

Synthese, Testung und 3D-QSAR von ABCG2-Inhibitoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Thomas Willmes

aus

Arnsberg

Bonn, 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 19.07.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Phänomen der Multidrug-Resistenz in der Krebstherapie	1
1.2	ABC-Transporter	2
1.2.1	Die Familie der ABC Transporter	2
1.2.2	ABCB1 (P-Glykoprotein)	7
1.2.3	ABCC1 (Multidrug Resistance-Related Protein 1, MRP1)	10
1.2.4	ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP)	14
1.3	<i>In silico</i> Methoden zur Untersuchung von ABC Transportern	18
1.3.1	Computergestütztes Design in der Arzneimittelforschung	18
1.3.2	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign von ABC-Transportern	21
1.3.3	Ligandbasiertes Wirkstoffdesign von ABC-Transportern	26
2	Zielsetzung	33
3	Botryllamide als ABCG2-Inhibitoren	37
3.1	Allgemeines	37
3.2	Synthese	39
3.2.1	Synthese der Phenylacrylsäuren	39
3.2.2	Mechanismen der Peptidkupplung	39
3.2.3	Synthese der gesättigten Amide	42
3.2.4	Synthese der ungesättigten Amide	44
3.3	Biologische Testung	46
3.4	Auswertung	50
3.4.1	Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2	50
3.4.2	Untersuchungen zur Selektivität gegenüber ABCB1	55
3.5	Ergebnisse und Ausblick	58
4	Monocarbonylanaloga von Curcumin (MACs) als ABCG2-Inhibitoren	59
4.1	Allgemeines	59
4.2	Synthese	61
4.3	Biologische Testung	61

4.4	Auswertung	65
4.4.1	Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2	65
4.4.2	Untersuchungen zur Selektivität gegenüber ABCB1	69
4.5	Ergebnisse und Ausblick	71
5	Pyrimidine als ABCG2-Inhibitoren	73
5.1	Allgemeines	73
5.2	Synthese	75
5.2.1	Synthese der 2,4-Bis-Anilinopyrimidine	75
5.2.2	Synthese der 4-Anilino-2-aryl-6-methylpyrimidine	80
5.3	Biologische Testung	84
5.4	Auswertung	84
5.4.1	Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2	84
5.4.2	Untersuchungen zur ABCG2-Selektivität	99
5.4.3	Untersuchungen zur intrinsischen Zytotoxizität und Resistenzaufhebung	100
5.5	Ergebnisse und Ausblick	104
6	3D-QSAR von Chinazolin- und Pyrimidinderivaten als ABCG2-Inhibitoren	107
6.1	Allgemeines	107
6.2	Auswahl der Datensätze	109
6.3	Konformationsanalyse der Moleküldatensätze	109
6.4	Überlagerung der Einzelkonformationen	110
6.5	Ergebnisse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle	111
6.5.1	Projekt I: 4-Anilino-2-phenylsubstituierte Chinoline und Chinazoline	115
6.5.2	Projekt II: 4-Anilino-2-arylsubstituierte Chinazoline- und Pyrimidine	118
6.5.3	Projekt III: 2,4-Disubstituierte Pyridopyrimidine	120
6.5.4	Projekt IV: Kombiniertes Datensatz von chinazolinbasierten ABCG2-Inhibitoren	122
6.6	Zusammenfassung	132
7	Zusammenfassung	135
8	Experimentalteil	139
8.1	Chemische Synthesen	139
8.1.1	Material und Methoden	139
8.1.2	Synthesevorschriften	142
8.2	Biologische Untersuchungen	233
8.2.1	Materialien	233
8.2.2	Zellkulturarbeit	235
8.2.3	Zellbasierte Assays	238

Literatur	251
A Tabellen der verwendeten Datensätze für die 3D-QSAR-Modelle	291
A.1 Projekt I	291
A.2 Projekt II	294
A.3 Projekt III	297
A.4 Projekt IV	299
Abbildungsverzeichnis	305
Tabellenverzeichnis	309
Akronyme	311

Einleitung

1.1 Das Phänomen der Multidrug-Resistenz in der Krebstherapie

Die **Multidrug-Resistenz (MDR)** im Allgemeinen ist ein Phänomen welches entsteht, wenn Erkrankungen gegenüber der Behandlung mit Medikamenten nicht ansprechen. Dieser Sachverhalt wurde zuerst an Bakterien entdeckt, als diese gegen die Behandlung mit Antibiotika resistent wurden. Seitdem wurden ähnliche Mechanismen bei anderen Krankheiten, einschließlich Krebs, entdeckt.[1]

Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland rund 483.000 Menschen neu an Krebs (Hautkrebsformen nicht miteinberechnet).[2] Die Chemotherapie gilt dabei als eine der Hauptbehandlungsmethoden für Krebspatienten. Fehlschläge in der Behandlung zeichnen sich entweder durch eine bereits bestehende (intrinsische) Resistenz der Krebszellen gegenüber dem eingesetzten Chemotherapeutikum oder durch eine während der Behandlung erworbenen (extrinsische) Resistenz aus.

Des Weiteren spielen Prozesse wie die Inhibition des Zelltods (Apoptose-Unterdrückung), Veränderungen im Wirkstoffmetabolismus oder an den epigenetischen und Arzneimittel betreffenden Zielstrukturen, sowie die verstärkte DNA-Reparatur und Genamplifikation eine Rolle. Die extrinsische Resistenz stellt ein besonderes Problem dar, da Tumore nicht nur gegenüber den ursprünglich eingesetzten Wirkstoff resistent werden, sondern auch gegenüber anderen Wirkstoffen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus eine Kreuzresistenz aufweisen können. Es wird angenommen, dass die Resistenz gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika bei über 90 % der Patienten mit metastasierendem Krebs zu einem Therapieversagen führt.[3–5] Einer der wichtigsten Mechanismen der Multidrug-Resistenz ist der erhöhte Efflux von Arzneimitteln und die damit verringerte Akkumulation des Wirkstoffs innerhalb der Zelle. Ermöglicht wird der Efflux von den **ATP-Bindungskassetten (ABC)**-Transportern. Durch diese Membranproteine wird eine Vielzahl verschiedener Xenobiotika unter Energieverbrauch entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle ausgeschleust. Dieser Effekt, verursacht durch ABC-Transportproteine wie **P-Glykoprotein (P-gp)**, wurde *in vitro* nachgewiesen.

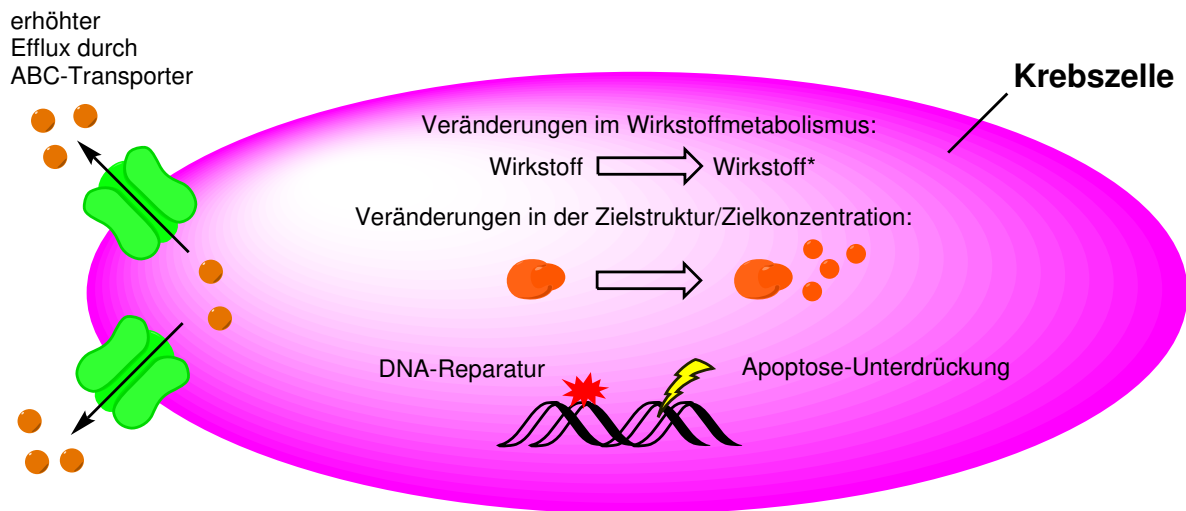


Abbildung 1.1 – Mechanismen der Multidrug-Resistenz in Krebszellen.

Während der Efflux über die ABC-Transporter ein normaler physiologischer Prozess ist, ist er auch ein bekannter Mechanismus der Multidrug-Resistenz in Krebszellen. Zu den wichtigsten Vertretern der ABC-Familie, die hierfür verantwortlich sind, gehören das **Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1)**, **Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1)** und das **Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)**. Alle drei Transportproteine weisen eine breite Substratspezifität auf und können viele Chemotherapeutika wie *Vinca*-Alkaloide, Anthracycline, Taxane und Proteinkinase-Inhibitoren transportieren. Des Weiteren wurde berichtet, dass die Expression dieser Proteine *in vitro* mit dem Versagen der Chemotherapie korreliert.[1, 4]

Da den ABC-Transportern im Hinblick auf die Multidrug-Resistenz eine besondere Rolle zuteil kommt wird im Folgenden detaillierter auf sie eingegangen.

1.2 ABC-Transporter

1.2.1 Die Familie der ABC Transporter

Für alle lebenden Organismen ist der Transport von Substanzen durch die Zellmembran hindurch essentiell. Dieser Prozess beinhaltet sowohl die Zufuhr von Nährstoffen aus dem extra- in den intrazellulären Raum, als auch die Ausschleusung von unerwünschten (toxischen) Verbindungen aus dem Zellinneren. Aufgrund der chemischen Vielfalt an Molekülen besteht ein wesentlicher Teil des Proteoms aus aktiven Transportern, die Stoffe durch die Membranen der Zelle oder subzellulärer Organellen hinausbefördern. Dieser Mechanismus kann entweder energiegetrieben sein, oder einem Konzentrationsgradienten folgen (Carrier). Beispiele für energiegetriebenen Transport sind die Änderung der freien Energie durch die Hydrolyse von **Adenosintriphosphat (ATP)** (Primärtransport), oder die Änderung der potentiellen Energie des chemischen Gradienten eines anderen Moleküls (Sekundärtransport).[6]

Die ABC-Transporter stellen eine der größten Familien von Membranproteinen dar. Sie kommen in allen drei Domänen der Lebewesen und sogar in einigen Riesenviren vor.[7] Die Mehrzahl der ABC-Gene kodiert membrangebundene Proteine, die direkt am Transport einer breiten Palette von Molekülen über Membranen hinweg beteiligt sind. [8] Die meisten Mitglieder dieser Superfamilie nutzen die freie Energie der ATP-Hydrolyse für die Translokation von gelösten Stoffen über biologische Membranen. Dabei können die ABC-Transporter sowohl als Im- und Exporter fungieren, wobei die in Eukaryoten vorkommenden Transporter ausschließlich eine Exportfunktion einnehmen.[9, 10] Derzeit existieren 48 ABC-Gene, die basierend auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz und Phylogenetik in sieben Unterfamilien unterteilt sind. Diese Subfamilien sind in allen Eukaryoten vertreten und weisen auf eine gemeinsamen Stammesursprung hin. Nach dem *Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee (HGNC)* sind die ABC-Gene in sieben Subfamilien ABC(A–G) zusammengefasst, wobei die Gene E und F Proteine kodieren, die nicht Membran-assoziiert sind und daher keine Transportfunktion ausüben.[11, 12]

In Tabelle 1.1 sind die ABC-Gene aufgelistet, deren Funktion bereits bekannt ist. Mutationen in diesen Genen sind die Ursache für eine breite Zahl an genetischen Krankheiten des Menschen wie etwa zystischer Fibrose, neurologischen Erkrankungen, Netzhautdegeneration, Cholesterin- und Gallentransportdefekten, Anämien und Wirkstoffresistenzen.[13]

Der Aufbau eines ABC-Transporters im Allgemeinen besteht aus vier Domänen.[14] Dabei ist es unerheblich welche Funktion das Transportprotein ausübt (Import oder Export). Jeder Transporter besitzt zwei **Transmembrandomänen (TMD)**, welche jeweils aus sechs α -Helices bestehen, die die Zellmembran durchdringen und zwei **Nucleotidbindungsdomänen (NBD)**, welche sich auf der intrazellulären Seite befinden. Die NBD stellen durch Hydrolyse von ATP die notwendige Energie für den Transportprozess bereit. Sie vermitteln zudem Konformationsänderungen innerhalb der TMD, sodass eine Translokation der Substrate über die Zellmembran hinweg möglich wird.[15, 16] Die NBD enthalten eine Reihe von hochkonservierten Proteinsequenzen, im Folgenden Motive genannt, die sich in zwei Unterdomänen weiter einteilen lassen. Zum einen gibt es die katalytische Domäne mit dem Walker A und Walker B Motiv, dem sogenannten Q-loop und dem H-Motiv. Zum anderen eine strukturell vielfältigere α -helikale Domäne, die das für ABC-Transporter typische Signaturmotiv LSGGQ (C-Schleife) enthält.[17, 18]

Der Transportmechanismus von ABC-Transportern ist bis heute umstritten und nicht eindeutig geklärt. Es gibt bislang drei geläufige Modelle, die versuchen diesen komplexen Prozess bis zu einem gewissen Grad zu beschreiben. Zu ihnen gehören das Porenmodell, das Flippase-Modell und das Modell des „hydrophoben Staubsaugers“, *hydrophobic vacuum cleaner (HVC)*. [19] Beim Porenmodell wird davon ausgegangen, dass die TMD eine porenähnliche Struktur innerhalb der Membran ausbilden. Der aktive Transport bei diesem Modell beruht auf drei Annahmen:

- (1) Die Substratspezifität wird durch eine Substraterkennungsstelle im Transportprotein bestimmt. An dieser Erkennungsstelle wird das Substrat gebunden und danach vermutlich eine energieabhängige Konformationsänderung durchlaufen, um die Freisetzung des Substrats auf der anderen Seite der Membran zu ermöglichen.

Tabelle 1.1: Übersicht über die ABC-Gene mit bekannter Funktion.

Gen	Alias	Funktion
ABCA1	ABC1	Cholesterintransport (zu HDL)
ABCA2	ABC2	Wirkstoffresistenz
ABCA3	ABC3	Phospholipidtransport (Lecithine)
ABCA4	ABCR	Transport von N-Retinyl-PE
ABCB1	P-gp, MDR1	Multidrug-Resistenz
ABCB2	TAP1	Peptidtransport
ABCB3	TAP2	Peptidtransport
ABCB4	PGY3	Phosphatidylcholintransport
ABCB6	MTABC3	Eisentransport
ABCB7	ABC7	Fe/S Clustertransport
ABCB11	SPGP	Transport von Gallensalzen
ABCC1	MRP1	Multidrug-Resistenz
ABCC2	MRP2	Efflux organischer Anionen
ABCC3	MRP3	Wirkstoffresistenz
ABCC4	MRP4	Nukleosidtransport
ABCC5	MRP5	Nukleosidtransport
ABCC7	CFTR	Chloridionenkanal
ABCC8	SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
ABCC9	SUR2	Untereinheit eines Kaliumkanals
ABCD1	ALD	VLCFA Transportregulierung
ABCE1	OABP, RNS4I	Elongationsfaktoren-Komplex
ABCG1	ABC8, White	Cholesterintransport
ABCG2	MXR, ABCG2	Efflux von Toxinen, Multidrug-Resistenz
ABCG4	White2	Cholesterintransport
ABCG5	White3	Sterintransport
ABCG8		Sterintransport

- (2) Die erste Interaktion des Substrats mit dem Transportprotein erfolgt von der zytosolischen, wässrigen Seite der Membran. Anschließend erfolgt direkt die Freisetzung des Substrats durch die Pore in den wässrigen, extrazellulären Raum auf der anderen Seite der Lipiddoppelschicht.
- (3) Die TMD des Transportproteins bilden eine porenähnliche Struktur, wodurch in der Membran eine hydrophile Mikroumgebung geschaffen wird. Dies ermöglicht es dem Substrat über diese hydrophile Pore durch die Membran hindurch zu gelangen.

Die Schlussfolgerung dieser Modellannahmen ist, dass das Transportprotein eine hydrophile Bahn darstellt, die es dem Substrat ermöglicht die Membran zu passieren ohne dabei in direkten Kontakt mit der inneren, hydrophoben Umgebung der Lipiddoppelschicht zu kommen.[20, 21]

Das Flippase-Modell geht nicht von einer direkten Interaktion des Substrats mit dem Transportprotein von der zytosolischen Seite der Zellmembran aus. Vielmehr beruht das Flippase-Modell auf der passiven Diffusion des Substrats in die Lipiddoppelschicht. Von dort aus gelangt es direkt in das Transportprotein.

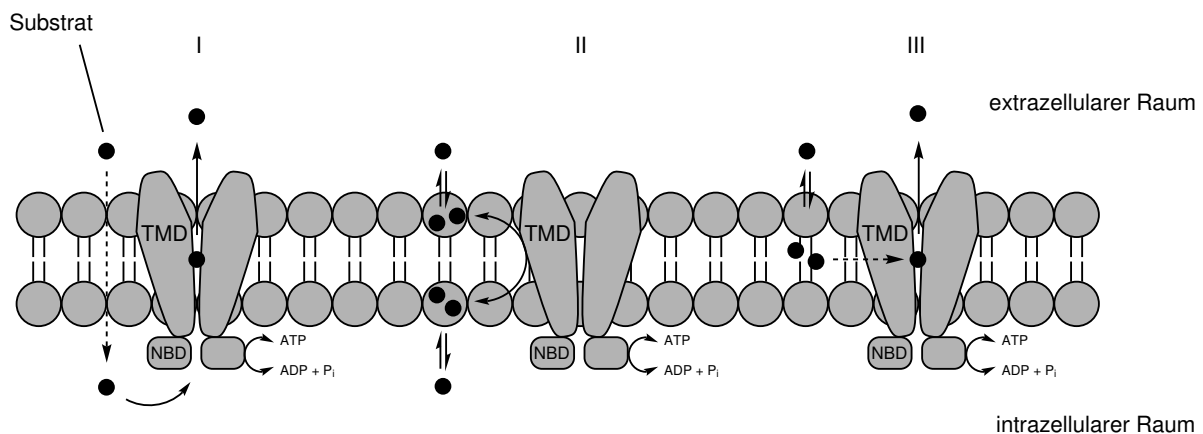


Abbildung 1.2 – Übersicht über die wichtigsten Modelle des Transportprozesses von ABC-Transportern. (I) Porenmodell, (II) Flippase-Modell, (III) HVC-Modell.

Dieses wiederum verlagert das Substrat vom inneren Teil der Lipidschicht zum äußeren, den extrazellulären Raum näheren Teil der Membran, aus dem es dann heraus diffundieren kann. Dieses Modell beruht auf der wichtigen Annahme, dass sich die Substrate zunächst in der Membran verteilen bevor sie mit dem Transportprotein interagieren. Dieses deckt sich mit dem Ergebnis, dass die meisten Substrate für P-gp hydrophobe Verbindungen sind von denen man erwarten würde, dass sie sich in der Lipiddoppelschicht anreichern.[21]

Das HVC-Modell vereint das Poren- und Flippase-Modell. Es wird davon ausgegangen, dass sich zunächst, wie im Flippase-Modell, das Substrat in der Membran einlagert und dort mit dem Transporter interagiert. Von diesem wird es aus der Membran aufgenommen und anschließend in den extrazellulären Raum heraus transportiert.[22]

Ein moderneres Bild für den Transportmechanismus liefert das „ATP-switch“-Modell.[23] Es basiert auf strukturellen und biochemischen Daten verschiedener ABC-Transporter. Der wichtigste Aspekt dieses Modells ist, dass der Transportprozess in mehreren Schritten abläuft. Dabei wird von einer Kommunikation zwischen den Nucleotid- und Transmembrandomänen ausgegangen, die aus Konformationsänderungen innerhalb der beiden Domänen resultieren. Die Triebkraft bei diesem Transportmodell ist ein Umschalten („switch“) zwischen zwei möglichen Konformationen der NBD. Zum einen bildet sich durch die Bindung von zwei ATP-Molekülen ein geschlossenes Dimer zwischen den beiden NBD aus. Dieses geschlossene Dimer dissoziiert nach Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und unter Freisetzung von Phosphat (P_i) in ein offenes Dimer der NBD. Bei diesem Prozess des Umschaltens zwischen geschlossenem und offenem NBD-Dimer wird eine Konformationsänderung auf die angeschlossenen TMD übertragen, wodurch der Transport eines Substrats letztendlich ermöglicht wird.[24]

Ein Überblick über die verschiedenen Schritte auf denen das ATP-switch-Modell beruht liefert die Abbildung 1.3. Die TMD sind als Zylinder dargestellt und durchziehen die Zellmembran. Die NBD stehen auf der intrazellulären Seite und sind schematisch unterhalb der TMD dargestellt. Im Ausgangszustand

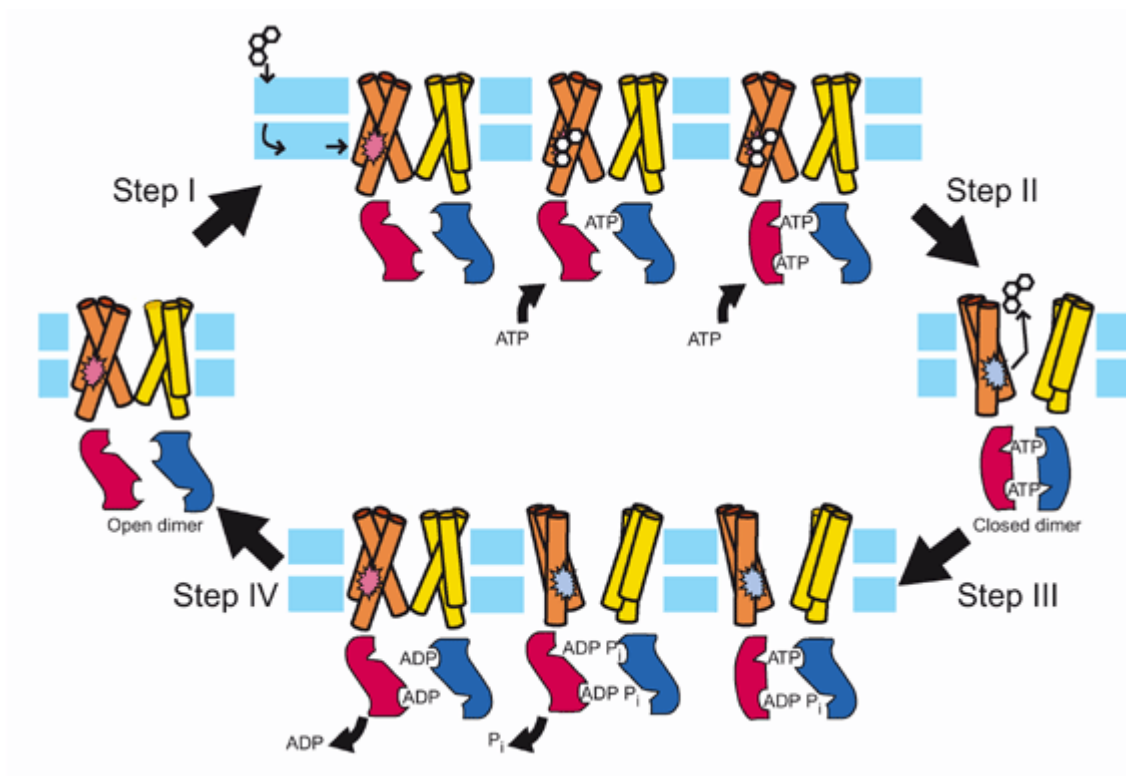


Abbildung 1.3 – Das ATP-switch Modell für den Transportzyklus eines ABC-Transporters. Entnommen von Higgins und Linton [23].

bzw. in seiner Basalaktivität stehen die NBD des Transporters in einer offenen Dimer-Konformation zueinander. Die Substratbindestelle (rosa) befindet sich im inneren Teil der Membran an den TMD.

- Schritt 1: Der Transportprozess startet mit der Bindung des Substrats an seine Bindungsstelle in der TMD vom Inneren der Membran heraus. Dadurch steigt die Affinität der NBD bezüglich der Bindung von ATP. Ebenso erfolgt eine Reduktion der Aktivierungsenergie für die Formation eines geschlossenen Dimers der NBD. Zwei ATP-Moleküle binden in einer kooperativen Weise an den NBD und generieren die geschlossene Dimer-Konformation.
- Schritt 2: Die geschlossenen NBD haben eine Konformationsänderung innerhalb der TMD zur Folge. Die Bindestelle des Substrats wird zur extrazellulären Seite hin geöffnet. Gleichzeitig sinkt die Affinität des Substrats zur Bindestelle und es wird anschließend freigegeben.
- Schritt 3: ATP wird hydrolysiert und ein Übergangszustand zwischen geschlossener und offener Konformation der NBD erzeugt. Die Hydrolyse erfolgt dabei schrittweise.
- Schritt 4: Nacheinander erfolgt die Freisetzung von Phosphat (P_i) und ADP und der Transporter wird in seinen Ausgangszustand zurückgesetzt.

Aus Tabelle 1.1 ist ersichtlich, dass ABCB1, ABCC1 und ABCG2 die wichtigsten, zur Multidrug-Resistenz beitragenden, Transportproteine sind. Im Folgenden werden diese drei ABC-Transporter näher beschrieben.

1.2.2 ABCB1 (P-Glykoprotein)

Der wohl bekannteste und meist untersuchte Vertreter der ABC-Transporter ist das P-Glykoprotein (P-gp). Nach dem *HGNC* Nomenklatursystem wird das Protein als ABCB1 bezeichnet und ist das Produkt des humanen MDR1-Gens.

Der Effluxtransporter ABCB1 wurde ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft entdeckt Multidrug-Resistenz in Tumorzellen auszulösen.[25] Zuerst entdeckt wurde das Protein im Jahr 1976.[26] Danach folgten eine Reihe von Untersuchungen, die bestätigten, dass sich in vielen Tumorzellen, die P-gp überexprimieren, eine Reduktion der intrazellulären Wirkstoffkonzentration als Folge eines erhöhten Efflux zeigte.[27–30] Des Weiteren wurde die Bedeutung von ABCB1 für das Phänomen der MDR bewiesen indem gezeigt wurde, dass Verapamil (ein potenter Inhibitor von P-gp) die Sensitivität von resistenten Leukämiezellen gegenüber verschiedenen Zytostatika erhöhen konnte.[31]

P-gp kommt sowohl in menschlichen als auch in Nagetiergeweben in geringen Mengen vor. Ein erhöhtes Auftreten des Effluxtransporter findet sich jedoch in den apikalen Gewebeschichten von Epithelzellen, des Dünn- und Dickdarms, in Leber- und Gallenkanälen, sowie im Nierengang. Dabei ist allen Geweben eine ausscheidende Funktion gemein.[32] Der Transporter befindet sich ebenfalls in der Nebenniere, der Plazenta und in der apikalen Membran von Endothelzellen, die die Kapillaren des Gehirns säumen. Diese bilden dort einen kontinuierlichen Monolayer aus – die Blut-Hirn-Schranke. Das P-Glykoprotein ist in diesen Zellen so ausgerichtet, dass Substrate wieder zurück in den Blutstrom transportiert werden und ist daher ein wesentlicher Faktor, der den Eintritt von Substanzen in das Gehirn begrenzt.[33]

Ebenso scheint es eine zentrale Rolle beim Schutz des Fötus und anderer empfindlicher Gewebe vor einer Vielzahl toxischer, endogener und exogener Moleküle zu spielen.[34]

P-Glykoprotein besteht aus insgesamt 1280 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 170 – 180 Kilodalton (kDa). Es setzt sich aus zwei homologen Hälften zusammen, die aus der Fusion eines Urgens entstanden sind. Jede Hälfte besteht aus 6 Transmembranhelices und einer Nucleotidbindungsdomäne.[34, 35] Eine Struktur von ABCB1 war lange Zeit nicht vorhanden und ein erstes Modell wurde aus dem hydrophilen Profil des Proteins und computergestützten Algorithmen vorhergesagt.[37] Die im Jahr 2001 aufgelöste Kristallstruktur des bakteriellen P-gp-Analogon (MsbA) von *Escherichia coli* (*E. coli*) war die erste bekannte Struktur eines ABC-Transporters.[38] Die gefundene Struktur wurde kontrovers diskutiert und Versuche wurden unternommen eine Kristallstruktur mit höherer Auflösung zu finden. Dies gelang 2006 durch Kristallisation des bakteriellen Transporters SAV1866 von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).[39]

Die erste Kristallstruktur von eukaryotischem P-gp aus der Maus wurde im Jahr 2009 veröffentlicht. Die Proteinsequenz zeigt eine 87%ige Identität mit der des humanen P-gp. Dabei wurde zum einen die apo-Struktur bei einer Auflösung von 3,8 Å aufgelöst und zum anderen zwei weitere Strukturen

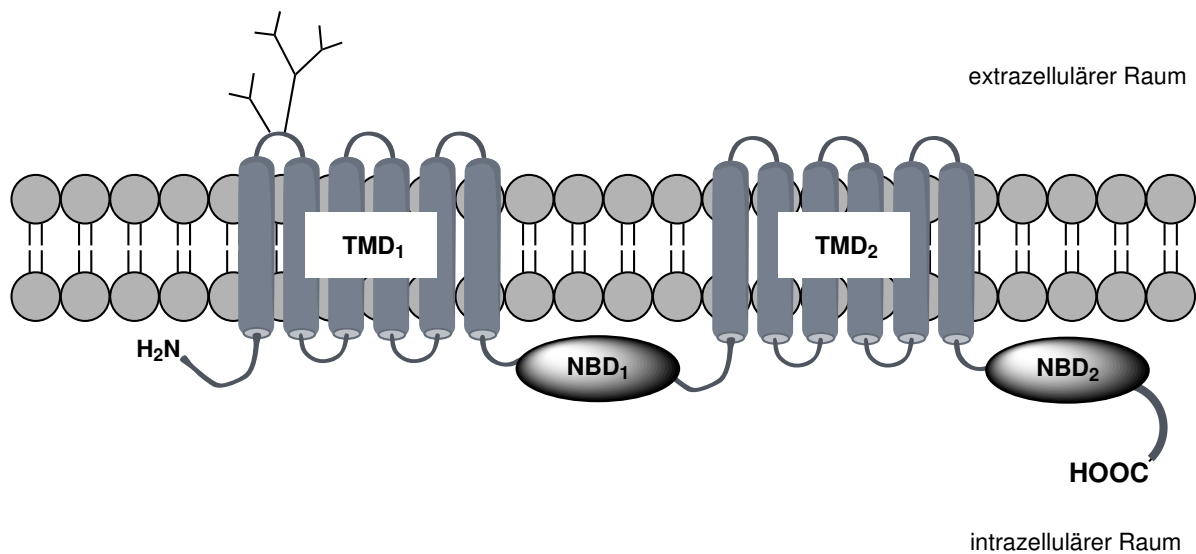


Abbildung 1.4 – Schematische Darstellung der Struktur von ABCB1 angelehnt an Schinkel und Jonker [36].

veröffentlicht, in Co-Kristallisation mit zwei Stereoisomeren eines zyklischen, hexapeptidalen Inhibitors.[40] Zwei ineinander greifende Bündel von α -Helices wurden beobachtet, die jeweils aus Teilen der N- und C-terminalen Hälfte bestehen. Die intrazellulären Schleifen einer der Helices berühren dabei die gegenüberliegende NBD. Diese Überschneidung wurde auch bei den beiden bakteriellen Transportern MsbA und SAV1866 gefunden.

Die zwei Nucleotidbindungsdomänen befinden sich in einem Abstand von 30 Å zueinander. Die beiden Bündel der Transmembrandomänen schließen dabei eine große Tasche mit einem Volumen von 6 000 Å³ ein, die jeweils Öffnungen zum Zytoplasma und dem Inneren der Zellmembran aufweisen.[34, 40] Es existieren zudem zwei Pforten in dem Bereich des Proteins, welcher in der Zellmembran liegt, die den Eintritt von Wirkstoffen aus der Lipiddoppelschicht ermöglichen. Die Struktur stützt dadurch das Modell des „hydrophoben Staubsaugers“, welches die Beobachtung erklärt, dass P-gp hydrophobe Wirkstoffe direkt aus der Membran transportieren kann.[22, 41]

Aufgrund der großen Aussparung innerhalb der Transmembrandomänen und der Vielzahl an chemisch unterschiedlichen Substraten für P-gp ist eine der zentralen Fragestellungen, wo und wie Substrate mit ABCB1 interagieren. Hierzu wurden unterschiedlichste biochemische Methoden angewandt, um die funktionellen Stellen des Transportproteins zu identifizieren. Dazu gehören Mutagenesestudien, Photo-Affinity Labeling und verschiedene fluoreszenzbasierte Methoden. Zusammenfassend lässt sich durch diese Untersuchungen die Hypothese aufstellen, dass die Substrate an „gemeinsamen, aber unterschiedlichen“ Stellen im Protein binden oder dass die Bindungsstellen eine gewisse Überlappung untereinander aufweisen.[42]

Ein Modell, das diese Beobachtung beschreibt ist die „*substrate-induced fit*“ Hypothese. Nach dieser Annahme existiert für alle Wirkstoffe eine gemeinsame Bindungsstelle in der zentralen Kavität von P-gp.

Nachdem das Substrat dort an die gemeinsamen Residuen gebunden hat werden bestimmte Seitenketten in den umgebenden TMD umorientiert, sodass sich eine für das Substrat spezifische Wechselwirkung mit dem Transportprotein ausbildet.[40, 43]

Messungen zur Kinetik des Transports der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Rhodamin 123 durch P-gp lieferten das Ergebnis, dass beide Farbstoffe den Transport des jeweils anderen anregen konnten. Dies ließ sich nicht mit dem Bild vereinbaren, dass beide Substanzen an derselben Stelle binden. Die kooperative Art und Weise in der das eine Substrat den Transport des anderen stimuliert kann am besten durch zwei unterschiedliche, transportfähige Bindungsstellen im Protein beschrieben werden. Entsprechend wurden diese beiden Bindungsstellen als H-Seite, die bevorzugt Hoechst bindet und transportiert, und als R-Seite, deren bevorzugtes Substrat Rhodamin 123 ist, bezeichnet.[44–46]

Andere Untersuchungen, die auf Radioligand-Bindungsstudien zurückgreifen gehen indes von vier Bindungsstellen für ABCB1 aus.[47]. Weitere Methoden zur Auffindung der möglichen Substratbindungsstellen wie etwa Photoaffinitätslabeling, ATP-Hydrolyse und zellbasierte Wirkstoff-Efflux-Assays gehen sogar von mannigfaltigen Bindungsstellen bei P-gp aus.[48–52] Eine genaue Lokalisation der potentiellen Orte an denen P-gp mit seinen Substraten interagiert bleibt ungeklärt.

ABCB1 kann eine Vielzahl von hydrophoben Verbindungen transportieren mit sowohl neutraler als auch positiver Ladung, einschließlich zahlreicher Zytostatika. Die klassische Resistenz gegenüber Chemotherapeutika steht für gewöhnlich in Zusammenhang mit der Überexpression von P-gp.[53, 54] Die Inhibition des Efflux-Transporters führt zu einer erhöhten Akkumulation von Wirkstoffen in kultivierten Krebszelllinien und einer verbesserten intratumoralen Verteilung derselben in Tierversuchen und bei Patienten.[55–59] Infolgedessen ist die Entwicklung von Inhibitoren für ABCB1 von großem Nutzen.

Der erste ABCB1-Inhibitor von dem berichtet wurde war der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil, dessen Einsatz schnell den Einzug in klinische Studien fand.[31, 60, 61] Die Wirksamkeit von Verapamil war jedoch sehr gering und es wurden weit höhere Dosierungen benötigt als im Vergleich zu seiner Wirkung gegenüber den Calcium-Kanälen, die schon bei geringeren Plasmakonzentrationen einsetzte. Ähnliche Effekte wurden für andere ABCB1-Inhibitoren beobachtet, die bereits in klinischen Studien in Gebrauch waren – jedoch für andere Zwecke und ohne Bezug zueinander.[62–65] Diese Substanzen agierten als weiteres Substrat von P-gp, die mit den anderen um den Transport konkurrieren. Alle dieser Wirkstoffe der ersten Generation zeichneten sich jedoch durch eine geringe Wirksamkeit aus, die in einer nicht-tolerierbaren Systemtoxizität resultierte.[66–68]

Die nachfolgenden Generationen von ABCB1-Inhibitoren basierten auf chemischen Abwandlungen der Strukturen der ersten Klasse von Inhibitoren, sowie Methoden der kombinatorischen Chemie. Ebenfalls zum Einsatz kam die Untersuchung von Naturstoffen, um neue Leitstrukturen zu entdecken.[69–77] Trotz dieser Bemühungen eine Möglichkeit zur Überwindung der Multidrug-Resistenz zu finden, haben es nur wenige Substanzen in die letzten Phasen der klinischen Studien geschafft. Dazu gehören zum einen [Tariquidar \(XR9576\)](#) und [Valspodar \(PSC833\)](#), ein nicht-immunsuppressives Derivat von Cyclosporin A.[81–85]

Um die klinische Entwicklung von P-gp-Inhibitoren ist es derzeit aufgrund der komplexen Historie

Tabelle 1.2: Auswahl bekannter Substrate und Inhibitoren von ABCB1.[34, 78–80]

Substrate	Inhibitoren
<i>Chemotherapeutika</i>	<i>1. Generation</i>
Anthracycline: Doxorubicin, Daunorubicin	Chinidin, Chlorpromazin, Cyclosporin A, Diltiazem
Taxane: Paclitaxel, Docetaxel	Erythromycin, Ketoconazol, Nifedipin
Vincaalkaloide: Vinblastin, Vincristin	Ritonavir, Tamoxifen, Verapamil
<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	<i>2. Generation</i>
Calcein AM	Biricodar (VX-710), OC144–093
Hoechst 33342	R101933, Valspodar (PSC 833)
Rhodamin 123	XR9051
<i>Herzmittel</i>	<i>3. Generation</i>
Antihypertensiva: Reserpin	Elacridar (GF120918), OC144-093
Calciumkanalblocker: Diltiazem, Nifedipin	Tariquidar (XR9576)
Digitalis-Glykoside: Digoxin	Zosuquidar (LY335979)
<i>Naturstoffe</i>	<i>Sonstige</i>
Curcuminoide, Flavonoide	Disulfiram, Kolliphor [®] EL
Colchicin, Actinomycin D	Curcuminoide, Flavonoide

relativ ruhig geworden. Es wurden viele Ressourcen und viel Zeit für die Erforschung potenter Inhibitoren aufgewendet. Diese Bemühungen lieferten in klinischen Studien mit den genannten Inhibitoren, aufgrund von Problemen mit pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Wechselwirkungen, sowie zu hohen Toxizitäten, nicht die gewünschten Ergebnisse. Trotz dieser Hürden in der Entwicklung von Modulatoren der Multidrug-Resistenz bleibt das Problem der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bestehen und das Interesse an einem in der Klinik praktikablen und effizienten ABCB1-Inhibitor bleibt in onkologischen Kreisen hoch.[3, 86]

1.2.3 ABCC1 (Multidrug Resistance-Related Protein 1, MRP1)

Das Multidrug Resistance-Related Protein 1 besteht aus 1 531 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa. ABCC1 wurde 1992 erstmals aus humanen Lungenkarzinomzellen kloniert. Die **komplementäre DNA (cDNA)** des Proteins wurde aus Doxorubicin-resistenten Zellen extrahiert und sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass es sich um einen ABC-Transporter handelt, der in seiner Sequenz nur eine entfernte Ähnlichkeit zu P-gp zeigte.[87] Weitere Studien zeigten, dass Membranvesikel aus Zellen, die mit MRP1 transfiziert wurden, einen erhöhten Efflux von **Glutathion (GSH)**-Konjugaten aufwiesen. Durch diese Versuche konnte bewiesen werden, dass MRP1 die lange gesuchte Pumpe für Glutathion-Konjugate war.[88–91] In klinischen Studien zeigte sich, dass ABCC1 in einer Reihe solider Tumore und bei malignen hämatologischen Erkrankungen überexprimiert wird. In einigen Fällen konnte eine Korrelation der Überexpression von MRP1 mit einem negativen Therapieverlauf und einem

schlechten Ausgang der Erkrankung nachgewiesen werden.[92–95]

MRP1 gehört zur Klasse C der ABC-Genfamilie und zeichnet sich durch eine Besonderheit im strukturellen Aufbau aus. Neben den, für ABC-Transporter üblichen, zwei Nucleotidbindungsdomänen (NBD₁₋₂) und zwei membrandurchspannenden Domänen (TMD₁₋₂) besitzt MRP1 eine weitere Transmembrandomäne (TMD₀) bestehend aus fünf α -Helices. Diese ist jedoch für die Funktion von MRP1 nicht notwendig, da das Ausschneiden der TMD den Transport von **Leukotrien C4 (LTC₄)** nicht beeinflusst.[96]

Des Weiteren zeigen sich, dass die beiden NBDs, welche bei ABC-Transportern im Allgemeinen identisch oder sehr ähnlich sind, relativ stark voneinander abwichen. Dies betraf auch die ansonsten hochkonservierten Proteinsequenzen des Walker B Motivs und der C-Schleife, dem Signaturmotiv von ABC-Transportern. Diese waren denen von CFTR (ABCC7) weitaus ähnlicher.[87, 97] Durch **Kryo-**

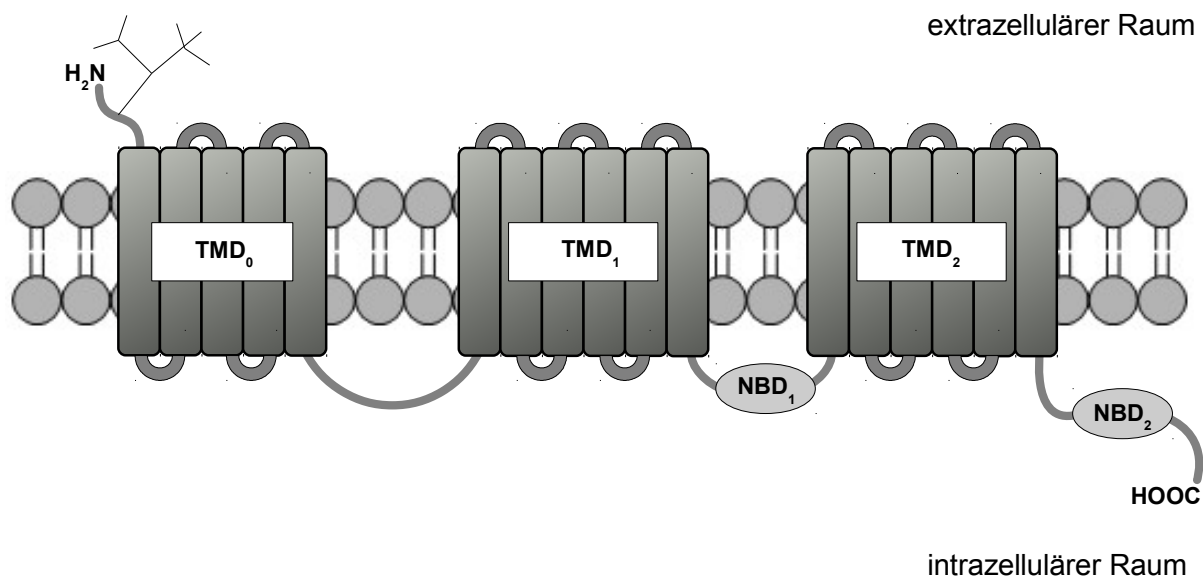


Abbildung 1.5 – Schematische Darstellung der Struktur von ABCC1 angelehnt an Schinkel und Jonker [36].

elektronenmikroskopie (Kryo-EM) konnte inzwischen die Struktur von Rinder-ABCC1 herausgefunden werden.[98] Die gefundene Molekülstruktur von MRP1 deckt sich gut mit den vorherigen Voraussagen zur räumlichen Struktur basierend auf Sequenzanalysen und biochemischen Daten.[91, 95, 99]

Die N-terminale TMD₀ besteht aus fünf α -Helices, gefolgt von einer Grenzflächendomäne, die auch Lasso Motiv genannt wird. Der Rest des Proteins formt einen Transporterkern ähnlich dem der anderen ABC-Transporter wie P-gp, ABCB10 und dem **Antigen-Peptidtransporter (TAP)**.[40, 100–102] Die 12 Transmembranhelices von TMD₁ und TMD₂ sind in zwei pseudo-symmetrische Bündel arrangiert. Eine große Kavität an der Grenzfläche der zwei helikalen Bündel zeigt eine Öffnung hin zur zytoplasmatischen Seite und durchzieht zur Hälfte die Lipiddoppelschicht. Die beiden NBD reichen etwa 30 Å weit in den intrazellulären Raum hinein und sind komplett voneinander separiert.

Die Kryo-EM-Aufnahmen wurden sowohl mit der apo-Struktur (3,5 Å) als auch im Komplex mit

LTC₄ (3,3 Å), einem Substrat von MRP1, aufgenommen. Innerhalb von MRP1 bindet LTC₄ zwischen den beiden Bündeln der TMD. Von der zytosolischen Seite aus gesehen liegt es etwa 10 Å weit in der Membran. Die Bindung erfolgt über ein Netzwerk zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Interaktionen zu beiden TMD-Bündeln und hält somit beide Hälften zusammen.

Die Bindungsstelle kann dabei in zwei Regionen unterteilt werden: eine positiv geladene Region koordiniert die GSH-haltige Hälfte des Moleküls in der sogenannten P-Tasche. Eine große hydrophobe Aussparung, die H-Tasche, bindet den lipophilen Teil von LTC₄ in der Weise, dass sich das Ende flach zwischen zwei Tryptophanreste einordnet in einer „Sandwich“-ähnlichen Struktur. Die zweiteilige Natur der Bindetasche wurde bereits vor über 20 Jahren vorhergesagt und konnte durch die Kryo-EM-Aufnahmen nun bestätigt werden.[103] Zudem kann aus dem Vergleich der apo-Struktur und der im Komplex mit LTC₄ gesehen werden, dass durch die Bindung des GSH-Konjugats die beiden NBD 10 Å näher aneinander rücken und sich ebenfalls besser zueinander orientieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Bindungsvorgang von LTC₄ mit einer Konformationsänderung einhergeht, in der die NBD sich annähern und sich zueinander ausrichten. Die Dimerisierung der NBD wird durch LTC₄ also initiiert und liefert eine Erklärung für die erhöhte ATPase-Aktivität in Gegenwart des GSH-Substrats.

MRP1 wird im Menschen in nahezu allen Geweben exprimiert, sowie in jeder Zelle des Blutsystems. Eine hohe Expression zeigt sich vor allem in der Niere, der Lunge, den Hoden und der Plazenta.[104–108] Ein mittelmäßiges Expressionslevel von ABCC1 zeigt sich überdies sowohl im Gehirn, als auch in der Blut-Hirn-Schranke. [109–111]

Ungeachtet der Ähnlichkeit im Resistenzverhalten von P-gp und MRP1 unterscheiden sich die Substratspezifitäten der beiden Transporter stark voneinander. Substrate von MRP1 beinhalten strukturell diverse, amphiphile, organische Anionen von denen viele mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfaten konjugiert sind. Das bekannteste Substrat mit höchster Affinität zu MRP1 ist bis heute das bereits beschriebene LTC₄. [93] Weitere Substrate mit einer hohen Affinität zu ABCC1 sind das Estrogen-Glucuronat E₂17βG und Gallensäurensulfate. [88, 90, 103]

Die Präferenz von MRP1 für lipophile Anionen spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass für den Transport von naturstoffbasierten Chemotherapeutika freies Glutathion notwendig ist. Als Konsequenz davon unterliegt die ABCC1-vermittelte Resistenz der Inhibition durch **Buthioninsulfoximin (BSO)**, einer Substanz, die die Synthese von Glutathion durch die Glutamatcysteinylgase unterbindet. [112–114]

Es existieren jedoch auch klinisch-relevante anionische Substrate, die nicht mit GSH konjugiert sind und direkt von MRP1 transportiert werden können, wie z.B. Methotrexat. Beispiele für nicht-klinisch relevante Substanzen sind anionische Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluo-3 oder Calcein. Diese finden in der Zellkultur zur Kontrolle der Expression von ABCC1 (und P-gp) Verwendung und werden ebenfalls direkt transportiert.[115–117] Aber auch endogene Substanzen wie etwa Folsäure sind Substrate von MRP1.[118, 119] Es existieren derzeit nur wenige Verbindungen, die als Modulator von MRP1 fungieren. Dies liegt nicht zuletzt an der Tatsache, dass die Entdeckung von ABCC1 noch nicht solange zurückliegt und entsprechend wenig über den Transporter bislang bekannt ist. Insofern ist die Anzahl an Inhibitoren, die gegenüber MRP1 wirksam sind überschaubar.[159, 160] Viele der an ABCB1 getesteten

Tabelle 1.3: Ausgewählte Beispiele für Substrate von humanem ABCC1.

Substrate	Beispiele	Referenzen
<i>Wirkstoffe und Xenobiotika</i>		
Chemotherapeutika	Folsäureantagonisten (Methotrexat, Edatrexat, Tomudex (ZD1694)), Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin), Etoposid, Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Irinotecan, SN-38, Geldanamycin, Anti-Androgene (Flutamid und sein Metabolit 2-Hydroxyflutamid)	[116, 120–126]
HIV Proteaseinhibitoren	Saquinavir, Ritonavir, Indinavir	[127, 128]
Antibiotika	Ciprofloxacin, Difloxacin, Grepafloxacin, Berberin, Pirarubicin	[129–133]
Halbmetalle	Natriumarsenit, Natriumarsenat, Kaliumantimonit, Kaliumantimonyltartrat	[120, 134]
Fluoreszenzfarbstoffe	Calcein AM, Calcein, Fluo-3, CFDA, BCECF	[135–137]
<i>Konjugate von Wirkstoffen und Xenobiotika</i>		
GSH-Konjugate	2,4-Dinitrophenyl-GSH, Biman-GSH, N-Ethylmaleinimid-GSH, Doxorubicin-GSH, Thiotepa-GSH, Cyclophosphamid-GSH, Melphalan-GSH, Chlorambucil-GSH, Etacrynsäure-GSH, Metolachlor-GSH, Atrazin-GSH, Sulforaphan-GSH, Aflatoxin B ₁ epoxid-GSH, 4-Nitrochinolin- <i>N</i> -oxid-GSH, As(GSH) ₃	[138–140]
Glucuronid-Konjugate	Etoposid-Glucuronid, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)-3β- <i>O</i> -glucuronid, SN-38-Glucuronid, 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid	[141]
<i>endogene Konjugate</i>		
GSH-Konjugate	LTC ₄ , LTD ₄ , Prostaglandin-A ₂ -GSH, 15-Deoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandin-A ₂ -GSH, 4-Hydroxynonenal-GSH	[88–90, 142–147]
Glucuronid-Konjugate	Estradiol-17-β-D-glucuronid, konjugiertes (Mono- und Bis)-Bilirubin, Hyodeoxycholat-6-α-glucuronid	[90, 103, 148, 149]
Sulfat-Konjugate	Estron-3-sulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat, 3α-Sulfatolithocholyl-Taurin	[90, 150]
Folate	Folsäure, Folinsäure	[151]
Peptide	GSH, GSSG, N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal	[123, 152–154]
Sonstige	Bilirubin, Sphingosin-1-phosphat	[155–158]

Substanzen zeigen auch gegenüber MRP1 eine inhibitorische Aktivität. Dazu gehören [Biricodar™ \(VX-710\)](#), [Dofequidar™ \(MS-209\)](#) und das Pflanzenalkaloid CBT-1.[161–163] Weitere Beispiele sind Modulatoren, die eine unspezifische, inhibitorische Wirkung auf [organische Anionentransporter \(OAT\)](#) zeigen wie etwa Probenecid, Sulfinpyrazon, Benzbromaron und Indometacin.[164]

Der bekannteste Inhibitor für MRP1 ist das Quinolin-Derivat MK-571, welches ursprünglich für die Asthmatherapie als Antagonist des Cysteinyl Leukotrienrezeptor 1 entwickelt wurde. Der MRP1-vermittelte Transport von LTC₄ wird durch MK-571 komplett inhibiert und kann die Multidrug-Resistenz von ABCC1-überexprimierenden Zellen aufheben.[88, 164, 165]

Weitere Fortschritte im Auffinden von Inhibitoren für ABCC1 wurden vor allem durch Screening-Methoden erzielt und führten so zur Entdeckung von trizyklischen Isoxazolen, die in der Lage sind MRP1 zu inhibieren und die Resistenz gegenüber ABCC1-Substraten wie etwa Doxorubicin aufzuheben.[166, 167] Weitere Beispiele für Substanzklassen, die MRP1 *in vitro* inhibieren können sind Pyrazolopyrimidine und Pyrrolopyrimidine.[168, 169] In einem erst kürzlich veröffentlichten Artikel wurde durch Synthese mittels „click“-Chemie eine Substanzbibliothek von Flavonoid-Dimeren hergestellt und auf ihre Aktivität gegenüber MRP1 getestet werden. Die besten Verbindungen besaßen EC₅₀-Werte im Bereich von 53 bis 298 nmol.[170]

1.2.4 ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP)

ABCG2 oder auch [BCRP](#) gehört zur Superfamilie der ABC-Transporter und wird vom ABCG2-Gen kodiert, welches am Genort 4q22 lokalisiert ist. Das Synonym BCRP resultierte aus der ersten Isolierung des ABCG2-Gens aus einer wirkstoffresistenten Sublinie der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7.[171]

ABCG2 besteht aus 655 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa. Es verfügt über nur eine N-terminale Nucleotidbindungsdomäne, die das ABC-Signaturmotiv (LSGGQ) enthält und eine C-terminale Transmembrandomäne bestehend aus sechs α -Helices. Seine Struktur ist demnach in umgekehrter Konfiguration zu den meisten anderen ABC-Transportern.[172] ABCG2 ist zudem ein Halbtransporter (eine NBD und eine TMD). Um seine Funktion als Efflux-Transporter ausüben zu können werden jedoch zwei NBD benötigt. Daher existiert ABCG2 mindestens als Homodimer, wobei auch von Homomultimeren berichtet wurde.[173–177]

An der Dimerisierung ist eine Disulfidbrücke von Cys603 beteiligt, die sich an der extrazellulären Schleife zwischen den Transmembranhelices 5 und 6 der TMD befinden.[178, 179] Aus Kristallisationsstudien ging hervor, dass ABCG2 einen tetrameren Komplex aus zwei Homodimeren bildet[180] während andere Forschungen ergaben, dass ABCG2 sich sogar zu höheren oligomeren Formen organisieren kann.[181, 182] Erst kürzlich konnte durch Kryo-EM-Aufnahmen die Struktur von humanem ABCG2 aufgeklärt werden. Sowohl die apo-Struktur von ABCG2 als Homodimer, sowie auch die Struktur im gebundenem Zustand mit Inhibitoren von ABCG2 wurde beschrieben.[183, 184] Dadurch ermöglichen sich detaillierte Einblicke zu den Wechselwirkungen zwischen kleinen Inhibitoren und ABCG2.

In beiden Studien zeigte sich, dass ABCG2 in einer einwärts-gerichteten Ausrichtung vorliegt. Innerhalb der beiden TMD befinden sich zwei Aussparungen. Die größere der zwei Aushöhlungen (Kavität

1) öffnet sich zum Zytoplasma und zum inneren Teil der Zellmembran hin und ist von der kleineren (Kavität 2) durch Leucinreste, die eine Art Verschluss bilden, getrennt. Jackson et al. [184] untersuchten die Kryo-EM-Strukturen von ABCG2 in Komplex mit verschiedenen Inhibitoren. Zum einen wurde ein Derivat von Ko143 (MZ29) als auch ein kleines Molekül basierend auf dem ABCB1-Inhibitor Tariquidar (MB136) co-kristallisiert. Sie beobachteten, dass im Falle von MZ29 zwei Moleküle innerhalb der Kavität 1 binden und im Falle von MB136 ein einzelnes Molekül die komplette Kavität ausfüllt. Abhängig von der Größe und Form des Inhibitors ist ABCG2 demnach in der Lage ein oder zwei Moleküle zu binden. Eine der Schlussfolgerungen von Jackson et. al. war, dass die Wirkung von Inhibitoren, die an Kavität 1 binden, auf zweifältige Weise erfolgt. Zum einen wird die Bindung von Substraten verhindert, da ABCG2 eine höhere Affinitäten gegenüber den Inhibitoren besitzt und diese fast vollständig das Volumen von Kavität 1 besetzen. In diesem Sinne hemmen die Inhibitoren kompetitiv. Während weniger wirksame Inhibitoren, wie MB136, sich innerhalb des Hohlraums bewegen können zeigte der potente Inhibitor MZ29 keine Anzeichen einer Bewegung. Des Weiteren schienen beide Inhibitoren, sowohl MZ29 als auch MB136, die einwärts-gerichtete Konformation der beiden TMD zu verfestigen. Dieses wiederum verhinderte ein Schließen der NBDs aufgrund der zueinander gekoppelten Konformation zwischen den Transmembran- und Nucleotidbindungsdomänen. Dadurch zeigten beide Inhibitoren auch eine Hemmung der ATPase-Aktivität von ABCG2.

Vor kurzem wurden ebenfalls Kryo-EM-Aufnahmen einer E211Q-Mutante von ABCG2 im prä-Translokationszustand im Komplex mit dem Substrat **Estronsulfat (E₁S)** und im post-Translokationszustand im Komplex mit ATP und Mg²⁺ veröffentlicht.[185] Hier zeigte sich, dass im Substrat-gebundenem Zustand ein Molekül von E₁S in der großen Kavität gebunden ist. In dem beobachteten Bindemodus kann auch nur ein einzelnes Substratmolekül zugleich die Bindestelle besetzen.

Im ATP-gebundenem Zustand wurde ersichtlich, dass die Substratbindestelle zusammengebrochen ist sich und eine außenliegende Öffnung zur extrazellulären Seite der Zellmembran ausgebildet hat. Durch die Bindung von ATP wurde eine Konformationsänderung innerhalb der TMD bewirkt. Ausgehend von

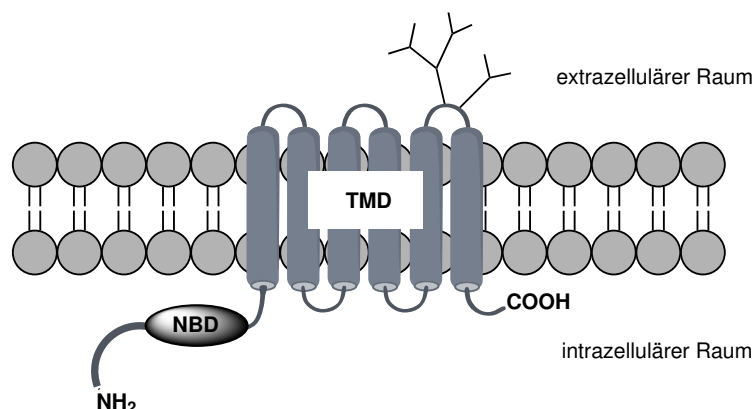


Abbildung 1.6 – Schematische Darstellung der Struktur von ABCG2 angelehnt an Schinkel und Jonker [36].

Tabelle 1.4: Ausgewählte Substrate von ABCG2.

<i>Substrate</i>	Beispiele	Referenzen
<i>Anthracendione</i>	Mitoxantron	[171, 174]
<i>Camptothecine</i>	Topotecan, Irinotecan (und SN-38), 9-Aminocamptothecin	[200–210]
<i>Tyrosinkinase-Inhibitoren</i>	Imatinib, Gefitinib, Nilotinib	[211–214]
<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	Hoechst 33342, Rhodamin 123 [*] , Pheo- phorbid A	[215–218]
<i>Porphyrine und Photosensibilisatoren</i>	Pheophorbid A-Methylester, Chlorin E6, Protoporphyrin IX	[219, 220]
<i>Sonstige</i>	Methotrexat, Doxorubicin [*] , Daunorubicin [*] , HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren, Thiosemicarbazone, Sulfa- salazin, Harnsäure	[197, 221–228]

* wird nur von ABCG2-Mutanten transportiert (z.B. R482G, R482T u.a.)

einer Schwenkbewegung und einer Änderung in der relativen Orientierung der NBD zueinander kommt es zu einer rigiden Verschiebung der TMD, wodurch sich ein Translokationspfad für das Substrat ergibt und dieses herausgeschleust werden kann.

Das Vorkommen und die Verteilung von ABCG2 im humanen Organismus ähnelt dem von ABCB1. So findet sich der Transporter vor allem in Geweben mit Barrierefunktion oder in Ausscheidungsorganen wieder. Eine erhöhte Expression von ABCG2 findet man in der Plazenta, wo es eine protektive Funktion zwischen mütterlichem und fötalem Kreislauf ausübt und den Embryo vor endogenen und exogenen Giftstoffen schützt. Weitere Gewebe, die ABCG2 in erhöhtem Maße exprimieren finden sich in den Hoden[186, 187], der Blut-Hirn-Schranke[188], im Gastrointestinaltrakt[189–191], der Leber[192] und in der Niere.[186, 193]

Die Anzahl an Substraten und Inhibitoren von ABCG2 ist seit seiner Entdeckung[171] stetig gestiegen. Die ersten Substrate, die gefunden wurden waren vornehmlich Chemotherapeutika, nicht zuletzt wegen der Erstbeschreibung von ABCG2 in wirkstoffresistenten Zellen.[194] Der Transport von Mitoxantron ist ein Kennzeichen von Zellen, die eine Überexpression von ABCG2 zeigen. Aber auch andere Zytostatika sind Substrate von ABCG2 wie etwa Flavopiridol, 9-Aminocamptothecin, Topotecan, Irinotecan und sein aktiver Metabolit SN-38, Antifolate wie Methotrexat, porphyrinhaltige Photosensibilisatoren wie Chlorin E6 und die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib, Gefitinib und Erlotinib.[195] Findet an der Stelle 482 in der Proteinsequenz von ABCG2 eine Punktmutation statt (R482G/T), so steigert sich die Transporteffizienz von Mitoxantron und ABCG2 ist zusätzlich in der Lage Rhodamin 123 und Anthracycline wie Doxorubicin und Bisantren zu transportieren.[196–199]

Der erste Inhibitor, der für ABCG2 gefunden wurde ist das Diketopiperazin [Fumitremorgin C \(FTC\)](#),

ein von den Schimmelpilzen *Aspergillus fumigatus* und *Neosartorya fischeri* produziertes Mykotoxin.[229] Noch bevor ABCG2 überhaupt bekannt war, wurde beschrieben, dass FTC die Resistenz gegenüber Mitoxantron von Arzneimittel-gestressten Zellen aufheben konnte. Zudem besaß FTC keinen Effekt auf Wirkstoffresistenzen, die von P-gp und MRP1 vermittelt wurden.[230] Die hohe Neurotoxizität von FTC führte zu einer Weiterentwicklung des Diketopiperazinderivats. Das FTC-Analogon Ko143 zeigte eine höhere Wirksamkeit und bessere Selektivität für ABCG2 zusätzlich zu einer niedrigeren Neurotoxizität.[231, 232]

Weitere Modulatoren die anfänglich entdeckt wurden sind Inhibitoren, die bereits für P-gp und MRP1 beschrieben wurden. Dazu gehören Cyclosporin A[233], Elacridar (GF120918)[234], Tariquidar (XR-9576)[216] und Biricodar (VX-710).[235] Weitere Inhibitoren finden sich in den Substanzklassen der Dihydropyridine wie Nimodipin und Nicardipin, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) wie Imatinib, Nilotinib und Erlotinib, Flavonoide wie Quercetin, Genistein, Chrysin und Tectochrysin, sowie Taxane und auch Bisindolylmaleimide und Carbazole.[195]

Die Inhibitoren von ABCG2 können nach ihrem Mechanismus in zwei Gruppen unterteilt werden:

- (1) „Allgemeine“ Inhibitoren wie FTC und Ko143, die die ATPase-Aktivität von ABCG2 komplett inhibieren
- (2) „Substrat-abhängige“ Inhibitoren, die eigentlich Substrate von ABCG2 sind und als kompetitive Inhibitoren fungieren

Die letztere der beiden Klassen führt zu einer substratabhängigen Hemmung bei der der Inhibitor (I) an derselben substratspezifischen Bindestelle wechselwirkt, aber nicht an einer anderen oder (II) mit einer allosterischen Bindestelle des Transporters interagiert, was zu Konformationsänderungen in der großen Bindetasche von ABCG2 führt, sodass der Transport von bestimmten Substraten beeinflusst wird.[172]

So konnte gezeigt werden, dass Nelfinavir den Efflux von Zidovudin und Abacavir hemmen kann, jedoch keinen Einfluss auf den Transport von Prazosin und Imatinib ausübt. Das lässt vermuten, dass die beiden Nucleosidanaloga (Zidovudin und Abacavir) in einer Region innerhalb von ABCG2 binden, die keine Überschneidung mit den Bindungsstellen von Prazosin und Imatinib aufweist.[236] Dadurch wird die These unterstützt, dass Substrate mit ABCG2 an vielen verschiedenen Regionen innerhalb des Transportproteins wechselwirken können.

Tabelle 1.5: Inhibitoren von ABCG2.

Inhibitoren	Beispiele	Referenzen
<i>FTC und verwandte Analoga</i>	Fumitremorgin C, Ko132, Ko134, Ko143	[229–231]
<i>Tyrosin- und Proteinkinase-Inhibitoren</i>	Gefitinib, Imatinib, EKI-785, Staurosporinanaloga	[214, 237–241]
<i>Flavonoide und Analoga</i>	Biochanin A, Chrysin, Tectochrysin, 6-Prenylchrysin, Genistein, Naringenin, Acacetin	[242–245]
<i>ABCB1-Inhibitoren</i>	Tariquidar, Elacridar, Dofequidar	[206, 216, 234, 246]
<i>Naturstoffe</i>	Botryllamide, Cannabinoide, Curcumin, Harmin, Hesperetin, Stilbene, Quercetin	[247–252]

1.3 *In silico* Methoden zur Untersuchung von ABC Transportern

1.3.1 Computergestütztes Design in der Arzneimittelforschung

Ein neues Medikament auf den Markt zu bringen, ist ein kostspieliger Prozess in Bezug auf Geld, Arbeitskraft und Zeit. Die Entdeckung und Entwicklung von Medikamenten dauert durchschnittlich 10 bis 15 Jahre und die ungefähren Kosten belaufen sich auf 800 Millionen bis 1,8 Milliarden US-Dollar.[253, 254] Der Einsatz von kombinatorischer Chemie führte zu einer Explosion von Moleküldatenbanken, die einen breiten chemischen Raum abdecken und half so der Pharmaforschung in der Ausweitung der Wirkstoffsuche und der Entwicklung von **Hochdurchsatz-Screenings (HTS)**.[255, 256] Ungeachtet dessen zeigt sich eine dramatische Entwicklung in der Langzeittendenz von neu zugelassenen Medikamenten. Nach Angaben der *Food and Drug Administration (FDA)* ist die Anzahl neuer Wirkstoffe im Jahr 2016 stark gesunken und stellt die niedrigste Zulassungsrate seit fast fünf Jahrzehnten dar.[257]

Um den Prozess der Wirkstofffindung schneller und kostengünstiger zu gestalten ist der Einsatz des computergestützten Wirkstoffdesigns für führende pharmazeutische Unternehmen und andere Forschungsgruppen unerlässlich geworden. Diese sogenannten *in silico* Methoden stellen mittlerweile einen wichtigen Ausgangspunkt in der Arzneistoffentwicklung dar. So können schon früh in der Entwicklungsphase spätere Misserfolge in den letzten Schritten minimiert werden.[258]

An dem Prozess der Wirkstofffindung sind viele Forschungsdisziplinen beteiligt wie die chemische und strukturelle Biologie, Chemoinformatik, organische Synthese und Pharmakologie. Der Weg hin zum potentiellen Wirkstoff besteht dabei aus mehreren Schritten:

- a) *Identifikation der Zielstruktur* Dies bedeutet die Ermittlung und Isolierung individueller Zielstrukturen und die Untersuchung ihrer Funktion und die Verbindung mit einer spezifischen Erkrankung

kung.[259]

- b) *Validierung der Zielstruktur* In diesem Schritt wird die Verknüpfung der Zielstruktur mit der zu untersuchenden Erkrankung als auch ihre biologische Funktion im Körper untersucht.[260]
- c) *Suche nach Leitstrukturen* Dies führt zur Entdeckung von Substanzen, die eine gewisse Wirksamkeit und Spezifität gegenüber der Zielstruktur zeigen und sich als Kandidaten zur Heilung der Erkrankung eignen.[261]
- d) *Leitstrukturentwicklung* Der Prozess beinhaltet die Verbesserung der Wirksamkeit und anderer wichtiger Eigenschaften der gefundenen Leitstrukturen durch iterative Prozesse. Hierfür werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente durchgeführt, um einen sicheren und effektiven Wirkstoff zu entwickeln. Des Weiteren werden Struktur-Wirkungsbeziehungen hergeleitet, um die Strukturabhängigkeit relevanter pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften zu identifizieren und diese auf weitere zu synthetisierenden Analoga zu übertragen.[262]
- e) *Präklinische Studien* Diese dienen der Erforschung von Synthesewegen zum Wirkstoff und von Methoden der Arzneimittelformulierung. Toxizitätsstudien und Tierversuche weisen die Wirksamkeit *in vivo* nach.[263, 264]
- f) *Klinische Studien* Es werden drei Phasen durchlaufen, die die Sicherheit, potentielle Nebenwirkungen, die Dosierung, Wirksamkeit und die pharmakokinetischen und pharmakodynamische Eigenschaften des Arzneimittels am Menschen erforschen.[264]

Das computergestützte Wirkstoffdesign, das im Prozess der Wirkstofffindung angewendet wird, basiert grundsätzlich auf zwei verschiedenen Ansätzen. Der Arbeitsablauf dieser Methodik ist in Abbildung 1.7 abgebildet.

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign bedient sich des 3-dimensionalen (3D) Aufbaus der Zielstruktur (Enzyme oder Rezeptoren) für die Entdeckung oder das Screening potentieller Modulatoren. Basierend auf den gefundenen Leitstrukturen folgt die Synthese, biologische Testung und Optimierung der Liganden.

Im Gegensatz dazu nutzen ligandbasierte Ansätze Substanzbibliotheken mit unterschiedlichen chemischen Strukturen, deren inhibitorische Wirksamkeit bekannt ist, um darauf basierende computerchemische Modelle zur Vorhersage der Aktivität gegenüber der Zielstruktur zu entwickeln. Beide Ansätze haben sich in den letzten Jahrzehnten, nicht zuletzt aufgrund des technischen Fortschritts, stets weiterentwickelt. Der gleichzeitige Einsatz von struktur- und ligandbasierten Strategien im Wirkstoffdesign profitiert dabei davon, dass sich die jeweiligen Stärken und Schwächen beider Ansätze einander ergänzen.[265] Im Folgenden sollen die beiden Herangehensweisen im Hinblick auf ihren Einsatz an ABC-Transportern einzeln betrachtet werden.

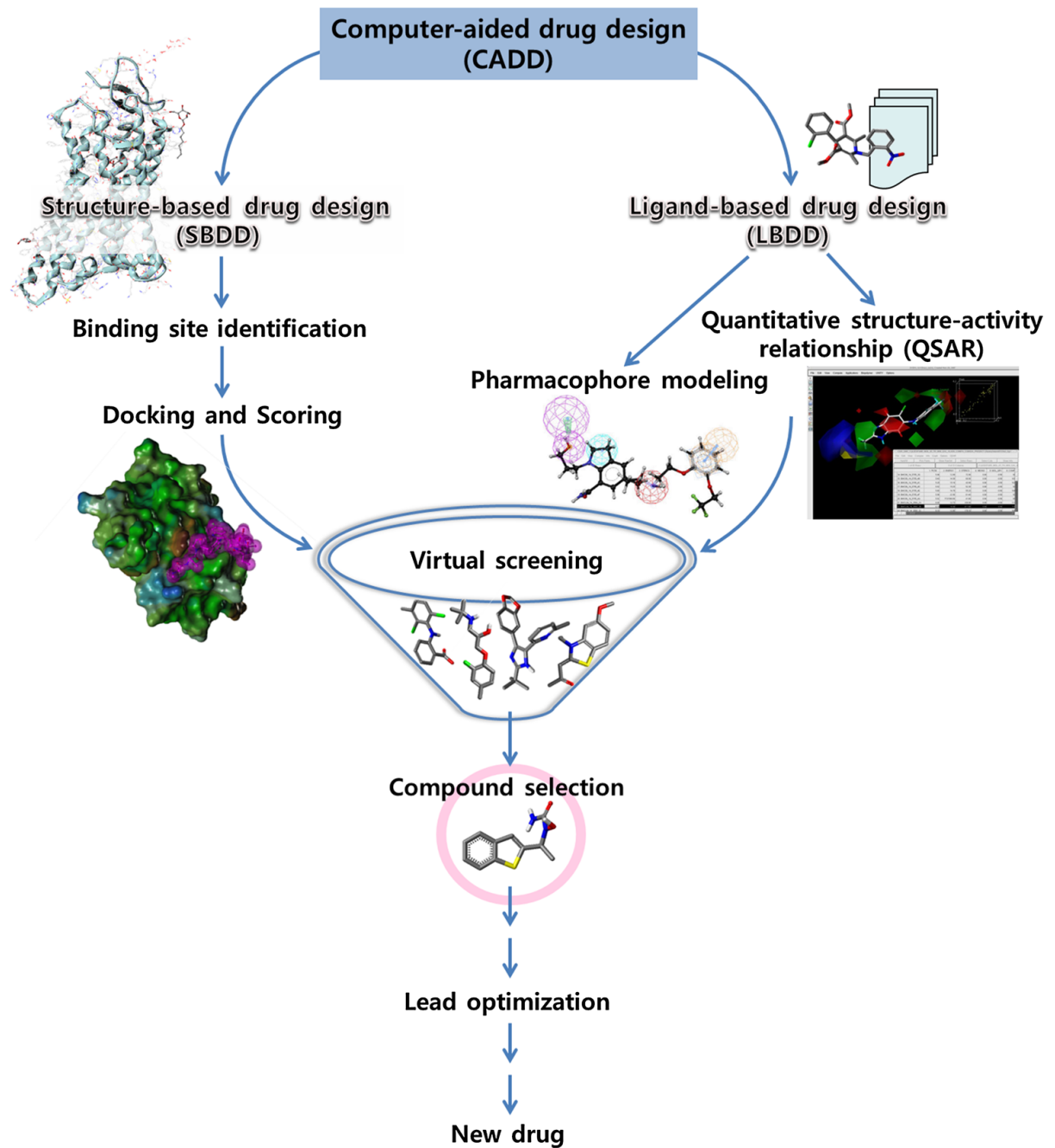


Abbildung 1.7 – Arbeitsablauf des computergestützten Wirkstoffdesigns. Entnommen von Macalino et al. [258].

1.3.2 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign von ABC-Transportern

Allgemeines

Die Basis des strukturbasierten Wirkstoffdesigns bildet die 3D-Struktur der Bindetasche des Zielmoleküls. Sie wird genauestens untersucht und die spezifischen Zentren ausgemacht, die eine möglichst starke Interaktion mit dem Protein erwarten lassen. Darauf aufbauend können Liganden entworfen und optimiert werden, die maßgeschneidert an das entsprechende Target angepasst sind.[256, 266]

Die Identifizierung einer Zielstruktur und die Erfassung der strukturellen Informationen bilden somit den ersten Schritt im strukturbasierten Design. Dabei wird auf strukturbiochemische Informationen aus Röntgenkristallographie, Kernspinresonanzspektroskopie, Kryoelektronenmikroskopie, Homologiemodellen und Molekulardynamik-Simulationen zurückgegriffen.[259, 261]

Im *de novo* Ansatz werden zunächst kleine Fragmente innerhalb der Bindetasche platziert, die gut mit den gefundenen Interaktionszentren übereinstimmen. Diese „Keime“ werden dann sukzessive in einem iterativen Design zu ganzen, potenten Liganden zusammengesetzt. Dabei wird bereits auf die Synthetisierbarkeit geachtet, um die neuartigen Liganden im Labor herstellen und im weiteren Screening einsetzen zu können.[267, 268] Zum Einsatz kommen hier schnelle Docking-Verfahren, die eine Bindungsgeometrie vorhersagen und Scoring-Funktionen, die bewerten, ob die gefundenen Bindungsgeometrien als energetisch günstig einzustufen sind.[269]

Das virtuelle Screening hingegen nutzt die breite Verfügbarkeit von Substanzbibliotheken kleiner Moleküle aus, um nach neuen Strukturen zu suchen, die als potentielle Liganden in Frage kommen. Diese können dann als Ersatz für bereits bekannte Modulatoren der Zielstruktur dienen, oder als mögliche neue Modulatoren des entsprechenden Targets für das bislang noch keine Informationen verfügbar waren.[256, 262]

Homologiemodelle zur Vorhersage von Ligand-Transporter-Interaktionen

Aufgrund der enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Strukturbiologie konnten inzwischen viele Kristallstrukturen von ABC-Transportern aufgeklärt werden. Die meisten entstammen prokaryotischen Organismen, jedoch konnten in den letzten Jahren auch Transportproteine von Eukaryoten isoliert und kristallographiert werden. So konnten in den vergangenen 5 Jahren u.a. die Strukturen der humanen ABC-Transporter ABCB10[102], ABCG5/ABCG8[270], ABCC7 (CFTR)[271, 272], ABCB1 (P-gp)[100, 273, 274] und ABCG2 (BCRP)[184, 185] veröffentlicht werden.

Mit dem Bekanntwerden der ersten Struktur in der Protein Data Bank[275] wurde das gesamte Gebiet der Strukturbiologie revolutioniert. Mit der Aufklärung der ersten Strukturen von ABC-Transportern folgten auch die ersten Homologiemodelle von ABC-Transportern und die Forschung im Bereich der computergestützten Methoden deckte bald die wichtigsten Transportproteine wie P-gp, Organische Anionen/Kationen Transporter (OAT/OKT), ABCG2 und MRP1/2 ab.[276] Einen Überblick über die existierenden Homologiemodelle und deren Ergebnisse liefert Tabelle 1.6. Die ersten Homologiemodelle

Tabelle 1.6: Übersicht über die Homologiemodelle von ABC-Transportern.

Transporter	Template (<i>Organismus</i>)	Methodik	Ergebnisse	Referenzen
P-gp	Msb A (<i>E. coli</i>)	Modeller	Inwärts-gerichtete Konformation, 20 aromatische Residuen	[277]
	Msb A (<i>E. coli</i>), BtuCD (<i>E. coli</i>)	N.A.	Geöffnete Konformation an der extrazellulären Oberfläche und geschlossen bei der Annäherung von TM6 und TM12	[278]
	Msb A (<i>V. cholera</i>), TAP1 (<i>H. sapiens</i>)	InsightII, CHARMM	Berührungsflächen zwischen TM3, TM11 und TM5, TM8	[279]
	TAP1 (<i>H. sapiens</i>), HisP (<i>S. typhimurium</i>), MJ0796 (<i>M. jannaschii</i>), MalK (<i>T. litoralis</i>)	Swiss-Model	Bindung von EGCG hebt Multidrug-Resistenz auf, 12 Wasserstoffbrückenbindungen sind involviert: Y1044, R1047, P1051, V1052, G1073, G1075, K1076, S1077, T1078, Q1081, Y1087, E1201 von NBD2.	[280]
	Sav1866 (<i>S. aureus</i>), MalK (<i>T. litoralis</i>)	Swiss-Model	Konformationsänderungen im katalytischen ATP-Zyklus	[281]
	Sav1866	MOE, CHARMM	Drei membranbezogene Bindestellen	[282]
	Sav1866 (<i>S. aureus</i>)	Modeller	Vernetzungen geschehen zwischen Helices 6 und 12	[283]
MRP1 (C-terminale Domäne)	HisP (<i>S. typhimurium</i>)	Rigorous models software	Apikale MRP2 Proteine besitzen ein Ende am C-Terminus, dass bei basolateralem MRP1 nicht vorhanden ist	[284]
MRP1 (TMDs)	Msb A (<i>E. coli</i>), Msb A (<i>V. cholera</i>), P-gp (<i>Homologiemodell</i>)	Modeller	W553(TM10), W1198(TM16), Y1243(TM17), W1246(TM17), F594 sind wichtige Residuen für den Transportweg	[285]
ABCG2 (NBD)	MalK (<i>E. coli</i>)	Swiss-Model	Intrazelluläre Domäne1 (ICD1) für Konformationsänderung nötig	[286]
ABCG2	MalK (<i>E. coli</i>) (NBD), Sav1866 (TMD)	Modeller	Docking von Liganden	[287]

von P-gp nahmen als Ausgangspunkt die vollständigen Strukturen von bakteriellen ABC-Transportern. Dazu gehörten der Lipidtransporter (Msb A) von *Escherichia coli* mit einer Auflösung von 4,5 Å [38], die Struktur des Transporters von *Vibrio cholerae* bei 3,8 Å [288] und der Msb A Transporter von *Salmonella typhimurium*. [289] Die Ermittlung von zwei Strukturen eines bakteriellen Transporters (Sav1866) von *Staphylococcus aureus* bei 3,0 Å führte zu einer Korrektur der bereits veröffentlichten Strukturen von Msb A (Ref. [38, 288, 289]), die sich unglücklicherweise als fehlerhaft erwiesen. [39, 290]

Die Struktur von Sav1866 ermöglichte die Entwicklung von Homologiemodellen für P-gp in seiner ATP-gebundenen Konformation. Die Apo-Struktur von MalK in einer geöffneten Ausrichtung wurde ebenso als Templates zur Entwicklung von Strukturen von ABCB1 in einem Nucleotid-freien Zustand genutzt. Die auf Sav1866 und MalK basierenden Untersuchungen von O'Mara und Tieleman [281] ermöglichte es die konformellen Änderungen zu überprüfen, die mit der Bindung und Hydrolyse von ATP während des Transportzyklus einhergehen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass im geschlossenen (auswärts-gerichteten) Zustand von P-gp die Translokationspore von Aminosäureresten der TM 3, 4, 6, 9, 10 und 12 gesäumt ist, die zusammen eine hydrophile Region bilden. Durch eine Rotation der NBD weitete sich die intrazelluläre Pore im geöffneten (auswärts-gerichteten) Zustand.

Sav1866 diente in einer anderen Veröffentlichung als Grundlage zur Entwicklung eines Modells, dass dem ersten Schritt der ATP-Hydrolyse nachempfunden ist. Des Weiteren konnte hierdurch eine Binderegion an der Grenzfläche zwischen der Membran und dem Cytosol ausgemacht werden, sowie zwei weitere Bindestellen, die innerhalb der TMD liegen. Die Resultate deuten darauf hin, dass das Transportprotein über mehrere Bindestellen verfügt und Substrate auf mehreren Wegen binden und/oder freigeben kann. [282]

Ein großer Fortschritt war die Auflösung der Apo-Struktur von Maus-P-gp bei 3,8 Å durch Röntgenkristallographie. Die Struktur enthielt zwei Bündel von jeweils sechs Transmembranhelices, die eine große Kavität formen, die sich sowohl zum Zytoplasma als auch zum inneren Teil der Zellmembran hin öffnet. Die Bindetasche besteht hauptsächlich aus hydrophoben, aromatischen Aminosäureresten. Es wurden ebenfalls zwei Strukturen in Co-Kristallisation mit zwei peptidischen Inhibitoren veröffentlicht. Alle inwärts-gerichteten Strukturen sind ein Beispiel für den Initialzustand des Transporters. Ein Homologiemodell basierend auf der auswärts-gerichteten Konformation des Proteins komplettiert das Bild des Transportzyklus. [40]

Abseits der vielen Modelle von ABCB1 wurden auch Versuche unternommen die Struktur der anderen Multidrug-Transporter vorherzusagen. So wurde ein Homologiemodell der C-terminalen, cytoplasmischen Domäne von MRP1 und MRP2 erstellt, welches auf der Struktur der Histidin-Permease (HisP) von *Salmonella typhimurium* basiert. Aus dem Modell konnte die Position des C-terminalen Endes vorhergesagt werden und aus dem Abgleich mit HisP geschlossen werden, dass eine Interaktion mit anderen Proteinen an diesem Ende bevorzugt ist. [284]

Eine weitere Reihe von Homologiemodellen von MRP1 wurde basierend auf der Struktur von EC-Msb A und VC-Msb A konstruiert. Mit Hilfe des Modells konnten strukturelle Einblicke in die Substratbindestelle von MRP1 erhalten werden. Sie befinden sich an der Nahtstelle zwischen Zellmembran und

dem Cytosol des Proteins. Des Weiteren konnte das Homologiemodell korrekt vorhersagen, dass eine Substitution von Ala an der Stelle von Phe594 in der Transmembranhelix 11 die Funktion von MRP1 nachteilig beeinträchtigt. Dies konnte später durch *in vitro* Studien nachgewiesen werden.[285]

Auch für ABCG2 existieren mittlerweile einige Homologiemodelle. Die erste gemodelte Struktur war die der NBD von ABCG2 basierend auf der MalK Struktur von *E. coli*. Das Modell wurde dann auf die gesamte Struktur von ABCG2 erweitert. Das komplette Modell setzte sich schließlich aus zwei identischen Untereinheiten zusammen, die sich in einer geschlossenen Konformation einander gegenüberstehen. Das NBD-Dimer zeigt eine charakteristische „Sandwich“-ähnliche Struktur der gebundenen Nukleotide. Die Interaktionen zwischen den TMD-Hälften wird durch die Transmembranhelices von TM1-3 der einen und den Helices 5 und 6 der anderen Transmembrandomäne bestimmt.[286] Neuere Kryo-EM-Aufnahmen konnten zeigen, dass die reale 3D-Struktur sich jedoch von dem Modell unterscheidet. So wurden angenommen, dass innerhalb von TM2 und TM5 zwei GXXXG-Motive an der Dimerisierung beteiligt sind.[291]. In der Kryo-EM-Struktur stehen die jeweiligen Aminosäurereste allerdings entgegengesetzt zueinander.[183]

Ein ähnlicher Ansatz zur Erstellung eines Homologiemodells von ABCG2 wurde basierend auf der Struktur von Sav1866 unternommen. Im Anschluss wurden sogar einige Liganden in das Modell gedockt, um mögliche Bindestellen innerhalb des Proteins auszumachen.[287]

Molecular Docking zur Identifizierung von Substraten/Inhibitoren für ABC-Transporter

Dockingmethoden können helfen das Verständnis von Protein-Ligand-Interaktionen zu verbessern. Die Genauigkeit der Vorhersagen kann dabei von vielen Faktoren beeinflusst werden.

Ein erster Versuch auf diesem Gebiet war die Untersuchung von 157 Substraten und 88 nicht-Substraten von P-gp. Hierfür wurde das Programm Glide verwendet und die gefundenen Bindungsgeometrien mit zwei verschiedenen Scoringfunktionen (SP und XP) energetisch bewertet. Daraus resultierte, dass sich in der Verteilung der Scoringwerte für Substrate und nicht-Substrate eine große Überschneidung zeigte. Somit konnte keine sichere Unterscheidung zwischen Substrat und nicht-Substrat getroffen werden.[292]

Ein nächster Versuch war der Ansatz eines **induced-fit Dockings (IFD)**, um die hohe Flexibilität des Transporters beim Docking zu berücksichtigen.[293] Dabei wurden zunächst ausgewählte Liganden in die Kristallstruktur von Maus-P-gp gedockt. Hierfür wurde mit dem Programm Glide eine $10 \times 10 \times 10 \text{ \AA}^3$ große Box innerhalb des Proteins definiert. Mit den vorgegebenen Einstellungen wurden anschließend 100 Bindungsposen pro Ligand generiert. In einem zweiten Schritt wurden mit dem Paket Prime ausgewählte Proteinseitenketten um den Liganden herum optimiert. Daraufhin wurden die Liganden wiederum in die vordefinierte Box gedockt und mit der Glide XP Scoringfunktion bewertet. Es wurden 24 bekannte Inhibitoren zusammen mit dem co-kristallisierten Liganden QZ59-RRR auf diese Weise in das Protein gedockt, um herauszufinden, ob der induced-fit Ansatz die Unterscheidung zwischen Inhibitoren und nicht-Inhibitoren verbessern kann. Daraufhin wurden 102 Metabolite, von denen man aufgrund von Efflux-Experimenten annehmen konnte, dass sie nicht-bindende Liganden sind, in das Protein gedockt.

In einer letzten Phase wurden dann eine Reihe von Cysteinprotease-Inhibitoren gedockt, was als erster Blindtest des Modells dienen sollte.

Als Resultat ergab sich, dass man durch das induced-fit Docking anhand der Werte der Scoringfunktion bindende Liganden (Glide XP-Score $< -14 \text{ kcal mol}^{-1}$) von nicht-bindenden Liganden (Glide XP-Score $> -12 \text{ kcal mol}^{-1}$) unterscheiden kann.

Durch diese Studie konnte ein erfolgreicher Einsatz des molekularen Docking gezeigt werden, um eine Aussage treffen zu können, ob ein gegebenes Molekül mit einem Transportprotein interagieren wird oder nicht. Eine zuverlässige Proteinstruktur und der Einsatz von Methoden zur Berücksichtigung der Flexibilität eines Proteins waren von entscheidender Bedeutung.

Gleichwohl wurden für die Erstellung des Modells chemisch einander ähnliche Strukturen verwendet. Es bleibt also unklar, ob sich dieses Modell auf Strukturen ausweiten lässt, die nicht bei der Erstellung mit berücksichtigt wurden.

In einem weiteren Modell, das auf der Struktur von Maus-P-gp beruht, wurden die Bindungsgeometrien weniger Liganden ausführlich untersucht und mit Informationen aus Studien zu [Struktur-Wirkungsbeziehungen \(SAR\)](#) verglichen sowie einem anschließendem Clustering basierend auf gemeinsamen chemischen Grundgerüsten.[\[294\]](#) Die SAR-Informationen wurden dann genutzt, um Prioritäten bei den Posenclustern zu setzen, um eine auf experimentellen Daten basierende Hypothese zu gewinnen. Anschließend wurde mit dieser Methode ein Datensatz von 1608 Inhibitoren und nicht-Inhibitoren von P-gp untersucht. Obwohl die Leistung dieser strukturbasierten Methodik relativ gering war (61 % für den externen Datensatz) im Vergleich zu den Ergebnissen durch Random Forest oder [support vector machine \(SVM\)](#)-Modellen (73 % bzw. 75 %) zeigt diese Veröffentlichung, dass die strukturbasierte Herangehensweise zur Klassifizierung von Liganden für ABC-Transporter erreichbar ist.[\[295\]](#)

Einen umfassenderen Ansatz verfolgte eine Docking-Studie zur Charakterisierung der M-, H- und R-Seite von Mäuse-P-gp.[\[296\]](#) Die Bindetaschen wurden dabei als Substrat- oder Modulator-Bindestellen klassifiziert, basierend auf der bevorzugten Platzierung der Liganden in eine der jeweiligen Bindetaschen. Die Bindetaschen H und R stehen dabei für die beiden Substratbindestellen von Hoechst 33342 und Rhodamin-123. Die Modulator-Bindestelle (M-Seite) wurde auf den Ort mit den Hauptinteraktionen von Verapamil bezogen. Weitere Dockingstudien mit Molekülen, die als Substrate oder Modulatoren von P-gp klassifiziert wurden, sind durchgeführt worden, um ein strukturbasiertes Modell zur Unterscheidung zwischen Substrat und Modulator zu generieren. Das Schema beinhaltet die Klassifikationen (i) nicht-Substrate, (ii) transportierte Substrate, (iii) nicht-transportierte Substrate und (iv) Modulatoren. Das Modell konnte 14 von 19 Modulatoren (74 %), 20 von 32 Substraten (63 %) und 2 von 3 nicht-Substraten korrekt vorhersagen.

Diese Studien zeigen auf überzeugende Art und Weise, dass strukturbasierte Methoden im Bereich der ABC-Transporter zu einem wertvollen Instrument für das tiefere Verständnis der molekularen Eigenschaften und der Untersuchung von Ligand-Transporter-Interaktionen geworden sind. Durch das Aufkommen neuer 3D-Strukturen von ABCC1 und ABCG2 in den letzten Jahren werden auch für diese ABC-Transporter strukturbasierte Methoden vermehrt Anwendung finden werden.

1.3.3 Ligandbasiertes Wirkstoffdesign von ABC-Transportern

Allgemeines

Die Methoden der **quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR)** (*engl. quantitative structure-activity relationships*), versuchen einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der daraus bedingten biologischen Wirkung zu erfassen. Die zu untersuchenden Substanzen sollten aus einer chemisch einheitlichen Serie stammen und müssen am selben Zielmolekül eine Wirkung entfalten. Auf diese Weise lassen sich strukturell ähnliche Inhibitoren eines bestimmten Target untereinander vergleichen.

Grundlage für diese Methoden liefert die Annahme, dass die Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen für die relative Stärke ihrer Wirkung an der Zielstruktur verantwortlich sind. Des Weiteren wird angenommen, dass sich diese Beiträge zur Affinität additiv verhalten. Diese Hypothesen bilden die Basis für eine mathematische Formulierung der biologischen Aktivität von Wirkstoffen.

Zu beachten dabei ist die jeweilige Komplexität des Testsystems. Im einfachsten Falle handelt es sich um die Hemmung eines Enzyms oder Rezeptors *in vitro*. Steigt die Komplexität des Systems an z.B. im Falle einer Untersuchung *in vivo* nach Gabe eines Medikaments, so müssen viele Prozesse berücksichtigt werden. Dazu gehört die Absorption, die Verteilung, der Metabolismus und die Ausscheidung (kurz: ADME) des Wirkstoffs im Körper. Eigentlich müsste jeder dieser Schritte einzeln betrachtet werden. Jedoch kann man auch in diesem Falle eine allgemein gültige Struktur-Wirkungsbeziehung aufstellen, sofern einer dieser Schritte den begrenzenden Faktor in den gesamten Struktur-Wirkungsbeziehungen darstellt.[297]

Maschinelles Lernen als Ansatz zur Vorhersage von Inhibitoren für ABC-Transporter

P-Glykoprotein ist mit Abstand der am besten untersuchte Transporter in der ABC-Familie. Daher wurden nahezu alle ligandbasierten Methoden, die es gibt an P-gp angewendet. Das Spektrum reicht dabei von der klassischen Hansch-Analyse, linearen und nicht-linearen Klassifizierungsalgorithmen über Pharmakophormodelle bis hin zu überwachten und unüberwachten künstlichen neuronalen Netzwerken.[298]

In den letzten Jahren wurde der Fokus auf die Klassifizierung großer Datenbanken verlagert, um *in silico* Profile zu erstellen, die die Untersuchung von Substanzbibliotheken hinsichtlich ihrer Aktivität an ABC-Transportern erlauben.

Eine der grundlegenden Arbeiten auf diesem Gebiet nutzte eine Kombination aus Molekülfeldern, pharmakophorbasierten Darstellungen der Substanzen, sowie physikochemische Deskriptoren um allgemeingültige und spezifische Modelle für P-gp-Inhibitoren zu entwickeln.[299] Aufbauend auf einem Datensatz von 1275 Molekülen wurde eine Vorgehensweise entworfen, die spezifische (Pharmakophore) und unspezifische (allgemeine physikochemische) Deskriptoren miteinander vereinte. Aus dem finalen

Modell gingen wichtige Parameter hervor wie die Flexibilität, die hydrophobe Oberfläche und der logP-Wert eines Moleküls, die für die Inhibition/nicht-Inhibition verantwortlich sind. Ein weiterer essentieller Faktor war die Form der Substanz, was auf die Bedeutung von 3D-Deskriptoren zur Beschreibung der inhibitorischen Aktivität hinweist.

Ein anderer Versuch zur Einstufung von ABCB1-Inhibitoren basierte auf Ansätzen der rekursiven Partitionierung und der Anwendung von Bayes-Klassifizierern unter Verwendung eines Satzes physikochemischer Deskriptoren und verschiedenen Fingerprint-Methoden. Auch in diesem Modell stellte sich der logP-Wert als wichtiger Indikator zur Unterscheidung zwischen Inhibitoren und nicht-Inhibitoren heraus.[300]

Da für ligandbasierte Ansätze zur Untersuchung von ABC-Transportern keine 3D-Strukturen nötig sind wurde in den vergangenen Jahren auch an *in silico* Modellen für die anderen Transportproteine intensiv geforscht.

Der bislang größte Datensatz für ABCG2, der bislang zusammengestellt wurde, besteht aus 978 einzelnen Substanzen, die aus 47 Studien entnommen wurden.[301] Der Datensatz wurde zur Erstellung eines Modells basierend auf Bayes-Klassifizierern genutzt unter Verwendung von ECFP_6 Fingerprints. Dadurch konnten wichtige Substrukturen entdeckt werden, die mit den bis dato veröffentlichten SAR-Studien zur Inhibition von ABCG2 übereinstimmen. Entscheidend für ein inhibitorisches Verhalten sind die Anzahl an Stickstoffatomen, die Aromatizität und die Anwesenheit von mehrkernigen Heterozyklen. Das Vorhandensein eines Schwefelatoms, fünfgliedrige Ringe oder amidische Strukturen scheinen eher zu Inaktivitäten zu führen. Das Modell erreicht eine Genauigkeit von 0,92 und eine Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve von 0,85 bei der Kreuzvalidierung dieser Bayes-Methode.

Es gab auch relativ früh bereits Studien, um Selektivitätsmodelle zu einigen ABC-Transportern zu erstellen. So wurde ein Datensatz von 122 strukturell unterschiedlichen Wirkstoffen untersucht, um ein Inhibitionsmuster für P-gp, ABCG2 und MRP2 zu finden.[302] Es konnte gezeigt werden, dass die Spezifikationen für Inhibitoren von P-gp, ABCG2 und MRP2 sich in großem Stil überschneiden. Ein computergestütztes Modell, basierend auf multivariater Statistik konnte 80 % der allgemeinen Inhibitoren und nicht-Inhibitoren eines externen Datensatzes der untersuchten ABC-Transporter korrekt identifizieren.

Pharmakophormodelle für Inhibitoren von ABC-Transportern

Ergänzend zu den klassischen QSAR- und Inhibitor/nicht-Inhibitor-Klassifikationsmodellen hat es eine Fülle an Pharmakophormodellen gegeben, die zur Aufklärung von Ligand-Transporter-Interaktionen entwickelt wurden. Aufgrund der hohen strukturellen Vielfalt der Modulatoren für ABC-Transporter haben auch die Pharmakophormodelle zu keinem entscheidenden Durchbruch im Verständnis der polyspezifischen Wirksamkeit der Inhibitoren auf molekularer Basis geführt. Die entwickelten Pharmakophormodelle zeigten jedoch gute Ergebnisse bei der Identifizierung von Liganden mit neuen chemischen Grundstrukturen, was ihre Nützlichkeit in ligandbasierten Modellen unter Beweis stellt. Eine Über-

Tabelle 1.7: Übersicht über die Pharmakophormodelle zur Vorhersage von Substraten und Inhibitoren von ABCB1.

Methoden	Datensatz		Leistungsvermögen		Referenzen
	Training	Test	Training	Test	
Pharmacophore-Catalyst 4.5	27	19	$r^2=0,77$	$r^2=0,77$, Spearman's Rho=0,68	[303]
	21	23	$r^2=0,88$	$r^2=0,34$, Spearman's Rho=0,70	
	17	16	$r^2=0,86$	$r^2=0,22$, Spearman's Rho=0,46	
	18	12	$r^2=0,76$	Spearman's Rho=0,59	
	16	7	$r^2=0,96$	$r^2=0,89$, Spearman's Rho=0,55	[304]
CONAN	144	51	Genauigkeit=80 %	Genauigkeit=63 %	[305]
Cerius2, SAP	163	97	Genauigkeit=88 %	Genauigkeit=88 %	[306]

sicht von ausgewählten Beispielen dieser Methodik, die an P-gp angewandt wurden ist in Tabelle 1.7 aufgeführt. So wurde ein Pharmakophormodell basierend auf 26 bekannten ABCB1-Inhibitoren mit einer Flavonoid-Grundstruktur entworfen. Dieses wurde anschließend in einem Screening der DrugBank Datenbank benutzt, woraufhin 167 Strukturen identifiziert werden konnten, die mit einem RMSD-Wert $<1 \text{ \AA}$ das Pharmakophor erfüllten. Von den gefundenen Strukturen wurden 21 für die biologische Testung ausgewählt und 12 der Substanzen konnten einen signifikanten Fluoreszenzanstieg in der intrazellulären Akkumulation von Rhodamin-123 zeigen.[307]

Für ABCG2 wurde ein Datensatz von 25 Inhibitoren als Grundlage zum Entwurf eines Pharmakophormodell herangezogen. Das Modell wurde anschließend in einem Screening der Collaborative Drug Discovery Datenbank, die aus 2815, von der FDA zugelassenen, Wirkstoffen besteht. 33 Arzneimittel wurden anschließend *in vitro* zur Bestimmung ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2 getestet. 19 der Substanzen zeigten einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf den ABCG2-vermittelten Transport von [3H]-Mitoxantron in MCF-7/AdrVp-Zellen.[308]

Ein Pharmakophormodell für MRP1 wurde basierend auf fünf unterschiedlichen und potenten Inhibitoren entwickelt. Es besteht aus 3 aromatischen Ringen und 3 Wasserstoffbrücken-Donoren. Mit diesem Modell konnten 3 bekannte Inhibitoren von MRP1 aus einem Datensatz von 500 Wirkstoffen herausgefiltert werden.[309]

QSAR Modelle von ABC-Inhibitoren

Modelle der quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: (i) 2D-QSAR Modelle, die substanzspezifische Parameter (z.B. logP-Wert, Molekulargewicht, oder topologische Deskriptoren) mit den biologischen Eigenschaften korrelieren und (ii) 3D-QSAR Modelle, welche Regressionsgleichungen nutzen, um einen Zusammenhang zwischen den chemischen Eigenschaften eines Moleküls oder seiner biologischen Aktivität und seiner 3-dimensionalen Struktur zu finden.

Mit einem detaillierten Verständnis, welche biochemischen Merkmale zur Affinität eines Modulators beitragen, können Hypothesen abgeleitet werden, durch welche strukturellen Unterschiede oder Ähnlichkeiten eine Aktivität oder Inaktivität bedingt wird.[276]

Bei der 2D-QSAR werden für eine Serie an Verbindungen zuerst numerische Deskriptoren berechnet, welche die Information der molekularen Struktur codieren. Diese Deskriptoren bzw. eine geeignete Teilmenge davon, werden dann in statistische Methoden oder künstlichen neuronalen Netzwerken eingesetzt, um Modelle zu entwickeln, die die gewünschte Eigenschaft oder Aktivität vorhersagen. Zu den am häufigsten angewendeten Methoden gehören die [lineare Diskriminanzanalyse \(LDA\)](#) und die eng damit verwandte [Hauptkomponentenanalyse \(PCA\)](#), (*engl. principal component analysis*).

Die wichtigsten und am häufigsten genutzten Verfahren der 3D-QSAR sind die [Comparative Molecular Field Analysis \(CoMFA\)](#)- und [Comparative Molecular Similarity Indices Analysis \(CoMSIA\)](#)-Methoden. Hierfür wird zunächst ein Datensatz von Molekülen erstellt, die an der selben Zielstruktur binden. Von allen Substanzen werden anschließend Konformationen erzeugt und diese daraufhin einander überlagert. Die auf diese Weise in Superposition gebrachten Moleküle werden dann in ein Gitter eingebettet, das sie weiträumig umfasst. Die Gitterpunkte weisen dabei einen gleichmäßigen Abstand (1 bis 2 Å) voneinander auf. Auf jedem Punkt des Gitters wird nun eine Sonde mit gewissen Merkmalen (z.B. ein Atom mit den Eigenschaften von Wasserstoff, Kohlenstoff oder Sauerstoff) platziert. Nun wird die Wechselwirkung dieser Sonde mit jedem Molekül des Datensatzes berechnet. Die Summe der Beiträge dieser Wechselwirkungen wird als Molekülfeld bezeichnet. Die jeweiligen Felder der Moleküle werden schließlich miteinander verglichen. Man erhält so eine Tabelle für jedes Molekül mit seiner biologischen Aktivität und den Werten aus den Molekülfeldern. Aus dieser Tabelle kann mittels PLS-Analyse (*engl. partial least squares*) eine Gleichung erzeugt werden, die wiedergibt an welchen Gitterpunkten und mit welchem Gewicht die Felder Beiträge zur Erklärung der biologischen Wirkung liefern.[297]

Eine Vielzahl an QSAR-Modellen wurden in der Vergangenheit aufgestellt, um eine Beziehung zwischen Struktur und Wirkung von ABC-Inhibitoren herzuleiten. Im Folgenden sollen einige Beispiele genannt werden, die auf unterschiedlichen QSAR-Ansätzen beruhen, um die Aktivität bzw. nicht-Aktivität von Substanzen an ABC-Transportern vorherzusagen.

Eine Übersicht der QSAR Modelle zur Vorhersage von ABC-Inhibitoren liefert Tabelle 1.8. Eine der angewandten Methoden beruhte auf der Entwicklung eines Modells zur Vorhersage der ATPase-Aktivität von P-gp. Hierzu wurden Moleküldeskriptoren berechnet und mittels multivariater Statistik analysiert, um einen Datensatz von 22 wirkstoffähnlichen Substanzen zu untersuchen. Mit dem Programm MolSurf wurden physikochemische Deskriptoren berechnet wie die Lipophilie, Polarität, Polarisierbarkeit und die möglichen Wasserstoffbrückenbindungen. Mit Hilfe der multivariaten PLS-Analyse wurde ein Modell erstellt, das den Zusammenhang zwischen der ATPase-Aktivität von ABCB1 und den berechneten Deskriptoren beschreibt. Physikochemische Merkmale, die mit der Größe der Moleküloberfläche, der Polarisierbarkeit und den Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängen hatten den größten Einfluss auf die ATPase-Aktivität. Diese Eigenschaften sollten möglichst groß sein, um eine hohe ATPase-Aktivität zu fördern.[316]

Tabelle 1.8: Übersicht über die QSAR-Modelle zur Vorhersage von Substraten und Inhibitoren von ABCB1.

Methoden	Datensatz		Leistungsvermögen		Referenzen
	Training	Test	Training	Test	
LDA (Datensatz 1)	397	200	Genauigkeit=82,0 %	Genauigkeit=83,1 %	[310]
LDA (Datensatz 2)	397	200	Genauigkeit=90,8 %	Genauigkeit=92,0 %	
LDA	95	58	SE=100 %, SP=90,6 %	Genauigkeit=86,2 %	[311]
PLS (Almond Des- kriptoren)	109	20	$r^2=0,83$ LOO $q^2=0,75$	$r^2=0,72$	[312]
PLS COMSIA	10	3	$q^2=0,720$	$r^2=0,998$, SEE=0,012, F=257,955	[313]
	18	2	$q^2=0,536$	$r^2=0,950$, SEE=1,761, F=45,800	
LDA (TOPS- MODE)	163	40	SE=82,4 %, SP=79,2 %, Genauigkeit=81,0 %	Genauigkeit=77,5 %	[314]
PLSD	53	272	Genauigkeit=88,7 %	Genauigkeit=72,4 %	[315]

In einer anderen Studie wurde ein strukturell unterschiedlicher Datensatz von 129 Substanzen verwendet, basierend auf den Effluxraten dieser Verbindungen in Permeabilitätsmessungen an Caco-2-Zellen. Die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 wurde durch Calcein AM Akkumulationstests bestimmt. Diese Daten wurden anschließend in einer 3D-QSAR Analyse benutzt unter Verwendung von pharmakophor- und physikochemisch-basierten Deskriptoren des Programms GRIND. Nach Anwendung einer PLS-Analyse ergab sich eine starke Korrelation zwischen den pharmakophor-basierten Deskriptoren und den inhibitorischen Aktivitäten der Substanzen. Dies wies darauf hin, dass den Interaktionen zwischen Inhibitor und Transporter eine Schlüsselrolle im Hinblick auf den Effluxprozess zukommt. Die Diffusion der Modulatoren durch die Membran schien weniger wichtig zu sein als die Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Eines der Pharmakophore, das aus dem Modell hervorstach bestand aus zwei hydrophoben Gruppen in einem Abstand von 16,5 Å zueinander und zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren in einem Abstand von 11,5 Å.[312]

In einer weiteren Publikation wurde eine Reihe von Steroiden mittels PLS-Analyse und Verwendung von CoMSIA-Deskriptoren untersucht, um drei 3D-QSAR Modelle für Substrate und neun 3D-QSAR Modelle für Inhibitoren von ABCB1 zu entwickeln. In einer vergleichenden Analyse der verschiedenen Modelle zeigte sich, dass sowohl für Substrate als auch für Inhibitoren die elektrostatischen Felder

einen größeren Beitrag zur Interaktion mit P-gp liefern als die sterischen Felder. Sterisch anspruchsvolle Gruppen an den Kohlenstoffen C-6, C-17a und C-21b wurden in beiden Modelltypen als unvorteilhaft eingestuft, wohingegen ein raumerfüllender Substituent an C-21a bevorzugt war. Bei den elektrostatischen Konturfeldern zeigte sich, dass negativ geladene Substituenten an C-11b und elektrostatische Gruppen im Allgemeinen an C-3, C-17a und C-21 für eine Interaktion mit P-gp bevorzugt werden. Ein Unterschied zwischen den Modellen zeigte sich insofern, dass der hydrophobe Anteil für ABCB1-Inhibitoren wesentlich notwendiger ist als für Substrate von P-gp.[313]

Ergänzend sei noch erwähnt, dass zusätzlich zu den obigen vorgestellten klassischen Pharmakophor- und QSAR-Modellen viele Bemühungen unternommen wurden neue Methoden zu entwickeln, die eine Kombination aus den verschiedenen Modelling-Ansätzen darstellen. So wurden Deskriptoren aus Pharmakophormodellen und QSAR-Analysen übernommen, um mit ihrer Hilfe neue Modelle unter Verwendung unterschiedlichster statistischer Methoden zu entwerfen. Daraus resultierten die Verfahren des überwachten und unüberwachten Lernens – Techniken, die bis heute eine breite Anwendung, nicht nur im Gebiet der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen finden. Viele dieser Methoden wurden angewandt, um Modelle zur Vorhersage von Inhibitoren und Substraten für ABC-Transporter zu entwerfen. Beispiele der eingesetzten statistischen Techniken des überwachten Lernens sind Entscheidungsbäume[300, 317], support vector machines[318–320] oder Bayes-Klassifizierungen.[321] Verfahrensweisen des unüberwachten Lernens zur Auffindung von Ligand-Transporter-Interaktionsmodellen sind die Kohonenkarten[322] oder der k-Nearest-Neighbor-Algorithmus.[318, 319]

Die bislang vorgestellten computerchemischen Methoden haben bereits viel zum Verständnis über Arzneimittelabsorption und Ausscheidungs- bzw. Toxizitätsprofile von ABC-Transportern beigetragen. Mit der ständig zunehmenden Rechenleistung und kontinuierlich verbesserten Algorithmen für Modellvorhersagen werden Computertechniken auch weiterhin eine wichtige Rolle bei der Erforschung von ABC-Transportern spielen.

Zielsetzung

Das Phänomen der Multidrug-Resistenz (MDR) von Krebszellen gegenüber verschiedensten Zytostatika führt oftmals zu einem Versagen der Chemotherapie. Ein Mechanismus der MDR ist die Überexpression von ABC-Transportern in den entarteten Zellen, wodurch sich die für eine zytotoxische Wirkung notwendige Konzentration des Chemotherapeutikums erhöht. Dies sichert das Überleben der Tumorzellen und verschlechtert die Prognose der betroffenen Patienten.

Eines der drei hauptverantwortlichen Transportproteine, die mit der Multidrug-Resistenz assoziiert werden, ist ABCG2 oder auch BCRP (*engl.: breast cancer resistance protein*). Es wurde im Jahr 1998 entdeckt und bislang ist wenig bekannt über seine genaue Funktion, sowie die Interaktionen zwischen ABCG2 und den ihm zugehörigen Substraten bzw. Modulatoren auf molekularer Ebene.

Ziel dieser Arbeit sollte daher die Entwicklung potenter und selektiver Inhibitoren von ABCG2 sein, um durch Hemmung des Transporters die von ABCG2 vermittelte MDR aufzuheben. Hierzu wurden verschiedene Grundstrukturen auf ihr Inhibitionsvermögen hin untersucht. Durch Abwandlungen des Substitutionsmusters sollten spezifische Wechselwirkungen herausgestellt und Struktur-Wirkungsbeziehungen entwickelt werden. Untersuchungen zur Selektivität der Modulatoren wurden durchgeführt und durch Experimente zur Zytotoxizität und Resistenzaufhebung der Substanzen sollte ihre Eignung für eine spätere Anwendung *in vivo* bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Substanzklassen genauer untersucht:

- In einem High-Throughput-Screening (HTS) einer Datenbank von Naturstoffextrakten wurden Botryllamide als neue Inhibitoren von ABCG2 identifiziert.[247] Es sollten verschiedene Modifikationen an der Grundstruktur und am Substitutionsmuster durchgeführt werden, um die Strukturen bzw. Struktureigenschaften zu ermitteln, die für eine biologische Wirkung essentiell sind.

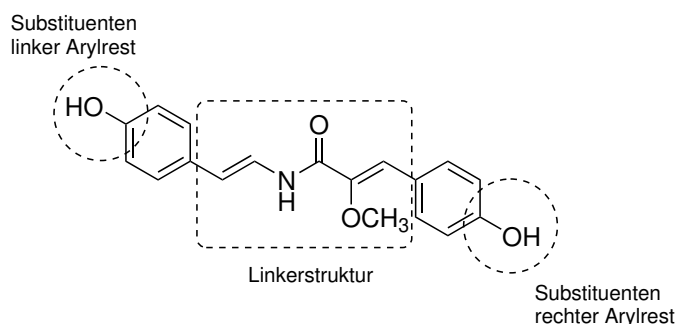


Abbildung 2.1 – Allgemeine Struktur und vorgenommene Modifikationen der Botryllamide.

- Ein weiterer Naturstoff, der in der Lage ist ABCG2 zu hemmen ist das aus dem Rhizom der Kurkumapflanze (*Curcuma longa*) stammende Curcumin.[249] Seine schlechte Bioverfügbarkeit und chemische Instabilität limitieren jedoch den Einsatz in klinischen Studien. Daher wurde Monocarbonylanaloga von Curcumin (MACs) entwickelt, die diese Nachteile nicht mit sich bringen.[323] Daher wurde das Ziel verfolgt durch unterschiedlich substituierte Cyclohexanonbasierte Monocarbonylanaloga des Curcumins herzustellen und auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber ABCG2 zu untersuchen.

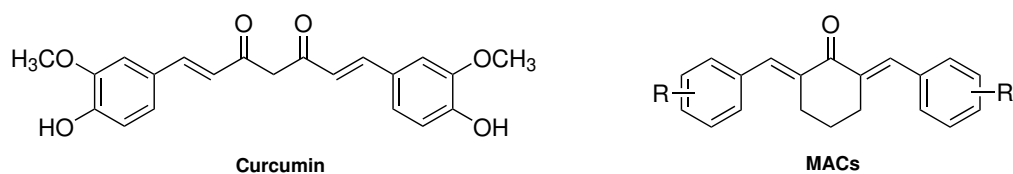


Abbildung 2.2 – Struktur von Curcumin und der synthetisierten MACs.

- Eine weitere Substanzklasse von Hemmstoffen für ABCG2 bildeten pyrimidinbasierte Strukturen. Aus vorherigen Publikationen ging hervor, dass Chinazoline und Pyrimidine potente ABCG2-Inhibitoren darstellen.[324] Da bislang nur wenige Untersuchungen hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Pyrimidine vorgenommen wurden sollte eine Substanzbibliothek von 2,4-Bis-Anilino- und 2-Aryl-4-Anilino-pyrimidinen aufgebaut werden. Basierend auf den Daten war das Ziel die für die Wirksamkeit verantwortlichen Strukturelemente zu ermitteln und entsprechende Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten. Weitergehende biologische Untersuchungen sollten die Eignung für *in vivo* Experimente überprüfen.

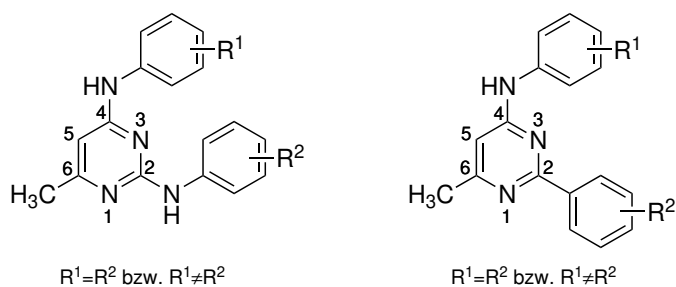


Abbildung 2.3 – Substitutionsmuster der untersuchten Pyrimidinstrukturen.

Im letzten Teil der Arbeit wurden computerchemische Methoden angewandt, um die Zusammenhänge zwischen den chemischen Strukturen und ihren biologischen Wirkungen zu ermitteln. Dazu wurde verschiedene Datensätze von ABCG2-Inhibitoren mit ihren Strukturen und korrespondierenden Aktivitätsdaten aus vorherigen Publikationen zusammengestellt.[324–327] Durch 3D-QSAR-Techniken wie CoMFA- und CoMSIA-Analysen sollten valide Regressionsmodelle entwickelt werden, mit denen neue Verbindungen vorhergesagt und Strukturvorschläge für neue, potente ABCG2-Modulatoren gemacht werden können.

Botryllamide als ABCG2-Inhibitoren

3.1 Allgemeines

Einer der ersten Inhibitoren von ABCG2, die bislang entdeckt wurden war das Mykotoxin Fumitremorgin C (FTC). Rabindran et al. [230] stressten Darmkrebszellen mit erhöhten Konzentrationen von Mitoxantron und konnten auf diese Weise eine resistente Zelllinie selektieren. Die selektierten Zellen erwiesen sich ebenfalls als kreuzresistent gegenüber Doxorubicin, Bisanren und Topotecan. Diese Multidrug-Resistenz konnte nicht mit den bekannten ABC-Transportern ABCB1 oder ABCC1 in Verbindung gebracht werden, da die Resistenz durch Zugabe von Inhibitoren dieser Transportproteine nicht aufgehoben werden konnte.

Zur Identifizierung von Substanzen, die diese neu entdeckte Multidrug-Resistenz aufheben können wurde ein Screening einer Bibliothek von verschiedenen Extrakten aus Mikroorganismen durchgeführt. Aus den Ergebnissen ging FTC hervor, dass erwiesenermaßen die Resistenz *in vitro* aufheben konnte. Basierend auf der Struktur von FTC wurde im weiteren Verlauf das Derivat Ko143 synthetisiert und ist bis dato die Referenzsubstanz für die Aufhebung von ABCG2-vermittelter Multidrug-Resistenz.

In späteren Jahren wurde immer wieder versucht durch Methoden des Hochdurchsatz-Screenings neue Modulatoren von ABCG2 zu entdecken. Da ein Naturstoff wie FTC die MDR von ABCG2-überexprimierenden Zellen aufheben kann wurden immer wieder Datenbanken untersucht, die nicht nur synthetische Moleküle, sondern auch viele Naturstoffe enthielten.[328]

Die Untersuchung von Naturstoffen und deren Derivaten war stets ein Ausgangspunkt zur Auffindung neuer Therapeutika. Auch einige der immer noch eingesetzten Chemotherapeutika entstammen dem vielfältigen Gebiet der Naturstoffe.[329–331] Viele der bisher identifizierten Substrate und Inhibitoren von ABC-Transportern entstammen ebenfalls aus dem Bereich der Biomoleküle und ihrer Derivate. Das Screening von Naturstoffen bietet nicht zuletzt aufgrund ihrer großen Biodiversität einen vielversprechenden Ansatz zur Entdeckung und Entwicklung neuer Leitstrukturen mit hoher Aktivität gegenüber der ABCG2-vermittelten Multidrug-Resistenz von Krebszellen.[332]

In einem 2009 veröffentlichten Artikel untersuchten Henrich et al. [247] in einem zuvor entwickelten

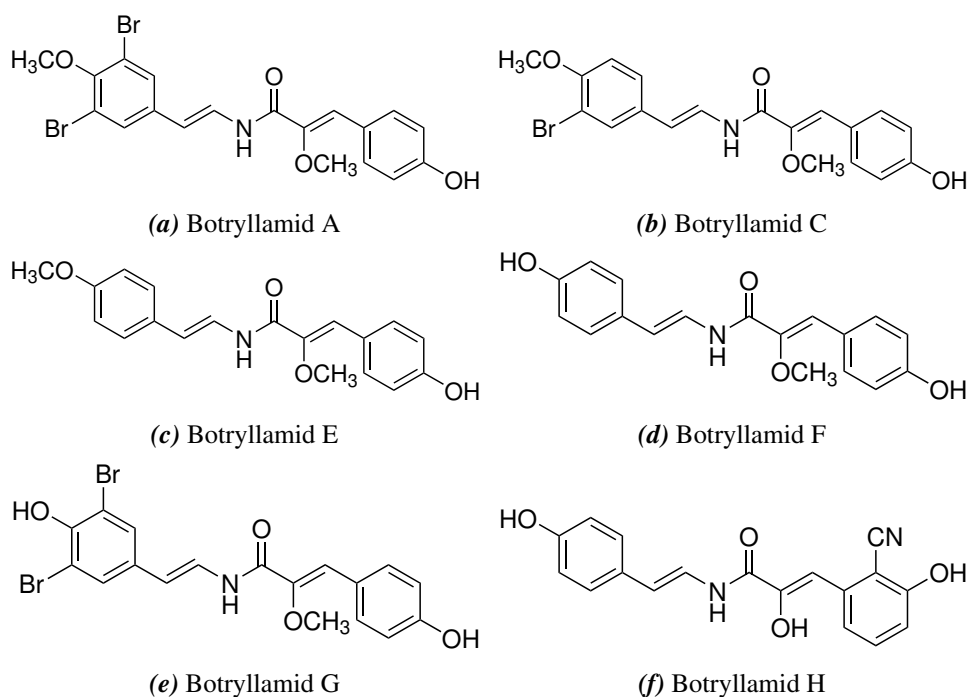


Abbildung 3.1 – Ausgewählte Strukturen der untersuchten Botryllamide extrahiert aus *Botryllus tyreus*.

Hochdurchsatz-Screening verschiedene Naturstoffextrakte des [National Cancer Institute \(NCI\)](#) auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2. Nach Aufreinigung der Extrakte, die eine Modulation von ABCG2 zeigten, konnten verschiedene Botryllamide als verantwortliche Substanzen der Inhibition von ABCG2 ausgemacht werden. Die aus der marinen Seescheide *Botryllus tyreus* stammenden Substanzen stimmten mit Strukturen überein, die im Zuge der chemischen Analyse von Organismen der Gattung *Botrylleus* bereits isoliert und beschrieben wurden.[333, 334] Ein Überblick über die aus dem Extrakt abgetrennten und getesteten Botryllamide zeigt Abbildung 3.1. Basierend auf den Ergebnissen aus Screening- und Durchflusszytometrie-Assays konnten die Botryllamide A – G als ABCG2-Inhibitoren identifiziert werden. Das Botryllamid H zeigte in keinem der beiden Assays eine nennenswerte Aktivität.

Im weiteren Verlauf wurden von Takada et al. [335] weitere Analoga der identifizierten Botryllamide synthetisiert und mittels zellbasierter Akkumulationstests mit Pheophorbid A auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht. Die Resultate ließen darauf schließen, dass eine Konjugation zwischen den α,β -Kohlenstoffen C2 und C3 des Michael-Systems für die Aktivität essentiell ist. Hingegen war eine weitere ungesättigte Struktur zwischen den Kohlenstoffatomen C10 und C11 der amidischen Molekülstruktur für eine inhibitorische Aktivität nicht zwingend erforderlich (vgl. Abb. 3.2).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden welche Auswirkungen eine Abwandlung des Substitutionsmusters an beiden Arylresten auf die inhibitorische Wirkung der Botryllamide hat. Des Weiteren wurde die Rolle des Substituenten am Kohlenstoff C2 untersucht und es sollte die Frage geklärt werden, in welchem Umfang ein gesättigtes bzw. ungesättigtes Kohlenstoffgerüst innerhalb des Amidlinkers für die Affinität von Bedeutung ist. Die Ausgangspunkte für die strukturell vorgenommenen Änderungen

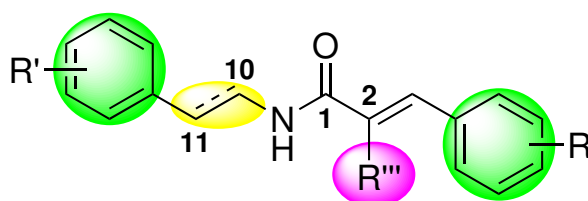


Abbildung 3.2 – Vorgenommene Modifikationen an der Grundstruktur der Botryllamide.

sind Abbildung 3.2 zu entnehmen. Zunächst wurden über eine Knoevenagelreaktion die α -substituierten Phenylacrylsäuren dargestellt. Hierzu wurden verschiedene Benzaldehyde unter Basenkatalyse mit verschiedenen Acetessigsäuremethylestern kondensiert. Mit der Auswahl des eingesetzten Benzaldehyds und der CH-aktiven Methylenelemente konnten auf diese Weise sowohl die Substituenten am Phenylrest als auch die funktionelle Gruppe am C2-Kohlenstoff der α -substituierten Phenylacrylsäure gezielt eingeführt werden.

Zur Synthese der zwischen C10 und C11 gesättigten Endstufen wurden die Phenylacrylsäuren mit den entsprechenden Phenethylaminen gekuppelt. Für die ungesättigten Endstufen wurden die Acrylsäuren zunächst mit Octopamin-Hydrochlorid verknüpft. Die Hydroxylgruppen wurden anschließend acetyliert. Im letzten Schritt erfolgte die Dehydratisierung der Amide an C10 und C11 zur ungesättigten Struktur und die Hydrolyse der phenolischen Acetylgruppen.

Im Nachfolgenden werden die einzelnen Syntheseschritte mechanistisch ausführlich beschrieben und auf die verschiedenen angewandten Methoden näher eingegangen.

3.2 Synthese

3.2.1 Synthese der Phenylacrylsäuren

Die Darstellung der gesättigten und ungesättigten Botryllamide erfolgte durch Kondensation eines substituierten Benzaldehyds mit Methoxyessigsäuremethylester oder Cyanessigsäuremethylester zur entsprechenden α -substituierten Phenylacrylsäure, die das gewünschte Substitutionsmuster am Phenylrest und dem C2-Kohlenstoff enthielt.[336, 337] Für den Fall, dass am Kohlenstoff C2 keine Substitution erfolgen sollte, wurde das jeweilige Zimtsäurederivat eingesetzt. Die allgemeine Syntheseroute, sowie die entsprechenden Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Phenylacrylsäuren sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

3.2.2 Mechanismen der Peptidkupplung

Im Anschluss an die Synthese der Phenylacrylsäuren (1 – 5, 6) erfolgte die Kupplung mit einem Phenethylaminderivat zum entsprechenden Amid. Für die Amidbildung steht eine Vielzahl verschiedenster Synthesemöglichkeiten zur Verfügung. Ihnen gemein ist zunächst die Aktivierung der Säure durch

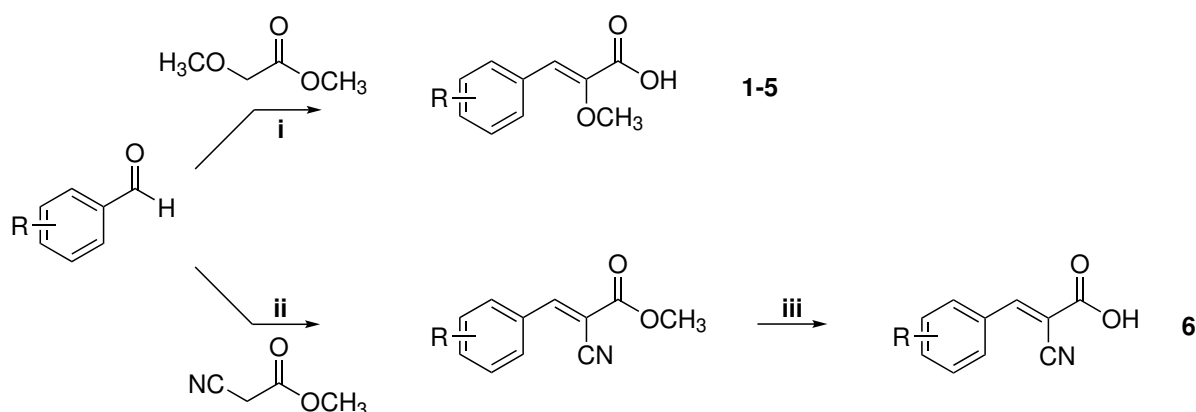


Abbildung 3.3 – Darstellung der α -substituierten Phenylacrylsäurederivate; Reaktionsbedingungen: (i) 1. NaOCH_3 , CH_3OH , Δ 2. HCl ; (ii) CH_3OH , Piperidin, RT; (iii) NaOH , CH_3OH , RT.

Überführung in ein reaktiveres Derivat. Die auf diese Weise „aktivierte“ Säure kann in einem zweiten Schritt mit dem eingesetzten Amin unter Aminolyse und Austritt der Abgangsgruppe zur Amidfunktion reagieren.[338, 339]

Peptidkupplung mit Carbodiimiden

Eine der Standardmethoden zur Peptidkupplung ist die Umsetzung der Carbonsäure und des Amins mit einem Carbodiimid z.B. **Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)** (siehe Abb. 3.4).[340] Der große Vorteil dieser Methodik ist die Möglichkeit der Darstellung des Produktes in einer Eintopfreaktion. Als Beiprodukt der Reaktion entsteht ein Harnstoffderivat, das je nach eingesetztem Carbodiimid entweder wasserunlöslich ist und durch Filtration abgetrennt werden kann oder wasserlöslich ist und durch Waschen mit verdünnter Säure aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann.[341, 342]

In einem ersten Schritt erfolgt die Addition der Carbonsäure an das Carbodiimid unter Ausbildung eines *O*-Acylharnstoffs. Dieser kann auf verschiedene Arten weiterreagieren:

- Eine unerwünschte Nebenreaktion ist die Umlagerung des *O*-Acylharnstoffs unter Transfer der Acylgruppe vom Sauerstoff zum Stickstoff und Ausbildung eines *N*-Acylharnstoffs.
- Die eigentliche Reaktion, die zum erwünschten Endprodukt führt, ist die Kupplung des Amins unter Abspaltung des Harnstoffderivats zum Amid.
- Eine weitere Möglichkeit ist die Formierung eines Anhydrids, welches anschließend mit dem Amin zum Amid weiterreagiert

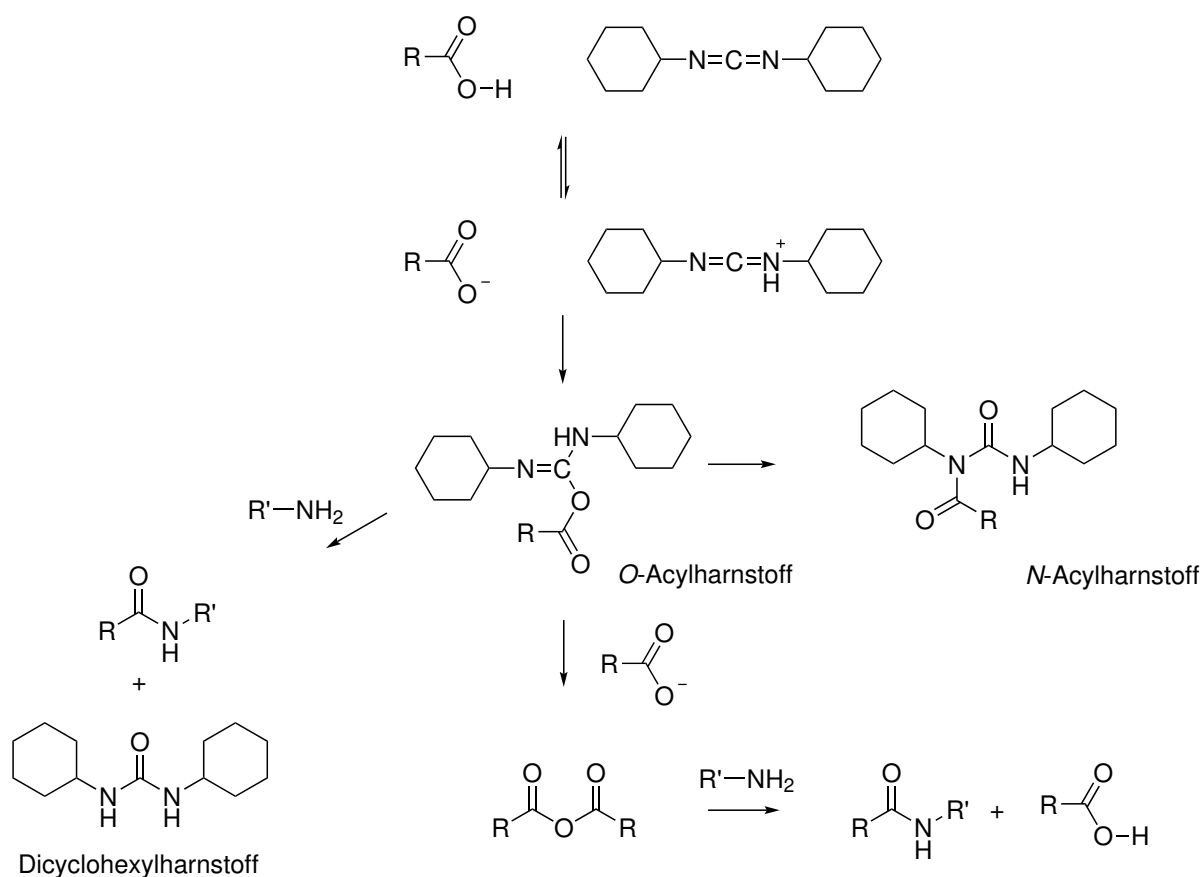


Abbildung 3.4 – Peptidkupplung mit DCC.

Die unerwünschte Bildung des *N*-Acyllharnstoffs kann durch Zugabe eines Nukleophils verhindert werden, wobei als zusätzlicher Effekt – bei Einsatz chiraler Edukte – deren Epimerisierung unterdrückt wird. Grund hierfür ist die schnellere Reaktion des Nukleophils mit dem *O*-Acyllharnstoff statt der dazu konkurrierenden Umlagerung des Acylrestes. Als Additiva werden nukleophile Basen wie z.B. 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und Hydroxybenzotriazol (HOBt) eingesetzt (s. Abb. 3.5).[343]

Peptidkupplung mit Carbonyldiimidazol

1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) kann ebenfalls als Kupplungsreagenz in einer Eintopfreaktion zusammen mit einer Carbonsäure und einem Amin eingesetzt werden.[344] Nach Deprotonierung der Carbonsäure durch CDI und nukleophilem Angriff des Carboxylats auf die protonierte CDI-Spezies wird Imidazol abgespalten und es entsteht ein gemischtes Anhydrid. Für die Weiterreaktion zum reaktiven Acylimidazol werden zwei Wege diskutiert: (i) Das abgespaltene Imidazol greift in einer intermolekularen Reaktion das gemischte Anhydrid an, welches unter Eliminierung von CO_2 und Imidazol zum Acylimidazol reagiert.[345] (ii) Ein intramolekularer Angriff des Imidazols auf den – von der Carbonsäure stammenden – Carbonylkohlenstoff unter Ausbildung eines intermediären Ringsystems, welches sich schließlich

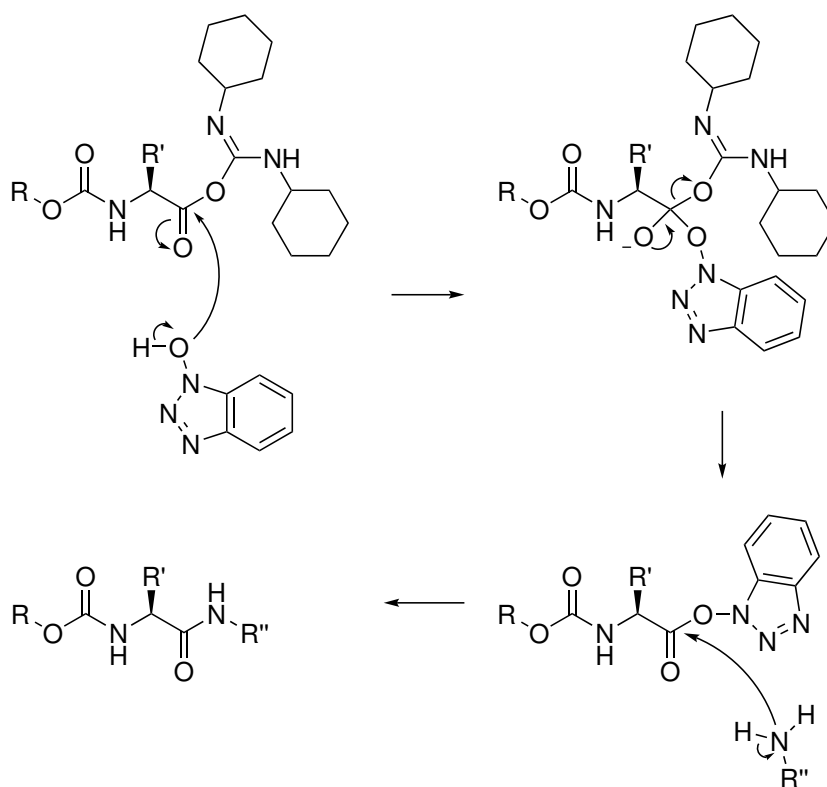


Abbildung 3.5 – Aktivierung mit HOBt als Additiv bei der Kupplung mit DCC.

nach Eliminierung von CO_2 wieder öffnet und das Acylimidazol ergibt.[346] Abschließend reagiert das Amin mit dem Acylimidazol unter Abspaltung eines weiteren Imidazols zum Amid (s. Abb. 3.6). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass für die Reaktion keine zusätzlich Base verwendet werden muss und die Amine auch als Hydrochloride eingesetzt werden können.[347, 348]

Peptidkupplung mit Benzotriazolen

Eine weitere Methode für die Peptidkupplung ist der Einsatz von Reagenzien, die auf dem 1H-Benzotriazolgerüst und ihren entsprechenden Aminium- oder Uroniumsalzen basieren.[349] Diese Kupplungsreagenzien reagieren mit der eingesetzten Säure zu einem OBt/OAt-„Aktivester“, welcher im weiteren Verlauf der Reaktion mit dem Amin zum entsprechenden Amid weiterreagiert (Abbildung 3.7). Die treibende Kraft der Reaktion ist – wie im Falle der Carbodiimide – die Bildung eines Harnstoffderivats als Nebenprodukt (s. Abb. 3.7).

3.2.3 Synthese der gesättigten Amide

Für die Synthese der gesättigten und ungesättigten Botryllamide wurden die eingesetzten Phenylacrylsäuren (**1 – 5, 6**) zunächst nach der Standardmethode mit DCC/HOBt als Kupplungsreagenz mit dem

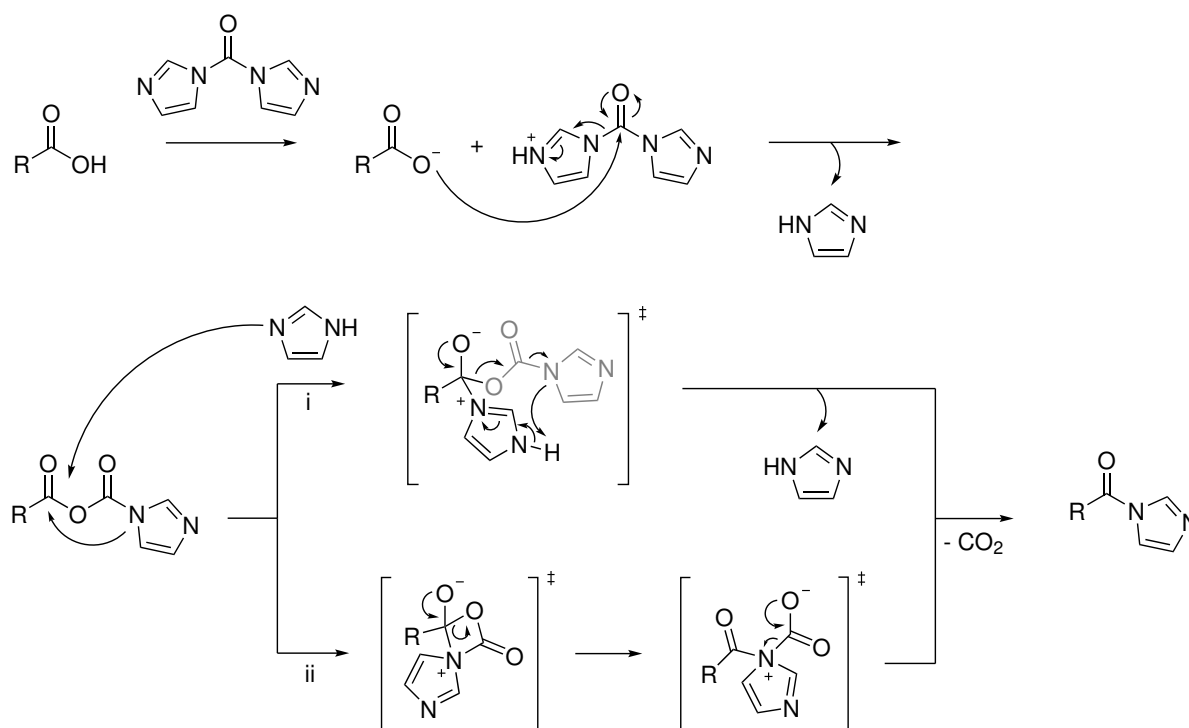


Abbildung 3.6 – Mechanismus der Bildung des Acylimidazols bei der Peptidkupplung mit CDI.

entsprechenden Phenethylamin umgesetzt. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemischs zeigte sich jedoch im NMR des vermeintlichen Produktes, dass sich lediglich die Säure an DCC addiert hatte, es aber zu keiner Weiterreaktion mit dem eingesetzten Amin gekommen war.

Aufgrund des Fehlschlags in der Synthese der Amide mit Hilfe von DCC wurde zunächst CDI als alternative Kupplungsmethode angewendet. Hierdurch konnte wie schon erwähnt auf den Einsatz einer Base verzichtet und die Amide auch als Hydrochloride eingesetzt werden. Die Amide konnten mit dieser Methode allerdings nur in geringer Ausbeute ($\leq 16\%$) erhalten werden. Zudem entstanden bei der Reaktion viele Nebenprodukte, wodurch sich die Aufarbeitung der Rohprodukte als zeitintensiv und im Verhältnis zur Ausbeute unökonomisch erwies.

In einem weiteren Versuch wurde [1-Ethyl-3-\(3-dimethylaminopropyl\)carbodiimid \(EDC\)](#) bzw. dessen Hydrochlorid eingesetzt, da der bei dieser Reaktion entstehende Harnstoff wasserlöslich ist und am Ende der Reaktion leichter abgetrennt werden konnte. Zudem konnte dadurch verhindert werden, dass es im Falle einer ähnlichen Löslichkeit der entstandenen Amide und des Harnstoffderivats im eingesetzten Lösungsmittel zu Problemen bei der Auftrennung der beiden Produkte kam. Durch den Wechsel des eingesetzten Carbodiimids konnte eine leichte Verbesserung der Ausbeuten für die Amidknüpfung erreicht werden. Diese waren jedoch mit 10–50 % noch nicht zufriedenstellend.

Als letzte Methode wurde das Benzotriazolderivat [O-\(Benzotriazol-1-yl\)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluorborat \(TBTU\)](#) als Kupplungsreagenz eingesetzt. Diese Methode erwies sich gegenüber den oben beschriebenen Syntheserouten als überlegen. Das Produkt konnte nach Entfernen des Lösemittels

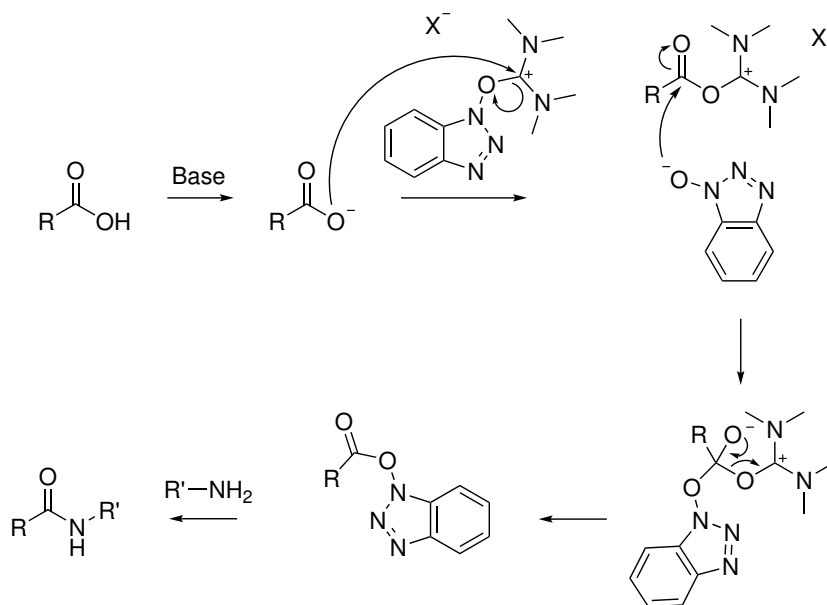


Abbildung 3.7 – Mechanismus der Peptidkupplung mit 1H-Benzotriazolenderivaten.

mit Hilfe von Wasser gefällt und in Ausbeuten von 70–90 % erhalten werden.

Zur Synthese der zwischen den Kohlenstoffen C10 und C11 gesättigten Botryllamide (Endstufen 7–25) wurden die α -substituierten Phenylacryl- oder Zimtsäuren mit verschiedenen Phenethylaminen unter Verwendung der TBTU-Methode gekuppelt (s. Abb. 3.8).

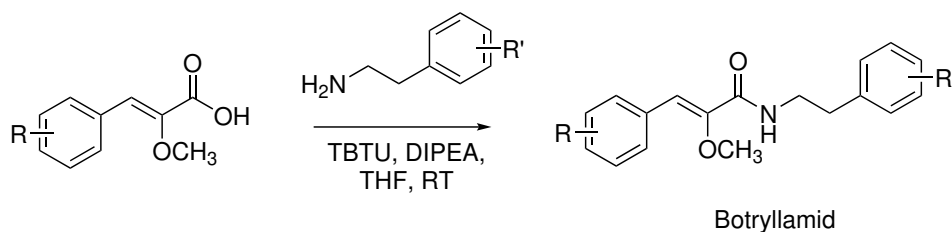


Abbildung 3.8 – Darstellung der zwischen C10 und C11 gesättigten Botryllamide 7–25.

3.2.4 Synthese der ungesättigten Amide

Für die Synthese der ungesättigten Botryllamide wurden die α -substituierten Phenylacryl- oder Zimtsäuren mit Octopamin-Hydrochlorid gekuppelt. Das entstandene Amid wurde anschließend mit Essigsäureanhydrid und Pyridin als Hilfsbase auf $100^\circ C$ erhitzt. Die Hydroxylgruppen des Amids greifen bei dieser Reaktion nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Anhydrids an. Auf diese Weise werden OH-Gruppen nach der Abspaltung von Essigsäure acetyliert (s. Abb. 3.9).[350] Dieser Schritt diente der Umwandlung der Hydroxylfunktionen in bessere Abgangsgruppen, was eine Voraussetzung für die im letzten Schritt erfolgende Eliminierung war.

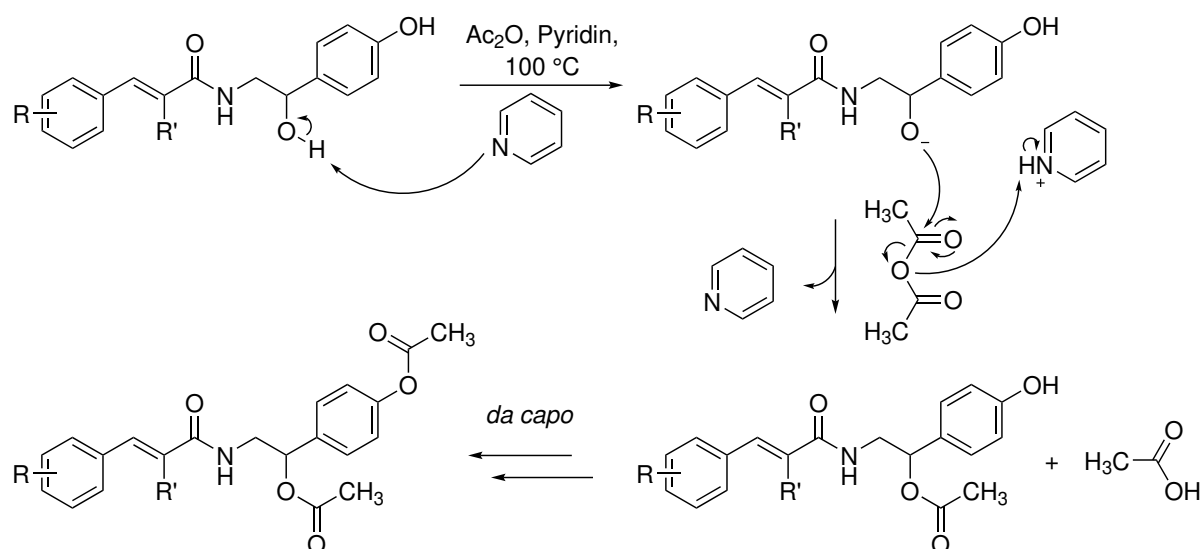


Abbildung 3.9 – Mechanismus zur Darstellung der acetylierten Vorstufen.

Der letzte Syntheseschritt zur Darstellung der ungesättigten Botryllamide erfolgte durch eine basenkatalysierte Eliminierung. Hierzu wurden die acetylierten Vorstufen mit einer katalytischen Menge Kaliumcarbonat in Dimethylsulfoxid (DMSO) auf 95 °C erhitzt. Dadurch wurde Essigsäure eliminiert, was zur Ausbildung der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffen C10 und C11 führte. Zur Abspaltung der Acetylgruppen an den phenolischen Hydroxygruppen wurde der Reaktionsansatz anschließend mit verdünnter NaOH bei Raumtemperatur gerührt und wässrig-sauer aufgearbeitet (Abbildung 3.10).[350]

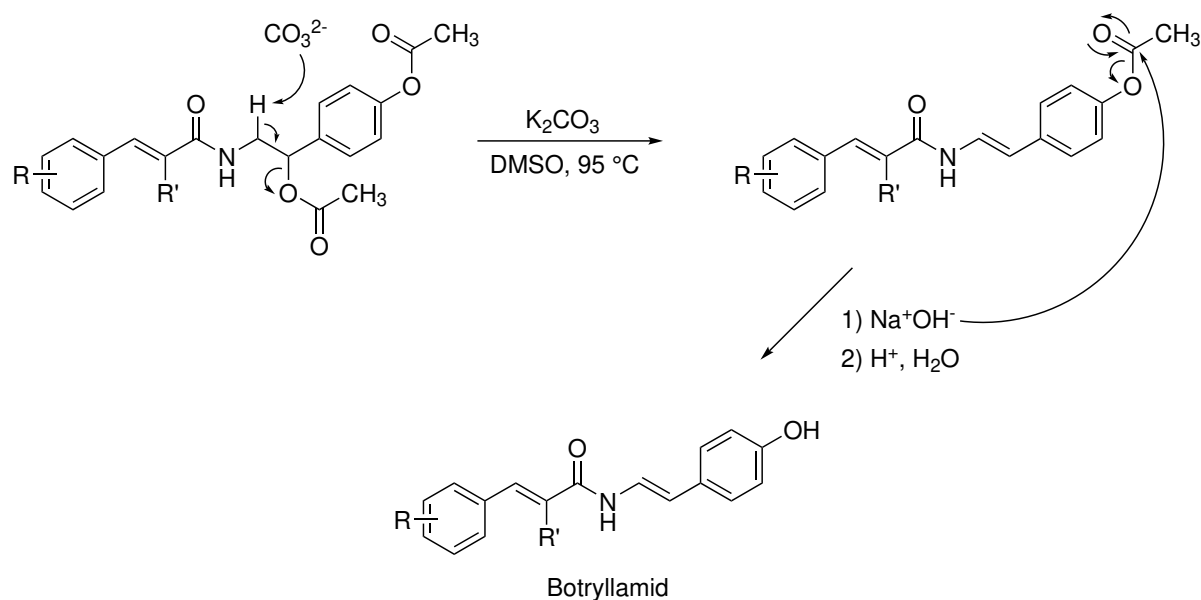


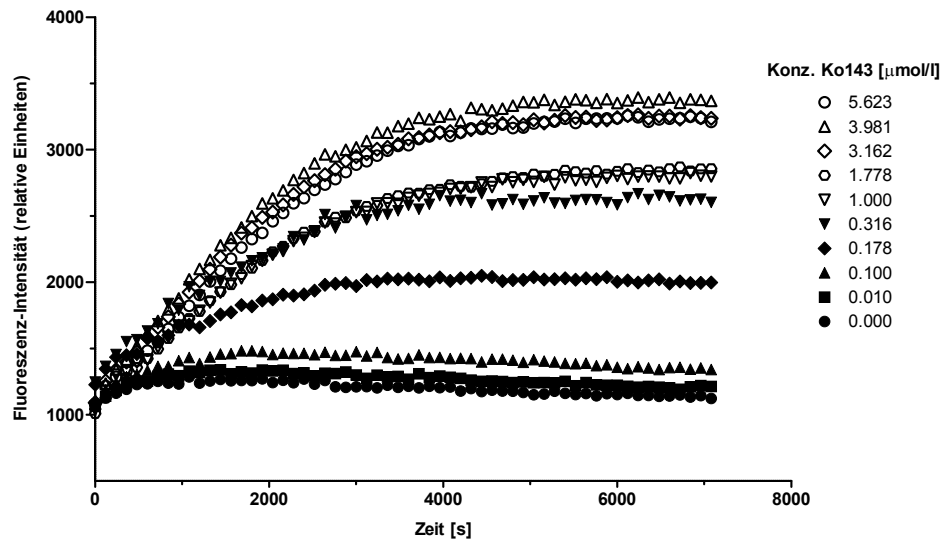
Abbildung 3.10 – Darstellung der zwischen C10 und C11 ungesättigten Botryllamid-Endstufen 42 – 49.

3.3 Biologische Testung

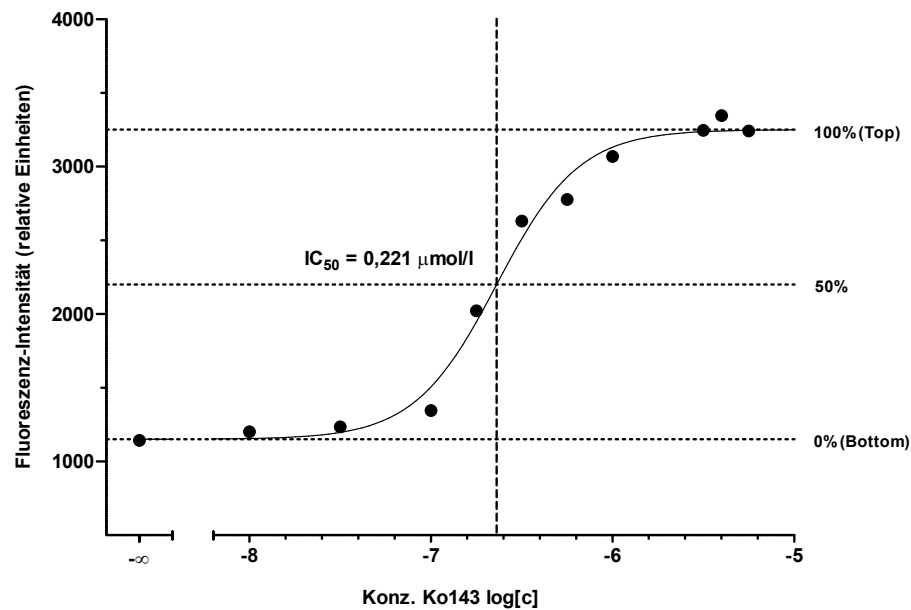
Die biologische Aktivität der neuen Verbindungen wurde mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays mit ABCG2 überexprimierenden Zellen des Typs *MDCK II BCRP* bestimmt. Das grundlegende Prinzip des Hoechst 33342-Tests basiert auf der Zunahme der Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 durch Einlagerung in eine lipophile Umgebung wie sie etwa in einer Zellmembran vorhanden ist bzw. durch die Einbindung von Hoechst 33342 an die DNA.

Da der Fluoreszenzfarbstoff auch ein Substrat von ABCG2 ist führt der aktive Transport von Hoechst 33342 durch das Transportprotein zu einer Abnahme der Gesamtfluoreszenz. Durch die Hemmung von ABCG2 wird der Efflux von Hoechst verhindert, wodurch sich der Fluoreszenzfarbstoff im Zellinneren anreichert und sich hierdurch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität ergibt. Im Hoechst 33342-Akkumulationsassay wird die Fluoreszenz in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen über einen Zeitraum von zwei Stunden vermessen. Die vermessenen Fluoreszenzwerte für jede Inhibitorkonzentration steigen stetig an bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Eine solche Kurve für den Standardinhibitor Ko143 ist in Abbildung 3.11(a) dargestellt.

Im Gleichgewichtszustand zeigen sich nur noch vernachlässigbar kleine Änderungen in der gemessenen Fluoreszenz. Dieser Zustand ist nach etwa 100 Minuten erreicht. Aus der durchschnittlichen Fluoreszenz im Gleichgewichtszustand kann für jede eingesetzte Inhibitorkonzentration eine Konzentrations-Effekt-Kurve abgeleitet werden. Mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism* wurden die Fluoreszenzdaten gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Über die Vier-Parameter bzw. Drei-Parameter logistische Gleichung mit variablem bzw. auf 1 fixiertem Hill-Koeffizienten wurden die sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Effektkurven erstellt. Aus dem Wendepunkt der Kurve der statistisch bevorzugten Gleichung kann die **halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀)** der Verbindung ermittelt werden. Dieser Wert kann anschließend sowohl zur Bewertung der inhibitorischen Aktivität einer einzelnen Substanz dienen als auch zum Vergleich der Inhibitionsstärke zwischen verschiedenen Verbindungen herangezogen werden. Die aus dem Hoechst 33342-Akkumulationsassay ermittelten Kurven für den Standardinhibitor Ko143 sind in Abbildung 3.11(b) dargestellt. Das grundlegende Prinzip und die Beschreibung der Durchführung des Hoechst 33342-Test sind dem Kapitel 8.2.3 des Experimentaltails zu entnehmen.



(a) Fluoreszenzintensität über die Zeit für verschiedene Konzentrationen des Standardinhibitors Ko143.



(b) Die aus 3.11(a) korrespondierende Konzentrations-Effekt-Kurve ($IC_{50} = 0,221 \mu\text{mol/l}$) des Standardinhibitors Ko143.

Abbildung 3.11 – Die mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelten Kurven für den Standardinhibitor Ko143.

In der Syntheseplanung wurden zunächst einige der bereits durch Takada et al. [335] synthetisierten und getesteten Botryllamide hergestellt. Es wurden drei Verbindungen synthetisiert, die in der Veröffentlichung die besten inhibitorischen Aktivitäten zeigten, sowie eine inaktive Substanz. Zu den ausgewählten Botryllamiden zählte eine zwischen den Kohlenstoffen C10 und C11 gesättigte Verbindung (Takada-16) und zwei Vertreter, deren Amidlinker ungesättigt war (Takada-20, Takada-19). Die inaktive Substanz aus dieser Reihe wies keinen Substituenten am Kohlenstoff C2 auf (Takada-18). Die jeweiligen Strukturen sind in Abb. 3.12 aufgeführt. Die vier ausgewählten Vertreter der Botryllamide wurden nachsyntheti-

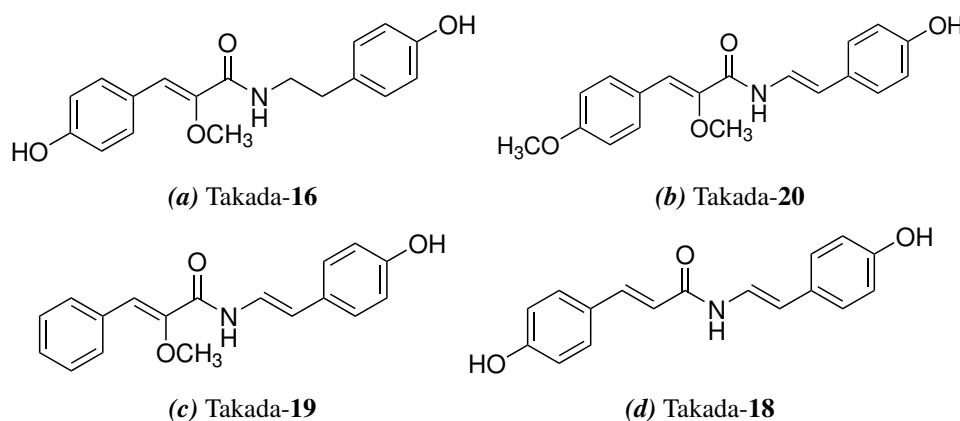
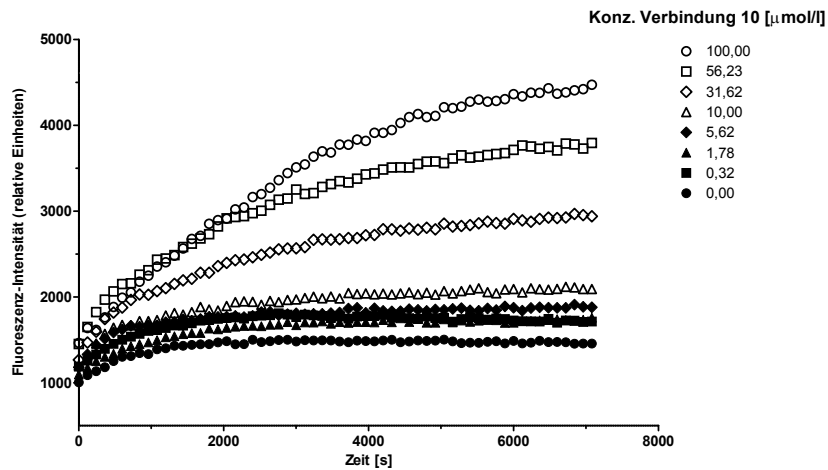


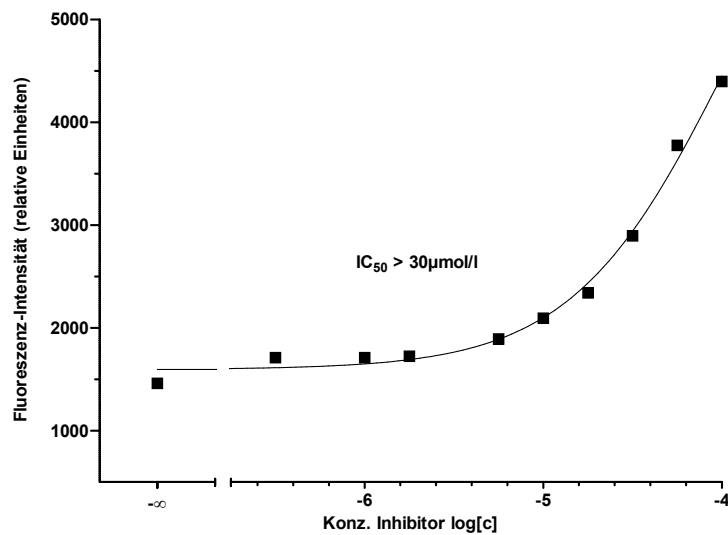
Abbildung 3.12 – Die ausgewählten Vertreter der von Takada et al. [335] synthetisierten Botryllamide und ihre IDs aus der Veröffentlichung.

siert und im Hoechst 33342-Test auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. In der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass die Verbindungen im zunächst verwendeten Messbereich (max. Inhibitor-Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$) kein Plateau erreichten. Daher wurde zunächst untersucht, ob sich durch eine Erhöhung der maximalen Inhibitor-Konzentration auf 100 $\mu\text{mol/l}$ ein Plateau im Hoechst 33342-Test einstellte. Auch durch diese Maßnahme ließ sich bei einigen Substanzen kein Top-Wert für die Fluoreszenz erreichen. Zudem stellte sich der Gleichgewichtszustand der Fluoreszenzwerte über die Zeit erst sehr spät ein. Als Beispiel für diesen Sachverhalt sind die Fluoreszenz- und Konzentrations-Effekt-Kurve für Verbindung 10 (entspricht Takada-16) in Abbildung 3.13 dargestellt. Wie der Abbildung entnommen werden kann war auch bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ noch kein Plateau erreicht worden. Da auf diese Weise keine Ermittlung des IC_{50} -Wert möglich war wurde der Top-Wert der Fluoreszenz des Standardinhibitors Ko143 für diese Substanz – und alle sich im Folgenden ähnlich verhaltenden Verbindungen – als Plateau (100 % Effekt) definiert. Daraus resultierend konnte anschließend der IC_{50} -Wert der Verbindungen ermittelt werden.

Eine Übersicht der ausgewählten Verbindungen und ihrer inhibitorischen Aktivitäten ist in Tabelle 3.1 aufgeführt. Betrachtet man die IC_{50} -Werte aus dem Hoechst 33342-Test und den Ergebnissen aus der Veröffentlichung von Takada et al. [335] so zeigt sich eine gute Korrelation der Werte untereinander. Die veröffentlichten Daten konnten somit bestätigt werden und auch die ermittelten Werte der inhibitorischen Aktivität wichen nur unwesentlich voneinander ab, sodass sich der Hoechst 33342-Akkumulationstest für



(a) Fluoreszenzintensität über die Zeit für verschiedene Konzentrationen von Verbindung **10** (entspricht Takada-16).



(b) Konzentrations-Effekt-Kurve für verschiedene Konzentrationen von Verbindung **10** (entspricht Takada-16).

Abbildung 3.13 – Beispiel für die mit dem Hoechst 33342-Akkumulationstest ermittelten Kurven für Verbindung **10** (entspricht Takada-16).

die weiteren Untersuchungen als geeignet herausstellte. Da in der Veröffentlichung von Takada et al. [335] nur einige wenige Substanzen untersucht wurden, war das Ziel zunächst eine größere Substanzbibliothek aufzubauen. Durch punktuelle Änderungen innerhalb der Grundstruktur der Verbindungen sollten auf diese Weise die essentiellen Bestandteile der Moleküle ermittelt werden, welche für eine inhibitorische Aktivität erforderlich sind bzw. positiv zu dieser beitragen. Zur detaillierten Evaluierung wurden jeweils Substanzpaare synthetisiert, die sich nur in einem Punkt innerhalb ihrer Molekülstruktur voneinander unterschieden.

Tabelle 3.1: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC₅₀-Werte der nachsynthetisierten Testsubstanzen und deren Vergleich mit den Verbindungen von Takada et al. [335]; Referenzsubstanz Ko143: IC₅₀ = 0,221 μmol/l; n = 3.

Verb.	IC ₅₀ ± σ [μmol/l]	Verb.[335]	IC ₅₀ ± σ [μmol/l][335]
10	> 30	Takada- 16	25,2 ± 1,7
43	6,15 ± 0,64	Takada- 20	6,4 ± 0,8
46	6,83 ± 0,95	Takada- 19	15,4 ± 1,0
48	> 30	Takada- 18	> 100

3.4 Auswertung

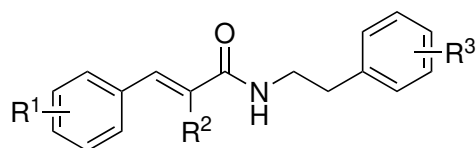
3.4.1 Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2

Aus den bisherigen Ergebnissen und Vorarbeiten ging hervor, dass für eine biologische Aktivität an ABCG2 eine ungesättigte Kohlenstoffkette zwischen C2 und C3 zwingend erforderlich ist. Daher wurden an dieser Position keinerlei Veränderungen unternommen. Der Einfluss des Substituenten am α-Kohlenstoff der Carbonylgruppe wurde hingegen nur unzureichend untersucht. Um dessen Einfluss auf die Aktivität zu überprüfen wurden verschiedene Vertreter mit unterschiedlichen Substituenten (H, OCH₃, CN) an dieser Position getestet. Das Ziel in der weiteren Vorgehensweise war es, den Einfluss der Substituenten am Phenylrest des von der Carbonsäure stammenden Teils der Substanzen zu untersuchen (C4 – C9). Da aus den bisherigen Ergebnissen und den natürlich vorkommenden Botryllamiden hervorging, dass ein elektronenschiebender Rest (OH, OCH₃) an diesem Molekülteil sich positiv auf die inhibitorische Aktivität auswirkte, wurde die Position dieser Substituenten am Arylrest variiert. Des Weiteren war von Interesse inwiefern eine gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoffkette zwischen C10 und C11 für eine inhibitorische Aktivität notwendig ist (vgl. Kap. 3.1; Abb. 3.2).

Zunächst wurden die α-substituierten Acrylsäuren (Verb. **1** – **5**) bzw. Zimtsäure mit verschiedenen Phenethylamin-Derivaten zu den entsprechenden – zwischen C10 und C11 gesättigten Kohlenstoffen – umgesetzt (s. Kap. 3.2). Die in der Literatur beschriebenen Botryllamide verfügten zumeist über eine OH-Funktionalität an Position-4 des vom Amin stammenden Phenylrest (C12 – C17). Dies wurde in den ersten synthetisierten Verbindungen berücksichtigt. Bei den weiteren Vertretern der gesättigten Botryllamide wurde die elektronische Natur des Substituenten und dessen Position abgeändert. Die Ergebnisse der biologischen Testung der zwischen C10 und C11 gesättigten Verbindungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Die Verbindungen **7** – **11** besitzen alle eine Hydroxylfunktion in Position 4 (**R**³) am Phenylrest des vom Phenethylamin stammenden Molekülteils (Kohlenstoffe C12 – C17). Betrachtet man nur den Einfluss des Substituenten (**R**¹) der anderen Phenylfunktion so stellte sich im Vergleich der Aktivitäten heraus, dass die unsubstituierte Verbindung **11** mit 9,87 μmol/l die beste inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 zeigte. Die Einführung eines Restes am Phenylring führte im Allgemeinen zu einem schlechteren IC₅₀-Wert. Den größten Einfluss zeigte dabei die Substanz **10**. Die Einführung einer OH-Gruppe in der *para*-Position

Tabelle 3.2: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC₅₀-Werte der Testsubstanzen mit gesättigtem Amidlinker; Referenzsubstanz Ko143: IC₅₀ = 0,221 μmol/l; n = 3. k.e. = kein Effekt



Verb.	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ ± σ [μmol/l]
7	3-OCH ₃	OCH ₃	4-OH	16,4 ± 1,7
8	4-OCH ₃	OCH ₃	4-OH	17,0 ± 0,7
9	3,4-OCH ₃	OCH ₃	4-OH	12,1 ± 1,8
10	4-OH	OCH ₃	4-OH	> 30
11	H	OCH ₃	4-OH	9,87 ± 1,65
12	H	H	4-OH	14,0 ± 2,0
13	3-OCH ₃	OCH ₃	4-NO ₂	8,39 ± 1,46
14	4-OCH ₃	OCH ₃	4-NO ₂	8,49 ± 2,02
15	3,4-OCH ₃	OCH ₃	4-NO ₂	7,79 ± 0,30
16	4-OH	OCH ₃	4-NO ₂	12,0 ± 0,6
17	H	H	4-NO ₂	12,6 ± 2,2
18	4-OCH ₃	OCH ₃	3-OCH ₃	8,17 ± 1,01
19	3,4-OCH ₃	OCH ₃	3-OCH ₃	k.e.
20	4-OH	OCH ₃	3-OCH ₃	> 30
21	H	OCH ₃	3-OCH ₃	17,0 ± 2,7
22	4-OCH ₃	OCH ₃	3,4-OCH ₃	9,29 ± 0,88
23	3,4-OCH ₃	OCH ₃	3,4-OCH ₃	> 30
24	4-OH	OCH ₃	3,4-OCH ₃	4,69 ± 1,29
25	H	OCH ₃	3,4-OCH ₃	9,80 ± 1,30

fürte zu einem Verlust der Hemmwirkung gegenüber ABCG2 (IC₅₀: >30 μmol/l). Dagegen bewirkte eine Methoxygruppe an dieser Position (Verbindung **8**) nur eine geringfügige Absenkung der inhibitorischen Wirkung.

Eine Variation der OCH₃-Funktion in die *meta*-Position (Verbindung **7**) bzw. die Kombination aus zwei Methoxygruppen in *meta*- und *para*-Position (Verbindung **9**) führte zu vergleichbaren Werten (**8**: 17,0 μmol/l; **7**: 16,4 μmol/l; **9**: 12,1 μmol/l) für die Inhibition von ABCG2. Ersetzte man die Methoxygruppe in α -Position zur Carbonylgruppe durch ein Wasserstoffatom und verglich die inhibitorische Aktivität der Substanz (Verbindung **12**: 14,0 μmol/l) mit der Inhibition durch die korrespondierenden Verbindung bei der die OCH₃-Funktion erhalten geblieben war (Verbindung **11**: 9,87 μmol/l) so führte dies zu einer Verschlechterung des IC₅₀-Werts. Der Effekt erwies sich jedoch als nicht so ausgeprägt wie er von Takada et al. [335] postuliert wurde, welche die Anwesenheit einer Methoxygruppe in α -Position als essentiell ansahen.

Insgesamt betrachtet zeigten sich zwischen den Substanzen **7** – **11** keine sehr großen Unterschiede in ihren biologischen Wirkungen. Die Ermittlung der Signifikanz der Differenzen in den Aktivitätsdaten mittels einfachem T-Test ergab, dass der Einfluss des Substituenten am linken Phenylrest sich in folgender Reihenfolge auf die inhibitorische Aktivität auswirkte: $R^1 = H = 3,4\text{-OCH}_3 > 3\text{-OCH}_3 = 4\text{-OCH}_3 \gg 4\text{-OH}$. Ein unsubstituierter Phenylrest ($R^1 = H$) stellte die aktivste Verbindung in dieser Reihe dar. Eine doppelte Substitution mit Methoxyresten war gegenüber der einfachen Substitution bevorzugt. Eine Hydroxyfunktion am Phenylrest führte zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Substituenten am Phenethylaminrest (R^3) untersucht. Hierzu wurde die elektronische Eigenschaft des Restes umgekehrt und die Hydroxylfunktion in Position 4 durch eine Nitrogruppe ersetzt. Durch diese Veränderung konnten die inhibitorischen Aktivitäten der Substanzen leicht verbessert werden. So zeigte sich, dass bei Substanz **10** ($>30 \mu\text{mol/l}$) der Austausch der OH-Funktion durch die Nitrogruppe (Verbindung **16**; $12,0 \mu\text{mol/l}$) eine Verbesserung des IC_{50} -Wert bewirkte. Auch bei den Isomeren mit Methoxygruppen als Substituenten am linken Phenylrest ($R^1 = 3\text{-OCH}_3, 4\text{-OCH}_3, 3,4\text{-OCH}_3$) konnte durch die Einführung der NO_2 -Funktion die Aktivitäten der korrespondierenden Verbindungen etwas verbessert werden (**13**: $8,39 \mu\text{mol/l}$; **14**: $8,49 \mu\text{mol/l}$; **15**: $7,79 \mu\text{mol/l}$). Der elektronenziehende mesomere Effekt der Nitrogruppe wirkte sich demnach positiv auf die Hemmwirkung der Substanzen aus.

Eine Ausnahme bildete Verbindung **17**, die bis auf die NO_2 -Funktion keine anderen Substituenten trug. Substanz **17** und ihr Analogon mit Hydroxygruppe (Verbindung **12**) inhibierten mit vergleichbaren Werten (**12**: $14,0 \mu\text{mol/l}$; **17**: $12,6 \mu\text{mol/l}$). Auch für Verbindung **17** zeigte sich, dass eine Methoxygruppe in α -Position für eine inhibitorische Wirkung nicht zwingend erforderlich schien (**17**: $12,6 \mu\text{mol/l}$; **12**: $14,0 \mu\text{mol/l}$).

Auch in der Reihe der Nitroverbindungen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den Hemmwirkungen gegenüber ABCG2. Ein Signifikanz-Test der Unterschiede in den Aktivitätsdaten ergab folgende Reihenfolge für die Substituenten: $R^1 = 3,4\text{-OCH}_3 = 4\text{-OCH}_3 = 3\text{-OCH}_3 > 4\text{-OH} = H$. Die Substanzen mit einer Methoxygruppe als Substituenten am Phenylrest stellten die aktivsten Vertreter innerhalb der Reihe der Nitroverbindungen dar. Ein Einfluss der Position oder Anzahl von Methoxygruppen konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden. Eine Hydroxyfunktion am Phenylrest ($R^1 = 4\text{-OH}$) verschlechterte die inhibitorische Wirkung gegenüber ABCG2 und führte zu einer vergleichbaren Hemmwirkung wie eine komplett unsubstituierte Nitroverbindung ($R^1, R^2 = H$).

Um zu untersuchen inwiefern ein nur mäßig elektronenschiebender Effekt sich auf die inhibitorische Wirkung der Substanzen auswirkte, wurde zunächst eine einzelne Methoxygruppe in der *meta*-Position am Phenethylrest eingeführt. Des Weiteren war eine Kombination aus *meta*- und *para*-Position von Interesse, um den Einfluss der Platzierung am Phenylrest selbst, sowie den Effekt einer doppelten Substitution zu ermitteln. Für Verbindung **20** stellte sich heraus, dass durch die Methoxygruppe keine Verbesserung der Aktivität erreicht wurde (IC_{50} : $>30 \mu\text{mol/l}$). Auch im Falle von Substanz **21** konnte die inhibitorische Wirkung gegenüber der korrespondierenden Hydroxyverbindung (Substanz **11**) nicht verbessert werden. Nur bei der Testverbindung **18** wurde durch die Methoxygruppe in *meta*-Position ein

IC₅₀-Wert (8,17 µmol/l) erreicht, der im Vergleich zur Substanz **8** (17,0 µmol/l) zweifach verbessert war und eine vergleichbare Inhibitionsstärke wie die entsprechende Verbindung mit einer 4-NO₂-Funktion (Substanz **14**; 8,49 µmol/l) aufwies. Für den linken Phenylrest **R**¹ führte auch hier die Substitution mit einer OH-Gruppe zu einer Inaktivität (IC₅₀: >30 µmol/l).

Die Einführung einer weiteren Methoxygruppe in *para*-Position hatte bei den doppelt-substituierten Substanzen **22** – **25** unterschiedliche Auswirkungen auf die Inhibitionsstärke zur Folge. So konnte festgestellt werden, dass die Verbindung **22** (**R**¹ = 4-OCH₃) mit einem IC₅₀-Wert von 9,29 µmol/l in vergleichbarer Weise inhibierte wie die Verbindungen **18** (IC₅₀: 8,17 µmol/l) und **14** (IC₅₀: 8,49 µmol/l). Sie war jedoch gegenüber Substanz **8** (IC₅₀: 17 µmol/l) doppelt so aktiv.

Eine Verbesserung in der inhibitorischen Wirkung durch die zusätzliche Methoxygruppe wurde beim Substanzpaar **25/21** beobachtet (**25**: 9,80 µmol/l; **21**: 17,0 µmol/l). Dadurch konnte in etwa dieselbe Aktivität erreicht werden wie bei Verbindung **11**, welche die stärker elektronenschiebende OH-Gruppe trug. Der deutlichste Effekt durch das *meta*- und *para*-Substitutionsmuster der Methoxygruppen zeigte sich bei Substanz **24** (IC₅₀: 4,69 µmol/l).

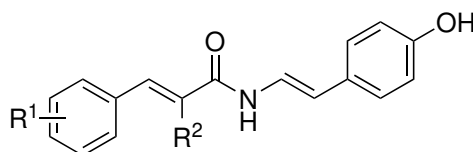
Im Vergleich zur monosubstituierten Verbindung **20** (**R**³ = 3-OCH₃) und dem entsprechenden Analogon mit Hydroxylgruppe (Substanz **10**, **R**³ = 4-OH) konnte durch die vorgenommene Variation eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität erzielt werden. Ebenso war die Verbindung **24** aktiver als die entsprechende Substanz mit einer NO₂-Gruppe (Substanz **16**, **R**³ = 4-NO₂) am Phenethylrest. Insgesamt betrachtet stellte sich Verbindung **24** als aktivste Substanz innerhalb der Botryllamide mit gesättigtem Amidlinker heraus.

Aus den Ergebnissen der Testung der von Takada et al. [335] stammenden Botryllamide (vgl. Tabelle 3.1, Seite 50) ging hervor, dass diejenigen Substanzen, welche eine vollständig ungesättigte Struktur besaßen (Verb. **43** und **46**) eine bessere inhibitorische Aktivität zeigten als die ungesättigte Verbindung **10**. Daher wurden zunächst weitere Vertreter synthetisiert deren Amidlinker komplett ungesättigt war. Des Weiteren wurde der Einfluss des Substituenten in α -Position zur Carbonylgruppe am Kohlenstoff C2 untersucht.

Hierzu wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben verfahren und die verschiedenen α -substituierten Acrylsäuren mit Octopamin-Hydrochlorid gekuppelt und nach Acetylierung der OH-Funktionen unter Basenkatalyse dehydratisiert. Die Ergebnisse der biologischen Testung der Substanzen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Beim Vergleich der Aktivitäten der Testverbindungen **42** – **47** mit ihren isomeren Strukturen mit gesättigtem Amidlinker (Substanzen **7** – **12**; vgl. Tabelle 3.2, Seite 51) zeigte sich, dass durch die ungesättigten Botryllamide die inhibitorische Aktivität im Allgemeinen etwas verbessert werden konnte.

Für Verbindung **42** (IC₅₀: 8,66 µmol/l) konnte die inhibitorische Wirkung zum korrespondierenden Amid **7** (IC₅₀: 16,4 µmol/l) mit gesättigter Linker-Struktur etwas verbessert werden. Ein stärkerer Effekt auf die Hemmwirkung gegenüber ABCG2 wurde für die Substanzpaare **44/9** und **43/8** beobachtet. Hier führte die ungesättigte Linkerstruktur zu einer doppelt so hohen Aktivität der Testverbindungen. Noch deutlicher wirkte sich die Veränderung auf Substanz **10** (IC₅₀: >30 µmol/l) aus. Durch die Einführung der ungesättigten Kohlenstoffkette bei Verbindung **45** (IC₅₀ = 7,82 µmol/l) konnte nun eine Aktivität

Tabelle 3.3: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC_{50} -Werte der Testsubstanzen mit ungesättigtem Amidlinker; Referenzsubstanz Ko143: $IC_{50} = 0,221 \mu\text{mol/l}$; $n = 3$.


Verb.	R ¹	R ²	IC ₅₀ ± σ [μmol/l]
42	3-OCH ₃	OCH ₃	8,66 ± 0,67
43	4-OCH ₃	OCH ₃	6,15 ± 0,64
44	3,4-OCH ₃	OCH ₃	5,03 ± 1,06
45	4-OH	OCH ₃	7,82 ± 1,15
46	H	OCH ₃	6,83 ± 0,97
47	H	H	4,80 ± 0,40
48	4-OH	H	> 30
49	H	CN	> 30

gegenüber ABCG2 beobachtet werden. Bei dem unsubstituierten Botryllamid **47** ($R^1, R^2 = H$) stellte sich die ungesättigte Struktur aktiver dar als das gesättigte Analogon **12** (Verbindung **47**: $4,80 \mu\text{mol/l}$; Verbindung **12**: $14,0 \mu\text{mol/l}$). Aus den Ergebnissen ließ sich somit schlussfolgern, dass für die untersuchten Botryllamidpaare sich eine ungesättigte Struktur innerhalb des Amidlinkers positiv auf die Inhibitionsstärke auswirkte. Dies konnte auf die verminderte Drehbarkeit der entsprechenden Amide und ihr starrereres Molekülgerüst zurückgeführt werden.

Betrachtet man den Einfluss des Substituenten R^1 bei den Testverbindungen, die einen Methoxyrest in α -Position tragen (Verbindungen **42** – **46**) so zeigte die Substanz **42** die geringste inhibitorische Aktivität ($R^1 = 3\text{-OCH}_3$, IC_{50} : $8,66 \mu\text{mol/l}$). Durch eine Methoxygruppe in *para*-Position konnte die Wirkung geringfügig erhöht werden (Verbindung **43**: $6,15 \mu\text{mol/l}$). Obwohl die *meta*-substituierte Substanz eine schlechtere Wirksamkeit aufwies war die Kombination der Methoxygruppen in *meta*- als auch *para*-Position (Verbindung **44**: $5,03 \mu\text{mol/l}$) in ihrer Inhibitionsstärke etwas effektiver als die der monosubstituierten Analoga **42** und **43**. Ein signifikanter Unterschied der Aktivitätswerte der Verbindungen **42**, **43** und **44** konnte nach einfachem t-Test jedoch nur zwischen den Substanzpaaren **42/43** und **42/44** beobachtet werden. Für einen Methoxyrest als Substituenten an Position R^1 ergab sich somit die Reihenfolge: $3,4\text{-OCH}_3 = 4\text{-OCH}_3 > 3\text{-OCH}_3$. Daraus konnte geschlossen werden, dass die *meta*-Position keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hatte. Die Testsubstanz **45**, welche eine Hydroxygruppe in *para*-Position trug inhibierte mit einem IC_{50} -Wert von $7,82 \mu\text{mol/l}$. Für die unsubstituierte Verbindung **46** konnte eine Hemmwirkung von $6,83 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Zwischen beiden Substanzen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Aktivität festgestellt werden.

Der Effekt des Substituenten R^2 in α -Position zur Carbonylgruppe des Amidlinkers wurde ebenfalls untersucht. Der Ersatz der Methoxygruppe durch ein Wasserstoffatom hatte unterschiedliche Auswir-

kungen auf die Aktivität der getesteten Substanzen. Die Verbindung **47** ($R^2 = H$) inhibierte mit einem IC_{50} -Wert von $4,80 \mu\text{mol/l}$. Sie zeigte gegenüber Substanz **46** ($R^2 = OCH_3$, IC_{50} : $6,83 \mu\text{mol/l}$) eine etwas stärkere Aktivität gegenüber ABCG2. Der Austausch der Methoxygruppe durch ein Wasserstoffatom führte beim Substanzpaar **48/45** zum gegenteiligen Effekt. Während Verbindung **45** mit einem IC_{50} -Wert von $7,82 \mu\text{mol/l}$ eine schwache Hemmwirkung gegenüber ABCG2 zeigte konnte beim Botryllamid **48** (IC_{50} : $>30 \mu\text{mol/l}$) kein modulierender Effekt mehr beobachtet werden.

Die Einführung eines stark elektronenziehenden Substituenten α -Position zur Carbonylgruppe führte bei Verbindung **49** ebenfalls zum Verlust der inhibitorischen Wirkung. Dies wurde als Anzeichen für die Bevorzugung von elektronenschiebenden Substituenten gedeutet.

Die aktivste Verbindung in der Reihe der Botryllamide mit gesättigtem Amidlinker stellte Substanz **47** dar. Das Fehlen einer Methoxygruppe in α -Position führte in diesem Fall nicht zu einer Inaktivität gegenüber ABCG2. Insofern konnte die Annahme von Takada et al. [335], welche die Anwesenheit einer Methoxygruppe in α -Position als essentiell ansahen, nicht bestätigt werden. Ein Vergleich zwischen den Amiden mit gesättigter und ungesättigter Linker-Struktur zeigte, dass in den meisten Fällen die Botryllamide mit einem komplett ungesättigtem Molekülgerüst eine etwas stärkere Inhibition gegenüber ABCG2 aufwiesen.

Insgesamt gesehen war jedoch das Botryllamid **24** mit einem IC_{50} -Wert von $4,69 \mu\text{mol/l}$ noch etwas besser und zeigte die stärkste Hemmwirkung gegenüber ABCG2. Die Struktur besaß mit einem gesättigtem Amid-Linker ebenfalls ein Strukturelement was ursprünglich als Voraussetzung für eine Aktivität gegenüber ABCG2 angesehen wurde. Die Thesen von Takada et al. [335] konnten durch die durchgeführten Untersuchungen somit nicht bestätigt werden.

3.4.2 Untersuchungen zur Selektivität gegenüber ABCB1

Für ausgewählte Vertreter der getesteten Botryllamide wurde die Selektivität der Substanzen gegenüber dem ABC-Transporter ABCB1 (P-Glykoprotein) untersucht, welcher ebenfalls eine zentrale Rolle in der durch die Familie der ABC-Transportproteine vermittelten Multidrug-Resistenz einnimmt. Hierzu wurde die Hemmwirkung der Botryllamide an ABCB1 mit Hilfe des Calcein AM-Akkumulationsassays bestimmt (s. Kapitel 8.2.3).

Die Grundlage des Assays beruht auf der intrazellulären Akkumulation von Calcein, welches durch unspezifische Esterasen im Inneren der Zelle aus dem nicht-fluoreszierenden Calcein AM gebildet wird. Das nach der Hydrolyse negativ geladene Calcein verbleibt im Zellinneren und kann über die Zunahme der Fluoreszenz vermessen werden. Die intrazelluläre Konzentration von Calcein AM wiederum wird durch die Effluxrate des Transportproteins bestimmt. Durch die Hemmung des Transportprozesses kann die gemessene Fluoreszenzzunahme mit der inhibitorischen Aktivität des eingesetzten Modulators korreliert und der korrespondierende IC_{50} -Wert bestimmt werden.

Die Hemmwirkung der untersuchten Substanzen wurde über ein Screeningverfahren mit der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie A2780 adr ermittelt. Dazu wurde für jede der Verbindungen bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ die relative Fluoreszenz (F_{rel}) der Modulatoren im Vergleich zum

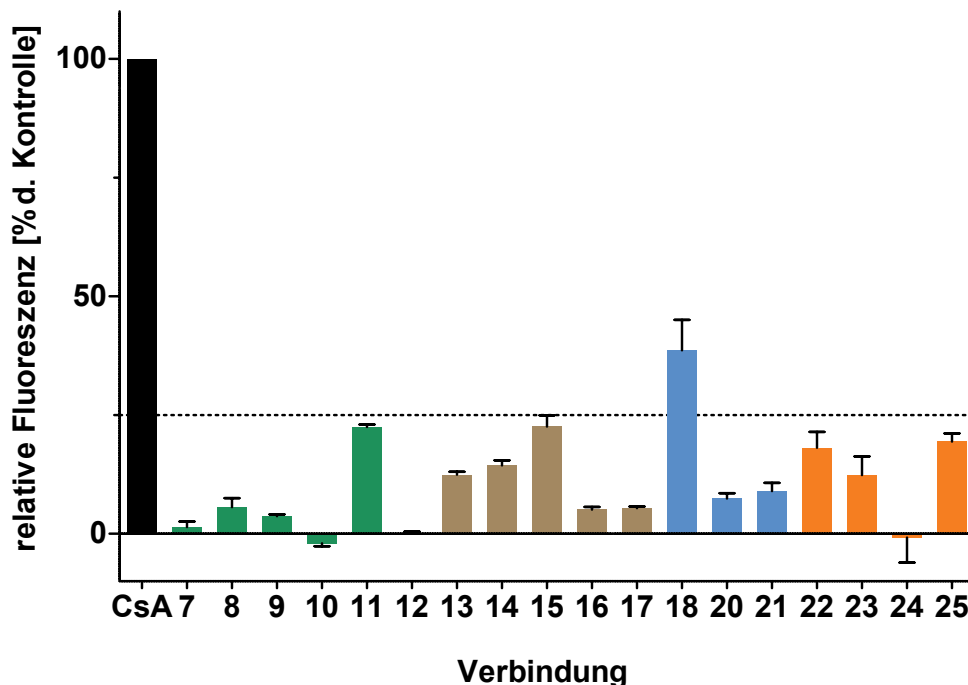


Abbildung 3.14 – Ergebnisse der relativen Fluoreszenzmessungen der Verbindungen mit $R^3 = 4\text{-OH}$ (grün), 4-NO_2 (braun), 3-OCH_3 (hellblau), $3,4\text{-OCH}_3$ (orange) bei $10\ \mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Standardinhibitor Cyclosporin A ($10\ \mu\text{mol/l}$); $n = 3$.

Standardinhibitor Cyclosporin A (Kontrolle) bestimmt.

In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse des Screenings für die Botryllamide mit gesättigtem Amid-Linker aus Tabelle 3.2 auf Seite 51 dargestellt. Für die Substanzen, welche eine Hydroxygruppe in *para*-Position am rechten Phenylrest (R^3) tragen (Botryllamide 7 – 12) konnte für die meisten der Verbindungen nur eine sehr schwache inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 nachgewiesen werden. Der relative Fluoreszenzwert lag bei $10\ \mu\text{mol/l}$ in einem Bereich von $<10\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Eine Ausnahme bildete hier die Testverbindung 11, welche mit einer etwa 20 %igen Hemmung aktiver war als die anderen Derivate in dieser Reihe. Substanz 11 wies am linken Phenylrest (R^1) keinen Substituenten auf und stellte für die Hemmung von ABCB1 die aktivste Verbindung dar. Für die Testsubstanzen mit einer Nitrogruppe in *para*-Position am rechten Phenylrest (R^3) stellten sich die Substanzen, welche Methoxygruppen als Rest R^1 trugen am aktivsten heraus. Eine Monosubstitution mit einer OCH_3 -Gruppe führte bei den Verbindungen 13 und 14 zu einer 12–14 %igen Hemmung von ABCB1. Die Einführung einer weiteren Methoxygruppe bewirkte bei Substanz 15 eine Zunahme der relativen Fluoreszenz auf $\approx 23\%$. Die Derivate 16 und 17 ($R^1 = 4\text{-OH}$, H), welche eine Hydroxygruppe bzw. keine Substitution aufwiesen, zeigten keine signifikante Inhibition gegenüber ABCB1 ($F_{rel} = <10\%$).

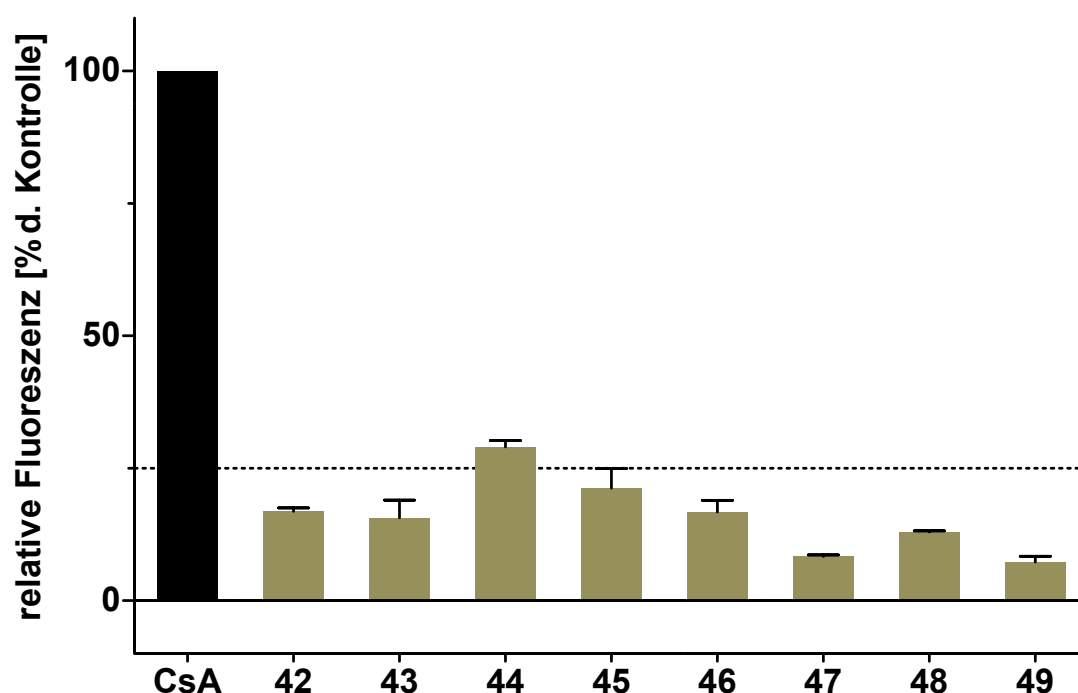


Abbildung 3.15 – Ergebnisse der relativen Fluoreszenzmessungen der Verbindungen mit ungesättigtem Amidlinker bei 10 $\mu\text{mol/l}$ bezogen auf den Standardinhibitor Cyclosporin A (10 $\mu\text{mol/l}$); $n = 3$.

Aus Abbildung 3.14 geht hervor, dass beim Vergleich der Verbindungen mit einer Methoxygruppe am rechten Phenylrest ($R^3 = 3\text{-OH}$) besonders Substanz **18** hervor stach. Diese verfügt am linken Phenylrest (R^1) über eine Methoxygruppe in *para*-Position und führte zu einem relativ hohen Fluoreszenzwert ($F_{rel} \approx 40\%$). Auch hier zeigten die Analoga **20** ($R^1 = 4\text{-OH}$) und **21** ($R^1 = \text{H}$) keinerlei Aktivität gegenüber ABCB1.

Verbindungen mit einer Disubstitution von Methoxygruppen am rechten Phenylrest ($R^3 = 3,4\text{-OCH}_3$) zeigten insgesamt nur eine schwache bis keine inhibitorische Wirkung gegenüber ABCB1. Während Substanzen **22**, **23** und **25** mit einer relativen Fluoreszenz im Bereich von $F_{rel} = 12 - 19\%$ noch schwach inhibierten, zeigte Verbindung **24** keinen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz.

Die Ergebnisse des Screenings der Testverbindungen mit ungesättigtem Amidlinker (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 54) sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Substanzen **42** ($R^1 = 3\text{-OCH}_3$) und **43** ($R^1 = 4\text{-OCH}_3$) zeigten mit einer relativen Fluoreszenz von $\approx 17\%$ nur schwache inhibitorische Eigenschaften gegenüber ABCB1. Dagegen führte die Kombination zweier Methoxygruppen bei Verbindung **44** ($R^1 = 3,4\text{-OCH}_3$) zu einem Anstieg der Fluoreszenz auf $F_{rel} \approx 30\%$.

Durch die Einführung einer Hydroxyfunktion bei Verbindung **45** ($R^1 = 4\text{-OH}$) sank die Fluoreszenz auf $\approx 20\%$ der Kontrolle. Das unsubstituierte Derivat **46** zeigte eine ähnliche relative Fluoreszenz wie die mit einer Methoxygruppe monosubstituierten Analoga **42** und **43**.

Die Verbindungen **47**, **48** und **49**, bei denen die OCH₃-Gruppe in α -Position zur Carbonylgruppe durch ein Wasserstoffatom (**47**, **48**) bzw. eine Nitrilgruppe (**49**) ausgetauscht wurde, zeigten nur eine sehr schwache Inhibition gegenüber ABCB1 ($F_{rel} = 8\%$, 13% bzw. 7%).

3.5 Ergebnisse und Ausblick

Ausgehend von unterschiedlichen Benzaldehyden wurden verschiedene Botryllamide mit gesättigter (**7** – **25**) und ungesättigter (**42** – **49**) Linkerstruktur hergestellt und auf ihre Hemmwirkung gegenüber ABCG2 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine durchgehend ungesättigte Struktur innerhalb des Amidlinkers die Hemmwirkung positiv beeinflusste, jedoch nicht zwingend erforderlich ist. So zeigten die Botryllamide **15** und **24**, mit einer gesättigten Linker-Struktur zwischen den Kohlenstoffen C10 und C11, ebenfalls eine Inhibition von ABCG2.

Der Einfluss des Substituenten in α -Stellung zur Carbonylfunktion auf die inhibitorische Wirkung der Botryllamide konnte nicht eindeutig geklärt werden. Wiesen die natürlichen Botryllamide an dieser Stelle zumeist eine Methoxygruppe auf, so konnte bei den Desmethoxyanaloga **47**, **12** und **17** kein Verlust der Aktivität festgestellt werden. Bei dem Substanzpaar **45/48** hingegen führte der Ersatz der Methoxygruppe in α -Stellung zur Inaktivität gegenüber ABCG2. Durch den Wechsel zu einem elektronenziehenden Substituenten (CN) bei Substanz **49** wurde die Hemmung von ABCG2 im Vergleich zur korrespondierenden methoxytragenden Verbindung **46** ebenfalls vollständig aufgehoben.

Eine ungesättigte Linker-Struktur, sowie eine Substitution mit einem Methoxyrest in α -Stellung zur Carbonylfunktion erwiesen sich bei den untersuchten Verbindungen somit nicht als essentielle Strukturmerkmale. Somit konnten diese ursprünglich von Takada et al. [335] postulierten Struktur-Wirkungsbeziehungen der Botryllamide nicht bestätigt werden.

Hingegen konnte die Annahme von Takada et al. [335], dass Variationen an den Substituenten der beiden Arylgruppen die Wirksamkeit bzw. den Grad der Hemmung nicht signifikant beeinflussten bestätigt werden. Bei vielen der untersuchten Botryllamide war der Einfluss der Substituenten an den Phenylresten auf die Unterschiede in den biologischen Aktivitäten nicht signifikant.

Die untersuchten Botryllamide waren insgesamt selektiv bezüglich ihrer Aktivität gegenüber ABCG2. Im Vergleich mit dem weiteren, wichtigen Transportprotein ABCB1 konnten nur zwei Substanzen eine relative Calcein-Fluoreszenz von mehr als 25 % im Vergleich mit dem Standardinhibitor Cyclosporin A von ABCB1 bewirken.

Die aktivste Verbindung innerhalb der untersuchten Botryllamide stelle Verbindung **24** dar, welche mit einem IC₅₀-Wert von 4,69 $\mu\text{mol/l}$ hemmte. Eine ähnlich starke Inhibition von ABCG2 wie mit dem Standardinhibitor Ko143 (IC₅₀ = 0,221 $\mu\text{mol/l}$) konnte jedoch nicht erreicht werden. Die untersuchten Botryllamide besaßen insgesamt gesehen nur eine schwache inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2, daher wurde auf die Synthese weiterer Derivate verzichtet und die Arbeit mit der Auffindung anderer Substanzklassen als ABCG2-Inhibitoren fortgeführt.

Monocarbonylanaloga von Curcumin (MACs) als ABCG2-Inhibitoren

4.1 Allgemeines

Seit der Entdeckung von ABCB1 im Jahre 1976 und der mit der Überexpression dieses ABC-Transporters verbundenen Multidrug-Resistenz wurden drei Generationen von ABCB1-Inhibitoren entwickelt, die Einzug in klinische Studien gefunden haben.[351] Keine der Verbindungen hat jedoch die Zulassung für die Anwendung in der Praxis erhalten. Dies war vor allem der Toxizität der Substanzen geschuldet. Die Inhibitoren der ersten Generation (z.B. Verapamil und Cyclosporin A) wurden in Konzentrationen eingesetzt, bei denen die resultierende Toxizität auf ihre primären pharmakologischen Wirkungen zurückzuführen ist (Herzrhythmusstörungen bzw. Immunsuppression). Bei den Inhibitoren der zweiten Generation (z.B. Valspodar) war vor allem die Ausscheidung von gleichzeitig verabreichten Krebsmedikamenten durch die Cytochrome P450 gestört und daher für ein Versagen in den klinischen Studien verantwortlich.[3, 351, 352]

Zu den potenziell sichereren Alternativen, die untersucht wurden, gehören verschiedene Pflanzenstoffe.[353] Einige dieser Pflanzenmetabolite können die Aktivität von ABC-Transportern inhibieren und sind in unserer Ernährung allgegenwärtig. Einer der vielversprechendsten Pflanzenstoffe ist Curcumin, welches aus der Kurkuma-Pflanze stammt und ein üblicher Bestandteil von Currypulver ist (s. Abb. 4.1).[354] Curcumin kann die Aktivität von ABCB1, ABCG2, ABCC1 und auch ABCC5 hemmen. ABCC5 ist ein Transporter, der in Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Gemcitabin und 5-Fluoruracil bei der Therapie von Bauchspeicheldrüsenkrebs steht.[353, 355] Ein Nachteil von Curcumin sind die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften des Naturstoffs *in vivo*. [356] Curcumin wird nur langsam über den Darmtrakt absorbiert und zudem schnell vom Körper metabolisiert. Beide Effekte führen insgesamt zu sehr niedrigen Plasmakonzentrationen.[357] Trotz oraler Applikation von 8–12 g in klinischen Phase I Studien konnten lediglich Plasmakonzentrationen im nanomolaren-Bereich erreicht werden.[358, 359]

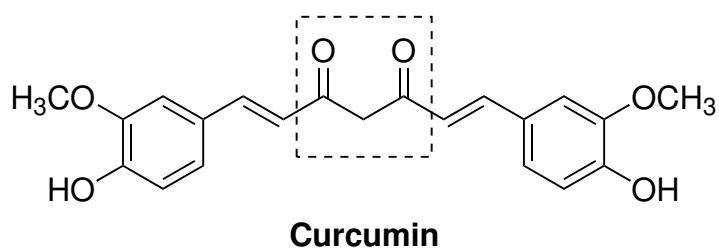


Abbildung 4.1 – Struktur von Curcumin in seiner 1,3-Diketoforn. Die pharmakologisch instabile β -Ketofunktion ist durch ein Kästchen angedeutet.

Da Curcumin die Aktivität der ABC-Transporter bei *in vitro*-Experimenten erst im mikromolaren-Bereich inhibierte gestaltete sich das Erreichen von entsprechenden Plasmakonzentrationen *in vivo* als sehr schwierig. [249, 355, 360, 361]

Eine Methode die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften von Curcumin zu verbessern war der Ersatz der 1,3-Diketogruppe durch einen Monocarbyl-Linker.[362, 363] Die β -Ketofunktion ist ein mögliches Ziel für Leberenzyme (z.B. Aldoketoreduktasen) und ist einer der Gründe für die Instabilität von Curcumin *in vivo*.[356] Die sogenannten **Monocarbylanaloga des Curcumins (MACs)** verfügen über eine verbesserte Verteilung in Tierversuchen und scheinen keine Verschlechterung der Toxizität zu verursachen. Sie verfügen zudem über eine ähnliche oder stärkere biologische Aktivität im Vergleich mit Curcumin hinsichtlich ihrer chemotherapeutischen, antibakteriellen, entzündungshemmenden und anti-oxidativen Eigenschaften.[356, 362]

Im Folgenden Kapitel sollten verschiedene MACs mit einem Cyclohexanonring als Linkerstruktur synthetisiert werden, die über zwei Methylidengruppen mit identischen Arylresten verbunden waren (s. Abb. 4.2). Die Verbindungen wurden anschließend auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 und ihre Selektivität im Hinblick auf ABCB1 untersucht.

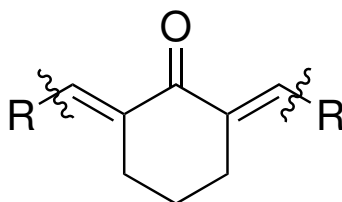


Abbildung 4.2 – Struktur der Cyclohexanon-basierten Monocarbylanaloga (MACs) von Curcumin.

4.2 Synthese

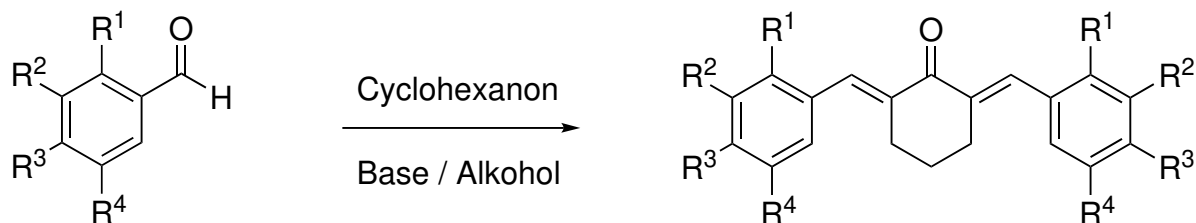
Die Verbindungen wurden im Allgemeinen durch eine Aldolkondensation der entsprechenden Aldehyde mit Cyclohexanon im alkalischen Milieu erhalten.[364] Die übliche Syntheseroute der Monocarbonylanaloga ist in Abbildung 4.3(a) gezeigt. Alle Reaktionen wurden in einem Molverhältnis von 2:1 für die korrespondierenden Aldehyde und Cyclohexanon durchgeführt. Aus den $^1\text{H-NMR}$ -Daten ging hervor, dass für die Methylengruppen nur zwei Signale auftauchten. Die Abwesenheit zweier zusätzlicher CH_2 -Funktionen in den Spektren ließ darauf schließen, dass keine monosubstituierten Verbindungen mit nur einem kondensierten Arylring entstanden waren. Für die Synthese von Verbindungen **62** und **63** mussten unter den alkalischen Bedingungen zunächst die Hydroxylfunktionen der Ausgangsverbindungen Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) und 4-Hydroxybenzaldehyd geschützt werden (s. Abb. 4.3(b)). Dazu wurden die Aldehyde mit 3,4-Dihydro-2*H*-pyran in Anwesenheit von Pyridin und Pyridinium *p*-Toluolsulfonat (PPTS) zum Tetrahydropyranylether umgesetzt.[365] Die entsprechenden Kondensationsprodukte (Substanzen **60** und **61**) konnten anschließend durch die basenkatalysierte Reaktion mit Cyclohexanon gewonnen werden. Verbindungen **60** und **61** wurden daraufhin mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) in Methanol (MeOH) behandelt wodurch die Schutzgruppen hydrolysiert wurden. Dies führte schließlich zu den Endstufen **62** und **63** mit ihren freien Hydroxylfunktionen.[366]

4.3 Biologische Testung

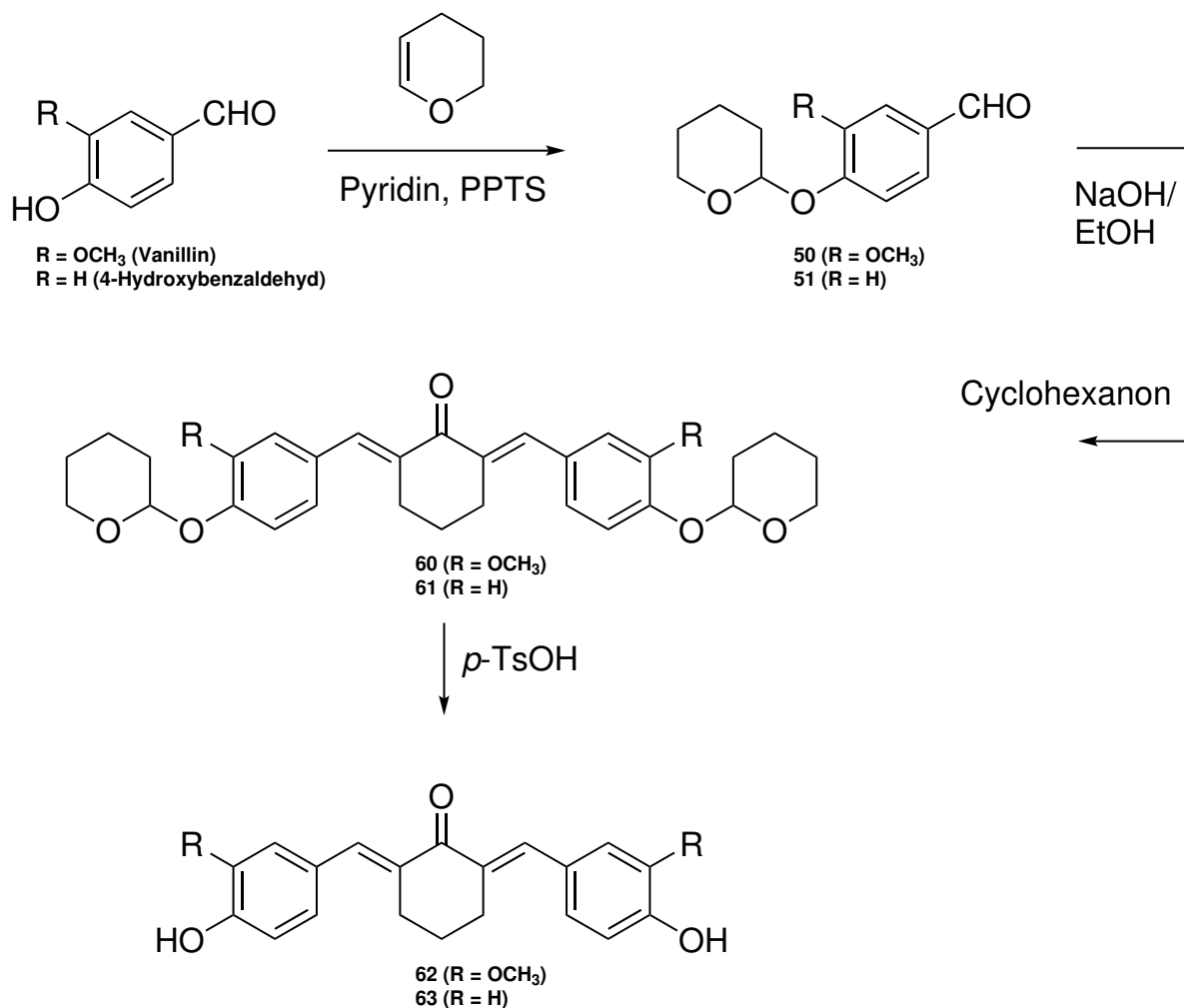
Die biologische Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays mit ABCG2 überexprimierenden Zellen des Typs *MDCK II BCRP* bestimmt. Detaillierte Informationen über den Hoechst 33342-Assay sind den Kapiteln 3.3 und 8.2.3 zu entnehmen.

In Kapitel 4.1 wurde bereits auf die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften von Curcumin hingewiesen. Wang et al. [367] fanden heraus, dass nach Zugabe von Curcumin zu einem Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und einem pH-Wert von 7,2 bereits nach 30 Minuten 92 % des Curcumins abgebaut waren. Eines der Hauptabbauprodukte war das Benzaldehyd Vanillin. Zudem wird Curcumin in *MDCK II* Zellen durch die Präsenz zweier α,β -ungesättigten Carbonylgruppen sehr schnell an Glutathion konjugiert.[368] Verbindungen, die wie im Falle der Monocarbonylanaloga nur eine der elektrophilen Ketogruppen aufweisen könnten weniger anfällig für einen nukleophilen Angriff seitens des Glutathions sein.[369]

Untersuchungen zur Stabilität der MACs *in vitro* und der pharmakokinetischen Profile *in vivo* zeigten, dass im Vergleich mit Curcumin der Ersatz der Diketofunktion bei den MACs zu einer erhöhten Stabilität führte. In der Studie von Liang et al. [362] wurde sowohl Curcumin, als auch zwei Monocarbonylanaloga des Curcumins untersucht und den Versuchstieren (Ratten) eine einmalige orale Dosis von 500 mg pro kg Körpergewicht verabreicht. Anschließend wurden in regelmäßigen Zeitabständen die Plasmakonzentrationen der Testverbindungen bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die höchste Plasmakonzentration von Curcumin lediglich 0,091 $\mu\text{g/ml}$ betrug und diese bereits 2 Stunden nach Verabreichung der einmaligen



(a) Allgemeine Synthese der auf Cyclohexanon-basierten Monocarbonylanaloga **52 – 59** und **64 – 75**.



(b) Syntheseroute für die Schützung und Entschützung der Verbindungen **62** und **63**.

Abbildung 4.3 – (a) Allgemeine Synthese der 2,6-Bis-benzylidencyclohexanone. (b) Synthese der 2,6-Bis-benzylidencyclohexanone mit Hydroxygruppen am Arylrest (**62**: R = OCH₃; **63**: R = H).

Dosis auf $0,040 \mu\text{g/ml}$ sank. Im Vergleich dazu erreichten die beiden verabreichten MACs maximale Plasmakonzentrationen von $0,820 \mu\text{g/ml}$ bzw. $4,10 \mu\text{g/ml}$. Auch die Clearance sank für die MACs im Vergleich mit dem Wert von Curcumin ($835,2 \text{ l}/(\text{kg h})$) auf $125,4 \text{ l}/(\text{kg h})$ bzw. $38,98 \text{ l}/(\text{kg h})$

Auch die Stabilitätsergebnisse der Untersuchungen *in vitro* (Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7,4$, 37°C , 75 h) zeigten, dass Curcumin zu 64% degradiert wurde während für die Monocarbonylanaloga ein weit weniger ausgeprägter Abbau zu beobachten war. Vier der untersuchten Substanzen zeigten auch nach 75 Stunden noch mehr als 90% ihrer ursprünglichen Struktur.

In Abbildung 4.4 sind die Fluoreszenzintensitäten über die Zeit für die Testverbindung 56 aus dem Hoechst 33342-Akkumulationsassay aufgetragen. Da sich mit der Zeit für die verschiedenen Konzentrationen ein Fluoreszenz-Plateau ausbildete und es zu keinem Abfall der Kurven kam konnte sichergestellt werden, dass zumindest für den Vermessungszeitraum des Assays eine Degradierung der Substanzen nicht stattfindet. Eine Auswirkung auf die mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelten IC_{50} -Werte der in diesem Kapitel untersuchten MACs konnte somit ausgeschlossen werden. Bei den

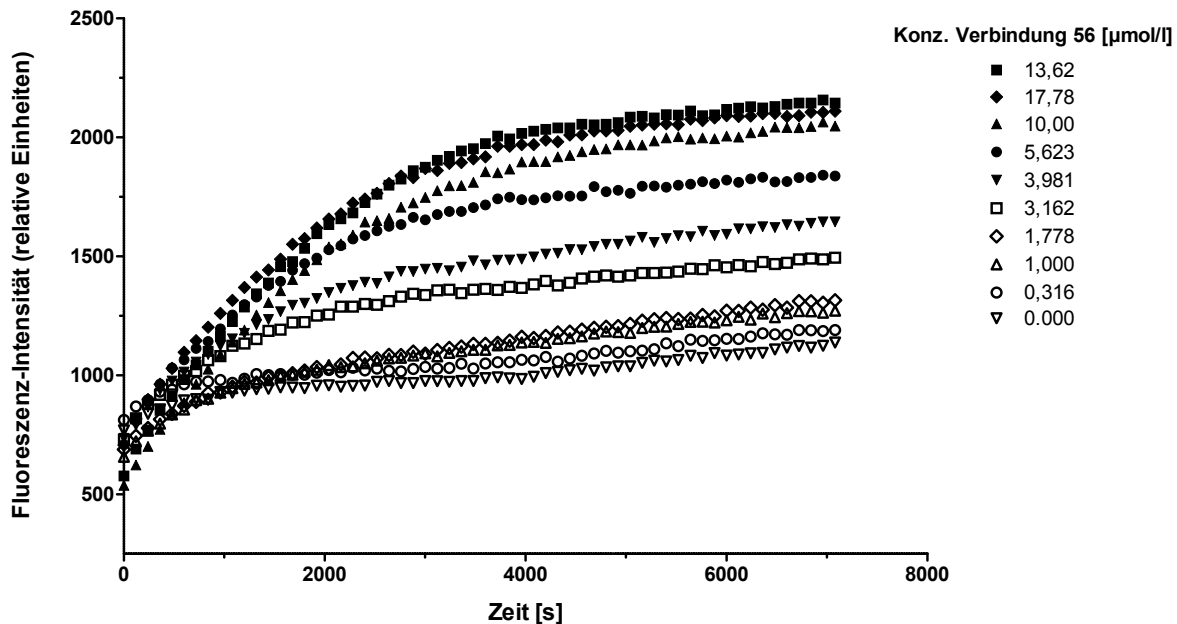


Abbildung 4.4 – Fluoreszenzintensität über die Zeit für verschiedene Konzentrationen von Verbindung 56.

weiteren Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Substanzen stellte sich für einige der Monocarbonylanaloga heraus, dass bei einer maximalen InhibitorKonzentration von $c_{\text{max}} = 10 \mu\text{mol/l}$ kein Fluoreszenzmaximum ausgebildet wurde. Daher wurden die Verdünnungsreihen der Modulatoren bis zu einer Konzentration von $c_{\text{max}} = 30 \mu\text{mol/l}$ angepasst.

Hierdurch konnte erreicht werden, dass viele der Substanzen ein Fluoreszenzplateau ausbildeten. Eine weitere Problematik stellte sich dann bei der biologischen Untersuchung von Substanz 56 dar. Diese erreichte zwar durch die angepasste ModulatorKonzentration im Hoechst 33342-Assay ein Fluoreszenzplateau, jedoch war dieses im Vergleich zum verwendeten Standard sehr viel geringer (s. Abb. 4.5).

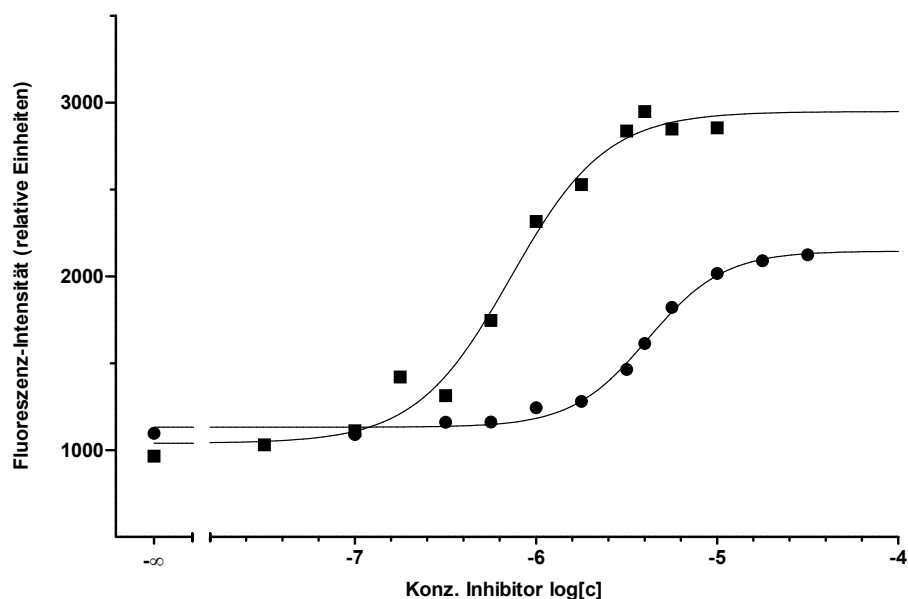


Abbildung 4.5 – Konzentrations-Effekt-Kurve von Substanz 56 (●) im Vergleich zur Referenzsubstanz XR9577 (■).

Dieses Phänomen wurde bereits durch Kühnle et al. [370] beschrieben. Um dies zu berücksichtigen wurde als zusätzlicher Parameter zur Bewertung der Ergebnisse aus der biologischen Testung die **Maximalinhibition** (I_{max}) eingeführt. Für jedes Experiment wurde neben dem IC_{50} -Wert einer Substanz die Differenz zwischen der maximalen (F_{max}) und minimalen (F_{min}) Fluoreszenz aus den Konzentrations-Effekt-Kurven gebildet. Diese wurden anschließend in das Verhältnis zu den entsprechenden maximalen und minimalen Fluoreszenzwerten des Standards gesetzt. Dadurch ergab sich das inhibitorische Maximum gemäß der Gleichung:

$$I_{max} = \frac{F_{max}(Modulator) - F_{min}(Modulator)}{F_{max}(Standard) - F_{min}(Standard)} \times 100\%$$

4.4 Auswertung

4.4.1 Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2

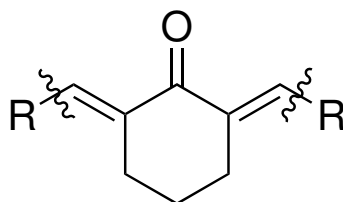
Eine Übersicht der Ergebnisse der biologischen Untersuchung der MACs ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Aus dieser ist ersichtlich, dass die Stammverbindung Curcumin mit einem IC_{50} -Wert von lediglich $32,0 \mu\text{mol/l}$ nur eine sehr schwache inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 zeigte. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Linkerstruktur auf die inhibitorische Aktivität der MACs hatte. Dazu wurde das Bis-Phenyl-Analogon 52 hergestellt und getestet. Die Veränderung der β -Ketofunktion im Curcumin zur Monocarbonylgruppe in Verbindung 52 (IC_{50} : $9,05 \mu\text{mol/l}$) hatte eine höhere inhibitorische Potenz zur Folge.

Bei den Auswertungen der Hoechst 33342-Akkumulationsassays für Verbindung 52 wurde festgestellt, dass bei höheren Modulatorkonzentrationen ein Fluoreszenzanstieg bei der mitvermessenen sensitiven Zelllinie auftrat. Dies führte bei der Ermittlung der IC_{50} -Werte dazu, dass die Maximalinhibition (I_{max}) über der des verwendeten Standards lag. Bei niedrigen Modulatorkonzentrationen lagen die Fluoreszenzwerte der sensitiven Zelllinie noch auf einer Geraden. Daher wurde aus diesen Werten der Mittelwert bestimmt, welcher als Basiswert für die Fluoreszenz der sensitiven Zelllinie diente. Anschließend wurde bei denjenigen Konzentrationen, bei denen ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten war, der Basiswert abgezogen und somit die Differenz berechnet. Von den Fluoreszenzwerten der resistenten Zelllinie wurde dann für jede Konzentration die ermittelte Differenz abgezogen. Mit diesen korrigierten Werten wurde im Anschluß die Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt und der IC_{50} -Wert ermittelt.

Durch das Abziehen der Eigenfluoreszenz des Modulator konnten die Konzentrations-Effekt-Kurven etwas verbessert werden. Jedoch lag die Maximalinhibition immer noch über der des verwendeten Standards. Dieser Effekt konnte später auch noch bei dem Monocarbonylanalogon 74 beobachtet werden. Da jedoch sowohl Substanz 52 als auch Verbindung 74 mit IC_{50} -Werten von $9,05 \mu\text{mol/l}$ bzw. $7,01 \mu\text{mol/l}$ nur eine schwache inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 besaßen wurde auf die Bestimmung des IC_{50} -Werte über alternative Fluoreszenz-Akkumulationsassays (z.B. mit Hilfe von Pheophorbid A) verzichtet. In einer Veröffentlichung von Revalde et al. [323] wurden verschiedenen MACs hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber ABCG2 untersucht. Dabei konnte keine direkte Korrelation der verschiedenen Linkerstrukturen oder Substituenten auf die Hemmwirkung festgestellt werden. Die aktivsten Substanzen wiesen jedoch alle mindestens eine Methoxysubstitution am aromatischen Rest auf. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene MACs synthetisiert, die Variationen in der Position und Anzahl der OCH_3 -Gruppen aufwiesen und ihre inhibitorische Wirkung gegenüber ABCG2 untersucht.

Die Einführung einer einzelnen Methoxygruppe in *meta*-Position (Verbindung 53: $5,32 \mu\text{M/l}$, 67 % I_{max}) hatte nur eine schwache Auswirkung auf die Inhibition von ABCG2. Eine Verschiebung in die *para*-Position (Verbindung 54: $8,80 \mu\text{M/l}$) wirkte sich im direkten Vergleich dazu negativ aus und führte zudem dazu, dass kein Fluoreszenzmaximum mehr erreicht werden konnte. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Positionen konnte nach Vergleich der Aktivitäten über einen einfachen t-Test allerdings nicht ermittelt werden.

Tabelle 4.1: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC₅₀-Werte der Monocarbonylanaloga des Curcumins (MACs); Referenzsubstanzen XR9577: IC₅₀ = 0,704 µmol/l; Ko143: IC₅₀ = 0,221 µmol/l; n = 3; k.e. = kein Effekt.



Verb.	R	IC ₅₀ ± σ [µmol/l]	I _{max} ± σ [%]
52	Ph	9,05 ± 3,10	122 ± 51
53	3-OCH ₃ -Ph	5,32 ± 0,19	67 ± 14
54	4-OCH ₃ -Ph	8,80 ± 2,80	100*
55	2,3-(OCH ₃) ₂ -Ph	5,21 ± 0,58	88 ± 17
56	3,4-(OCH ₃) ₂ -Ph	4,20 ± 0,01	60 ± 9
57	2,5-(OCH ₃) ₂ -Ph	4,97 ± 1,78	83 ± 3
58	2,3,4-(OCH ₃) ₃ -Ph	5,30 ± 0,67	81 ± 23
59	3,4,5-(OCH ₃) ₃ -Ph	1,60 ± 0,20	83 ± 8
62	3-OCH ₃ -4-OH-Ph	2,21 ± 0,35	79 ± 11
63	4-OH-Ph	k.e.	-
64	4-F-Ph	6,46 ± 1,11	60 ± 6
65	4-Cl-Ph	11,4 ± 1,4	100*
66	4-Br-Ph	k.e.	-
67	4-CH ₃ -Ph	k.e.	-
68	4-CF ₃ -Ph	k.e.	-
69	3,4-F-Ph	9,66 ± 2,51	100*
70	3-Py	k.e.	-
71	4-Py	k.e.	-
72	2-Pyrrol	k.e.	-
73	2-N-Methyl-pyrrol	k.e.	-
74	2-Furan	7,01 ± 0,89	160 ± 14
75	2-Thiophen	6,32 ± 0,24	93 ± 1
Curcumin **	-	32,0 ± 4,2	-

* Berechnung durch Festlegen der Maximalinhibition auf das Referenzniveau.

** Der IC₅₀-Wert ist der Literatur entnommen.[323]

Die Kombination zweier Methoxygruppen bei den Verbindungen **55**, **56** und **57** führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der inhibitorischen Wirkung. Die Substanzen hemmten ABCG2 mit vergleichbaren IC_{50} -Werten (**55**: 5,21 $\mu\text{M/l}$, 88 % I_{max} ; **56**: 4,20 $\mu\text{M/l}$, 60 % I_{max} ; **57**: 4,97 $\mu\text{M/l}$, 83 % I_{max}).

Verglichen mit den monosubstituierten MACs **53** und **54** führte nur die Kombination zweier Methoxygruppen in *meta*- und *para*-Position bei Verbindung **56** zu einem signifikanten Unterschied in den Aktivitäten gegenüber ABCG2. Allerdings zeigte sich bei Substanz **56** mit einem I_{max} -Wert von 60 % keine Zunahme der Maximalinhibition. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bereits für die monosubstituierten Analoga niedrige Werte der Fluoreszenzmaxima ermittelt werden konnten. Im Falle von Verbindung **54** konnte sogar kein Fluoreszenzmaximum beobachtet werden. Dieser Aspekt wirkte sich demnach negativ auf die Kombination aus *meta*- und *para*-Position bei Verbindung **56** aus. Die MACs **55** und **57** dagegen zeigten mit I_{max} -Werten von 88 % bzw. 83 % eine vergleichbare maximale Fluoreszenz wie die Referenzsubstanz.

Bei den trisubstituierten Methoxyanaloga **58** und **59** wurden unterschiedliche Effekte auf die inhibitorische Aktivität festgestellt. Bei Substanz **58** führten die Methoxygruppen ($R = 2,3,4\text{-(OCH}_3\text{)}$) zu keiner nennenswerten Verbesserung der Inhibition gegenüber ABCG2 (IC_{50} : 5,30 $\mu\text{M/l}$, 81 % I_{max}). Dagegen konnte bei Substanz **59** ($R = 3,4,5\text{-(OCH}_3\text{)}$) die Hemmwirkung etwas verbessert werden (IC_{50} : 1,60 $\mu\text{M/l}$, 83 % I_{max}). Ebenso führte die Trisubstitution bei den Verbindungen zu einem vergleichbaren Fluoreszenzmaximum wie für die Referenzsubstanz. Aus dem Vergleich der beiden Analoga **58** und **59** konnte auf eine Bevorzugung der Position 5 im Vergleich zur Position 2 geschlossen werden ($R = 3,4,5\text{-OCH}_3 > 2,3,4\text{-OCH}_3$).

Aus dem Vergleich der MACs mit Methoxysubstituenten konnten nur wenige Schlüsse über den Einfluss der Anzahl und Position der OCH_3 -Gruppen auf die Hemmwirkung gegenüber ABCG2 geschlossen werden. Hierzu waren die Unterschiede in den biologischen Aktivitäten insgesamt zu gering. Die aktivste Verbindung in dieser Reihe stellte die trisubstituierte Substanz **59** dar. Nach einem Signifikanztest konnte für die betrachteten Monocarbonylanaloga folgender Einfluss des Substitutionsmuster auf die biologische Aktivität gegenüber ABCG2 festgestellt werden: $R = 3,4,5\text{-(OCH}_3\text{)} > 3,4\text{-(OCH}_3\text{)} > 3\text{-OCH}_3$. Für die drei MACs **59**, **56** und **53** zeigte sich somit der Trend, dass eine höhere Substitution mit OCH_3 -Gruppen die Hemmung von ABCG2 positiv beeinflusste.

Um einen direkten Vergleich mit Curcumin ziehen zu können, wurde Substanz **62** ($R = 3\text{-OCH}_3, 4\text{-OH}$) auf ihre Aktivität gegenüber ABCG2 untersucht. Das inhibitorische Vermögen (IC_{50} : 2,21 $\mu\text{M/l}$) mit einem I_{max} von 79 % war viel höher als bei Curcumin. Dies bewies nochmals die Bedeutung der Monocarbonylanaloga und zeigte, dass allein durch die Veränderung in der Linkerstruktur eine beträchtliche Steigerung der inhibitorischen Wirkung erzeugt werden konnte.

Ebenso bedeutsam schien die Anwesenheit einer Methoxyfunktion zu sein. Bei dem entsprechenden Bisdsmethoxyanalogon **63** ($R = 4\text{-OH}$), welches nur noch die Hydroxyfunktion in *para*-Position trug, ging die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 vollständig verloren.

Für die weiteren Untersuchungen war von Interesse wie sich die Elektronegativität, Polarität und

Größe der Substituenten auf die Aktivität der MACs auswirkte. Zu diesem Zwecke wurde die Reihe der Halogene und ihr Einfluss auf die Hemmwirkung gegenüber ABCG2 untersucht. Dabei war zu beobachten, dass ausgehend von Fluor zu Brom die Aktivität zunehmend negativ beeinflusst wurde. Die Substanz **64** (R = 4-F) inhibierte mit einem IC₅₀-Wert von 6,46 µM/l und einer Maximalinhibition von 60 %. Gegenüber der unsubstituierten Verbindung **52** konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten festgestellt werden.

Wurde ein Chlorsubstituent an derselben Position eingeführt (Substanz **65**; R = 4-Cl), so kam es zu einer weiteren Abnahme der inhibitorischen Aktivität (IC₅₀: 11,4 µM/l). Zudem konnte nun kein Fluoreszenzmaximum mehr beobachtet werden. Die Fortführung der Reihe hin zum Brom bei Verbindung **66** führte zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung gegenüber ABCG2. Die steigende Größe der Substituenten und die sinkende Elektronegativität innerhalb der Halogenreihe korrelierte demnach mit einem Abfall der Hemmwirkung der Substanzen. Gleichbedeutend damit ist eine Abnahme in der Polarität der C–X-Bindung. Fluor bevorzugt aufgrund seiner hohen Elektronendichte und geringen Polarisierbarkeit dipolare Interaktionen mehr als alle anderen Halogene.[371] Die Korrelation des Abfalls der inhibitorischen Aktivität mit der sinkenden Polarität der C–X-Bindungen spricht dafür, dass eine solche Interaktion für die Affinität innerhalb der Halogenreihe der Substanzen eine Rolle spielt. Somit ergab sich für die Halogensubstituenten folgender Einfluss auf die biologische Aktivität der Monocarbonylanaloga: R = H = 4-F > 4-Cl > 4-Br.

Viele Studien haben gezeigt, dass der beste Strukturparameter, welcher mit der Affinität eines Liganden korreliert die Größe seiner hydrophoben Oberfläche ist welche nach der Bindung vergraben innerhalb der Bindetasche vorliegt.[372] Daher sollte bei den Verbindungen **67** und **68** durch die Einführung einer CH₃- bzw. CF₃-Gruppe die möglichen Beiträge einer hydrophoben Gruppe zur Aktivität gegenüber ABCG2 untersucht werden. Für beide Derivate konnte in den Fluoreszenzakkumulationsassays kein Effekt beobachtet werden. Die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche an dieser Position führte demnach zu einem Verlust der Hemmwirkung der Substanzen.

Da die unsubstituierte Grundstruktur der MACs (Verbindung **52**) eine schwache Aktivität zeigte, wurde der Effekt des aromatischen Systems auf die Hemmung von ABCG2 untersucht. Zunächst wurde der Phenylrest durch einen Pyridinring ausgetauscht und zudem dessen Position variiert. Die Verbindungen **70** und **71** tragen jeweils eine Pyridinrest in Position 3 bzw. 4. Für keine der beiden Substanzen konnte eine inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden. Als nächstes wurden die kleineren stickstoffhaltigen Heterozyklen Pyrrol (Verbindung **72**) und *N*-Methyl-Pyrrol (Verbindung **73**) eingeführt. Auch für diese Derivate konnte keine Hemmwirkung beobachtet werden. Durch den Austausch des Pyrrolrings mit einem 2-Furyl-Rest zeigte die Substanz **74** mit einem IC₅₀-Wert von 7,01 µM/l eine schwache Aktivität gegenüber ABCG2. Hierdurch konnte eine ähnliche Hemmwirkung wie für die Grundstruktur **52** erreicht werden (**52**: 9,05 µM/l). Eine Veränderung in der Größe des Heteroatoms durch die Einführung eines 2-Thiophenyl-Restes bei Substanz **75** führte zu einem vergleichbaren IC₅₀-Wert von 6,32 µM/l. Ein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten konnte durch Einführung von heteroaromatischen Systemen nicht erreicht werden. Lediglich ein 2-Furyl- und Thiophenyl-Rest führten

im Vergleich mit der Grundstruktur zu ähnlichen Werten für die Inhibition von ABCG2.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass vor allem methoxytragende Phenylreste die Hemmwirkung der untersuchten MACs verbessern konnte. Eine eindeutige Aussage zur Anzahl oder Positionierung der Methoxyfunktionen konnte anhand der Ergebnisse nicht getätigt werden. Nur bei drei Verbindungen (Substanzen **59**, **56** und **53**) konnte ein leichter Trend beobachtet werden nach dem mit steigender Anzahl an Methoxygruppen auch die Hemmwirkung zunimmt.

Im Allgemeinen konnte durch die Monocarbonylstruktur des Linkers die inhibitorische Wirkung der Substanzen im Vergleich mit Curcumin deutlich gesteigert werden. Große und hydrophobe Reste wirken sich negativ auf die Aktivität gegenüber ABCG2 aus. Des Weiteren konnten Heteroaromaten als Ersatz für die Phenylfunktion die Inhibition nicht verbessern bzw. führten in den meisten Fällen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust.

4.4.2 Untersuchungen zur Selektivität gegenüber ABCB1

Zur Bestimmung der Selektivität der MACs wurde die Hemmwirkung gegenüber dem ABC-Transporter ABCB1 untersucht. Hierzu wurde zunächst über ein Screeningverfahren die Aktivität der ausgewählten MACs an ABCB1 ermittelt. Es wurde die relative Fluoreszenz der Verbindungen im Vergleich zum Standardinhibitor Cyclosporin A mit Hilfe des Calcein AM-Assays (vgl. Kap. 8.2.3) mit der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie *A2780 adr* vermessen. Neben den MACs, die eine Hemmung von ABCG2 aufwiesen, wurden auch solche untersucht, welche keine Aktivität an diesem Transporter aufzeigten.

Das Ergebnis des Screenings ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass vor allem die methoxytragenden Verbindungen der MACs mit Ausnahme von Substanz **57** eine gewisse Aktivität gegenüber ABCB1 zeigten. Vor allem die Derivate **56** und **59** zeigten eine relative Fluoreszenz von $F_{rel} \geq 25\%$ in Bezug auf den Standardinhibitor Cyclosporin A.

Die Verbindungen mit Halogenen an Position 4 (Verbindungen **64** – **66**), sowie diejenigen mit hydrophoben Resten wie Methyl- bzw. Trifluormethylgruppen (Substanzen **67** bzw. **68**) zeigten keine nennenswerten Aktivitäten an ABCB1.

Bei den MACs mit heteroaromatischen Resten, die nur schwach aktiv oder inaktiv gegenüber ABCG2 waren, wies interessanterweise Verbindung **73** mit einer relativen Fluoreszenz von $F_{rel} > 25\%$ eine gewisse Hemmwirkung gegenüber ABCB1 auf.

Von den drei Vertretern **56**, **59** und **73** ($F_{rel} > 25\%$) wurden im Anschluss an das Screening vollständige Dosis-Effektkurven mittels Calcein AM-Akkumulationsassay aufgenommen und die IC_{50} -Werte der Verbindungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Substanz **56** zeigte eine etwas bessere Aktivität gegenüber ABCG2 im Vergleich zur Hemmung von ABCB1. Das trimethoxy-substituierte Derivat **59** inhibierte die beiden Transportproteine mit vergleichbaren IC_{50} -Werten. Das Monocarbonylanalogon **73**, welches einen *N*-Methyl-pyrrol-Rest trug war gegenüber ABCG2 inaktiv, zeigte jedoch im Screening eine gewisse Hemmung von ABCB1. Mit einem IC_{50} -Wert von $4,24 \mu\text{M/l}$ konnte eine mäßige Inhibition von P-gp nachgewiesen werden.

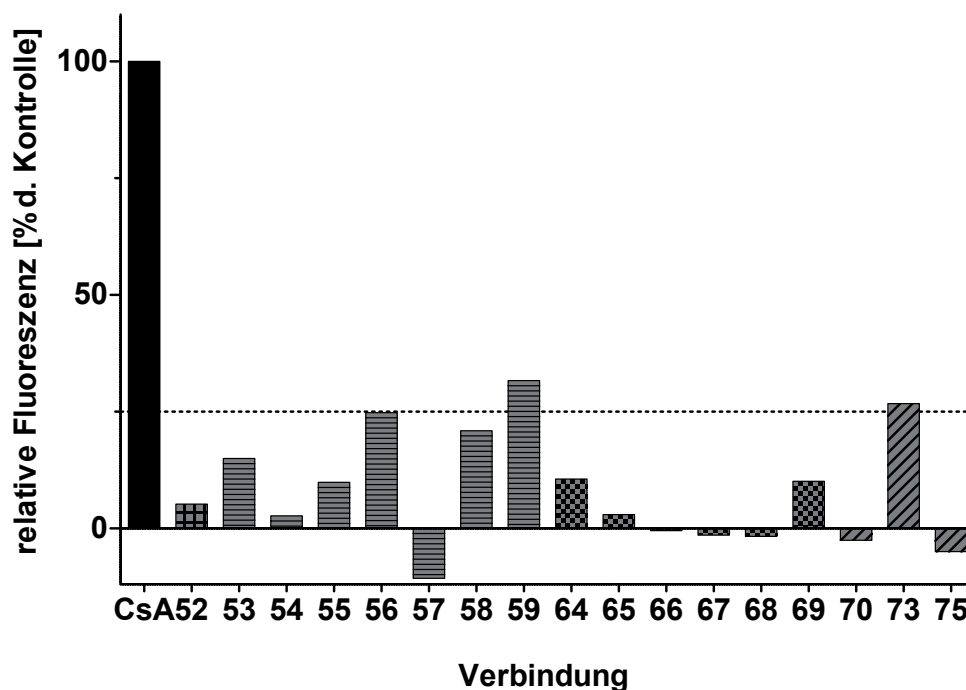
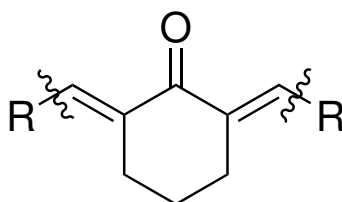


Abbildung 4.6 – Ergebnisse der relativen Fluoreszenzmessungen der ausgewählten Monocarbonylanaloga bezogen auf den Standardinhibitor Cyclosporin A ($10 \mu\text{mol/l}$); $n = 1$.

Tabelle 4.2: IC_{50} -Werte der Monocarbonylanaloga mit mehr als 25%iger Fluoreszenzzunahme im Calcein-AM-Assay und deren Vergleich mit der Inhibition gegenüber ABCG2; Referenzsubstanz CsA: $\text{IC}_{50} = (1,21 \pm 0,16) \mu\text{mol/l}$; $n = 3$; k.e. = kein Effekt.



Verb.	R	$\text{IC}_{50} \pm \sigma [\mu\text{mol/l}]$	$\text{IC}_{50} \pm \sigma [\mu\text{mol/l}] \text{ MDCKII BCRP}$
56	3,4-(OCH_3) ₂ -Ph	$5,98 \pm 0,80$	$4,20 \pm 0,01$
59	3,4,5-(OCH_3) ₃ -Ph	$1,43 \pm 0,02$	$1,60 \pm 0,20$
73	2-N-Methyl-pyrrol	$4,24^*$	k.e.
Curcumin**	-	$50,5 \pm 4,7$	$32,0 \pm 4,2$

* $n = 1$.

** Die IC_{50} -Werte sind der Literatur entnommen.[323]

4.5 Ergebnisse und Ausblick

Die Monocarbylanaloga des Curcumins (MACs) stellen eine neue Substanzklasse von ABCG2-Modulatoren dar. MACs sind eine synthetisch leicht zugängliche Substanzklasse und zeichnen sich im Vergleich zu Curcumin durch eine größere chemische Stabilität aus.

Die in diesem Kapitel untersuchten Verbindungen waren hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber ABCG2 aktiver als Curcumin ($IC_{50} = 32,0 \mu\text{mol/l}$). Im Vergleich mit den Referenzsubstanzen XR9577 ($IC_{50} = 0,704 \mu\text{mol/l}$) und Ko143 ($IC_{50} = 0,221 \mu\text{mol/l}$) konnte allerdings keine der Substanzen eine ähnlich starke Hemmwirkung aufweisen.

Die aktivste Verbindung aus der Substanzklasse der MACs stellte das trimethoxysubstituierte Derivat **59** dar, welches den ABCG2-vermittelten Transport mit einem IC_{50} -Wert von $1,60 \mu\text{mol/l}$ hemmte. Sie zeigte zudem eine vergleichbare Aktivität gegenüber ABCB1 ($IC_{50} = 1,43 \mu\text{mol/l}$).

Aussagekräftige Ergebnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehung konnten aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den biologischen Aktivitäten nicht ermittelt werden. Es konnte eine gewisse Tendenz beobachtet werden, dass polare Reste wie Methoxygruppen im Vergleich zu unpolaren Resten die Hemmwirkung gegenüber ABCG2 positiv beeinflussten.

Wie schon die Botryllamide zeigten auch die Monocarbylanaloga nur eine schwache Inhibition von ABCG2. Beiden Substanzklassen ist gemein, dass sie über zwei aromatische Reste verfügen, die über eine Linkerstruktur miteinander verbunden sind. Variationen an den Substitutionsmustern der aromatischen Reste hatten keinen großen Einfluss auf die Hemmung von ABCG2.

Für die weitere Vorgehensweise zur Auffindung von ABCG2-Inhibitoren wurde daher nach einer neuen Substanzklasse gesucht, die sich vom Molekülgerüst her deutlicher zu den bereits untersuchten Botryllamiden und Monocarbylanaloga des Curcumins unterschied.

Pyrimidine als ABCG2-Inhibitoren

5.1 Allgemeines

Das aus *Aspergillus Fumigatus* isolierte Fumitremorgin C (FTC) ist ein selektiver Inhibitor von ABCG2, jedoch mit neurotoxischen Wirkungen, die eine klinische Nutzung der Verbindung verhindern.[373] Auf Grund dessen wurde versucht weniger toxische und potentere Inhibitoren zu entwickeln. Dies führte zur Entdeckung von Ko143 einem Derivat von FTC, welches in Tierversuchen mit Mäusen die orale Verfügbarkeit von Topotecan deutlich verbessern konnte.[231] Zu den weiteren spezifischen ABCG2-Inhibitoren zählen Substanzklassen wie Flavone oder die erst kürzlich entdeckten Chromone.[374, 375] Auch Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib, sowie Imatinib und Nilotinib, die als Chemotherapeutika in der Behandlung der **chronischen myeloischen Leukämie (CLM)** ihre Verwendung finden, sind potente ABCG2-Inhibitoren (siehe Abbildung 5.1).[240, 376, 377]

Basierend auf der Chinazolin-Grundstruktur, welche im Gefitinib vorkommt, wurden Substanzbibliotheken verschieden substituierter Chinazoline hergestellt. Einige der Substanzen zeigten eine höhere Hemmwirkung gegenüber ABCG2 als der bekannte Standardinhibitor Ko143. Sie wiesen zudem eine Selektivität für ABCG2 auf, sowie wesentlich geringere Toxizitäten.[325, 326, 378] Des Weiteren wurden Substanzen basierend auf einer 4-Methylpyrimidin-Struktur synthetisiert, um herauszufinden inwiefern ein kondensierter Aromat in den bereits bekannten Chinazolinen für die Hemmung von ABCG2 notwendig ist.[324]

Der Einfluss der Pyrimidinstruktur wurde von Krapf et al. [324] nur an wenigen Beispielen untersucht, um einen Vergleich mit den intensiver analysierten Chinazolinen ziehen zu können. So wurden in Position 2 bislang nur Phenyl- und Pyridinreste eingeführt, sowie der Einfluss substituierter Aniline in Position 4 auf die Aktivität gegenüber ABCG2 intensiver untersucht.

In diesem Teilprojekt sollten die biologischen Aktivitäten der Pyrimidine untersucht und ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt werden (siehe Abbildung 5.2). Zunächst wurde die Hemmwirkung von 2,4-Bis(anilino)-substituierten Pyrimidinen gegenüber ABCG2 untersucht. Gleichzeitig ermöglichte der

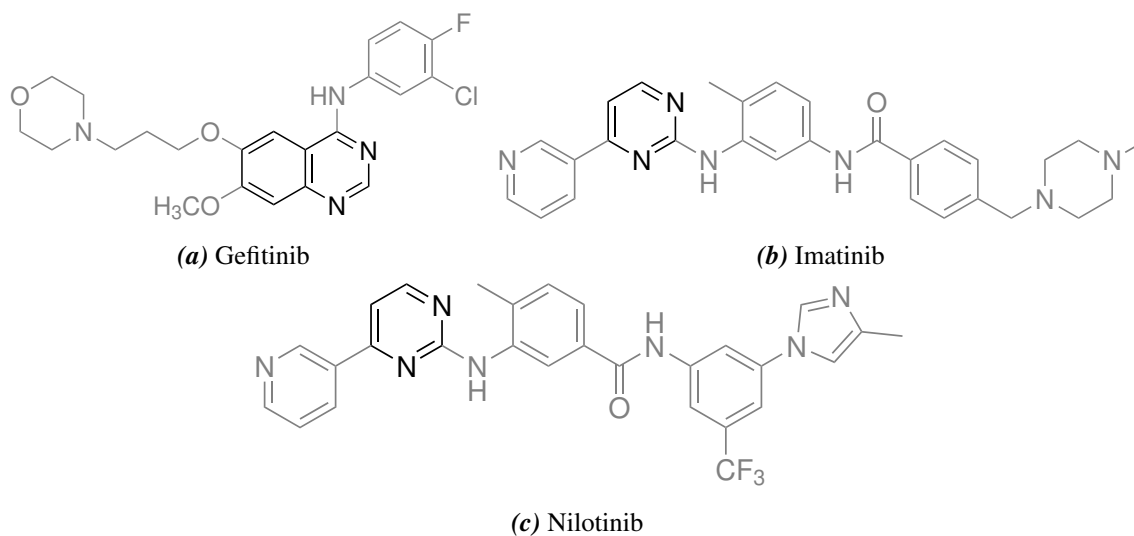


Abbildung 5.1 – Beispiele von Tyrosinkinase-Inhibitoren mit Chinazolin- und Pyrimidingrundgerüst, die eine Hemmung von ABCG2 bewirken.

Vergleich mit den korrespondierenden Phenyl- und Pyridinresten an diesem Molekülteil die Bedeutung des Anilinlinkers für die Hemmung von ABCG2 aufzuklären. Zudem sollte durch die Einführung substituierter Phenylreste in Position 2 untersucht werden, welchen Einfluss die Substituenten auf die inhibitorische Wirkung der Pyrimidine ausüben. Des Weiteren war von Interesse, ob ein Wechsel der substituierten Phenylreste in Position 2 und 4 zu einer vergleichbaren Aktivität führte und die Reste somit untereinander austauschbar sind.

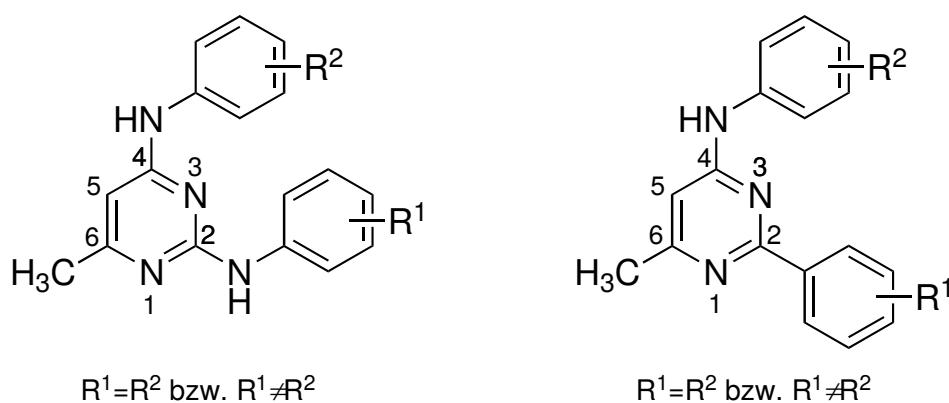


Abbildung 5.2 – Die vorgenommenen Variationen am Substitutionsmuster der Pyrimidine.

5.2 Synthese

5.2.1 Synthese der 2,4-Bis-Anilinopyrimidine

Symmetrische 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine

Ausgangspunkt für die Synthese der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine war die mikrowellenunterstützte Umsetzung von 2,4-Dichloro-6-methylpyrimidin mit verschiedenen substituierten Anilinen in Isopropanol. Die Edukte waren kommerziell erhältlich und erlaubten die schnelle Synthese einer Substanzbibliothek verschiedener, symmetrisch-substituierter 2,4-Bis(anilino)-6-methylpyrimidine. Die allgemeine Syntheseroute ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Bei den eingesetzten Anilinen wurde sich auf Substituenten in *meta*- und *para*-Position beschränkt, da aus früheren Studien zu den Chinazolinanaloga hervorgegangen ist, dass eine *ortho*-Substitution sich negativ auf die inhibitorische Aktivität auswirkte.[325] Des Weiteren wurde der Methylrest in Position 6 beibehalten, da der Austausch an dieser Position durch Phenylreste oder Anilinlinker verschiedener Länge keinen signifikanten Beitrag zur Verbesserung der Hemmwirkung der Pyrimidine leistete.[379]

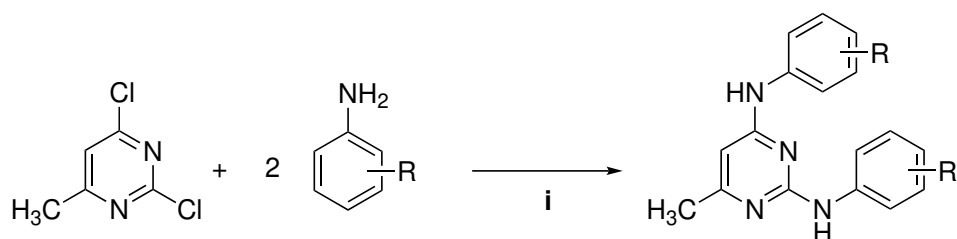


Abbildung 5.3 – Allgemeine Syntheseroute der symmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine. Reaktionsbedingungen: (i) *iso*-Propanol, MW, 70 W, 125 – 140 °C.

Reaktionsmechanismus:

Der Syntheseweg der symmetrisch-substituierten 2,4-Bis-Anilinopyrimidine erfolgte über eine nukleophile aromatische Substitution der Chlorsubstituenten des 2,4-Dichloro-6-methylpyrimidins durch das korrespondierende Anilin. Der Mechanismus für die S_NAr -Reaktion ist in Abbildung 5.4 aufgeführt.

Ausgangspunkt ist der Angriff des Anilin-Stickstoffs auf eines der Chloratome des Pyrimidins. Da die Elektronendichte in Position 2 durch die Nachbarschaft zu zwei Stickstoffen am niedrigsten ist erfolgt die Erstsitution wahrscheinlich zunächst an dieser Position.

Nach Addition des Anilins an Position 2 klappt die Doppelbindung zunächst zum Stickstoff im Pyrimidinring, da dieser aufgrund seiner Elektronegativität dazu befähigt ist negative Ladungen zu stabilisieren. Zusätzlich kann die im Intermediat entstandene negative Ladung über den Pyrimidinring resonanzstabilisiert werden. Im letzten Schritt erfolgt die Eliminierung von HCl, wobei das aromatische System wiederhergestellt wird.

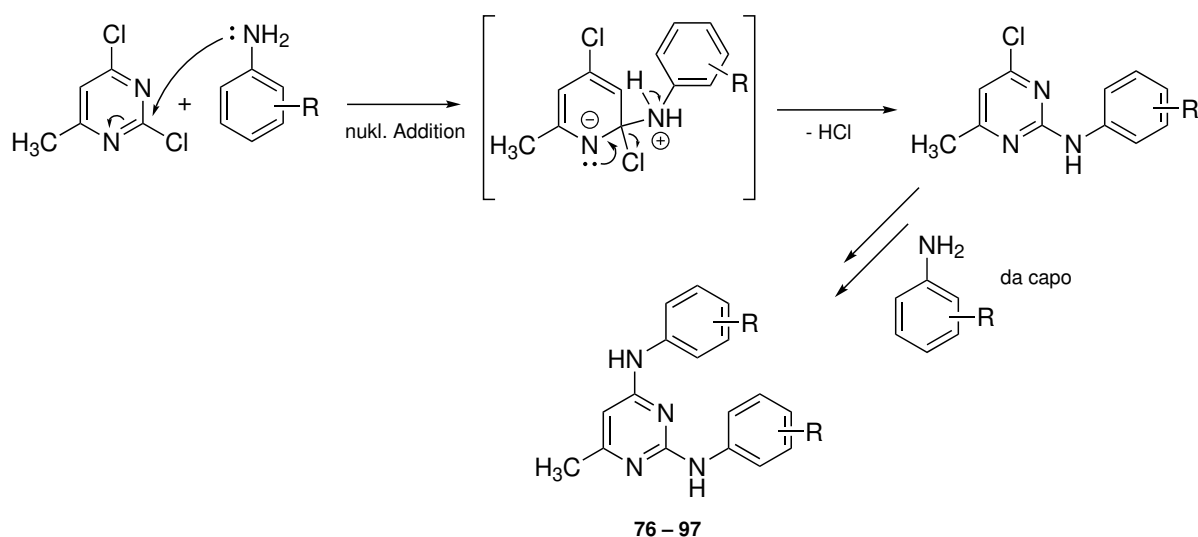


Abbildung 5.4 – Reaktionsmechanismus der nukleophilen aromatischen Substitution der symmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.

Asymmetrische 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine

Zur Darstellung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine wurde zunächst der Versuch unternommen durch Änderung der Molverhältnisse zum monosubstituierten 4-Chloro-2-anilino-6-methylpyrimidin zu gelangen. Wurde bei der Synthese der symmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine für die beiden Edukte 2,4-Dichloro-6-methylpyrimidin und Anilin ein Molverhältnis von 1:2 verwendet, so wurde zunächst versucht durch Änderung auf ein 1:1-Verhältnis unter denselben Reaktionsbedingungen das entsprechende Produkt mit nur einem Anilinrest zu erhalten.

Nach Isolierung des Produktes der Reaktion wurde im Anschluss im NMR-Spektrum der Substanz jedoch zwei breite Singulets im Tieffeld-Bereich beobachtet, wie sie für Anilinprotonen typisch ist. Durch Verringerung der Reaktionstemperatur konnte ebenfalls kein monosubstituiertes Produkt erhalten werden, da unterhalb des angegebenen Temperaturbereichs von 125 – 140 °C keine Umsetzung der Edukte erfolgte.

Durch die Erstsitution mit einem Anilinrest wird über den positiven mesomeren Effekt des Anilin-Stickstoffs die Elektronendichte des Pyrimidinrings erhöht. Die Reaktivität des heterozyklischen Systems gegenüber einer zweiten nukleophilen aromatischen Substitution sollte daher herabgesetzt werden und eine Monosubstitution möglich sein. Da dies jedoch nicht beobachtet wurde mussten weitere Effekte wie die Güte der Abgangsgruppe, sowie Lösemittel effekte die Reaktion beeinflussen. Daraufhin wurde nach einer alternativen Syntheseroute zur Darstellung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine gesucht.

Die allgemeine Syntheseroute zur Herstellung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine ist in [Abbildung 5.5](#) dargestellt.

Zunächst wurde *S*-Methylisothioharnstoff-Hemisulfat mit Acetessigsäureethylester und Natriumcarbonat in einer Kondensationsreaktion zu 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon umgesetzt.[380]

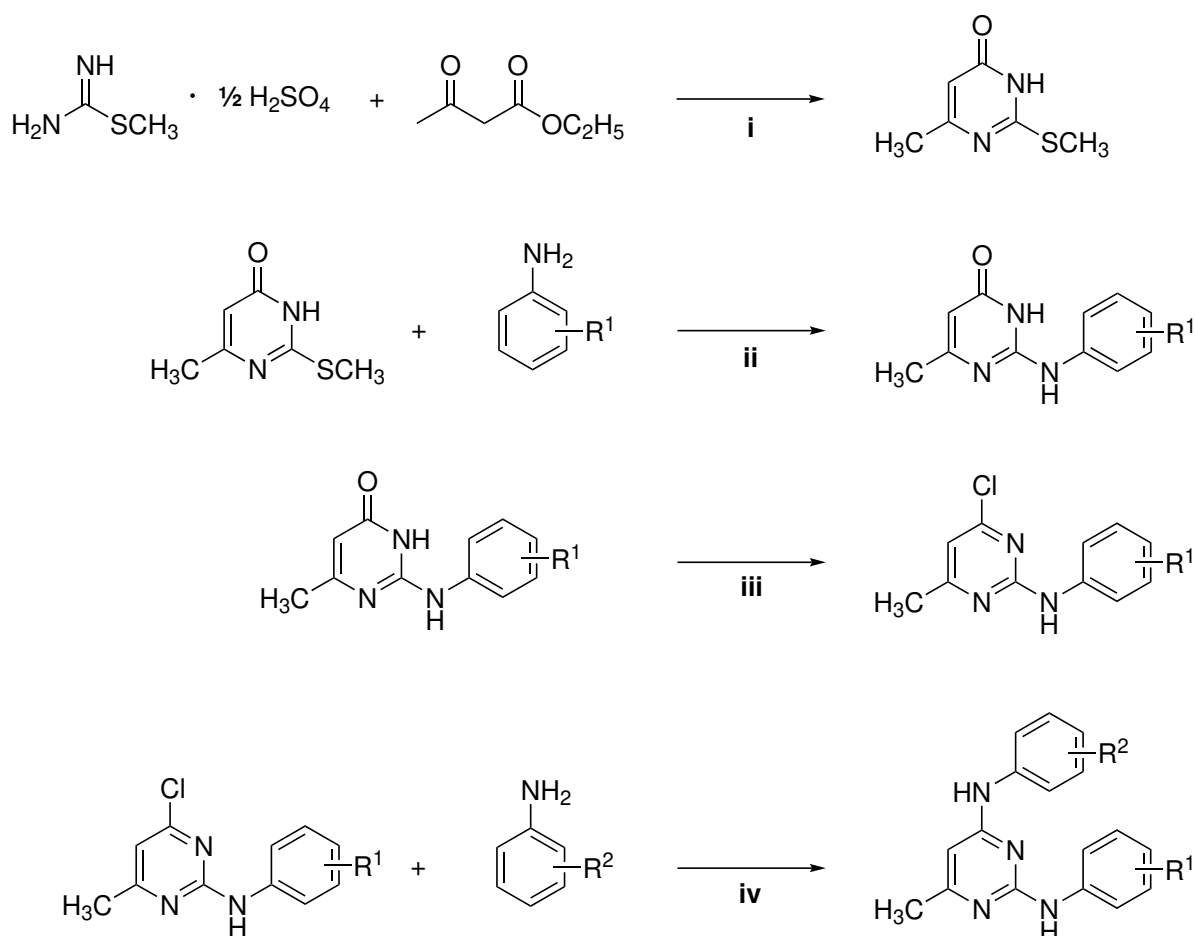


Abbildung 5.5 – Allgemeine Syntheseroute der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine. Reaktionsbedingungen: (i) Na_2CO_3 , H_2O , RT; (ii) MW, 70 W, 140–160 °C; (iii) POCl_3 , reflux; (iv) *iso*-Propanol, MW, 70 W, 125–140 °C.

Anschließend erfolgte eine nukleophile Substitution des Thiomethylrest in Position 2 durch das eingesetzte Anilin in einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Dies gelang durch Abwandlung eines bekannten Protokolls, indem das 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon zusammen mit dem korrespondierenden Anilin unter Mikrowellenbestrahlung erhitzt wurde.[381] Hierdurch erfolgte die Einführung des ersten Anilinrests. Das anilierte Pyrimidinon wurde dann mit Phosphoroxychlorid in Position 4 zum entsprechenden 4-Chlor-6-Methyl-N-Arylpyrimidin-2-amin chloriert. Das Produkt dieser Reaktion konnte anschließend mit verschiedenen Anilinen unter Mikrowellenbestrahlung umgesetzt werden. Auf diese Weise gelang die Synthese der Endstufen mit asymmetrischer Anilinosubstitution in den Positionen 2 und 4.

(i) Reaktionsmechanismus der Darstellung von 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon:

Der Mechanismus des ersten Teils des Reaktionswegs ist in Abbildung 5.6 detailliert beschrieben. Der erste Schritt zur Darstellung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine besteht aus der basenkatalysierten Reaktion zwischen *S*-Methylisothioharnstoff-Hemisulfat und Acetessigsäureethylester. Die Reaktion besteht aus zwei Additions-Eliminierungsmechanismen. Zunächst wird die Ketofunktion des Acetessigesters von einem der Stickstoffe des *S*-Methylisothioharnstoffs angegriffen, da diese reaktiver ist als die Esterfunktion. Nach Ausbildung des tetraedrischen Intermediats wird nach zweifacher Protonierung des Carbonylsauerstoffs Wasser abgespalten und es bildet sich ein Imin. Der Ringschluss erfolgt schließlich durch eine nukleophile Substitution am Carbonylkohlenstoff der Esterfunktion unter Austritt von Ethanol als Abgangsgruppe. Im letzten Schritt der Reaktion kommt es zu einer Tautomerisierung zum 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon (**98**).

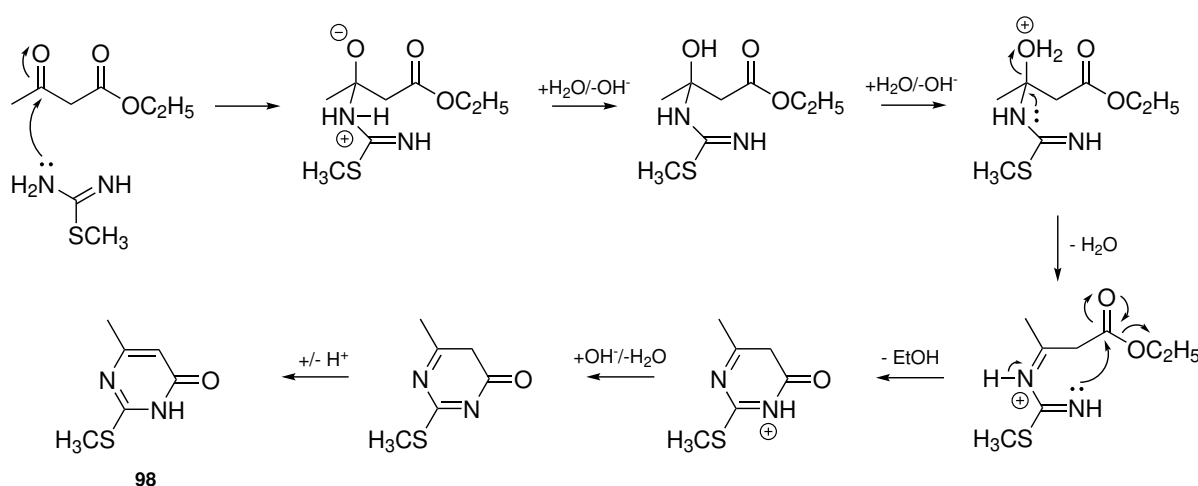


Abbildung 5.6 – Reaktionsmechanismus der Bildung von 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon, welcher als Ausgangsstoff zur Synthese der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine dient.

(ii) Reaktionsmechanismus für die Substitution des Thiomethylrests:

In der zweiten Teilreaktion der Syntheseroute erfolgt die nukleophile Substitution des Thiomethylrests durch das eingesetzte Anilin (siehe Abbildung 5.7). Der Stickstoff des Anilins addiert sich an den Iminkohlenstoff in Position 2 des Pyrimidinonrings an dem der Thiomethylrest sitzt. In dem daraufhin ausgebildeten tetraedrischen Intermediat kann die negative Ladung vom Pyrimidinonstickstoff durch seine Elektronegativität relativ gut stabilisiert werden. Anschließend erfolgt eine Umprotonierung zwischen dem Anilinrest und der Thiomethylgruppe. Die C-N-Doppelbindung bildet sich zurück und Methanthiol verlässt als Abgangsgruppe das Molekül. Eine zu schnelle Erhöhung der Temperatur barg die Gefahr eines zu großen Überdrucks, welcher zum Bersten des Reaktionsgefäß in der Mikrowelle hätte führen können. Da Methanthiol gasförmig entwich musste darauf geachtet werden mit einer geringen Wattzahl die Reaktionstemperatur langsam auf 140 – 160 °C zu erhöhen.

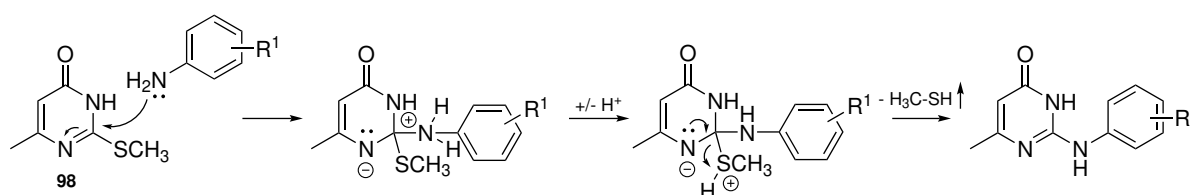


Abbildung 5.7 – Reaktionsmechanismus der Bildung der 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone.

(iii) Chlorierung des 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon mit POCl_3 :

Im dritten Schritt erfolgte die Chlorierung des 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinons. Hierzu wurde das Edukt in Phosphoroxychlorid gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Der Mechanismus dieses Schrittes ist in [Abbildung 5.8](#) abgebildet. Zunächst greift der Carbonylsauerstoff des Pyrimidinons am Phosphor des Phosphoroxychlorids an und es tritt ein Chloridion als Abgangsgruppe aus. Hierbei ist die Affinität von Phosphor zu Sauerstoff entscheidend. Des Weiteren erhöht die Nachbarschaft zum Stickstoff, aufgrund seines positiven mesomeren Effektes, die Elektronendichte und somit die Nucleophilie des Sauerstoffs der Carbonylfunktion.

Im Anschluss daran greift das ausgetretene Chloridion nucleophil am Kohlenstoff in Position 4 an. Die Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung wird aufgehoben und das Elektronenpaar klappt zum Stickstoff, woraufhin dieser sein freies Elektronenpaar zurückerhält. Über seinen positiven mesomeren Effekt schiebt nun der Stickstoff sein freies Elektronenpaar zum Kohlenstoff herüber und HPO_2Cl_2 verlässt als Abgangsgruppe das Molekül. Nach Deprotonierung des Stickstoffs erhält man das 4-Chlor-6-methyl-2-arylpyrimidin. Der Reaktionsmechanismus entspricht in etwa der Bildung des Formylierungsreagenzes in der Vilsmeier-Reaktion.[382]

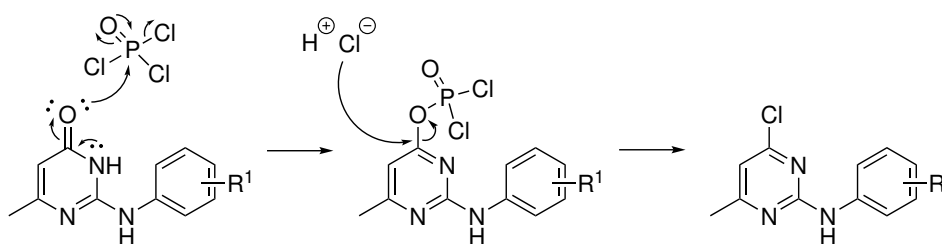


Abbildung 5.8 – Mechanismus der Chlorierung von 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon.

(iv) Umsetzung der chlorierten Vorstufe mit Anilinen:

Das Produkt aus Reaktion (iii) kann nun mit verschiedenen Anilinen in einer nukleophilen aromatischen Substitutionsreaktion zu den korrespondierenden asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidin umgesetzt werden. Der Mechanismus (siehe Abbildung 5.9) folgt dabei denselben Prinzipie wie bereits in Abbildung 5.4 beschrieben wurde.

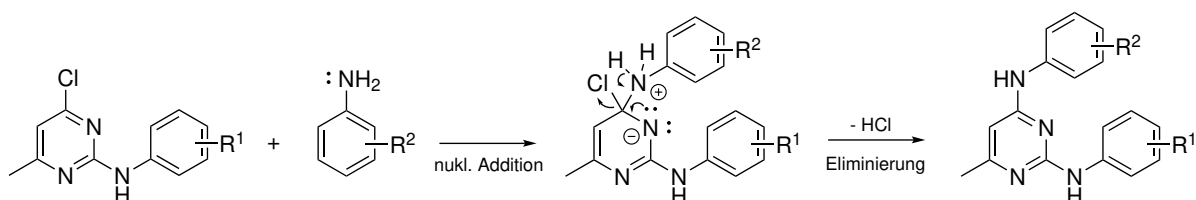


Abbildung 5.9 – Reaktionsmechanismus der Bildung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilinopyrimidine.

5.2.2 Synthese der 4-Anilino-2-aryl-6-methylpyrimidine

Eine Zusammenfassung des allgemeinen Synthesewegs zur Darstellung der substituierten 4-Anilino-2-aryl-6-methylpyrimidine ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

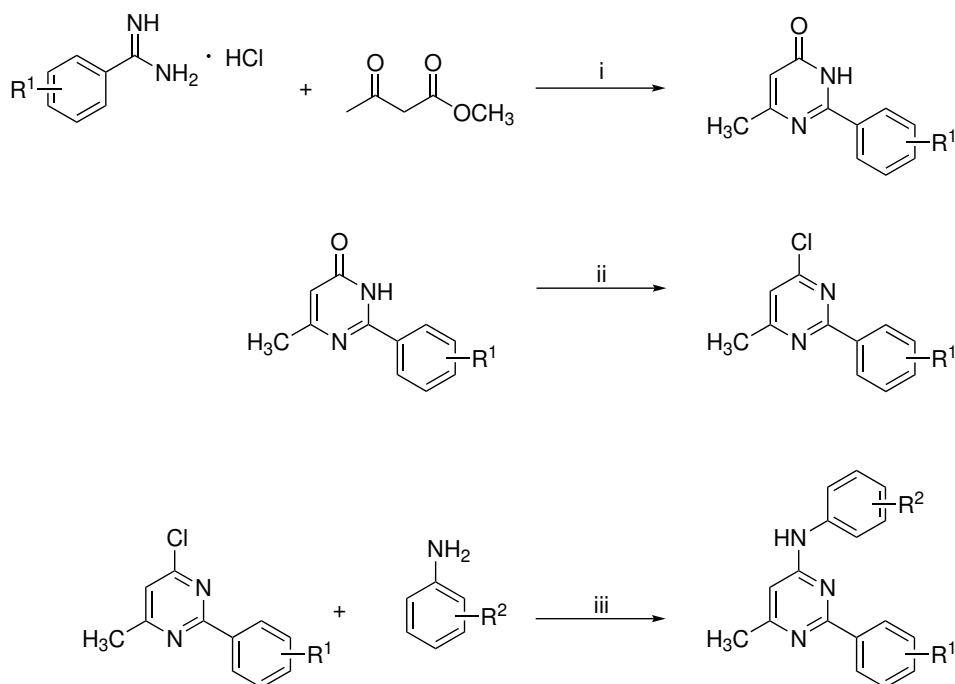


Abbildung 5.10 – Allgemeine Syntheseroute der Verbindungen **111** – **128**. Reaktionsbedingungen: (i) $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, MW, 60 W, 70°C ; (ii) POCl_3 , ΔT ; (iii) *iso*-Propanol, $\text{HCl}(\text{kat.})$, MW, 70 W, 120°C .

Der Syntheseweg basierte dabei auf der von Krapf et al. [324] entwickelten Syntheseroute zur Herstellung von 4-Anilino-2-pyridylpyrimidinen mit geringfügigen Modifikationen. Die Benzamide waren bis

auf 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid kommerziell erhältlich. Das 3-Nitrobenzamidin wurde über eine basenkatalysierte Reaktion aus 3-Nitrobenzonnitril hergestellt. Ausgehend von den verschiedenen substituierten Benzamidin-Hydrochloriden wurden zunächst die entsprechenden Pyrimidinone synthetisiert. Diese wurden im nächsten Schritt durch die Chlorierung mit Phosphoroxychlorid in die korrespondierenden 4-Chlor-2-aryl-6-methylpyrimidine überführt, welche in Position 2 einen, vom eingesetzten Benzamidin abhängigen, substituierten Phenylrest trugen. Die 4-Chlor-2-aryl-6-methylpyrimidine dienen dann als Ausgangsstoff für die Herstellung der Endstufen. Hierzu wurden mittels mikrowellenunterstützter Synthese verschiedene, kommerziell erhältliche Aniline mit den unterschiedlichen Vorstufen umgesetzt. Ein großer Vorteil war die kurze Reaktionszeit von 20–30 min, sowie die sehr hohe Reinheit der Produkte. In vielen Fällen war eine Aufreinigung nicht nötig, da die Endstufen nach LC/MS-Analysen bereits eine Reinheit von $\gg 95\%$ aufwiesen.

Darstellung von 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid:

Die Darstellung von 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid (**102**) erfolgte nicht nach der klassischen Pinner-Reaktion durch die säurekatalysierte Darstellung des Imidoesters und anschließender Umsetzung mit verschiedenen Nucleophilen.[383] Für die Herstellung wurde eine basenkatalysierte Eintopfreaktion verwendet, bei der zunächst 3-Nitrobenzonnitril und eine Lösung aus Natriummethanolat in Methanol vermischt wurden. Das Produkt konnte anschließend durch Zugabe von Ammoniumchlorid und Aminolyse des *in situ* gebildeten Imidoesters erhalten werden (siehe Abbildung 5.11).[384]

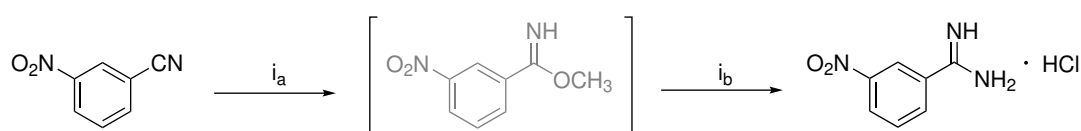


Abbildung 5.11 – Syntheseroute zur Darstellung von 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid. Reaktionsbedingungen: (i_a) NaOCH₃/CH₃OH, RT; (i_b) NH₄Cl, RT.

Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Zunächst erfolgt der nukleophile Angriff des Methanolat-Anion auf den elektrophilen Kohlenstoff der Nitrilfunktion unter Auflösung der Dreifachbindung. Der negativ geladene Stickstoff wird nach dem Angriff durch das Säure-Base-System CH₃OH/CH₃O⁻ protoniert und es entsteht der Imidoester.

Nach Zugabe von Ammoniumchlorid wird durch die Reaktion mit Methanolat *in situ* Ammoniak erzeugt. Dieser reagiert anschließend durch Aminolyse des Imidoesters nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus zum entsprechenden positiv geladenen Benzamidin. Im letzten Schritt wird das Produkt durch wässrig-saure Aufarbeitung als Hydrochlorid aus der Reaktionslösung ausgefällt.

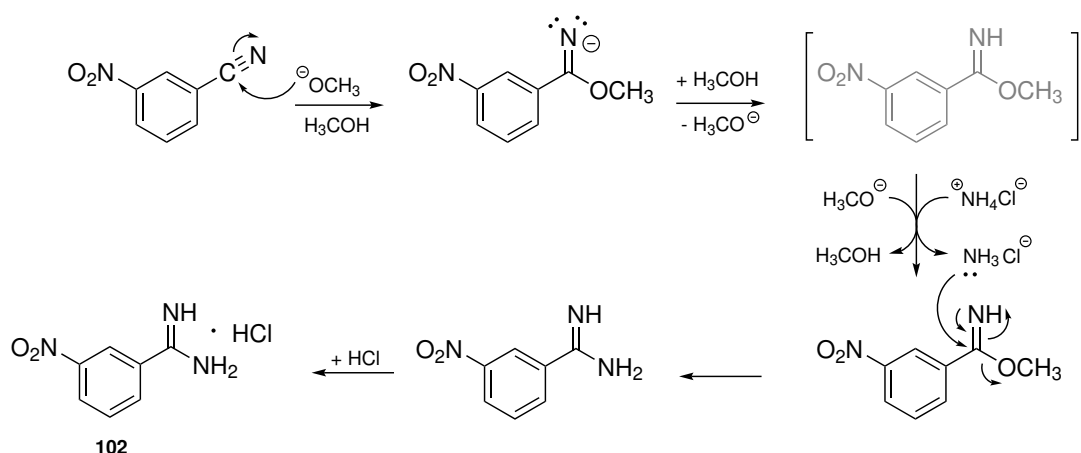


Abbildung 5.12 – Mechanismus der basenkatalysierten Synthese von 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid.

Mechanismus der Synthese der 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone:

Zur Herstellung der 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone wurden die Benzamidin-Hydrochloride in einer Kondensationsreaktion mit Acetessigsäuremethylester umgesetzt (s. Abb. 5.13). Der Mechanismus verläuft in Analogie zu der bereits beschriebenen Darstellung von 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon (vgl. Abb. 5.6 auf Seite 78). Zuerst kommt es zur Addition eines der Stickstoffe des Benzamidins an die Ketofunktion des Acetessigsäuremethylesters. Anschließend führt die Kondensationsreaktion zur Ausbildung eines Imins. Der Ringschluss erfolgt durch die Addition des anderen Benzamidin-Stickstoffs an die Esterfunktion und nachfolgender Eliminierung von Methanol. Durch Tautomerisierung entstehen zum Schluss die korrespondierenden 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone (**103–106**).

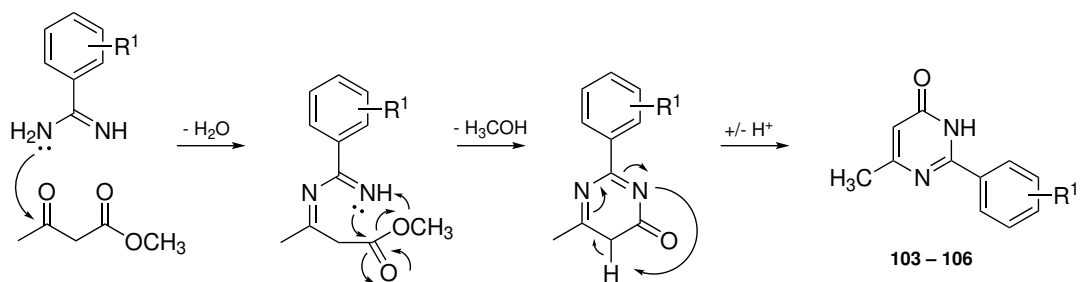


Abbildung 5.13 – Reaktionsmechanismus der Bildung der 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone.

Mechanismus der Chlorierung der 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone:

Im nächsten Schritt erfolgte die Chlorierung der Pyrimidinone mit **Phosphoroxychlorid (POCl₃)** zu den entsprechenden 4-Chlor-6-methyl-2-arylpurimidinen **107–110**. Der Reaktionsmechanismus folgt

dabei denselben Prinzipien wie er bereits in Abbildung 5.8 auf Seite 79 für die Chlorierung des 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinons beschrieben wurde und soll daher an dieser Stelle nicht nochmal erläutert werden.

Nukleophile aromatische Substitution der 4-Chlor-6-methyl-2-arylpyrimidine:

Die Ausgangsstoffe **107 – 110** wurden im letzten Schritt der Synthese mit verschiedenen Anilinen in einer nukleophilen aromatischen Substitution zu den Endstufen **111 – 128** umgesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 5.14 beschrieben. Nach nukleophilem Angriff des Anilins in Position 4 verschiebt sich das Elektronenpaar der Doppelbindung in den Pyrimidinring und es bildet sich eine negative Ladung am benachbarten Stickstoff aus. Die negative Ladung wird über die verschiedenen mesomeren Grenzformeln resonanzstabilisiert. Anschließend bildet sich das aromatische System zurück und Chlorid verlässt als Abgangsgruppe das Molekül. Im letzten Schritt erfolgt die Deprotonierung des Anilins durch das Chloridion und es entsteht HCl als Nebenprodukt. Das Zufügen einer nicht-nukleophilen Base wie z.B. Triethylamin oder DIPEA zum Abfangen der entstandenen Chlorwasserstoffsäure, die sonst das substituierte Anilin protonieren würde, führte dazu, dass keine Umsetzung der Edukte stattfand. Erst indem einige Tropfen konz. HCl zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurden kam es zur Reaktion der Vorstufen mit den substituierten Anilinen zu den gewünschten Endstufen der 4-Anilino-2-aryl-6-methylpyrimidinen. Die eingesetzte Chlorwasserstoffsäure diente demnach als Katalysator für die Reaktion.

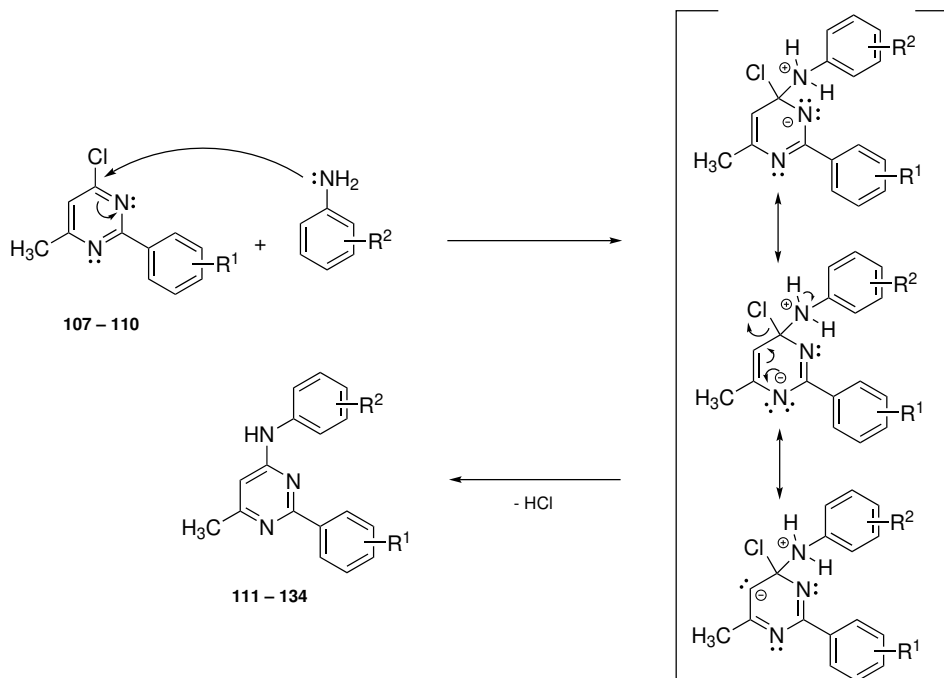


Abbildung 5.14 – Reaktionsmechanismus der nukleophilen aromatischen Substitution der 4-Chlorpyrimidine mit verschiedenen Anilinen zu den Endstufen **111 – 134**.

5.3 Biologische Testung

Die biologische Aktivität der synthetisierten Pyrimidine wurde mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays mit ABCG2 überexprimierenden Zellen des Typs *MDCK II BCRP* bestimmt. Detaillierte Informationen über den Hoechst 33342-Assay sind den Kapiteln 3.3 und 8.2.3 zu entnehmen.

Für die Selektivitätsuntersuchungen wurden die Hemmwirkungen der Pyrimidine gegenüber den beiden ABC-Transportproteinen ABCB1 und ABCC1 bestimmt. Hierzu wurden über Screeningverfahren die biologischen Aktivitäten mittels Calcein AM-Test mit der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie *A2780 adr* und der ABCC1 überexprimierenden Zelllinie *H69AR* ermittelt. Durchführung und Vorgehensweise beim Calcein AM-Test sind dem Kapitel 8.2.3 des Experimentalteils dieser Arbeit zu entnehmen.

Die intrinsische Zytotoxizität, sowie die Fähigkeit zur Resistenzaufhebung wurde an exemplarischen Beispielen der Pyrimidinderivate mittels MTT-Test untersucht. Die praktische Durchführung und Vorgehensweise beim MTT-Test sind ebenfalls dem Kapitel 8.2.3 des Experimentalteils dieser Arbeit zu entnehmen.

5.4 Auswertung

5.4.1 Inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2

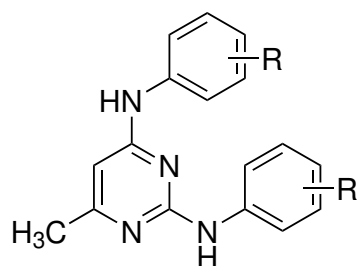
Ergebnisse der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine

Eine Zusammenfassung der Aktivitätsdaten der Verbindungen 76 – 97 ist in Tabelle 5.1 aufgeführt. Zuerst wurden die inhibitorischen Aktivitäten von substituierten 2,4-Bis-anilino-6-methylpyrimidinen untersucht. Hierzu wurde der Einfluss unterschiedlicher Substituenten in *meta*- und *para*-Position der Anilinlinker (Rest R) verglichen. Eine *ortho*-Substitution wurde im Folgenden nicht näher betrachtet. Aus früheren Forschungen zur Aktivität von Chinazolinen als ABCG2-Inhibitoren ging hervor, dass im Rahmen der dort untersuchten *ortho*-Verbindungen diese Position keinen positiven Beitrag zur Hemmung lieferte.[325]

Zunächst wurde die Hemmwirkung der unsubstituierten Grundstruktur bestimmt, um einen Referenzpunkt für die Effekte der eingeführten Substituenten auf die Aktivität der 2,4-Bis-anilinopyrimidine zu erhalten. Es zeigte sich, dass Verbindung 76 mit einem IC_{50} -Wert von 1,832 $\mu\text{mol/l}$ und einer Maximalinhibition von 108 % zu einer moderaten Hemmung von ABCG2 führte. Im Vergleich mit den im Kapitel 3 untersuchten Botryllamiden zeigte sich allerdings eine wesentlich bessere inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Substanz 76 eine ähnliche Hemmwirkung wie die aktivste Verbindung der im Kapitel 4 untersuchten Monocarbonylanaloga. Die Grundstruktur der 2,4-Bis-anilinopyrimidine konnte somit bereits eine bessere bzw. vergleichbare inhibitorische Wirkung gegenüber ABCG2 zeigen als alle vorherigen Verbindungen.

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche Modifikation in *meta*-Position durchgeführt, um deren Beitrag zur inhibitorischen Wirkung zu ermitteln. Hierzu wurden zum einen unterschiedliche elektronischen Eigenschaften der funktionellen Gruppen wie etwa bei den Nitro-, Nitril-, Methoxy- oder

Tabelle 5.1: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC_{50} -Werte der symmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine; Referenzsubstanz Ko143: $IC_{50} = 0,221 \mu\text{mol/l}$; $n = 3$.



Verb.	R	$IC_{50} \pm \sigma$ [$\mu\text{mol/l}$]	$I_{\text{max}} \pm \sigma$ [%]
76	H	$1,832 \pm 0,495$	108 ± 8
77	3-NO ₂	$0,273 \pm 0,060$	87 ± 15
78	3-CN	$0,481 \pm 0,112$	100 ± 14
79	3-OCH ₃	$2,088 \pm 0,309$	118 ± 7
80	3-SCH ₃	$1,190 \pm 0,336$	92 ± 23
81	3-F	$0,864 \pm 0,237$	108 ± 8
82	3-Cl	$1,830 \pm 0,332$	120 ± 20
83	3-Br	$1,085 \pm 0,170$	105 ± 11
84	3-I	$0,680 \pm 0,139$	87 ± 11
85	3-CF ₃	$1,246 \pm 0,417$	114 ± 33
86	4-NO ₂	$0,024 \pm 0,003$	86 ± 12
87	4-CN	$0,308 \pm 0,046$	83 ± 14
88	4-OCH ₃	$2,922 \pm 0,788$	100 ± 1
89	4-SCH ₃	$0,797 \pm 0,380$	73 ± 1
90	4-F	$0,569 \pm 0,171$	89 ± 8
91	4-Cl	$0,425 \pm 0,111$	73 ± 17
92	4-Br	$0,568 \pm 0,084$	98 ± 4
93	4-I	$0,563 \pm 0,114$	85 ± 1
94	4-CF ₃	$0,549 \pm 0,226$	110 ± 23
95	4-CH ₃	$2,109 \pm 0,423$	97 ± 5
96	4-Phenoxy	$3,120 \pm 0,467$	61 ± 11

Thiomethylfunktionen untersucht. Zum anderen wurden physikochemische Parameter wie etwa die Größe und Lipophilie der Substituenten durch den Einbau von Halogenen und kleineren als auch größeren hydrophoben Resten wie Methyl-, Trifluormethyl-, oder Phenylgruppen berücksichtigt.

Die Einführung von stark elektronenziehenden Resten wie eine Nitro- (Verbindung **77**) oder Nitrilgruppe (Verbindung **78**) führte zu einer deutlichen Verbesserung der inhibitorischen Aktivität der Substanzen im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **76**. Eine Nitrogruppe in *meta*-Position konnte den IC₅₀-Wert auf 0,273 µmol/l steigern. Gleichzeitig blieb die Maximalinhibition mit 87 % ungefähr auf dem Niveau der Referenzsubstanz. Somit konnte eine ähnlich starke Hemmwirkung gegenüber ABCG2 erreicht werden wie mit dem Standardinhibitor Ko143 (0,221 µmol/l). Eine Nitrilgruppe an der gleichen Position hatte im Vergleich dazu eine etwas geringere Auswirkung auf die Hemmung von ABCG2. Jedoch war Substanz **78** mit einem IC₅₀ von 0,481 µmol/l immer noch um mehr als die Hälfte aktiver als Verbindung **76**. Ebenso lieferte die Nitrilgruppe ein vergleichbares Fluoreszenzmaximum wie der Standardinhibitor Ko143.

Elektronenschiebende Reste in *meta*-Position wie bei den Verbindungen **79** und **80** mit Methoxy- bzw. Thiomethylgruppen hatten unterschiedliche Effekte auf die inhibitorische Wirkung der Substanzen. Eine Methoxygruppe verschlechterte die Aktivität auf einen IC₅₀-Wert von 2,922 µmol/L. Durch den Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel bei Verbindung **80** konnte eine Steigerung der Hemmwirkung erreicht werden. Mit einem IC₅₀-Wert von 1,190 µmol/L war die Thiomethylgruppe stärker aktiv als die analoge Verbindung mit Sauerstoff und ebenfalls aktiver als die unsubstituierte Grundstruktur. Vergleichbare Inhibitionswerte wie für die beiden Verbindungen mit elektronenziehenden Substituenten (R = 3-NO₂, 3-CN) konnten durch diese Variationen jedoch nicht erreicht werden.

Als nächstes wurden Halogen-substituierte Derivate synthetisiert und getestet. Hierbei zeigte sich innerhalb der Verbindungen **81–84** keine einheitliche Tendenz bezüglich der inhibitorischen Wirkungen. So führte ein Fluorsubstituent in *meta*-Position zu einer Steigerung der Hemmwirkung auf 0,864 µmol/l mit einem I_{max}-Wert von 108 %. Ein Chloratom an dieser Position bewirkte bei Substanz **82**, dass sie mit 1,830 µmol/l in vergleichbarer Stärke inhibierte wie die unsubstituierte Verbindung. Die Einführung eines Bromatoms führte wiederum dazu, dass sich die Hemmwirkung auf einen IC₅₀-Wert von 1,085 µmol/L steigerte. Das noch größere Iod konnte die inhibitorische Aktivität im Vergleich zur unsubstituierten Substanz noch weiter steigern und erreichte ebenfalls eine Maximalinhibition auf dem Referenzniveau (**84**: 0,680 µmol/l, 87 % I_{max}). In seiner Hemmwirkung gegenüber ABCG2 war es mit dem Fluor-Derivat vergleichbar. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe der Substituenten und deren Elektronegativität konnte nicht hergestellt werden. Aus den Ergebnissen ergab sich für die Inhibitionsstärke der Halogene die Reihenfolge: I > Br = F > Cl.

Die Einführung einer CF₃-Gruppe als elektronenziehender Rest in *meta*-Position, der zudem die Lipophilie des Moleküls erhöhte, hatte keinen großen Effekt auf die inhibitorische Wirkung der Substanz. Die Verbindung **85** konnte zwar einen I_{max} von 114 % erreichen, jedoch inhibierte der Modulator mit 1,246 µmol/l nur geringfügig stärker als die unsubstituierte Verbindung. Da die Trifluormethylgruppe nur eine geringe Größe im Vergleich mit den Halogenen aufweist, die ansonsten über ähnliche physiko-

chemische Eigenschaften verfügen konnte ein sterischer Einfluß auf die Hemmwirkung ausgeschlossen werden.

Im weiteren Verlauf sollten die Auswirkungen derselben Substituenten in *para*-Position des Phenylrings auf die Hemmwirkung der Substanzen untersucht werden. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, ob die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche der Moleküle einen positiven Einfluss auf die inhibitorische Wirkung ausübte.

Eine Nitrogruppe in Position 4 des Phenylrestes bewirkte zunächst, dass sich ein Löslichkeitsproblem bei der Herstellung der Verdünnungsreihen für Substanz **86** ergab. Es konnte beobachtet werden, dass in den Eppendorfgefäßen mit den höchsten Modulatorkonzentrationen mit der Zeit eine Trübung einsetzte. Zudem ergab sich schon bei relativ niedrigen Konzentrationen ein Fluoreszenzplateau.

Es war daher notwendig die höchsten Konzentrationen in Methanol herzustellen, um einer Ausfällung der Substanz während des Hoechst 33342-Akkumulationstest entgegen zu steuern, wobei eine maximale Konzentration von 10 Vol.-% im Assay nicht überschritten wurde. Auch wurden die Verdünnungsreihen angepasst, um vollständige Dosis-Effekt-Kurven aufnehmen zu können.

Nachdem die Anpassungen an das Testsystem durchgeführt wurden, konnte die inhibitorische Wirkung von Verbindung **86** bestimmt werden. Mit einem IC_{50} -Wert von $0,024 \mu\text{mol/l}$ wurde die bislang stärkste Hemmung von ABCG2 festgestellt. Mit einer Maximalinhibition von 86 % konnte ebenfalls das Niveau der Referenzsubstanz erreicht werden. Im Vergleich mit der *meta*-substituierten Verbindung **77** wurde die Inhibitionsstärke noch weiter gesteigert und sogar die Hemmwirkung der Referenzsubstanz Ko143 gegenüber ABCG2 konnte übertroffen werden.

Für das Substanzpaar **87/78** mit einer Nitrilfunktion als Rest zeigte sich, dass die *para*-substituierte Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von $0,308 \mu\text{mol/l}$ eine ähnlich starke Inhibition zeigte wie das Derivat mit *meta*-Substitution (**78**: $0,481 \mu\text{mol/l}$). Die Maximalinhibition von 83 % für das *para*-substituierte Derivat fiel hingegen etwas geringer aus als für die *meta*-Verbindung ($I_{\text{max}} = 100 \%$).

Die *para*-substituierten Isomere der Verbindungen mit den elektronenschiebenden Methoxy- bzw. Thiomethylresten (**88**: $2,922 \mu\text{mol/l}$, 100 % I_{max} ; **89**: $0,797 \mu\text{mol/l}$, 73 % I_{max}) besaßen im Vergleich mit ihren *meta*-substituierten Derivaten keinen signifikanten Einfluss auf die Inhibitionsstärke.

Auch für die *para*-substituierten Isomere zeigte sich, dass der Einfluss des Schwefelatoms sich positiv auf das inhibitorische Vermögen der Substanz auswirkte und zu einer stärkeren Hemmung von ABCG2 führte als das korrespondierende Derivat mit einer Methoxygruppe. Da diese Beobachtung bei beiden Isomerenpaaren zu beobachten war konnte daraus geschlossen werden, dass die Stärke des mesomeren Effektes offenbar eine Rolle spielte. Der +M-Effekt ist umso größer, je kleiner die Elektronegativität, je kleiner der Atomradius und je größer die negative Ladung des Substituenten ist. Insofern übte das Schwefelatom im Vergleich zum Sauerstoffatom einen schwächeren elektronenschiebenden Effekt aus, welcher eine stärkere Inhibition bewirkte.

Bei der Halogenreihe in *para*-Position (**90–93**) konnten verschiedene Einflüsse auf die biologische Aktivität der Substanzen gegenüber ABCG2 festgestellt werden.

Ein Fluoratom in *para*-Stellung (Verbindung **90**) zeigte mit $0,569 \mu\text{mol/l}$ und einem I_{max} -Wert von

89 % eine stärkere Inhibition im Vergleich mit der unsubstituierten Referenzsubstanz. Die Verbindung war in etwa so aktiv wie das *meta*-substituierte Isomer **81**.

Die halogentragenden Modulatoren mit Chlor- bzw. Bromsubstituenten (**91/92**) inhibierten in vergleichbarer Stärke mit einem IC₅₀-Wert von 0,425 bzw. 0,568 µmol/l.

Eine Vergrößerung des Substituenten durch die Einführung eines Iodatoms führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Hemmwirkung. Das Derivat **93** inhibierte bei einer I_{max} = 85 % mit einem IC₅₀ von 0,563 µmol/l in ähnlichem Ausmaß wie die korrespondierenden Verbindungen mit Fluor-, Chlor- oder Bromsubstituenten.

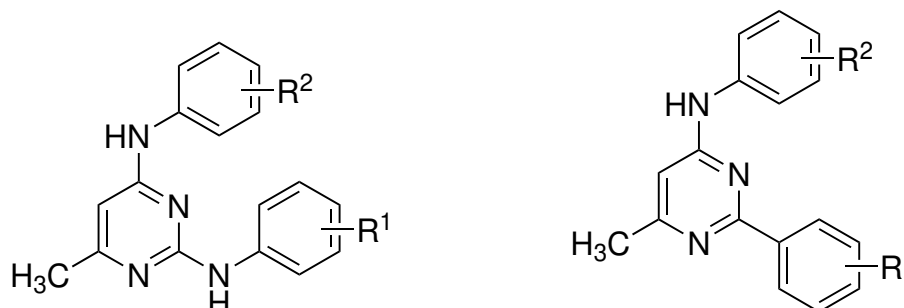
Innerhalb der *para*-substituierten Halogenderivate zeigten sich somit keine signifikanten Unterschiede in den biologischen Aktivitäten der Substanzen. Demnach war der Einfluss der Größe oder Elektronegativität des Substituenten in diesem Fall unerheblich und spielte keine entscheidende Rolle für die Hemmung von ABCG2.

Die elektronenziehende Trifluormethylgruppe als Rest in *para*-Position des Aromaten (**94**) inhibierte mit einem IC₅₀ von 0,549 µmol/l um die Hälfte stärker als die Referenzsubstanz **76**. Des Weiteren war das *para*-substituierte Derivat deutlich aktiver im Vergleich mit dem *meta*-Isomer. Nur die noch stärker elektronenziehenden Reste wie die Nitro- oder Cyanogruppe bei den Derivaten **86/87** waren mit ihren Inhibitionsstärken der Trifluormethylgruppe überlegen. Das Ausmaß des Elektronendefizits am aromatischen System schien demnach einen Einfluss auf die Hemmwirkung durch elektronenziehenden Reste auszuüben.

Durch Einführung einer Methylgruppe und eines Phenoxy substituenten sollte die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche und ihr Einfluss auf die Inhibition der Verbindungen untersucht werden. Die relativ kleine Methylgruppe bei Derivat **95** bewirkte bereits eine Verschlechterung der Hemmwirkung mit einem IC₅₀ von 2,109 µmol/l. Um einen stärkeren hydrophoben Effekt zu erzielen, wurde bei der Verbindung **96** ein Phenoxyrest untersucht. Dies bewirkte einen weiteren Abfall der Inhibitionsstärke auf 3,120 µmol/l. Zudem erreichte die Substanz im Akkumulationsassay nur noch eine Maximalinhibition von I_{max} = 61 %. Die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche ging demnach im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung mit einem signifikanten Aktivitätsverlust einher.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung der 2,4-Bis-anilino-6-methylpyrimidine war es von Interesse die Bedeutung des Stickstoffs im Linker an Position 2 des Pyrimidinrings für die Hemmwirkung der Testverbindungen zu untersuchen. Dazu wurden exemplarisch zwei Vertreter mit Bis-Anilino-Struktur ausgewählt und mit den korrespondierenden Derivaten verglichen, die an Position 2 direkt mit dem Phenylrest verknüpft sind und keinen Anilinstickstoff als Linkerstrukturelement enthielten. Die Ergebnisse der biologischen Testung der Substanzen sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Für die unsubstituierten Verbindungen bewirkt die zusätzliche NH-Einheit an Position 2 eine Absenkung der inhibitorischen Aktivität. Das Derivat **88** mit dem direkt verknüpftem Phenylrest besitzt eine mehr als 2,5-fach stärkere Hemmwirkung als Substanz **76**. Einen deutlicheren Unterschied liefert die Gegenüberstellung des Substanzpaares **101/63**. Das Bis-Anilinopyrimidin **101** zeigt mit einem IC₅₀ von 0,423 µmol/l bereits eine gute inhibitorische Aktivität an ABCG2. Die direkt verknüpfte Substanz **63** übertrifft diese Wirkung jedoch

Tabelle 5.2: Vergleich der IC₅₀-Werte der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine mit ihren korrespondierenden Derivaten ohne Anilinlinker in Position 2; Referenzsubstanz Ko143: IC₅₀ = 0,221 μmol/l; n = 3.



Verb.	R ¹	R ²	IC ₅₀ ± σ [μmol/l]	I _{max} ± σ [%]
76	H	H	1,832 ± 0,495	108 ± 8
101	H	3-NO ₂	0,423 ± 0,192	92 ± 11
88 *	H	H	0,648 ± 0,150	-
63 *	H	3-NO ₂	0,133 ± 0,030	80 ± 8

* IC₅₀-Werte sind der Literatur entnommen: **88**[385]; **63**[379].

mit einem IC₅₀-Wert von 0,133 μmol/l. Das Fluoreszenzmaximum lag ebenfalls mit 80 % des I_{max}-Werts der Referenzsubstanz in einem akzeptablem Bereich. Die Einführung des zusätzlichen Anilinolinkers an Position 2 hatte auch in diesem Beispiel eine starke Erniedrigung der Hemmstärke zur Folge.

Einen Grund für die großen Unterschiede zwischen den betrachteten Substanzpaaren **76/88** und **101/63** liefert eine Betrachtung der Bindung zwischen dem Pyrimidinring und dem Substituenten in Position 2. Im Falle der direkt miteinander verknüpften Verbindungen **88** und **63** ergeben sich nicht so viele Freiheitsgrade bezüglich der möglichen Konformationen wie für die Verbindungen **76** und **101**. Durch die Einführung des NH-Linkers sind die beiden Arylsysteme in Position 2 durch ein Atom mehr miteinander verbunden, wodurch sich deren Freiheitsgrade der möglichen Konformationen erhöhen. Zudem sind die 2,4-Bis-Anilino-pyrimidine deutlich hydrophiler verglichen mit den jeweiligen 2-Aryl-4-Anilino-pyrimidinen. Diese Tatsachen spiegeln sich in den Unterschieden der Hemmwirkungen der Substanzen wieder. Ein starres Molekülgerüst in Verbindung mit einer insgesamt höheren hydrophoben Oberfläche korrelierte mit dem inhibitorischem Vermögen der Pyrimidine.

Aufgrund dieses Sachverhaltes wurden weitere Verbindungen der 2-Aryl-4-Anilino-pyrimidine synthetisiert, um den Einfluss von substituierten Phenylresten in Position 2 auf die Hemmwirkung der Substanzen zu untersuchen.

Ergebnisse der 2-Aryl-4-Anilino-6-methylpyrimidine

Zur Ergründung der Auswirkungen von substituierten Phenylresten in Position 2 wurden verschiedene Benzamidin-Hydrochloride eingesetzt und nach den Synthesewegen in Kapitel 5.2.2 die Vorstufen der 4-Chlor-6-methyl-2-arylpyrimidine hergestellt. Da sich aus den bisherigen Ergebnissen herausgestellt hatte, dass insbesondere eine Nitrogruppe die Aktivität der Testverbindungen steigern konnte, wurde diese in *meta*- und *para*-Position des Phenylsubstituenten in Position 2 eingeführt. Des Weiteren wurden eine Methylgruppe und ein Chloratom an dieser Stelle des Moleküls eingefügt, da beide funktionelle Gruppen einen vergleichbaren Wert zur Lipophilie beitragen, jedoch unterschiedliche elektronische Eigenschaften besitzen.[386] Während die Methylgruppe einen elektronenschiebenden Effekt hat verfügt das Chloratom über elektronenziehende Eigenschaften. Dadurch konnte ein Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Substituenten allein auf die voneinander verschiedenen elektronischen Effekte zurückgeführt werden. Die entsprechend substituierten Vorstufen der 4-Chlor-6-methyl-2-arylpyrimidine wurden anschließend mit verschiedenen Anilinen umgesetzt. Auf diese Weise wurde eine Substanzbibliothek aufgebaut und die Endstufen auf ihre Hemmwirkung gegenüber ABCG2 untersucht. Die Ergebnisse der biologischen Testung sind in Tabelle 5.3 aufgeführt. Ein Beispiel der vollständigen Konzentrations-Effekt-Kurven dreier potenter Vertreter der Testverbindungen ist in Abbildung 5.15 dargestellt.

Aus den Ergebnissen der biologischen Testung der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine ging hervor, dass elektronenziehende Substituenten in *meta*- und *para*-Position sich positiv auf die Hemmwirkung der Substanzen auswirkten. Daher wurde zunächst eine Nitrogruppe am Phenylrest in Position 2 ($R^1 = 4\text{-NO}_2$) des Pyrimidinrings eingeführt. Anschließend wurden Variationen der Substituenten am Phenylring in Position 4 ($R^2 = \text{NO}_2, \text{CN}, \text{OCH}_3$) untersucht. Die jeweils unsubstituierten Verbindungen ($R^1 = R^2 = \text{H}$ bzw. $R^2 = \text{H}, R^1 = \text{NO}_2, \text{Cl}, \text{CH}_3$) dienten als Referenz, um die auftretenden Unterschiede der biologischen Testung vergleichend bewerten zu können.

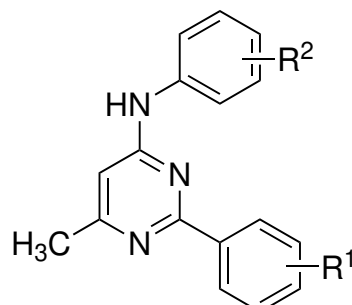
Die Substanz **111** mit einem 4-Nitrophenylrest in Position 2 und einer unsubstituierten 4-Anilinostruktur ($R^2 = \text{H}, R^1 = 4\text{-NO}_2$) zeigte mit $0,851 \mu\text{mol/l}$ ($I_{\text{max}} = 94 \%$) eine moderate Aktivität gegenüber ABCG2. Im Vergleich dazu inhibierte die gänzlich unsubstituierte Verbindung **88** ($R^1 = R^2 = \text{H}$) mit einem IC_{50} -Wert von $0,648 \mu\text{mol/l}$. Beide Derivate wiesen somit in etwa dieselbe Hemmwirkung gegenüber ABCG2 auf.

Das korrespondierende Derivat **64**, bei welchem die Position der Nitrogruppe ausgetauscht wurde ($R^2 = 4\text{-NO}_2, R^1 = \text{H}$) besaß mit einem IC_{50} -Wert von $0,053 \mu\text{mol/l}$ ein sehr hohes Inhibitionsvermögen ($I_{\text{max}} = 79 \%$).

Durch einen zusätzlichen Substituenten in *meta*-Position als R^2 ($3\text{-NO}_2, 3\text{-OCH}_3, 3\text{-CN}$) bei den Verbindungen **112–114** konnten ebenfalls starke Hemmwirkungen gegenüber ABCG2 erreicht werden. So zeigte die Substanzen **112** mit einem IC_{50} -Wert von $0,067 \mu\text{mol/l}$ eine ähnliche Inhibition von ABCG2 wie das Derivat **64**. Die Maximalinhibition war jedoch mit einem I_{max} -Wert von 53% im Vergleich zur Referenzsubstanz Ko143 um die Hälfte reduziert.

Bei der Substanz **113** mit einer Methoxyfunktion in *meta*-Position wurde die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 etwas abgeschwächt ($\text{IC}_{50} = 0,109 \mu\text{mol/l}$). Der I_{max} -Wert von 74% war jedoch im

Tabelle 5.3: Mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassays ermittelte IC₅₀-Werte der 2-Aryl-4-Anilino-6-methylpyrimidine; Referenzsubstanz Ko143: IC₅₀ = 0,221 µmol/l; n = 3.



Verb.	R ¹	R ²	IC ₅₀ ± σ [µmol/l]	I _{max} ± σ [%]
111	4-NO ₂	H	0,851 ± 0,312	94 ± 6
112	4-NO ₂	3-NO ₂	0,067 ± 0,017	53 ± 9
113	4-NO ₂	3-OCH ₃	0,109 ± 0,034	74 ± 16
114	4-NO ₂	3-CN	0,022 ± 0,001	80 ± 15
115	4-Cl	H	1,451 ± 0,051	89 ± 18
116	4-Cl	3-NO ₂	0,134 ± 0,059	54 ± 1
117	4-Cl	3-OCH ₃	1,990 ± 0,637	99 ± 26
118	4-Cl	3-CN	0,610 ± 0,090	80 ± 10
119	4-Cl	4-NO ₂	0,215 ± 0,009	61 ± 10
120	4-Cl	4-OCH ₃	0,320 ± 0,061	51 ± 1
121	4-Cl	4-CN	0,427 ± 0,183	103 ± 12
122	4-CH ₃	H	2,772 ± 1,894	100 ± 1
123	4-CH ₃	3-NO ₂	0,807 ± 0,809	62 ± 16
124	4-CH ₃	3-OCH ₃	0,788 ± 0,212	98 ± 12
125	4-CH ₃	3-CN	0,300 ± 0,065	68 ± 13
126	4-CH ₃	4-NO ₂	0,343 ± 0,006	77 ± 14
127	4-CH ₃	4-OCH ₃	2,120 ± 0,254	104 ± 23
128	4-CH ₃	4-CN	0,580 ± 0,047	90 ± 12
129	3-NO ₂	H	0,739 ± 0,197	86 ± 23
130	3-NO ₂	4-NO ₂	0,087 ± 0,032	53 ± 9
131	3-NO ₂	4-OCH ₃	0,171 ± 0,083	61 ± 12
132	3-NO ₂	4-CN	0,077 ± 0,036	74 ± 18
133	3-NO ₂	4-Cl	0,082 ± 0,003	64 ± 2
134	3-NO ₂	4-CH ₃	0,183 ± 0,004	54 ± 6
85 *	H	3-CN	0,122 ± 0,020	-
86 *	H	4-CN	0,128 ± 0,030	-
88 *	H	H	0,648 ± 0,150	-
63 *	H	3-NO ₂	0,133 ± 0,030	80 ± 8
64 *	H	4-NO ₂	0,053 ± 0,010	79 ± 8

* IC₅₀-Werte sind der Literatur entnommen: **85–88**[385]; **63/64**[379].

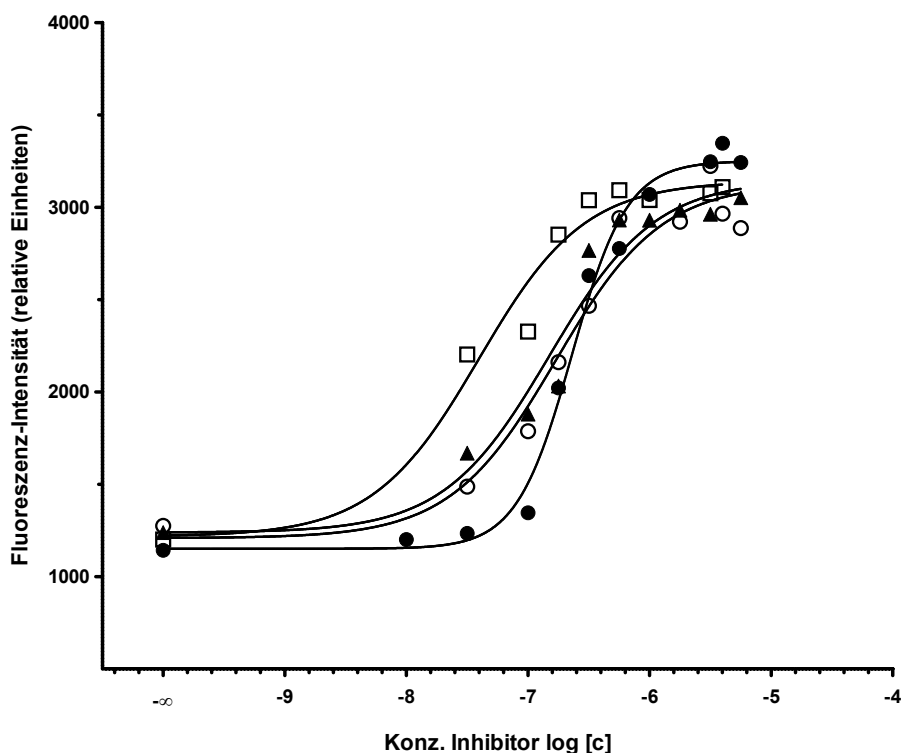


Abbildung 5.15 – Konzentrations-Effekt-Kurven der Verbindungen **112** (\blacktriangle , IC_{50} : 0,149 $\mu\text{mol/l}$), **113** (\circ , IC_{50} : 0,169 $\mu\text{mol/l}$) und **114** (\square , IC_{50} : 0,039 $\mu\text{mol/l}$) im Hoechst 33342 Akkumulationsassay mit Ko143 (\bullet , IC_{50} : 0,230 $\mu\text{mol/l}$) als Referenzsubstanz unter Verwendung der ABCG2-überexprimierenden Zelllinie MDCK II BCRP.

Vergleich mit Verbindung **112** deutlich erhöht.

Das Derivat **114** mit einer Nitrilfunktion in *meta*-Position (0,022 $\mu\text{mol/l}$, 80 % I_{max}) wies neben seiner sehr hohen inhibitorischen Aktivität eine mit Ko143 vergleichbare Maximalinhibition auf. Die Substanz stellte unter allen bislang untersuchten Verbindungen den stärksten ABCG2-Inhibitor dar.

Als nächstes wurde der 4-Nitrophenylsubstituent in Position 2 durch einen Phenylrest mit dem schwächer elektronenziehenden Chloratom ersetzt ($R^1 = 4\text{-Cl}$). Dies bewirkte durch den hydrophoben Effekt des Chlors eine Zunahme der Lipophilie der entsprechenden Testverbindungen. Die zu den Derivaten **111**–**114** korrespondierenden 4-Chlorphenylverbindungen **115**–**118** hatten insgesamt einen Abfall der inhibitorischen Aktivität der Substanzen zur Folge.

Die an R^2 unsubstituierte Verbindung **115** besaß mit einem IC_{50} von 1,451 $\mu\text{mol/l}$ eine deutlich geringere Aktivität als das entsprechende Nitroderivat **111** bzw. das unsubstituierte Pyrimidin **88**. Somit wirkte sich ein Chlorsubstituenten am Phenylrest in Position 2 negativ auf die Inhibitionsstärke der Substanz aus.

Die zusätzliche Einführung der elektronenziehenden Substituenten NO_2 und CN am Anilinrest in Position 4 konnte die Hemmwirkung wieder steigern. Das 3-Nitroderivat **116** zeigte dabei mit einem

IC₅₀-Wert von 0,134 µmol/l wieder eine deutliche Aktivität gegenüber ABCG2. Allerdings wies die Substanz verglichen mit der Referenzsubstanz Ko143 nur noch 54 % der Maximalinhibition auf.

Das Derivat **118** mit einer Nitrilfunktion inhibierte hingegen mit einem schwächeren IC₅₀-Wert von 0,610 µmol/l. Allerdings stieg die Maximalinhibition auf einen Wert von 80 % und näherte sich somit dem Wert der Referenzsubstanz wieder an.

Die Methoxytragende Substanz **117** inhibierte mit 1,990 µmol/l in vergleichbarer Stärke wie die unsubstituierte Verbindung **115**. Die elektronenschiebende OCH₃-Gruppe hatte im Gegensatz zu den korrespondierenden Derivaten mit Nitro- bzw. Nitrilsubstituenten in *meta*-Stellung keinerlei Auswirkungen auf die Hemmstärke.

Eine Veränderung der Position der Substituenten NO₂, OCH₃ und CN am Anilinrest von der *meta* in die *para*-Stellung hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivitäten der Substanzen. Die Variation der Nitrofunktion bewirkte, dass die Verbindung **119** mit einem IC₅₀-Wert von 0,215 µmol/l eine gleiche Hemmung von ABCG2 aufwies wie ihr Konstitutionsisomer mit der NO₂-Gruppe in *meta*-Position. Allerdings war auch beim *para*-substituierten Derivat die Maximalinhibition reduziert (I_{max} = 61 %).

Die Substanz **120** mit einer Methoxygruppe in *para*-Stellung inhibierte mit 0,320 µmol/l viel stärker als ihr Isomer **117** (IC₅₀ = 1,990 µmol/l). Auch für die Testverbindung **120** reduzierte sich jedoch die Maximalinhibition auf die Hälfte des Referenzniveaus (I_{max} = 51 %).

Beim Derivat **121** mit einer Nitrilgruppe in *para*-Position wurde mit einem I_{max} von 103 % eine ähnliche Maximalinhibition wie für die Referenzsubstanz erreicht. Mit einer Hemmwirkung von 0,427 µmol/l war die Verbindung genauso potent wie ihr *meta*-substituiertes Isomer **118**.

Für die Variation des Substitutionsmusters ergaben sich bei den Verbindungen **116** – **121** somit nur für die Methoxygruppe deutliche Unterschiede in den biologischen Aktivitäten der Derivate.

Bei den Testsubstanzen **122**–**128** wurde der 4-Chlorphenylrest in Position 2 durch einen 4-Tolylrest ersetzt. Die CH₃-Gruppe bewirkte im Gegensatz zum Chloratom einen schwach elektronenschiebenden Effekt auf den Phenylring, während die Lipophilie der Verbindungen nahezu unverändert blieb. Insofern konnten Unterschiede in den biologischen Aktivitäten zwischen 4-Chlor- und 4-Tolylderivaten auf die unterschiedlichen elektronischen Effekte der beiden Substituenten zurückgeführt werden.

Bei den Derivaten mit einem Tolylrest in Position 2 war die unsubstituierte Verbindung **122** (R¹ = 4-CH₃, R² = H) in dieser Substanzreihe diejenige, welche die geringste inhibitorische Aktivität aufwies (IC₅₀ = 2,772 µmol/l).

Durch die Einführung von elektronenziehenden Substituenten am Anilinrest (R² = NO₂, CN) konnten im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **122** deutlich höhere Hemmwirkungen erreicht werden.

Sowohl die *meta*-substituierte Nitro- als auch die Cyanoverbindung (Substanzen **123** und **125**) zeigten mit 0,807 µmol/l und 0,300 µmol/l eine deutliche Verbesserung der biologischen Aktivität gegenüber ABCG2. Beide Derivate erreichten jedoch nur 62 – 68 % der Maximalinhibition.

Eine Veränderung des Substitutionsmusters von der *meta*- in die *para*-Position bewirkte für die Nitroverbindungen eine leichte Verbesserung der Hemmwirkung. Die Substanz **126** inhibierte mit 0,343 µmol/l und einem I_{max}-Wert von 77 % etwas stärker als das Isomer **123** mit der Nitrogruppe in

meta-Position.

Für das Substanzpaar **125/128** mit einer Nitrilfunktion am Anilinrest verhielt sich die Änderung des Substitutionsmusters von der *meta*- in die *para*-Position genau umgekehrt zu den Nitroverbindungen. Hier zeigte das *meta*-substituierte Derivat **125** ($IC_{50} = 0,300 \mu\text{mol/l}$) eine etwas höhere Aktivität gegenüber ABCG2 als das Isomer **128**, welches die Nitrilfunktion in *para*-Position trug ($IC_{50} = 0,580 \mu\text{mol/l}$).

Für die *para*-Position zeigte sich bei der Verbindung **128** mit einem I_{max} von 90 % allerdings eine ähnlich hohe Maximalinhibition wie für die Referenzsubstanz Ko143.

Einen deutlicheren Unterschied in den biologischen Aktivitäten zeigten die beiden Derivate mit einer elektronenschiebenden Methoxygruppe in *meta*- bzw. *para*-Position. Das *meta*-Isomer **124** zeigte mit einem IC_{50} -Wert von $0,788 \mu\text{mol/l}$ und einer Maximalinhibition von 98 % eine ähnlich starke Inhibition wie das korrespondierende Nitroderivat (Substanz **123**). Hingegen bewirkte die Methoxygruppe in *para*-Position keine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität und war mit $2,120 \mu\text{mol/l}$ genauso aktiv wie die unsubstituierte Verbindung **122**.

Bei den bisherigen Pyrimidinen hatte sich herausgestellt, dass eine Nitrogruppe am Phenylrest in Position 2 gegenüber einem Chloratom oder einer Methylgruppe sich positiv auf die inhibitorische Aktivität der Substanzen auswirkte. Daher sollte im weiteren Verlauf der biologischen Testung der Pyrimidine untersucht werden inwiefern sich eine Variation in der Position des Nitrosubstituenten auf die Hemmung von ABCG2 auswirkte.

Des Weiteren war von Interesse, ob sich die Substituenten an den Phenylresten in Position 2 und 4 untereinander austauschen ließen. Daher wurde bei den Verbindungen **129–134** an der Position 2 ein Phenylrest mit einer Nitrogruppe in *meta*-Stellung eingeführt. Für den Anilinrest in Position 4 wurden die Substituenten NO_2 , OCH_3 , CN , Cl und CH_3 in *para*-Position gegenübergestellt. Dies ermöglichte einen Vergleich der biologischen Aktivitäten zwischen den jeweiligen Konstitutionsisomeren.

Das Substanzpaar **112/130**, bei welchem die Position der beiden Nitrofunktionen ausgetauscht wurden inhibierte mit etwa gleichen IC_{50} -Werten. Beide Substanzen zeigten zudem eine vergleichbare Maximalinhibition (**112**: $0,067 \mu\text{mol/l}$, 53 % I_{max} ; **130**: $0,087 \mu\text{mol/l}$, 53 % I_{max}).

Bei den Derivaten mit Methoxysubstituenten inhibierte die Substanz **131** ($R^1 = 3\text{-NO}_2$, $R^2 = 4\text{-OCH}_3$,) mit $0,171 \mu\text{mol/l}$ ebenfalls genauso stark wie ihr Analogon **113** ($R^1 = 4\text{-NO}_2$, $R^2 = 3\text{-OCH}_3$), welches einen IC_{50} -Wert von $0,109 \mu\text{mol/l}$ besaß. Während die Verbindung **113** mit einem I_{max} -Wert von 74 % eine hohe Maximalfluoreszenz zeigte, so führte der Austausch der Substituenten bei Verbindung **131** zu einer Reduzierung der Maximalinhibition ($I_{\text{max}} = 61 \%$).

Der Austausch der Methoxygruppe mit elektronenziehenden Nitrilfunktionen führte bei den Verbindungen **114** ($R^1 = 4\text{-NO}_2$, $R^2 = 3\text{-CN}$) und **132** ($R^1 = 3\text{-NO}_2$, $R^2 = 4\text{-CN}$) zu vergleichbaren Hemmwirkungen von $0,022$ bzw. $0,077 \mu\text{mol/l}$ bei einer maximalen Inhibition im Bereich von 74–80 % des I_{max} -Werts des Standardinhibitors Ko143.

Bei den Konstitutionsisomerenpaar **116** ($R^1 = 4\text{-Cl}$, $R^2 = 3\text{-NO}_2$) und **133** ($R^1 = 3\text{-NO}_2$, $R^2 = 4\text{-Cl}$) hatte der Substituentenaustausch ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Hemmwirkung der Substanzen. Beide Inhibitoren wiesen mit $0,134$ bzw. $0,082 \mu\text{mol/l}$ vergleichbare Hemmstärken auf. Nur

bei der Substanz **133** konnte der I_{\max} -Wert auf 64 % etwas verbessert werden.

Für das Isomerenpaar **123** ($R^1 = 4\text{-CH}_3$, $R^2 = 3\text{-NO}_2$) und **134** ($R^1 = 3\text{-NO}_2$, $R^2 = 4\text{-CH}_3$) führte der Austausch zwischen den Phenylresten in den Positionen 2 und 4 dazu, dass die Substanz **134** (0,183 $\mu\text{mol/l}$, 54 % I_{\max}) etwas aktiver war als das Isomer **123** (0,807 $\mu\text{mol/l}$, 81 % I_{\max}). Die Maximalinhibition der Substanz **134** wurde durch die Maßnahme jedoch reduziert und blieb in etwa auf der Hälfte des Fluoreszenzniveaus der Referenzsubstanz Ko143.

Um die einzelnen Beiträge der Substituenten zur inhibitorischen Wirkung der Substanzen gegenüber ABCG2 herauszustellen wurde für die Substanzen **111** – **134** eine Free-Wilson Analyse durchgeführt.

Die Free-Wilson-Analyse ist ein strukturbasierter Ansatz, bei der die biologische Aktivität der Ausgangsstruktur zu Grunde gelegt und mit der Aktivität von Analoga mit unterschiedlichen Substituenten verglichen wird. Die Methode von Free und Wilson basiert auf einem additiven mathematischen Modell, bei dem angenommen wird, dass ein bestimmter Substituent an einer bestimmten Position einen additiven und konstanten Beitrag zur biologischen Aktivität eines Moleküls leistet. Es handelt sich um eine Regressionstechnik, bei der die An- oder Abwesenheit von Substituenten oder Gruppen als einzige Moleküldeskriptoren in Korrelation mit der biologischen Aktivität stehen.[387, 388]

Sie wird durch die folgende Gleichung repräsentiert:

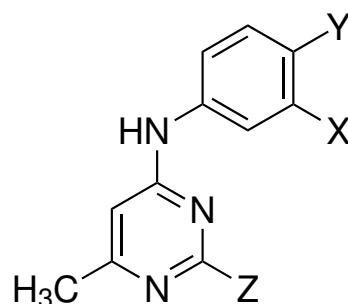
$$BA = \sum a_i x_i + \mu$$

Wobei BA die biologische Aktivität ist, μ ist die Aktivität der Referenzsubstanz, a_i ist der Beitrag der einzelnen Substituenten an den verschiedenen Positionen und x_i bezeichnet die Anwesenheit ($x_i = 1$) oder Abwesenheit ($x_i = 0$) eines bestimmten Substituenten.

Für das Free-Wilson Modell wurden die Aktivitäten der Substanzen zunächst in den pIC_{50} -Wert umgerechnet. Er berechnet sich aus dem IC_{50} -Wert durch die Bildung des negativen dekadischen Logarithmus aus dem Zahlenwert der Konzentration in mol/l .

Anschließend wurde für die Substanzen eine Matrix erstellt in der die An- oder Abwesenheit der Substituenten an den verschiedenen Positionen durch die Zahlen 1 und 0 repräsentiert wurde. Baierend auf dieser Matrix und den experimentellen Aktivitätsdaten wurde mit der freien Statistik-Software R eine lineare Regression durchgeführt. Aus dem Regressionsmodell konnte daraufhin die Free-Wilson Gleichung für das Modell erstellt werden. Eine Übersicht der Ergebnisse der Free-Wilson-Analyse ist in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Tabelle 5.4: Ergebnisse der Free-Wilson Analyse für die ausgewählten Pyrimidinstrukturen **111** – **134**. Als Referenzsubstanz diente die unsubstituierte Pyrimidin-Grundstruktur (Verbindung **88**). Die aus der Regressionsanalyse berechneten Aktivitätsdaten sind in der vorletzten Spalte der Tabelle angegeben. Die Residuen sind in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführt.



Verbindung	meta (X)	para (Y)	(Z)	pIC ₅₀ exp.	pIC ₅₀ ber.	Residuum pIC ₅₀ (exp.) – pIC ₅₀ (ber.)
111	H	H	4-NO ₂ -Ph	6,070	6,383	-0,313
112	NO ₂	H	4-NO ₂ -Ph	7,173	7,282	-0,112
113	OCH ₃	H	4-NO ₂ -Ph	6,963	6,826	0,134
114	CN	H	4-NO ₂ -Ph	7,651	7,369	0,291
115	H	H	4-Cl-Ph	5,838	5,632	0,208
116	NO ₂	H	4-Cl-Ph	6,874	6,532	0,338
117	OCH ₃	H	4-Cl-Ph	5,701	6,075	-0,375
118	CN	H	4-Cl-Ph	6,214	6,618	-0,408
119	H	NO ₂	4-Cl-Ph	6,667	6,623	0,047
120	H	OCH ₃	4-Cl-Ph	6,495	6,203	0,287
121	H	CN	4-Cl-Ph	6,370	6,466	-0,096
122	H	H	4-CH ₃ -Ph	5,557	5,416	0,144
123	NO ₂	H	4-CH ₃ -Ph	6,093	6,316	-0,226
124	OCH ₃	H	4-CH ₃ -Ph	6,104	5,859	0,241
125	CN	H	4-CH ₃ -Ph	6,522	6,403	0,117
126	H	NO ₂	4-CH ₃ -Ph	6,465	6,407	0,053
127	H	OCH ₃	4-CH ₃ -Ph	5,674	5,987	-0,317
128	H	CN	4-CH ₃ -Ph	6,237	6,251	-0,011
129	H	H	3-NO ₂ -Ph	6,131	6,168	-0,038
130	H	NO ₂	3-NO ₂ -Ph	7,060	7,159	-0,099
131	H	OCH ₃	3-NO ₂ -Ph	6,767	6,739	0,031
132	H	CN	3-NO ₂ -Ph	7,113	7,003	0,107
133	H	Cl	3-NO ₂ -Ph	7,087	7,087*	0,000
134	H	CH ₃	3-NO ₂ -Ph	6,737	6,737*	0,000
88	H	H	Ph	6,190	6,190**	0,000*

* Single Point Determination.

** Referenzsubstanz des Modells.

Die Gleichung, welche sich aus dem Free-Wilson-Modell berechnete, stellte sich wie folgt dar:

$$\begin{aligned}
 pIC_{50} = & +0,90(+0,23)[meta-NO_2] + 0,44(+0,23)[meta-OCH_3] + 0,99(+0,23)[meta-CN] \\
 & + 0,99(+0,23)[para-NO_2] + 0,57(+0,23)[para-OCH_3] + 0,83(+0,23)[para-CN] \\
 & + 0,92(+0,36)[para-Cl] + 0,57(+0,36)[para-CH_3] \\
 & + 0,19(+0,36)[4-NO_2-Ph] - 0,56(+0,35)[4-Cl-Ph] \\
 & - 0,77(+0,35)[4-CH_3-Ph] - 0,02(+0,36)[3-NO_2-Ph] \\
 & + 6,19(+0,29)
 \end{aligned}$$

$$(n = 25; r^2 = 0,848; s = 0,295; \text{F-Statistik}(df1,df2): \text{F-Wert}(12,12) = 5,595; \text{p-Wert} = 0,003)$$

Aus der Gleichung ist ersichtlich welchen Wert die Substituenten an den jeweiligen Positionen zur biologischen Aktivität beitragen. Hinter den einzelnen Beiträgen ist in Klammern die Standardabweichung der Koeffizienten angegeben. So ergaben sich für alle Substituenten am Anilinrest in Position 4 der Pyrimidinstruktur durchwegs positive Beiträge zur Hemmung von ABCG2. Den größten Einfluss zeigten hierbei die elektronenziehenden Substituenten (NO₂ und CN).

Für die Nitrogruppe ergaben sich Werte von +0,90 für die *meta*-Position und +0,99 für die *para*-Position. Somit konnte kein großer Unterschied zwischen beiden Positionen ermittelt werden. Dies deckte sich mit den Beobachtungen aus den experimentell ermittelten Werten zur biologischen Aktivität. Auch hier konnte zwischen den *meta*- oder *para*-substituierten Nitroderivaten oftmals kein signifikanter Unterschied in den Hemmwirkungen gegenüber ABCG2 festgestellt werden.

Ein ähnliches Bild stellte sich für die Cyanofunktion dar. Für die *meta*-Position wurde ein Beitrag von +0,99 berechnet und für die *para*-Position ein Wert von +0,83. Auch für die Cyanosubstituenten ergaben sich somit sehr ähnliche Beitragswerte zur biologischen Aktivität, obgleich eine leichte Bevorzugung der *meta*-Position erkennbar war. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls durch die Werte aus der biologischen Testung der Cyanoderivate bestätigt werden. Die Hemmwirkungen gegenüber ABCG2 waren für die Substanzen mit einem Cyanosubstituenten in *meta*- bzw. *para*-Position sehr ähnlich.

Für die elektronenschiebende Methoxyfunktion wurden für die *meta*- und *para*-Position positive Beiträge von +0,44 bzw. +0,57 berechnet. Somit war der Einfluss dieses Substituenten nicht so groß wie bei den elektronenziehenden Nitro- und Cyanofunktionen. Zwischen der *meta*- und *para*-Position ergaben sich auch für den Methoxysubstituenten keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz zur Cyanofunktion konnte für die OCH₃-Gruppe eine leichte Bevorzugung der *para*-Position beobachtet werden.

Die Beiträge des Chlor- bzw. Methylsubstituenten führen bei der Berechnung der Aktivitätswerte gemäß der Free-Wilson Gleichung zu einem identischen Ergebnis wie die experimentell ermittelten Hemmstärken. Dies liegt daran, dass diese Substituenten in der Free-Wilson Matrix nur einmal auftauchen. Dies sind sogenannte *single point determinations*. In solchen Fällen enthalten die Werte der Substituentenbeiträge den experimentellen Fehler der einzelnen Verbindung. In jedem Fall geben sie ein

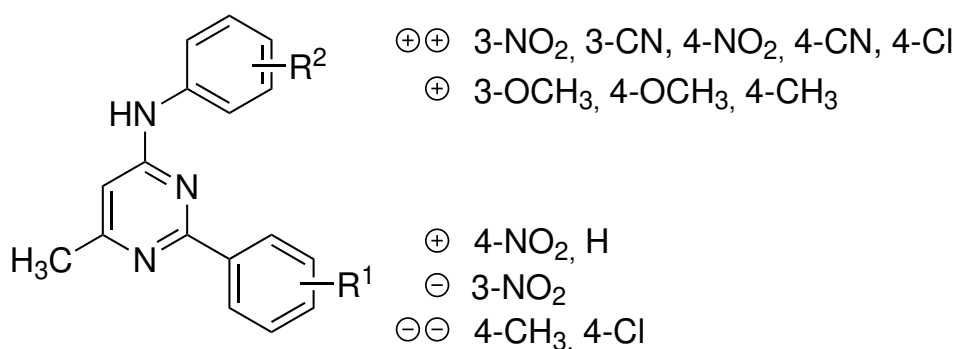


Abbildung 5.16 – Strukturmerkmale der Pyrimidine als ABCG2-Inhibitoren. $\oplus\oplus$: Substituenten zeigen eine sehr hohe Aktivität, \oplus : Substituenten zeigen eine hohe Aktivität, \ominus : Substituenten verringern die Aktivität, $\ominus\ominus$: Substituenten führen zu einem starken Aktivitätsverlust.

erstes Maß für die Wirkung eines bestimmten Substituent auf die biologischen Aktivität, jedoch ohne eine statistische Signifikanz aufzuweisen.

Für den Chlorsubstituenten ergab sich ein Beitrag von +0,92 für die *para*-Position während sich eine Methylgruppe mit +0,57 weniger stark auf die Hemmstärke auswirkte und den gleichen Einfluss zeigte wie eine Methoxyfunktion an dieser Position.

Betrachtet man den Einfluss des Phenylrestes in Position 2 der Pyrimidinstruktur so konnte lediglich ein 4-Nitrophenylrest an dieser Stelle des Moleküls einen positiven Beitrag von +0,19 zur biologischen Aktivität leisten. Ein 4-Chlorphenylrest verschlechterte die Hemmwirkung um -0,56 und ein *p*-Tolylrest sogar um -0,77. Die Einführung eines 3-Nitrophenylrestes an dieser Position fiel mit einem Beitrag von -0,02 hingegen weniger ins Gewicht. Eine Veränderung der Position des Nitrosubstituenten hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Hemmwirkung der Pyrimidinderivate an dieser Stelle der Molekülstruktur.

Im Vergleich zur Pyrimidingrundstruktur mit einem unsubstituierten Phenylrest an Position 2 konnte somit nur durch einen 4-Nitrophenylrest eine leichte Verbesserung der inhibitorischen Wirkung erreicht werden. Der etwas schwächer elektronenziehende Chlorsubstituent führte bereits zu einer Verschlechterung der Hemmwirkung. Eine Methylgruppe an dieser Position verringerte die biologische Aktivität noch weiter.

Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Effekte der Substituenten auf die Pyrimidin-Leitstruktur ist in Abbildung 5.16 gezeigt. Das aktivste Derivat stellte das Pyrimidin **114** dar (0,022 $\mu\text{mol/l}$, 80 % I_{max}). Die Substanz bewirkte eine stärkere Hemmung von ABCG2 als der Standardinhibitor Ko143 und zeigte zugleich ein ähnlich hohes Fluoreszenzniveau wie die Referenzsubstanz.

Auch weitere Verbindungen zeigten im Vergleich mit Ko143 höhere oder zumindest vergleichbare Aktivitäten gegenüber ABCG2. Somit konnte gezeigt werden, dass die Pyrimidine potente ABCG2-Inhibitoren sind und dadurch eine interessante Substanzklasse zur Aufhebung der durch ABCG2 vermittelten Multidrug-Resistenz darstellen.

5.4.2 Untersuchungen zur ABCG2-Selektivität

Zur Untersuchung der Selektivität wurde die Hemmwirkung von ausgewählten Vertretern der Pyrimidine gegenüber den ABC-Transportproteinen ABCB1 und ABCC1 bestimmt. Von den aktivsten Substanzen, mit einem IC_{50} -Wert $\leq 0,30 \mu\text{mol/l}$ und einiger moderat aktiver Verbindungen, wurde über ein Screeningverfahren die Aktivität mittels Calcein AM-Tests (Kapitel 8.2.3) mit der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie *A2780 adr* und mit der ABCC1 überexprimierenden Zelllinie *H69AR* ermittelt. Es wurde die relative Fluoreszenz der Verbindungen im Vergleich zum Standardinhibitor Cyclosporin A vermessen.

Inhibition von ABCB1

Wie aus Abbildung 5.17 ersichtlich ist, erreichte keine der untersuchten Testverbindungen ein Fluoreszenzmaximum von $F_{rel} \geq 25 \%$. Den größte Effekt verursachten die Substanzen **116** und **125** mit ungefähr 20 % bei $10 \mu\text{mol/l}$. Beide Derivate verfügten über einen elektronenziehenden Rest (NO_2/CN) als R^2 in *meta*-Position und über einen *para*-substituierten Phenylrest in Position 2 mit einer Chlor- bzw. Methylgruppe. Verbindung **129** ($R^1 = 3\text{-NO}_2$, $R^2 = \text{H}$) erreichte noch eine schwache Inhibition von $F_{rel} \approx 15 \%$. Die restlichen Derivate zeigten zumeist eine sehr schwache Inhibition von ABCB1 bis 10 % bei $10 \mu\text{mol/l}$. Da die meisten der gewählten Verbindungen eine starke Hemmung von ABCG2 zeigten sind die ermittelten, schwachen inhibitorischen Aktivitäten gegenüber ABCB1 zu vernachlässigen. Für die ausgewählten Vertreter der Substanzklasse der Pyrimidine konnte dadurch nachgewiesen werden, dass sie keine signifikante Hemmwirkung gegenüber ABCB1 besitzen.

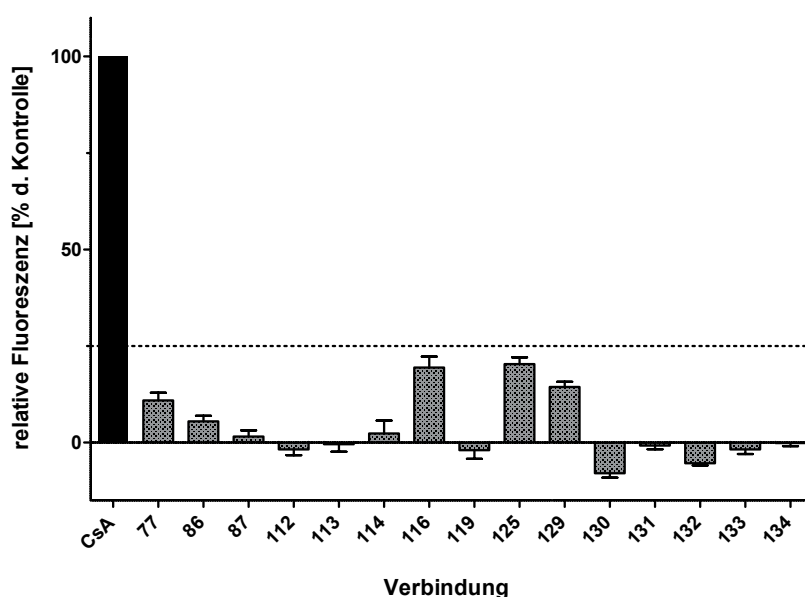


Abbildung 5.17 – Ergebnisse der relativen Fluoreszenzmessungen der ausgewählten Pyrimidinderivate bezogen auf den Standardinhibitor Cyclosporin A ($10 \mu\text{mol/l}$) an der ABCB1-überexprimierenden Zelllinie *A2780 adr*; $n = 3$.

Inhibition von ABCC1

Das Ergebnis des Screenings der ausgewählten Pyrimidine bezüglich ihres Inhibitionsvermögens gegenüber ABCC1 ist in Abbildung 5.18 abgebildet. Von allen untersuchten Derivaten zeigte nur die Verbindung **129** mit einem Fluoreszenzmaximum von $F_{rel} \approx 50\%$ eine erhöhte inhibitorische Aktivität gegenüber ABCC1. Die beiden Substanzen **76** und **125** wiesen mit relativen Fluoreszenzwerten von $F_{rel} \approx 20$ bis 25% nur sehr geringe Hemmwirkungen auf. Die anderen untersuchten Verbindungen zeigten keine biologische Aktivität gegenüber ABCC1. Mit Ausnahme von Substanz **129** wiesen die Pyrimidinderivate demnach keine signifikante Hemmwirkung gegenüber ABCC1 auf.

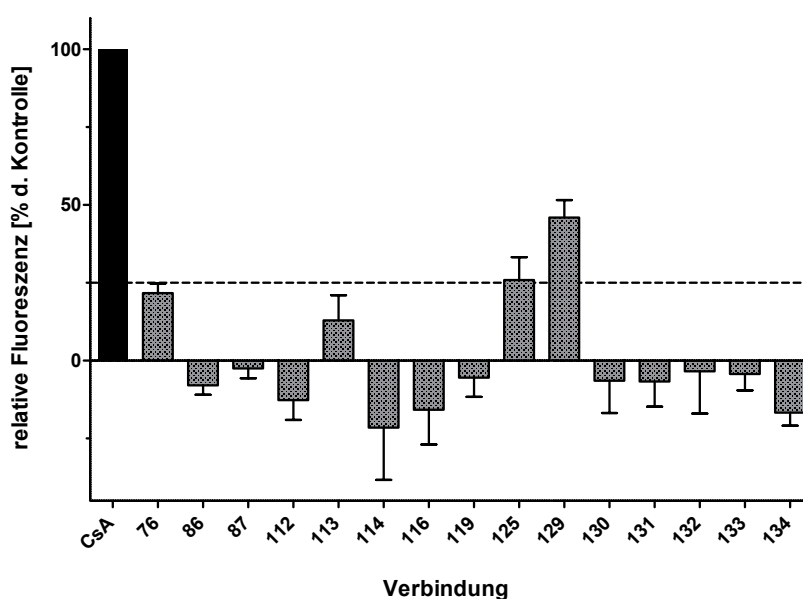


Abbildung 5.18 – Ergebnisse der relativen Fluoreszenzmessungen der ausgewählten Pyrimidinderivate bezogen auf den Standardinhibitor Cyclosporin A ($10\ \mu\text{mol/l}$) an der ABCC1-überexprimierenden Zelllinie H69AR; $n = 3$.

5.4.3 Untersuchungen zur intrinsischen Zytotoxizität und Resistenzauflösung

Intrinsische Zytotoxizität ausgewählter Inhibitoren mit Pyrimidinstruktur

Von zwei der aktivsten Verbindungen wurde stellvertretend für die gesamte Substanzklasse die intrinsische Zytotoxizität bestimmt. Zusätzlich zur Hemmwirkung gegenüber ABCG2 sollten die Verbindungen geringe Toxizitätswerte relativ zur inhibitorischen Aktivität aufweisen, um sich für zukünftige *in vivo* Studien zu eignen. Das toxische Verhalten der Substanzen gegenüber der Zelllinie MDCK II (resistente und sensitive Zellen) wurde mittels MTT-Test (Kapitel 8.2.3) untersucht und der therapeutische Quotient TQ (GI_{50}/IC_{50}) berechnet. Exemplarische Dosis-Effektkurven für die Modulatoren **114** und **132** sind in Abbildung 5.19 dargestellt.

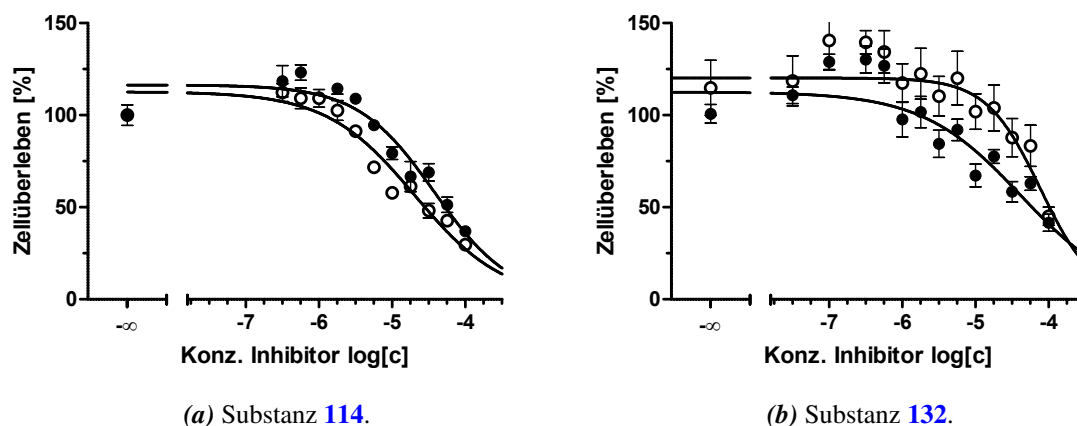


Abbildung 5.19 – Exemplarische Beispiele der Dosis-Effektkurven aus dem MTT-Test für die Verbindungen **114** und **132** unter Verwendung von resistenten (○) und sensitiven (■) MDCK II-Zellen.

Eine Übersicht der Daten aus den MTT-Tests ist in Tabelle 5.5 aufgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse ist zudem der Standardinhibitor Ko143 mit aufgeführt. Die beiden untersuchten Substanzen **114** und **132** wiesen wesentlich höhere GI_{50} -Werte auf als der Standardinhibitor Ko143. Die geringe intrinsische Zytotoxizität der Derivate **114** und **132** stellte die Pyrimidine aufgrund ihrer hohen TQ-Werte als geeignete Kandidaten für eine *in vivo* Testung heraus. Beide Vertreter besaßen eine sehr gute Hemmung von ABCG2 und erwiesen sich insbesondere im Hinblick auf ihre Zytotoxizitäten dem Standardinhibitor Ko143 als überlegen.

Überprüfung der Fähigkeit zur Aufhebung der Multidrug-Resistenz

Die Fähigkeit der Pyrimidinderivate die Resistenz von ABCG2-überexprimierenden Zellen gegenüber einem Zytostatikum aufheben zu können wurde mit Hilfe des MTT-Test untersucht. Hierzu wurden die resistente Zelllinie *MDCK II BCRP* mit unterschiedlichen Konzentrationen von SN-38 versetzt. Der Irinotecan-Metabolit **7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38)** ist ein Substrat von ABCG2.

Als Positivkontrolle wurden sensitive Zellen in Abwesenheit der zu untersuchenden Modulatoren mit SN-38 behandelt. Für die Negativkontrolle wurde die resistente Zelllinie ohne Zugabe von Modulatoren mit SN-38 versetzt. Zum Nachweis der Resistenzaufhebung wurden verschiedene Konzentrationen der ABCG2-Inhibitoren **112**, **113**, **114**, **119** und **132** zu den resistenten Zellen hinzugefügt.

Mit steigender Konzentration der eingesetzten Modulatoren sollten sich die sigmoidal-verlaufenden Dosis-Effektkurven von der Negativkontrolle hin zur Kurve der Positivkontrolle verschieben (d.h. hin zur Kurve der sensitiven Zelllinie ohne ABCG2-Expression). Dies diente zur Verifizierung, dass die Toxizität von SN-38 mit steigender Modulatorkonzentration zunahm. Die aus den MTT-Tests resultierenden Kurven für die untersuchten Modulatoren sind in Abbildung 5.20 dargestellt.

Aus der Abbildung geht hervor, dass mit steigenden Modulatorkonzentrationen bei allen untersuchten Inhibitoren die sigmoidalen Dosis-Effektkurven zu niedrigeren Konzentrationen von SN-38 hin verschoben

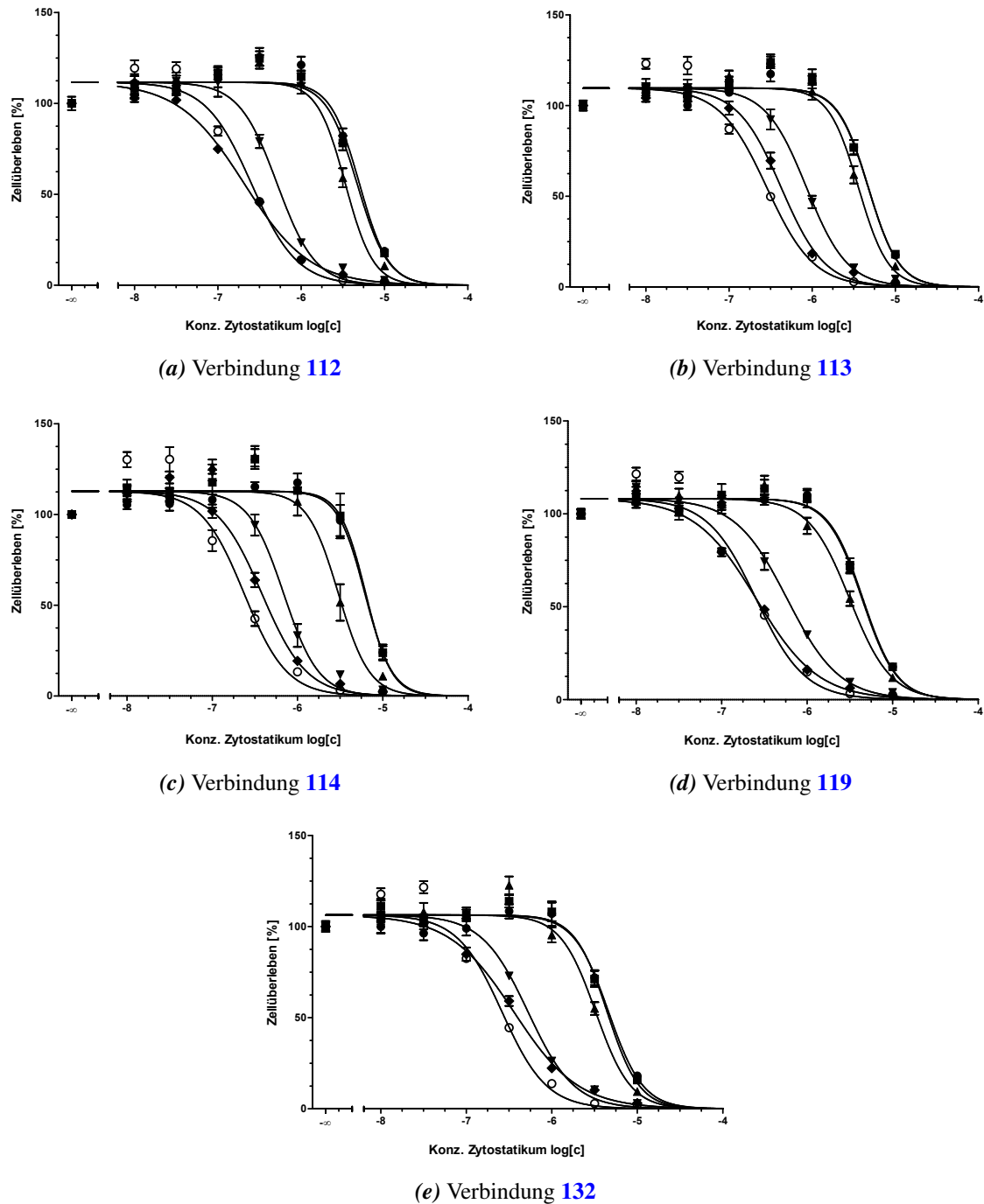
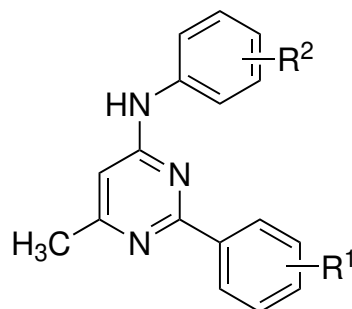


Abbildung 5.20 – Mit Hilfe des MTT-Assays ermittelte Dosis-Effektkurven zur Aufhebung der Multidrug-Resistenz für die ausgewählten Pyrimidinderivate 112 – 132. Die Kurven zeigen die Sensibilisierung der ABCG2-überexprimierenden Zelllinie MDCK II BCRP im Hinblick auf den Irinotecan-Metabolit SN-38. Die Pyrimidinderivate 112 – 132 wurden mit Konzentrationen von 0 $\mu\text{mol/L}$ (\bullet), 0,001 $\mu\text{mol/L}$ (\blacksquare), 0,01 $\mu\text{mol/L}$ (\blacktriangle), 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (\blacktriangledown) und 1 $\mu\text{mol/L}$ (\blacklozenge) eingesetzt und mit der sensitiven Zelllinie (\circ) ohne Zugabe des jeweiligen Modulators verglichen. $n = 3$.

Tabelle 5.5: Mit Hilfe des MTT-Test ermittelte GI₅₀-Werte der ausgewählten Pyrimidine und die zugehörigen IC₅₀- und TQ-Werte.

Verb.	R ¹	R ²	IC ₅₀ ± σ [μmol/l]	Zelllinie	GI ₅₀ ± σ [μmol/l]	TQ
114	4-NO ₂	3-CN	0,022 ± 0,010	res: [*] wt: [*]	37,8 ± 3,7 20,5 ± 2,2	1 718
132	3-NO ₂	4-CN	0,077 ± 0,040	res: [*] wt: [*]	77,2 ± 9,9 42,0 ± 6,0	1 003
Ko143 [389]			0,221 ± 0,020	res: [*] wt: [*]	11,3 ± 0,5 10,9	51,1

* res = MDCK II BCRP, wt = MDCK II

werden. In Abwesenheit der Modulatoren war eine Zytostatikakonzentration von (4,964 ± 0,434) μmol nötig, um das Wachstum der resistenten Zelllinie zu halbieren. Bei einer Modulatorkonzentration von 0,001 μmol/l trat noch kein signifikanter Effekt auf. Die Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen auf 0,01 μM führte bei Substanz **114** bereits zu einer Reduzierung auf die Hälfte der ursprünglich notwendigen Zytostatikakonzentration. Etwas geringer fiel der Effekt für die Substanzen **112**, **119** und **132** aus, für die bei 0,01 μmol/l die Konzentration von SN-38 um 1/3 reduziert wurde. Beim Derivat **113** sank die Zytostatikakonzentration nur noch um 25 % des ursprünglich notwendigen Wertes.

Mit der höchsten eingesetzten Modulatorkonzentration von 1 μmol/l konnte die Resistenz der transfizierten MDCK II BCRP Zelllinie nahezu vollständig aufgehoben werden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den GI₅₀-Werten von SN-38 für die sensitiven Zellen (0,258 ± 0,013) μmol und den entsprechenden Werten des Zytostatikums bei den eingesetzten Modulatorkonzentrationen von 1 μmol/l erkennbar. Die bei den resistenten Zellen notwendige SN-38-Konzentration konnte durch alle Inhibitoren um mehr als 90 % gesenkt werden.

Eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse liefert die Auftragung der aus den MTT-Tests resultierenden GI₅₀-Werte der Modulatoren bzw. deren negativer dekadischer Logarithmus (pGI₅₀) gegen die entsprechenden logarithmierten Konzentrationen der Substanzen.

Daraus kann durch nichtlineare Regression eine sigmoidale Dosis-Effektkurve unter Verwendung der Vier-Parameter- bzw. Drei-Parameter-logistischen Gleichung erhalten werden. Aus dieser Gleichung

lassen sich dann die **mittlere effektive Konzentration (EC₅₀)** für die Modulatoren ermitteln. Dies diente zur weiteren Charakterisierung der Fähigkeiten der Inhibitoren die von ABCG2 vermittelte Multidrug-Resistenz aufzuheben. Die entsprechenden Dosis-Effektkurven sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

Über die sigmoidalen Kurven aus Abb. 5.21 konnten EC₅₀-Werte von 0,016 µmol/l, 0,021 µmol/l, 0,011 µmol/l, 0,015 µmol/l und 0,017 µmol/l für die Substanzen **112**, **113**, **114**, **132** und **119** ermittelt werden. Die Verbindungen führten im MTT-Test zur Resiszenzaufhebung entsprechend zu vergleichbaren mittleren effektiven Konzentrationen.

Das Derivat **114** besaß im Hoechst 33342-Assay mit einem IC₅₀ von 0,022 µmol/l einen vergleichbaren Wert für die Hemmung von ABCG2.

Die Substanzen **112**, **113** und **132** hingegen wiesen im Vergleich zu ihren Inhibitionsstärken aus dem Hoechst-Akkumulationstest (0,067 µmol/l, 0,109 µmol/l und 0,077 µmol/l) etwas geringere EC₅₀-Werte auf.

Die Verbindung **119** erwies sich im MTT-Test mit 0,017 µmol/l als sehr viel aktiver als der mit dem Hoechst-Test ermittelte Inhibitionswert von 0,215 µmol/l.

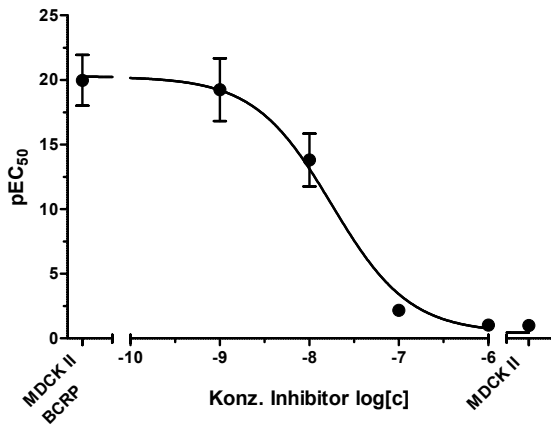
5.5 Ergebnisse und Ausblick

Innerhalb dieses Projektes wurden 46 ABCG2-Inhibitoren mit einer Pyrimidingrundstruktur synthetisiert und auf ihre Hemmwirkung gegenüber ABCG2 untersucht. Im Vergleich zu den Substanzklassen der Botryllamide und Monocarbonylanaloga des Curcumins (MACs) erwiesen sich die Pyrimidine als potente Inhibitoren von ABCG2. Einige der Vertreter zeigten IC₅₀-Werten unterhalb von 0,1 µmol/l und waren somit aktiver als der bekannte ABCG2-Inhibitor Ko143.

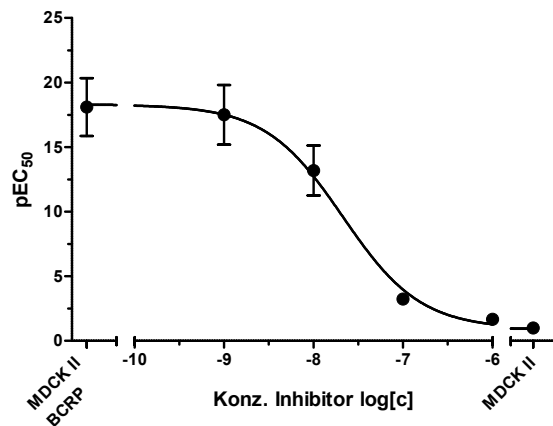
Es konnte gezeigt werden, dass bei den symmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine vor allem die Derivate mit elektronenziehenden Substituenten eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber ABCG2 aufwiesen. An der Position 2 der Pyrimidingrundstruktur erwies sich die Verknüpfung über einen NH-Linker jedoch der direkten Verbindung eines Phenylsubstituenten jedoch als unterlegen. Dies konnte auf den größeren Freiheitsgrad und die erhöhte Hydrophilie der Substanzen zurückgeführt werden, welche mit der Einführung eines zusätzlichen NH-Linkers einher ging.

Bei den 2-Aryl-4-Anilino-6-methylpyrimidinen zeigte sich, dass die substituierten Phenylreste an Position 2 der Pyrimidingrundstruktur keine signifikanten Auswirkungen auf das Inhibitionsvermögen der Derivate hatten. Der größere Einfluss auf die Inhibitionsstärke ging von den Substituenten am Anilinoest in Position 4 aus. Elektronenziehende Substituenten (NO₂ und CN) wirkten sich sehr stark auf die Hemmung von ABCG2 aus. Elektronenschiebende Substituenten (OCH₃) hatten ebenfalls einen positiven Effekt auf die inhibitorische Wirkung, jedoch weniger ausgeprägt als bei Substituenten mit starken elektronenziehenden Eigenschaften.

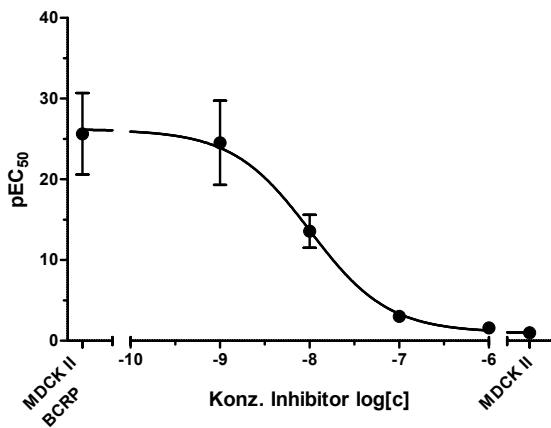
Für ausgewählte Vertreter der Pyrimidine wurden die Hemmwirkungen gegenüber den beiden ABC-Transportproteine ABCB1 und ABCC1 untersucht. Im Vergleich mit der Hemmwirkung der Substanzen gegenüber ABCG2 zeigten die ausgewählten Vertreter nur eine schwache Inhibition von ABCB1 und



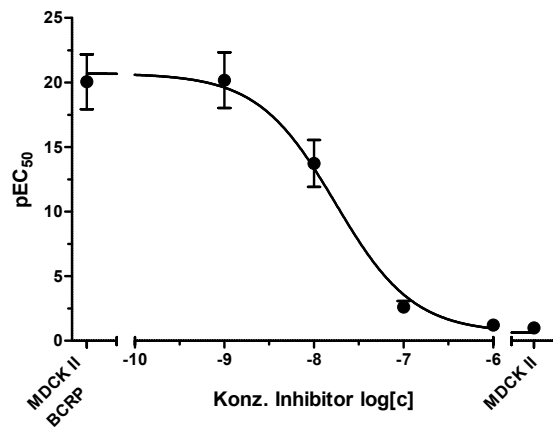
(a) Verbindung 112



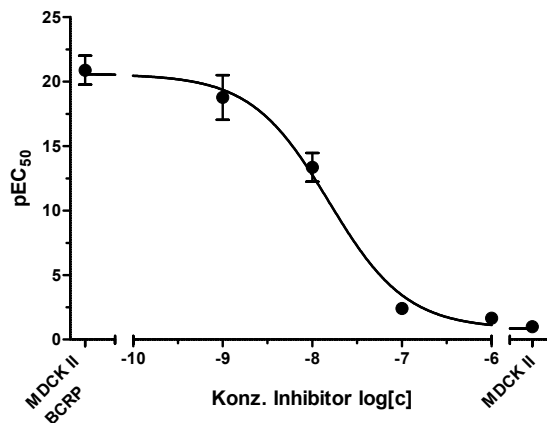
(b) Verbindung 113



(c) Verbindung 114



(d) Verbindung 119



(e) Verbindung 132

Abbildung 5.21 – Nichtlineare Regressionsgeraden der aus den MTT-Tests aus Abbildung 5.20 resultierenden pGI_{50} -Werte der Modulatoren 112–132 aufgetragen gegen die eingesetzten Konzentrationen; $n = 3$.

ABCC1. Aus den Ergebnissen konnte somit geschlossen werden, dass die Substanzklasse der Pyrimidine selektive ABCG2-Inhibitoren sind.

Für die aktivsten Derivate wurde die intrinsische Zytotoxizität untersucht und das Vermögen zur Aufhebung der ABCG2-vermittelten Multidrug-Resistenz überprüft. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Vertreter eine geringere Zytotoxizität aufwiesen als der Standardinhibitor Ko143. Zudem konnte durch Zugabe von Pyrimidin-Inhibitoren die Resistenz einer ABCG2-überexprimierenden Zelllinie gegenüber SN-38, einem aktiven Metaboliten von Irinotecan, nahezu vollständig aufgehoben werden.

Die in diesem Kapitel untersuchten Pyrimidine stellen potente ABCG2-Inhibitoren dar, die sich aufgrund ihrer geringen Zytotoxizitäten und ihrem Vermögen zur Aufhebung der ABCG2-vermittelten Multidrug-Resistenz für *in vivo* Studien eignen.

3D-QSAR von Chinazolin- und Pyrimidinderivaten als ABCG2-Inhibitoren

6.1 Allgemeines

Das Ziel von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) ist es, ein mathematisches Modell zu erzeugen, das den Zusammenhang zwischen der dreidimensionalen chemischen Struktur eines Moleküls und seiner (biologischen) Wirkung beschreiben kann. Die klassischen QSAR-Ansätze korrelierten die biologische Aktivitäten der Wirkstoffe mit ihren physikochemischen Eigenschaften oder binären Variablen, die stellvertretend für bestimmte strukturelle Parameter herangezogen wurden.[390, 391] Ein Nachteil der klassischen Ansätze war, dass der 3-dimensionalen Struktur der untersuchten Substanzen keine Beachtung geschenkt wurde.

Ein erster Versuch diesen Aspekt zu berücksichtigen war der Ansatz von Cramer und Milne [392] aus dem Jahr 1979, in welchem die Autoren die Moleküle untereinander verglichen, indem sie diese im Raum übereinanderlagerten und ihre Molekülfelder auf ein 3D-Gitter abbildeten. Basierend auf dieser Grundlage wurde die Methode weiterentwickelt und als *dynamic lattice-oriented molecular modeling system* (DYLOMMS) bekannt.[393]

Nachfolgend wurden daran gearbeitet die Methodik weiter zu verbessern. So wurde zur Berechnung der Korrelation zwischen den Molekülfeldern und den biologischen Aktivitäten der Verbindungen das *Partial Least Squares* (PLS)-Verfahren verwendet und die Repräsentation der Liganden erfolgte über die Darstellung ihrer elektrostatischen und sterischen Felder. Die auf diese Weise optimierte Vorgehensweise wurde schließlich CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) genannt.[394] Das CoMFA-Verfahren ist die wohl bekannteste und am meisten genutzte Methode der 3D-QSAR-Analyse. Die CoMFA-Analyse besaß jedoch auch ihre Grenzen und führte durch die relativ steilen Potentiale, welche zur Berechnung der Molekülfelder verwendet wurden, immer wieder zu Unstetigkeiten. Eine Lösung dieser Problematik lieferte die Veränderung der CoMFA-Felder. In einem analogen Verfahren wurde die Ähnlichkeit der

Moleküle über ihre sterischen und physikochemischen Eigenschaften im Raum ermittelt und anschließend mit ihren biologischen Affinitäten korreliert. Diese Erweiterung der CoMFA-Analyse wurde CoMSIA-Methode (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) genannt.[395]

Da die beiden Verfahren der CoMFA- und CoMSIA-Methode in diesem Kapitel verwendet wurden, um die 3D-QSAR-Modelle zu erstellen, soll kurz die Vorgehensweise bei einer solchen Analyse vorgestellt werden.

Für die Entwicklung von 3D-QSAR-Modellen ist es zunächst notwendig einen Datensatz von Molekülen auszuwählen. Eine der Voraussetzungen ist, dass die zu untersuchenden Verbindungen auf dieselbe Art und Weise mit der Zielstruktur interagieren. Anschließend müssen dreidimensionale Strukturen der Substanzen erzeugt werden, sofern der Datensatzes nicht auf experimentell bestimmten 3D-Strukturen (z.B. aus Röntgenkristallographie) basiert.

Im nächsten Schritt werden für die Atome jedes Molekül des Datensatzes die Partialladungen berechnet und daraufhin einige, energetisch günstige, Konformationen generiert. Diese werden dann mit geeigneten Methoden (z.B. Pharmakophor-basierten Verfahren) einander überlagert, um letztendlich eine vernünftige und einheitliche Anordnung der Moleküle im dreidimensionalen Raum zu erhalten.

Um die überlagerten Strukturen herum wird daraufhin eine große Box mit exakt definierten Gitterpunkten in einheitlichen Abständen platziert. Auf jedem dieser Gitterpunkte wird ein Sondenatom (z.B. ein Kohlenstoffatom, ein positiv oder negativ geladenes Atom, ein Wasserstoffbrückendonator bzw. Akzeptor oder eine hydrophobe Sonde) gesetzt und dessen Energie berechnet, die es an diesem Punkt im Gitter erfährt. Auf diese Weise werden die entsprechenden Felder generiert, welche in Form von Tabellen mit den entsprechenden Werten für jedes der Moleküle des Datensatzes gespeichert werden. Diese Tabellen besitzen meist mehrere tausende Spalten, die mit den biologischen Aktivitäten der Substanzen korreliert werden müssen.

Zu diesem Zweck wird zumeist eine PLS-Analyse durchgeführt. Zusätzlich wird durch Kreuzvalidierung die interne Vorhersagekraft des Modells bestimmt. In der *leave-one-out* Kreuzvalidierung wird eine der Substanzen des Datensatzes herausgenommen und mit den restlichen Verbindungen ein QSAR-Modell erstellt. Dieses dient wiederum als Grundlage zur Voraussage der Aktivität der ausgeschlossenen Verbindung. Das Prinzip wird solange wiederholt bis jedes Molekül des Datensatzes einmal ausgeschlossen wurde. Die Summe der quadrierten Differenzen zwischen experimentellen und vorhergesagten Aktivitätsdaten dient dann als Gradmesser für die Qualität des internen Vorhersagemodells.

Aus der PLS-Analyse folgt eine Regressionsgleichung mit vielen tausend Koeffizienten. Diese können als Konturdiagramme um die Moleküle des Datensatzes herum dargestellt werden. Aus ihnen lassen sich die zur Aktivität der Substanzen positiv und negativ beitragenden Terme der verschiedenen Parameter (z.B. elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen) im dreidimensionalen Raum aufzeigen.

6.2 Auswahl der Datensätze

Für die Entwicklung der 3D-QSAR-Modelle mussten zunächst geeignete Datensätze der zu untersuchenden Molekülstrukturen erstellt werden. Die Grundvoraussetzungen hierfür waren:

- Die verwendeten Verbindungen mussten den gleichen Wirkmechanismus aufzeigen, d.h. dieselbe Zielstruktur besitzen.
- Die biologischen Aktivitäten sollten mindestens eine Varianz von 2–3 logarithmischen Einheiten besitzen und gleichzeitig eine möglichst breite Verteilung aufzeigen.
- Die strukturellen Unterschiede sollten den chemischen Raum möglichst gut abdecken, um redundante Strukturen innerhalb der Datensätze zu minimieren.

Die für die 3D-QSAR-Modelle verwendeten Strukturen und Daten der biologischen Aktivitäten wurden im Rahmen der Dissertationen von Kapil Juvele und Michael Krapf untersucht und in größten Teilen bereits veröffentlicht.[324–327, 378, 396–398] Für die QSAR-Modelle wurden die Substanzen anhand ihrer Grundstruktur in folgende Datensätze aufgeteilt:

- **Projekt I: 4-Anilino-2-phenylsubstituierte Chinoline und Chinazoline**
- **Projekt II: 4-Anilino-2-arylsubstituierte Chinazoline- und Pyrimidine**
- **Projekt III: 2,4-Disubstituierte Pyridopyrimidine**
- **Projekt IV: Kombiniertes Datensatz aus 2,4-Disubstituierten Chinazolinen und Pyrimidinen**

Die Aktivitätsdaten der Verbindungen innerhalb der Datensätze wurden mit Hilfe des Hoechst 33342-Akkumulationsassay bestimmt und die Inhibitionsstärken der jeweiligen Moleküle in die logarithmierten pIC_{50} -Werte umgewandelt. Eine Übersicht der jeweiligen Strukturen der Datensätze und ihre korrespondierenden Aktivitäten sind den Tabellen im Anhang A zu entnehmen.

6.3 Konformationsanalyse der Moleküldatensätze

Da die 3D-QSAR-Analyse auf dem Vergleich struktureller Unterschiede der zu untersuchenden Inhibitoren basiert, ist die Überlagerung der Ligandenstrukturen ein entscheidender Schritt in der Analyse. Da keine geeigneten Kristallstrukturen der Zielverbindungen vorlagen, war es schwierig eine rezeptorgebundene Konformation der Liganden abzuleiten. Somit konnte nicht direkt auf die gebundene bzw. bioaktive Konformation der Moleküle zurückgegriffen werden.

Die CoMFA- und CoMSIA-Analyse korreliert jedoch nur die Unterschiede der Liganden untereinander mit ihren biologischen Aktivitäten. Insofern ist die Kenntnis über die bioaktive Konformation nicht zwingend erforderlich, solange eine beliebige Konformation existiert, die für alle Verbindungen des Datensatzes gleich ist.

Zunächst mussten die Moleküle der jeweiligen Datensätze in 3D-Strukturen umgewandelt werden. Diese wurden mit Hilfe des Molecule-Bilders im Programm MOE[399] generiert und anschließend unter Verwendung des MMFF94x-Kraftfelds[400–404](*Merck molecular force field 94x*) einer lokalen Energieminimierung unterzogen.

Als Vorlage (Template) zur Überlagerung der einzelnen Strukturen diente die unsubstituierte Verbindung des jeweiligen Datensatzes. Die Verbindungen innerhalb der Datensätze besaßen alle ein sehr starres Grundgerüst mit wenigen drehbaren Bindungen. Daher wurde mit Hilfe von MOE, unter Verwendung des MMFF94x-Kraftfeld und den Standardeinstellungen, eine systematische Konformationsanalyse der jeweiligen Template-Strukturen durchgeführt. Von den erzeugten Konformationen wurde die energetisch günstigste (globale Minimum) als Vorlage zur Überlagerung aller anderen Moleküle des korrespondierenden Datensatzes ausgewählt.

6.4 Überlagerung der Einzelkonformationen

Wie im vorherigen Kapitel 6.3 beschrieben konnte auf keine bioaktive Konformation zurückgegriffen werden. Daher wurde für alle Verbindungen der Datensätze dieselbe Konformation der Template-Strukturen ausgewählt unter der Annahmen, dass die Moleküle auf ihr gemeinsames Grundgerüst übereinandergelagert werden.[405–408]

Für die Berechnung der relativen Anordnung der einzelnen Verbindungen auf die vorher festgelegte Konformation des Templates, Überlagerung oder Alignment genannt, wurde ein flexibler Ansatz gewählt. Die flexible Alignment-Methode beruht auf einer, alle Atome umfassenden, Technik, die Kraftfeld- und 3D-Ähnlichkeitsterme kombiniert. Dabei wird nach einer, auf der Gauß-Verteilung basierenden, Beschreibung von formgebenden und pharmakophorbasierten Merkmalen ein kollektives Alignment der Strukturen erzeugt.[409, 410]

Dazu wurde mit Hilfe eines SVL-Skriptes jede der nach Kapitel 6.3 minimierte 3D-Struktur des Datensatzes auf das korrespondierende Template abgebildet.[411] Die dafür verwendeten Parameter sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Die einander überlagerten Strukturen jedes Datensatzes wurden anschließend in einer MOE-Datenbank abgespeichert. Da bestimmte Methoden zur Bestimmung der Partialladungen konformationsabhängig sind[412] wurde die Berechnung der entsprechenden Ladungsterme an das Ende der Konformationsanalyse und des Alignments angeschlossen. Die für die Berechnung der elektrostatischen und hydrophoben Felder in den CoMFA- und CoMSIA-Analysen notwendigen Ladungen wurden unter Verwendung der semiempirischen PM3-Methode berechnet.[413–415]

Die auf diese Weise überlagerten Strukturen mit ihren Partialladungen wurden für jeden Datensatz als mol2-File abgespeichert und bildeten die Grundlage für die Berechnungen der CoMFA- und CoMSIA-Modelle. Die Überlagerung der Strukturen von **Projekt II** sind exemplarisch in Abbildung 6.1 abgebildet.

Tabelle 6.1: Einstellungen für das flexible Alignment zur Überlagerung der 3D-Strukturen.

Parameter	Einstellungen
Configuration Limit:	100
Alpha:	1
RMSD Tolerance:	0,5
Gradient Test:	0,01
Maximum Steps:	500
Conformational Search:	Randomly Rotate Single Bonds Preserve Chirality of Unconstrained Chiral Centers Randomly Invert Unconstrained Chiral Centers
Atom Based Similarity Terms	
Volume	1
Aromaticity	1
H-Bond Donor	3
H-Bond Acceptor	3
Hydrophobe	1
Hydrophobe - Don/Acc	-1
Partial Charge	1

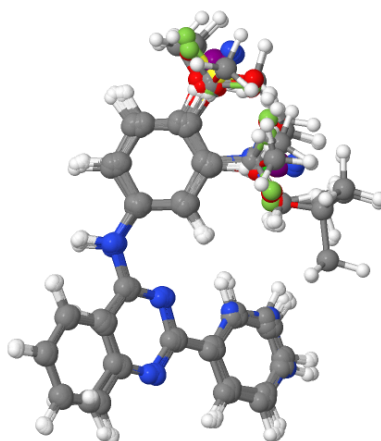
6.5 Ergebnisse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle

Die CoMFA und CoMSIA-Methode basiert, wie bereits in Kapitel 6.1 kurz erläutert, auf dem Vergleich der elektrostatischen und sterischen Felder der überlagerten 3D-Strukturen der Liganden im Raum. Dazu werden diese in ein Gitter platziert, dessen einzelne Gitterpunkte in einem gleichmäßigem Abstand von 2 Å zueinander angeordnet sind. Die berechneten Interaktionsenergien an den einzelnen Gitterpunkten um die Liganden herum werden anschließend mit ihrer biologischen Aktivität korreliert. Aus diesem großen Datensatz erfolgt schließlich die Erstellung einer Regressionsgleichung mit Hilfe der PLS-Analyse.

Für die Berechnung der Felder bei der CoMFA-Analyse werden zwei Potentiale genutzt, wobei als Sondenatom an den Gitterpunkte im Allgemeinen ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom mit einer einfach positiven Ladung (+1) verwendet wird. Die elektrostatischen Energien zwischen den Sonden- und Ligandatomen an jedem der Gitterpunkte ergeben sich aus dem Coulomb-Potential:

$$E_{elek} = \sum_{i=1}^n \frac{q_i q_j}{D r_{ij}}$$

Wobei E_{elek} = Coulomb-Energie; q_i = Partiaalladung des Atoms i vom Liganden; q_j = Ladung des Sondenatoms; D = Dielektrizitätskonstante und r_{ij} = Abstand zwischen Atom i und Gitterpunkt j (an welchem das Sondenatom platziert ist).



Jmol

Abbildung 6.1 – Exemplarisches Beispiel zur Überlagerung der Verbindungen anhand des Datensatz von **Projekt II**. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt.[416]

Die sterischen Wechselwirkungen werden über das Lennard-Jones-Potential wie folgt berechnet:

$$E_{vdW} = \sum_{i=1}^n (A_{ij}r_{ij}^{-12} - C_{ij}r_{ij}^{-6})$$

Wobei E_{vdW} = van der Waals-Interaktionsenergie; r_{ij} = Abstand zwischen Atom i und Gitterpunkt j (an welchem das Sondenatom platziert ist) und A_{ij} bzw. C_{ij} , welches Konstanten sind, die von den jeweiligen van der Waals-Radien der korrespondierenden Atome abhängen.

Die Form der beiden Potentiale ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist verlaufen beide Potential in Richtung niedriger Abstände sehr steil. Dies führt dazu, dass bei geringen Abständen zwischen Sonden- und Ligandatom sehr große Werte erzeugt werden. Daher wird meist ein Grenzwert (*cut-off*) definiert (z.B. 30 kcal/mol), um die Potentialwerte zu begrenzen. Die CoMSIA-Methode verläuft in ähnlicher Weise zur CoMFA-Analyse, jedoch werden nicht die Unterschiede zwischen den Molekülen herausgestellt, sondern ihre relativen Ähnlichkeiten zueinander. Hierbei stehen Felder zu den elektrostatischen, sterischen, hydrophoben, sowie Wasserstoffbrückendonor- und Akzeptor-Eigenschaften zur Verfügung. Die Ähnlichkeitswerte werden dabei abstandsabhängig über eine Gauß-Kurve zwischen dem Sondenatom und den Ligandatomen bestimmt.

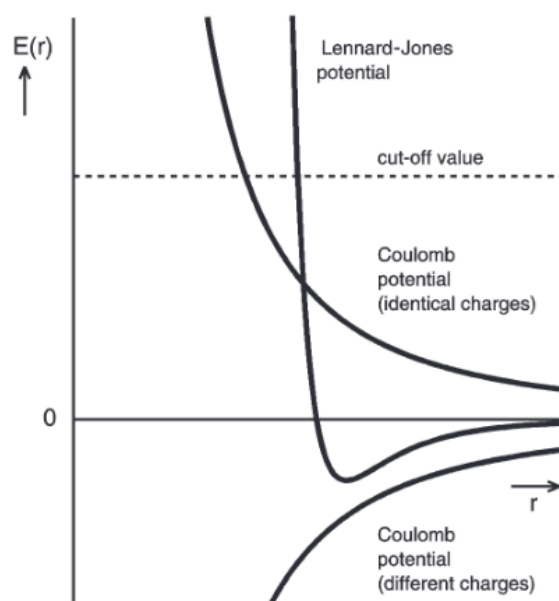


Abbildung 6.2 – Coulomb- und Lennard-Jones-Potentiale für die CoMFA-Analyse. Entnommen von Kubinyi [417]

Für das Molekül j des Datensatzes wird das Ähnlichkeitsmaß am Gitterpunkt q wie folgt berechnet:

$$A_{F,k}^q(j) = - \sum_{i=1}^n w_{probe,k} w_{ik} e^{-\alpha r_{iq}^2}$$

Wobei i = Summenindex über alle Atome des untersuchten Moleküls j ; w_{ik} = Wert der physikochemischen Eigenschaft k des Atoms i ; $w_{probe,k}$ = Sondenatom mit Ladung $+1$, Radius 1 \AA und der hydrophoben Eigenschaft $+1$; α = Dämpfungsfaktor und r_{iq} = gegenseitiger Abstand zwischen Sondenatom am Gitterpunkt q und Atom i des untersuchten Moleküls.

Die Steigungen der resultierenden CoMSIA-Felder sind nicht so steil wie für das Coulomb- bzw. Lennard-Jones-Potential bei der CoMFA-Analyse (vgl. Abb. 6.3). Daher kann auf die Verwendung von Grenzwerten bei der CoMSIA-Methode verzichtet werden. Des Weiteren kommt es in der CoMSIA-Berechnung auch bei sehr kleinen Abständen zwischen den Atomen immer noch zu nachvollziehbaren Feldwerten. Insofern stellt die CoMSIA-Methode eine Erweiterung der klassischen CoMFA-Analyse dar. Die Ergebnisse aus den CoMFA- und CoMSIA-Berechnungen werden in einer Datenmatrix gespeichert, wobei die biologischen Aktivitäten der Verbindungen die unabhängigen Variablen und die korrespondierenden Feldwerte die abhängigen Variablen des Datensatzes bilden. Mit Hilfe der PLS-Analyse werden aus dieser Datenmatrix schrittweise die (wichtigen) Informationen extrahiert, um diese anschließend in ein lineares Modell zur Erklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen umzuwandeln. Diese extrahierten Daten werden als latente Variablen bezeichnet und enthalten eine maximale Varianz der abhängigen Variablen (CoMFA- bzw. CoMSIA-Feldwerte), die gleichzeitig in optimaler Weise mit der unabhängigen

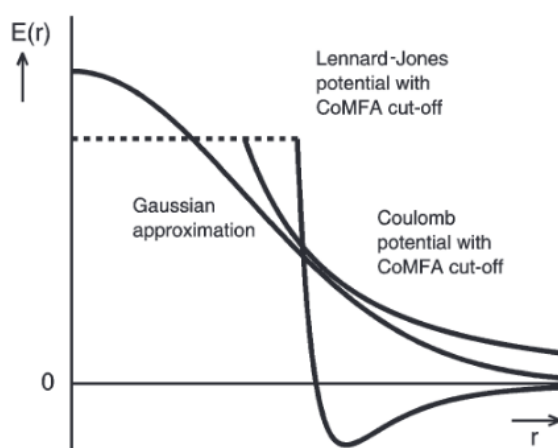


Abbildung 6.3 – Vergleich zwischen der Gauß-Kurve der CoMSIA-Methode mit den Potentialen aus der CoMFA-Analyse. Entnommen von Kubinyi [417]

Variablen (biologische Wirkung) korrelieren. Der schrittweise Vorgang bei der PLS-Analyse geschieht auf die Weise, dass mit der ersten latenten Variablen der größte Teil der Varianz erfasst werden kann. In den weiteren Schritten wird versucht die Restvarianz sukzessive zu beschreiben. Die PLS-Analyse ist eng verwandt mit der Hauptkomponentenanalyse.

Um die Ergebnisse der PLS-Analyse zu validieren, wurde eine Verbindung aus dem Datensatz temporär entfernt und basierend auf den verbliebenen Daten ein Regressionsmodell erstellt. Dieses wurde dann genutzt, um die biologische Aktivität der zuvor entfernten Substanz vorherzusagen (*Leave-One-Out-Kreuzvalidierung, LOO*). Die Abweichung des berechneten Werts der Verbindung mit der experimentell bestimmten Aktivität diente dann als Maß für die Güte des Regressionsmodells. Als statistische Größen zur Bewertung der Ergebnisse dienen hierfür:

- Die Summe der Abweichungsquadrate PRESS (*PREDictive error Sum of Squares*):

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (Y_{i,pred.} - Y_{i,exp.})^2$$

($Y_{i,pred.}$: vorhergesagte Aktivitäten; $Y_{i,exp.}$: experimentelle Aktivitäten)

- Der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage q^2 :

$$q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{i=1}^n (Y_{i,exp.} - \bar{Y})^2}$$

(\bar{Y} : Mittelwert der experimentellen Aktivitäten)

Der q^2 -Wert liefert eine Abschätzung zur Aussagekraft des QSAR-Modells. Er kann Werte von $-\infty$ bis 1 annehmen, wobei ein q^2 von 1 einem perfekten Modell entspräche, welches keinen Unterschied zwischen experimentellen und vorhergesagten Aktivitätsdaten aufweisen würde. Ein negativer Wert für q^2 hieße, dass das Modell schlechter ist, als wenn die Mittelwerte aller Aktivitätsdaten zur Vorhersage der biologischen Wirkung herangezogen würden, wobei letzteres einen q^2 -Wert = 0 entspräche.

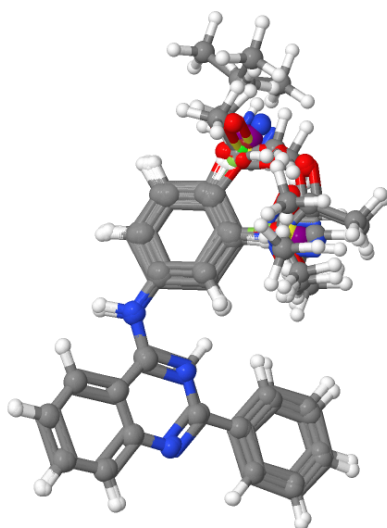
Zur Validierung der QSAR-Modelle wurden die kreuzvalidierten q^2 -Werte, sowie die **Standardabweichung der Summe der Abweichungsquadrate (PRESS)** mit steigender Komponentenanzahl ermittelt. Dem Modell wurden solange neue Komponenten hinzugefügt bis das q^2 durch Hinzunahme einer weiteren Komponente nicht mehr gesteigert wurde, d.h. dass keine signifikante Information dazugewonnen werden konnte. Ein QSAR-Modell gilt dann als valide wenn die q^2 -Werte oberhalb von 0,4–0,5 liegen.[297]

Die in den folgenden Unterkapiteln diskutierten 3D-QSAR-Modelle wurden mit der 3D-QSAR-Suite des Programms SYBYL-X erstellt.[418] Die Berechnung der Ladungen der überlagerten Strukturen wurde mit dem Programm MOE durchgeführt unter Verwendung der PM3-Methode.

Für die Berechnung der CoMFA- und CoMSIA-Felder wurden die Standardeinstellungen von SYBYL-X verwendet. Die Kreuzvalidierung erfolgte nach der **Leave-One-Out (LOO)**-Methode. Für die PLS-Analyse wurde ein Column-Filtering von 1.0 verwendet.

6.5.1 Projekt I: 4-Anilino-2-phenylsubstituierte Chinoline und Chinazoline

Der Datensatz basierte auf den Ergebnissen aus den Dissertationen von Kapil Juvale und Michael Krapf bzw. den daraus erfolgten Publikationen.[325, 326] Als Grundgerüst wurden 2-Phenyl-4-Anilino-substituierte Chinolin- und Chinazolinstrukturen ausgewählt. Die Überlagerung aller Verbindungen ist der Abbildung 6.4 zu entnehmen.



Jmol

Abbildung 6.4 – Überlagerung aller Strukturen des Datensatz von **Projekt I**. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt.[416]

Tabelle 6.2: Auszüge aus der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von **Projekt I**.

CoMFA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung	
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}
Both	-0,460	1	0,575
Elektrostatisches (e)	-0,799	1	0,638
Sterisches (s)	-0,065	1	0,491
H-Brücken (hb)	-0,054	3	0,505
e + s + hb	-0,245	3	0,549
CoMSIA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung	
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}
Elektrostatisches (e)	0,104	2	0,458
Sterisches (s)	-0,043	1	0,486
Hydrophobes (h)	0,172	1	0,433
H-Brücken Donor (d)	0,012	4	0,498
H-Brücken Akzeptor (a)	0,147	4	0,462
e + h	0,189	1	0,428
e + d	0,230	3	0,432
s + h	0,160	1	0,436
e + h + d	0,203	4	0,447
e + d + a	0,222	5	0,450
e + h + d + a	0,181	4	0,453
e + s + h + d	0,166	1	0,435
e + s + h + d + a	0,117	1	0,447

Die zugehörigen strukturellen und biologischen Daten sind der entsprechenden Tabelle im Anhang [A.1](#) aufgeführt. Einige Auszüge der Ergebnisse aus der PLS-Analyse der berechneten CoMFA- und CoMSIA-Modelle sind der Tabelle [6.2](#) zu entnehmen. Wie aus Tabelle [6.2](#) ersichtlich ist lieferte die CoMFA-Analyse des Datensatzes nur negative Werte für den q^2 -Wert der jeweiligen Felder. Die CoMFA-Analyse war demnach ein schlechteres Modell als wenn die mittleren Aktivitätswerte zur Vorhersage der biologischen Wirkung herangezogen würden.

Die Betrachtung der CoMSIA-Ergebnisse zeigte, dass diese, mit Ausnahme des sterischen Feldes, eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur CoMFA-Methode darstellten. Die besten Modelle konnten mit der Kombination aus elektrostatischem und Wasserstoffbrückendonor-Feld ($q^2 = 0,222$), sowie aus elektrostatischem, Wasserstoffbrücken-Donor- und Akzeptor-Feldern ($q^2 = 0,230$) erreicht werden. Trotzdem ergaben auch die CoMSIA-Analysen keine zufriedenstellenden QSAR-Modelle, die eine signifikante Aussagekraft zur Vorhersage der biologischen Aktivitäten liefern konnten.

Ein Grund dafür könnten sogenannte *activity cliffs* innerhalb des Datensatzes sein. Als *activity cliffs* werden Substanzpaare bezeichnet, die einen strukturell ähnlichen Aufbau zeigen, sich jedoch in ihrer biologischen Wirkung deutlich unterscheiden.[\[419\]](#) Dies sei am Beispiel zweier Substanzen des Datensatzes

in Abbildung 6.5 gezeigt. Der Unterschied zwischen den Strukturen ist marginal. Die Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch ein Atom innerhalb des molekularen Grundgerüst, zeigen jedoch Unterschiede in der biologischen Aktivität von etwa einer logarithmischen Einheit. Des Weiteren ist ein Austausch zwischen einem Stickstoff (N) und einer Kohlenstoffeinheit (CH) in aromatischen Systemen isoster zueinander (Azalogie).[420] Diese geringen Veränderungen der strukturellen Merkmale haben einen drastischen Effekt auf die biologische Wirkung der Verbindungen. Die CoMFA- und CoMSIA-Methoden vermögen es nicht die feinen Differenzen im Aufbau mit der großen Diskrepanz in den Aktivitäten aufzulösen und miteinander zu korrelieren. Dies kann einer der Gründe sein, warum die CoMFA- und CoMSIA-Analysen für den Datensatz versagten.

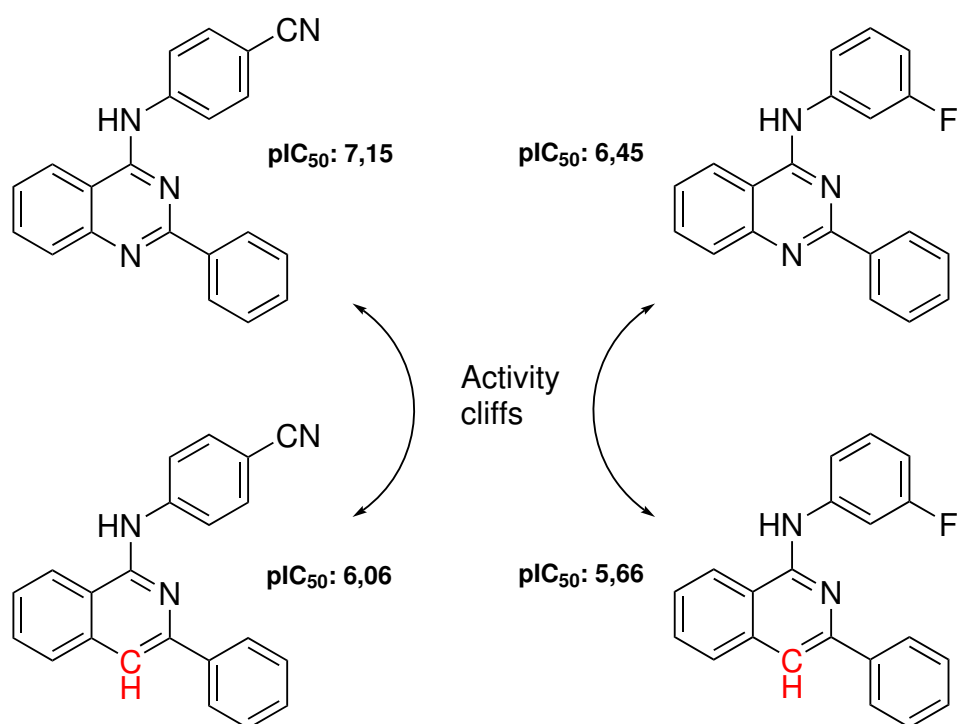


Abbildung 6.5 – Exemplarisches Beispiel für activity cliffs im Datensatz von **Projekt I**. Die Ersatz des Stickstoffs (N) mit der isosteren CH-Gruppe führt zu deutlichen Unterschieden in der biologischen Aktivität der Substanzpaare.

6.5.2 Projekt II: 4-Anilino-2-arylsubstituierte Chinazoline- und Pyrimidine

Für den Datensatz wurden ABCG2-Inhibitoren mit Chinazolin- und Pyrimidingrundgerüst ausgewählt (s. Tabelle A.3). Die besten Ergebnisse der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Felder sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Eine vollständige Darstellung der PLS-Analyse aller Feldkombinationen ist in Tabelle A.4 des Anhang A.2 zu finden. Eine Betrachtung der einzelnen CoMFA-Felder für sich zeigte, dass

Tabelle 6.3: Auszüge aus der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von **Projekt II**.

CoMFA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung	
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}
Both	0,265	2	0,388
Elektrostatisches (e)	0,275	6	0,404
Sterisches (s)	-0,011	1	0,451
H-Brücken (hb)	0,280	1	0,380
e + s + hb	0,331	1	0,366
CoMSIA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung	
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}
Elektrostatisches (e)	0,397	2	0,352
Sterisches (s)	-0,100	1	0,470
Hydrophobes (h)	0,175	6	0,431
H-Brücken Donor (d)	-0,046	2	0,463
H-Brücken Akzeptor (a)	0,434	3	0,345
e + s	0,390	2	0,354
e + h	0,501	4	0,327
h + a	0,486	5	0,336
e + s + h	0,473	3	0,332
e + h + a	0,514	4	0,323
e + h + s + d	0,431	2	0,342
e + h + s + a	0,484	4	0,333
e + s + h + d + a	0,413	3	0,351

das elektrostatische und Wasserstoffbrücken-Feld mit q^2 -Werten von 0,275 bzw. 0,280 noch die besten QSAR-Modelle ergaben. Das sterische Feld führte bei der CoMFA-Analyse zu negativen Werten für den kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten. Das beste CoMFA-Modell zur internen Vorhersage lieferte die Kombination aus elektrostatischen, sterischen und Wasserstoffbrücken-Molekülfeldern (e + s + hb; $q^2 = 0,331$). Insgesamt war die CoMFA-Analyse mit den relativ niedrigen Korrelationskoeffizienten keine geeignete Methode, um aussagekräftige Vorhersagen der biologischen Aktivitäten des Datensatzes zu ergeben.

Die CoMSIA-Analyse des Datensatzes führte bei den einzelnen Feldern zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während mit dem elektrostatischen (e) und H-Brücken Akzeptorfeld (a) q^2 -Werte von

0,397 bzw. 0,434 resultierten, ergab das hydrophobe Molekülfeld nur ein q^2 von 0,175. Sterische und Wasserstoffbrückendonor-Eigenschaften korrelierten in keinerlei Weise mit den biologischen Aktivitäten, was sich in den negativen Werten des Korrelationskoeffizienten für beide CoMSIA-Felder widerspiegelte.

Aus der Tabelle 6.3 geht weiterhin hervor, dass die besten Modelle eine Kombination der CoMSIA-Felder aus elektrostatischen und hydrophoben (e + h), sowie elektrostatischen, hydrophoben und Wasserstoffbrücken-Akzeptor (e + h + a) Molekülfeldern lieferten mit q^2 -Werten von 0,501 bzw. 0,514 bei vier Komponenten. Die übrigen Feldkombinationen ergaben bei den besten CoMSIA-Modellen lediglich ein q^2 im Bereich von 0,390–0,486. Ein Grund für die geringen Korrelationen lag im Datenbereich der pIC_{50} -Werte des Datensatzes. In Abbildung 6.6 ist die Häufigkeitsverteilung der biologischen Aktivitäten der Verbindungen zur Erstellung der QSAR-Modelle abgebildet. Wie man der Abbildung

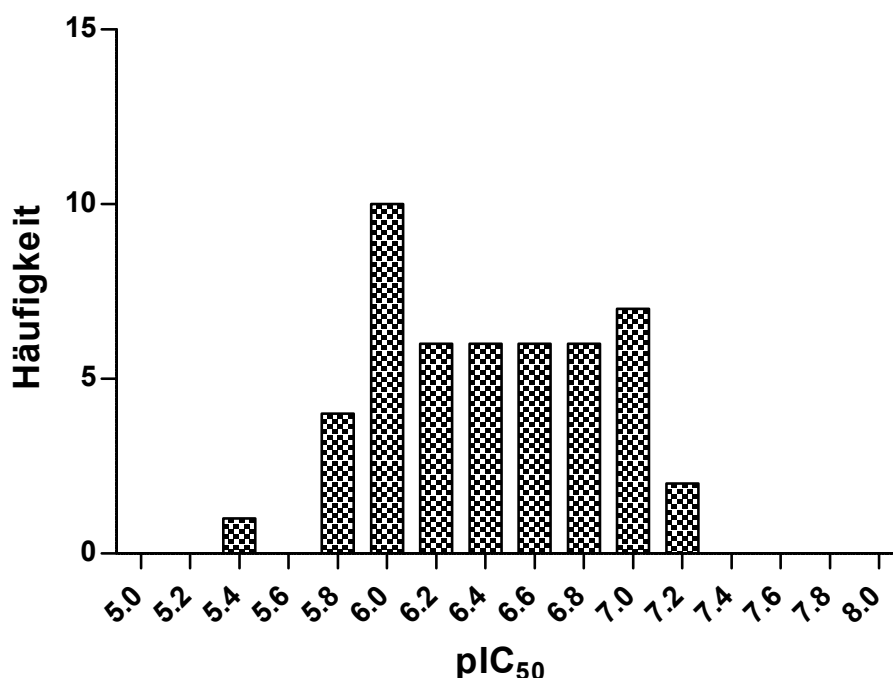


Abbildung 6.6 – Häufigkeitsverteilung der biologischen Aktivitäten des Datensatz von **Projekt II**.

entnehmen kann folgten die biologischen Aktivitäten nicht exakt einer Normal- bzw. Gauß-Verteilung. Idealerweise entsprechen die Aktivitätsdaten bei der Erstellung von 3D-QSAR-Modellen einer Normalverteilung mit einem Maximum innerhalb des Mittelwerts des Datenbereiches und wenigen Verbindungen mit einer sehr geringen bzw. sehr hohen biologischen Aktivität. Im Bereich der pIC_{50} -Werte 6,2–7,0 ist die Häufigkeitsverteilung relativ konstant. Des Weiteren folgt daraus, dass die Aktivitätsdaten in Bezug auf die Datensatzgröße (48 Verbindungen) nur einen recht schmalen Wertebereich von etwa einer logarithmischen Einheit umfassten, was für die Erstellung von QSAR-Modellen oftmals unzureichend ist. Dies ist mit ein Grund dafür, dass die CoMFA- und CoMSIA-Modelle nur Ergebnisse ergaben, die mit einem q^2 -Wert von $\approx 0,5$ in einem akzeptablem Bereich lagen.

6.5.3 Projekt III: 2,4-Disubstituierte Pyridopyrimidine

Für dieses Projekt wurden verschiedene Pyridopyrimidine zur Erstellung eines QSAR-Modells herangezogen.[327] Der Datensatz umfasste 34 Verbindungen deren Wertebereich in Abbildung 6.7 dargestellt ist. Die Aktivitätsdaten folgten dabei, mit Ausnahme der Extrema am unteren und oberen Wertebereich, mehr einer Normalverteilung als im Vergleich zu **Projekt II**. Die besten Ergebnisse der PLS-Analyse der

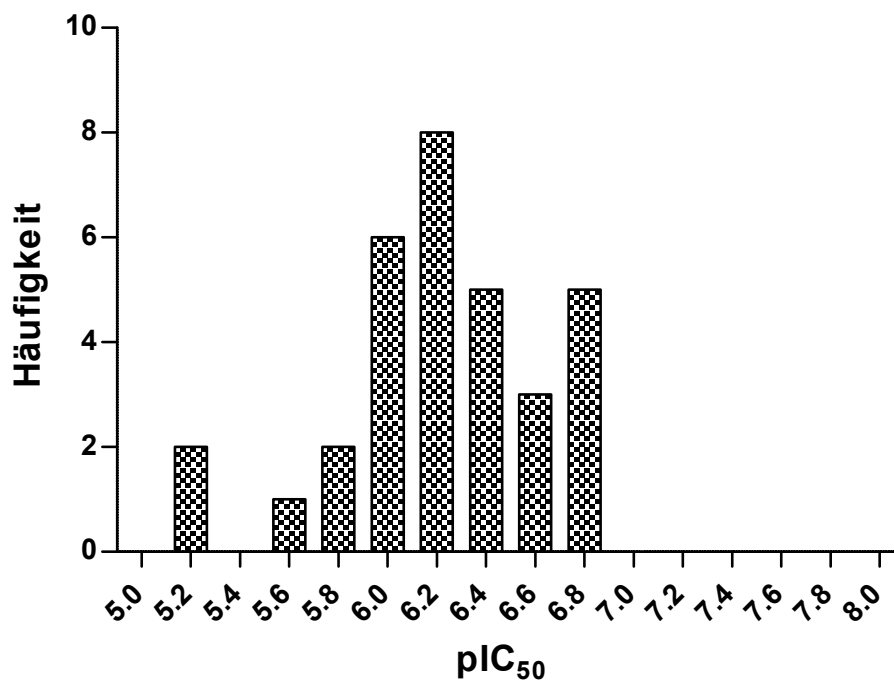


Abbildung 6.7 – Häufigkeitsverteilung der biologischen Aktivitäten des Datensatz von **Projekt III**.

Pyridopyrimidine sind in Tabelle 6.4 aufgeführt. Die vollständigen Tabellen zu den strukturellen und statistischen Daten des Datensatzes können im Anhang A.3 eingesehen werden. Für die CoMFA-Analysen ergaben sich für die Pyridopyrimidine kreuzvalidierte Korrelationskoeffizienten im Bereich von 0,185 – 0,280. Das elektrostatische Feld lieferte dasselbe Ergebnis ($q^2 = 0,230$) wie die CoMFA-Analyse unter Einbeziehung elektrostatischer und sterischer Wechselwirkungen (CoMFA Both). Offensichtlich trug das sterische Feld keinerlei signifikante Informationen bei und ergab für sich allein genommen auch nur einen sehr geringen q^2 -Wert von 0,185. Das beste CoMFA-Modell lieferte das H-Brücken-Molekülfeld mit einem q^2 von 0,280, zeigte jedoch gleichzeitig eine sehr hohe Standardabweichung der Summe der Abweichungsquadrate ($S_{PRESS} = 0,500$). Mit Hilfe der CoMFA-Methode konnte somit durch keines der Felder oder Feldkombinationen eine verlässliche interne Vorhersage der biologischen Aktivitäten der Pyridopyrimidine erreicht werden.

Die Betrachtung der kreuzvalidierten CoMSIA-Modelle zeigte, dass die Aktivität der Substanzen am Besten mit dem Wasserstoffbrückenakzeptor-Feld bei 6 Komponenten beschrieben werden konnte

Tabelle 6.4: Auszüge aus der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von **Projekt III**.

CoMFA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	
Both	0,230	3	0,490	
Elektrostatisches (e)	0,230	3	0,490	
Sterisches (s)	0,185	2	0,496	
H-Brücken (hb)	0,280	6	0,500	
e + s + hb	0,205	3	0,498	
CoMSIA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	
Elektrostatisches (e)	0,200	4	0,508	
Sterisches (s)	-0,008	2	0,552	
Hydrophobes (h)	0,330	6	0,482	
H-Brücken Donor (d)	0,270	1	0,462	
H-Brücken Akzeptor (a)	0,535	6	0,402	
s + a	0,552	6	0,407	
d + a	0,640	6	0,353	
e + h + a	0,727	6	0,308	
h + d + a	0,722	6	0,311	
e + h + d + a	0,659	6	0,344	
e + h + s + a	0,686	6	0,330	
e + s + h + d + a	0,646	6	0,350	

($q^2 = 0,535$). Die anderen CoMSIA-Felder führten zu schlechteren Korrelationskoeffizienten. Insbesondere das sterische Feld (wie auch schon in den Projekten I und II) korrelierte nicht mit den Aktivitätsdaten und ergab einen negativen q^2 -Wert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den Datensätzen Substituenten fehlen, die relativ viel Raum in Anspruch nehmen, sodass die Informationen darüber keine Signifikanz besitzen.

Die Kombination aus sterischen und Wasserstoffbrückenakzeptor-Feldern (s + a) konnte den q^2 -Wert im Vergleich zum Akzeptor-Feld allein nicht verbessern, was die redundante Information aus dem sterischen CoMSIA-Feld bestätigte. Durch das Einbeziehen der Wasserstoffbrückenakzeptor- und Donor-Wechselwirkungen hingegen konnte der Korrelationskoeffizient auf einen Wert von 0,640 gesteigert werden.

Als beste CoMSIA-Analysen stellten sich die Kombinationen aus elektrostatischem, hydrophobem und H-Brücken-Akzeptorfeld (e + h + a), sowie aus hydrophobem, Wasserstoffbrückendonor- und Akzeptorfeldern (h + d + a) heraus, die mit q^2 -Werten von 0,727 bzw. 0,722 in etwa dieselben Korrelationskoeffizienten bei 6 Komponenten aufwiesen. Die beiden CoMSIA-Modelle zeigten ebenfalls die geringste Standardabweichung und konnten die biologische Aktivität am Besten vorhersagen. Das

Hinzufügen weiterer CoMSIA-Felder konnte die kreuzvalidierten Werte nicht weiter steigern. Dies verwundert nicht, da die Betrachtung der einzelnen Felder zeigte, dass insbesondere das hydrophobe und H-Brücken-Akzeptor-Feld hauptsächlich mit den Aktivitätswerten korrelierten.

Aufgrund des relativ kleinen Datensatzes von nur 34 Verbindungen gestaltete sich eine Unterteilung in ein Trainings- und Testset als etwas kompliziert. Zum einen steigt bei zu wenigen Substanzen im Trainingsdatensatz die Gefahr, dass durch Zufallskorrelation hohe q^2 -Werte erzielt werden. Zum anderen können durch unbeabsichtigte Effekte irrelevante Regressoren zur Erklärung der Varianz beitragen und das Bestimmtheitsmaß künstlich erhöhen (*overfitting*). Nach Tropsha [421] benötigt es mindestens 40 Substanzen, um ein zuverlässiges QSAR-Modell aus Trainings- und Testdatensatz zu erhalten.

Die gute interne Vorhersage der CoMSIA-Felder e+h+a und h+d+a mit den q^2 -Werten 0,727 bzw. 0,722 müsste demnach noch durch ein Testdatensatz bestätigt werden, welcher mit den vorhandenen Daten jedoch nicht herstellbar war. Dennoch kann das interne Modell zur Vorhersage neuer aktiver Verbindungen dienen, die dann experimentell auf ihre Aktivität hin untersucht und anschließend als Trainingsdatensatz zur weiteren Validierung des Modells herangezogen werden können.

6.5.4 Projekt IV: Kombierter Datensatz von chinazolinbasierten ABCG2-Inhibitoren

Für die 3D-QSAR-Analyse von **Projekt IV** wurde ein Datensatz von 82 unterschiedlich substituierten Chinazolinen ausgewählt. Ausgangspunkt war eine arbeitsgruppeninterne Datenbank, die alle Substanzen und Aktivitätsdaten enthielt, die bislang in unterschiedlichen Projekten synthetisiert und biologisch getestet wurden. Als Kriterium für die Auswahl der Verbindungen wurde die Anzahl unabhängiger Experimente der biologischen Testung ($n \geq 3$), sowie eine Standardabweichung von $\sigma \leq 0,2$ herangezogen. Da ein Modell nur so gut sein kann wie die experimentellen Daten auf denen es beruht sollte hierdurch eine zuverlässige Ausgangslage für die Erstellung der CoMFA- und CoMSIA-Analysen geschaffen werden.[422]

Mit dem Datensatz wurde anschließend eine PLS-Analyse aller QSAR-Molekülfelder durchgeführt. Die besten Modelle der CoMFA- und CoMSIA-Analysen sind in Tabelle 6.5 aufgeführt. Die vollständigen strukturellen und biologischen Daten, sowie alle Ergebnisse der PLS-Analyse sind den vollständigen Tabellen im Anhang A.4 zu entnehmen.

Die besten Modelle der CoMFA-Analyse ergab die Einbeziehung elektrostatischer und sterischer Wechselwirkungen (CoMFA Both), sowie die Kombination aus elektrostatischen, sterischen und H-Brücken-Feldern (e + s + hb) mit q^2 -Werten von 0,476 bzw. 0,490 bei jeweils 2 Komponenten. Die einzelnen CoMFA-Felder erzielten Korrelationskoeffizienten im Bereich von 0,356–0,417. Die interne Vorhersage der CoMFA-Modelle korrelierte nur mäßig mit den biologischen Aktivitäten des Datensatzes. Jedoch zeigten sich Verbesserungen im Vergleich zu den vorherigen Projekten I–III.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der CoMSIA-Analyse konnte nur das elektrostatische Feld mit einem q^2 -Werten von 0,531 die Aktivitätsdaten einigermaßen gut beschreiben. Die weiteren Felder verfügten über kreuzvalidierte Korrelationen in einem niedrigen Bereich ($q^2 \approx 0,2$) bzw. konnten

Tabelle 6.5: Auszüge aus der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von **Projekt IV**.

CoMFA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung			No Validation		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	r²	SD	F
Both	0,476	2	0,354	0,902	0,160	73,6
Elektrostatisches (e)	0,387	3	0,385	0,880	0,177	58,8
Sterisches (s)	0,356	4	0,397	0,793	0,233	30,7
H-Brücken (hb)	0,417	2	0,373	0,847	0,200	44,4
e + s + hb	0,490	2	0,349	0,939	0,126	123,1
CoMSIA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung			No Validation		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	r²	SD	F
Elektrostatisches (e)	0,531	5	0,341	0,844	0,202	43,1
Sterisches (s)	0,245	6	0,436	0,725	0,268	21,1
Hydrophobes (h)	0,225	3	0,433	0,617	0,317	12,9
H-Brücken Donor (d)	-0,012	1	0,488	0,185	0,462	1,8
H-Brücken Akzeptor (a)	0,227	5	0,438	0,578	0,332	11,0
e + h	0,632	6	0,304	0,847	0,200	44,4
e + d	0,587	6	0,322	0,869	0,186	52,8
e + s + h	0,623	6	0,308	0,848	0,199	44,7
e + h + d	0,676	6	0,285	0,881	0,176	59,4
e + h + a	0,614	7	0,314	0,851	0,198	45,6
e + h + d + a	0,660	7	0,294	0,883	0,175	60,3
e + h + s + d	0,660	6	0,293	0,879	0,178	58,2
e + s + h + d + a	0,629	6	0,306	0,881	0,177	59,2

Wasserstoffbrückendonor-Eigenschaften die biologischen Daten überhaupt nicht erklären, was sich in einem negativen Korrelationskoeffizienten äußerte.

Interessanterweise ergab die Kombination aus elektrostatischem und H-Brücken-Donor-Feld eine relativ gute Korrelation mit den Aktivitätsdaten, obwohl die Wasserstoffbrückendonor-Eigenschaften für sich genommen zu einem negativen Wert für q^2 geführt hatten. Dennoch konnte im Vergleich zu den elektrostatischen Parameter allein (e: $q^2 = 0,531$) eine leichte Verbesserung der internen Vorhersage des QSAR-Modells erreicht werden (e + d: $q^2 = 0,587$). Das Einbeziehen der elektrostatischen und hydrophoben CoMFA-Felder (e + h) konnte die Voraussage der Aktivitätsdaten nochmals auf einen q^2 -Werten von 0,632 bei 6 Komponenten steigern, jedoch war der F-Wert etwas geringer als bei der Kombination aus elektrostatischen und H-Brücken-Donor-Wechselwirkungen als physikochemische Deskriptoren.

Fügte man weitere CoMSIA-Felder hinzu, so zeigte sich, dass die Verknüpfung von elektrostatischen, sterischen und hydrophoben Eigenschaften (e + s + h: $q^2 = 0,623$) und das Zusammenspiel von elektrostatischen, hydrophoben und Wasserstoffbrückenakzeptor-Wechselwirkungen (e + h + a: $q^2 = 0,614$) bei 6 bzw. 7 Komponenten die CoMSIA-Feldkombination e + h nicht signifikant verbessern konnten. Hingegen

fürte das Einbeziehen des H-Brücken-Donor-Parameters zum elektrostatischem und hydrophobem Feld ($e + h + d$: $q^2 = 0,676$, $n_{opt} = 6$) zum besten Ergebniss der CoMSIA-Analyse des Datensatzes. Auch die Standardabweichung zeigte bei dieser Feldkombination den geringsten Wert in der PLS-Analyse. Für die nicht-kreuzvalidierte Korrelation der experimentellen und berechneten Aktivitätswerte wurde ein r^2 von 0,881 ermittelt.

Mehr als drei Deskriptoren zur Beschreibung des Datensatzes führten zu keiner weiteren Verbesserung der internen Vorhersagekraft des QSAR-Modells im Vergleich zur Einbeziehung der CoMISA-Felder $e + h + d$, sodass die höher parametrisierten PLS-Ergebnisse nicht weiter betrachtet wurden. Es wurde daher entschieden das einfachere Modell ($e + h + d$) als optimale QSAR-Gleichung zur Voraussage der Aktivitäten des Datensatzes anzuwenden und im Folgenden näher zu betrachten und zu validieren.

Dazu wurden zunächst die vorhergesagten Aktivitäten des QSAR-Modells gegen die experimentell bestimmten biologischen Daten aufgetragen. Das entsprechende Diagramm ist in Abbildung 6.8 gezeigt.

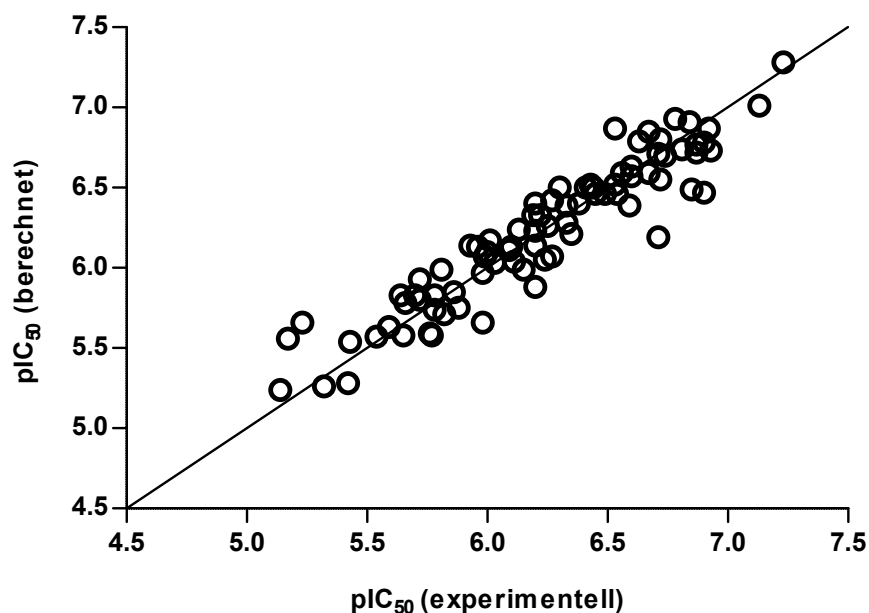


Abbildung 6.8 – Auftragung der vorhergesagten gegen die experimentellen pIC_{50} -Werte für die interne Vorhersage des CoMSIA-Modells $e + h + d$.

Die größten Ausreißer des internen Modells mit einer Abweichung des berechneten vom experimentellen von mehr als 0,4-logarithmischen Einheiten bildeten die Verbindungen **10**, **11** und **12** (vgl. Tabelle A.7). Wie bereits in Kapitel 6.5.1 beschrieben kann einer der Gründe für Ausreißer bzw. das Versagen von QSAR-Modellen an *activity cliffs* innerhalb des verwendeten Datensatzes liegen. Aus diesem Grund wurde für den gesamten Datensatz von **Projekt IV** nach Substanzpaaren gesucht, die *activity cliffs* bilden und somit für Probleme im QSAR-Modell sorgen könnten.

Eine Methode zur Quantifizierung von *activity cliffs* bietet die paarweise Analyse der Verbindungen des Datensatz basierend auf einem Index, dem sogenannten **Structure-activity landscape index (SALI)**.^[423] Dieser ist wie folgt definiert:

$$SALI_{i,j} = \frac{|A_i - A_j|}{1 - \text{sim}(i, j)}$$

wobei A_i und A_j die biologischen Aktivitäten der Verbindungen i und j sind, und $\text{sim}(i, j)$ der Ähnlichkeitskoeffizient der beiden Substanzen zueinander ist.

Zunächst mussten zur Berechnung des SALI die Verbindungen des QSAR-Modells hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit untereinander untersucht werden. Hierzu wurden die 3D-Strukturen mit Hilfe von Fingerprint-Techniken in eine simple Darstellung übersetzt. Für diesen Prozess wurden **Extended-connectivity fingerprints (ECFPs)** genutzt.^[424] Anschließend wurden die Fingerprints der Moleküle untereinander verglichen woraus dann eine Ähnlichkeitsmatrix resultierte in der für jedes Substanzpaar des Datensatz ein Ähnlichkeitskoeffizient berechnet wurde. Dieser kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei ein Wert von 1 identischen Molekülen entspricht. Je näher der Koeffizient an 0 liegt desto unterschiedlicher sind sich die Moleküle in ihrer Struktur.

Aus dem Ähnlichkeitskoeffizienten der Datenmatrix konnte anschließend die SALI-Matrix für die Substanzdatenbank erstellt werden. Dies wurde mit dem Statistik-Programm R durchgeführt, welches mit einigen zusätzlichen Funktionen die Berechnung der SALI-Matrix basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix und den Aktivitätsdaten erlaubte.^[425, 426] Nach obiger Gleichung ergibt sich daraus, dass die maßgeblichen *activity cliffs* eines Datensatzes zu einem sehr großen Wert des SALI führen.

Die Analyse der SALI-Werte für den verwendeten Datensatz führte dazu, dass die Verbindungen **11** und **12**, welche zu den größten Ausreißern des Modells gehörten, mit einem SALI von 3,71 zu den bedeutsamsten *activity cliffs* beitrugen. Die Strukturen der drei größten Ausreißer (**10**, **11**, **12**) und ihre zugehörigen SALI-Werte sind in Abbildung 6.9 dargestellt.

Das Substanzpaar **10/12** besitzt einen sehr kleinen SALI-Wert, was aufgrund der strukturellen Differenzen und den ähnlichen Aktivitätsdaten nicht weiter verwunderte. Etwas signifikanter stellte sich der Unterschied zwischen den Substanzpaaren **10/11** und **11/12** dar. Der geringere SALI von 2,64 für das Substanzpaar **10/11** ist mit den gegensätzlichen Substituenten zu erklären mit einer Nitrogruppe auf der einen und Methoxyfunktionen auf der anderen Seite. Maßgebliche Beiträge zu den *activity cliffs* lieferte das Molekülpaar **11/12**, die Konstitutionsisomere bilden, welche sich deutlich in ihren Aktivitäten unterscheiden. Insbesondere die Substanzen **10** und **12** wurden durch das CoMSIA-Modell mit pIC_{50} -Werten von 6,19 bzw. 6,47 schlechter vorhergesagt als ihre experimentellen Inhibitionswerte von 6,71 bzw. 6,90. Die Substanz **11** wurde hingegen mit einem pIC_{50} von 5,66 besser bewertet als ihre tatsächliche biologische Wirkung (pIC_{50} : 5,23). Des Weiteren war festzustellen, dass die Ausreißer an der unteren bzw. oberen Grenze des Wertebereiches der Aktivitätsdaten des Datensatz zu finden waren. Sie stellten somit Beispiele für die beiden Extrema der pIC_{50} -Werte dar.

Zur weiteren Validierung des CoMSIA-Modells wurde untersucht, inwiefern eine Randomisierung der Aktivitätsdaten die kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 beeinflussten.^[427] Hierzu wurden die

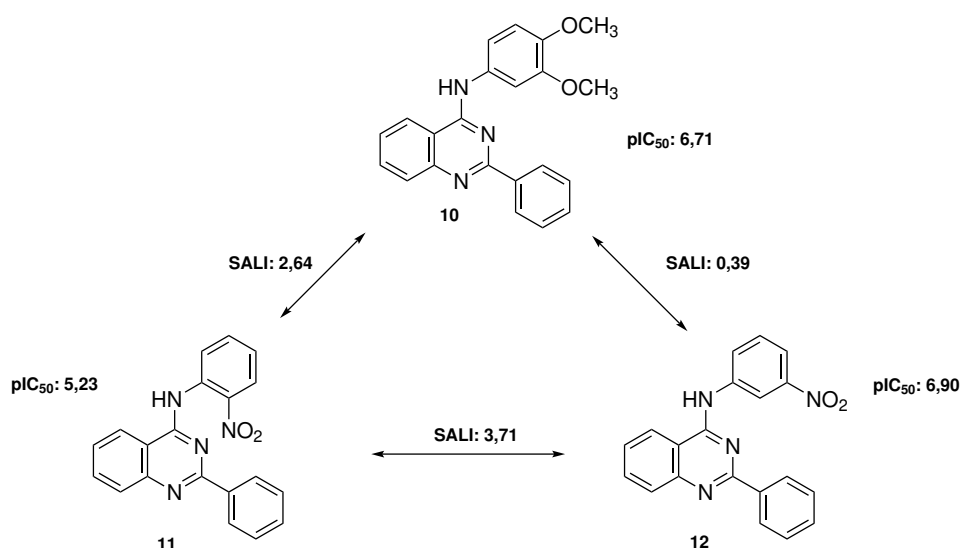


Abbildung 6.9 – SALI-Werte, Strukturen und Aktivitätsdaten der drei größten Ausreißer des CoMSIA-Modells $e + h + d$.

experimentellen Inhibitionswerte 100 mal zufällig neu verteilt und anschließend mit dem CoMSIA-Feld $e + h + d$ eine erneute PLS-Analyse durchgeführt. Die entsprechenden q^2 -Werte der Modelle mit den randomisierten Aktivitätsdaten ist in [Abbildung 6.10](#) dargestellt.

Aus der [Abbildung](#) geht hervor, dass keines der CoMSIA-Modelle mit randomisierten Aktivitätsdaten die biologische Wirkung der Verbindungen des Datensatz korrekt voraussagen konnte. Dies spiegelte sich in den zumeist negativen Werten für den kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 wieder. Die höchsten q^2 -Werte lieferten die randomisierten Modelle **27**, **41** und **96** mit Korrelationskoeffizienten von 0,021, 0,022 bzw. 0,044. Diese sind allerdings viel zu gering, um von einem validen QSAR-Modell sprechen zu können. Somit war die interne Vorhersagekraft der CoMSIA-Feldkombination $e + h + d$ auch gegenüber der zufälligen Anordnung der biologischen Daten stabil, was zusätzlich zum kreuzvalidierten q^2 -Wert von 0,676 als weiteres Argument für die Güte des Modells sprach.

Eine gute interne Validierung alleine reicht jedoch nicht immer aus, um als Kriterium für die Voraussagekraft des entwickelten Modells dienen zu können.[\[428\]](#) Die aus einem 3D-QSAR-Modell folgende Regressionsgleichung sollte auch die Fähigkeiten besitzen die biologischen Daten eines externen Satzes von Verbindungen korrekt vorherzusagen. Dadurch kann die Güte des Modells weiter validiert werden. Um dies für den Fall des CoMSIA-Feldes $e + h + d$ zu überprüfen wurde ein kleiner Datensatz von 15 Chinazolinen ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Erstellung des Modells noch nicht getestet worden waren. Diese Verbindungen dienten als Testset für die externe Vorhersagekraft des CoMSIA-Modells. Eine Übersicht mit den entsprechenden Strukturen und Aktivitätsdaten ist in [Tabelle 6.6](#) aufgelistet. Die Strukturen des externen Datensatzes wurden analog zu den anderen QSAR-Modellen aufbereitet und einander überlagert. Anschließend wurden mit dem CoMSIA-Feld $e + h + d$ die Aktivitäten der Verbindungen vorhergesagt. Zur Analyse wurden die berechneten Aktivitäten des Testdatensatzes gegen

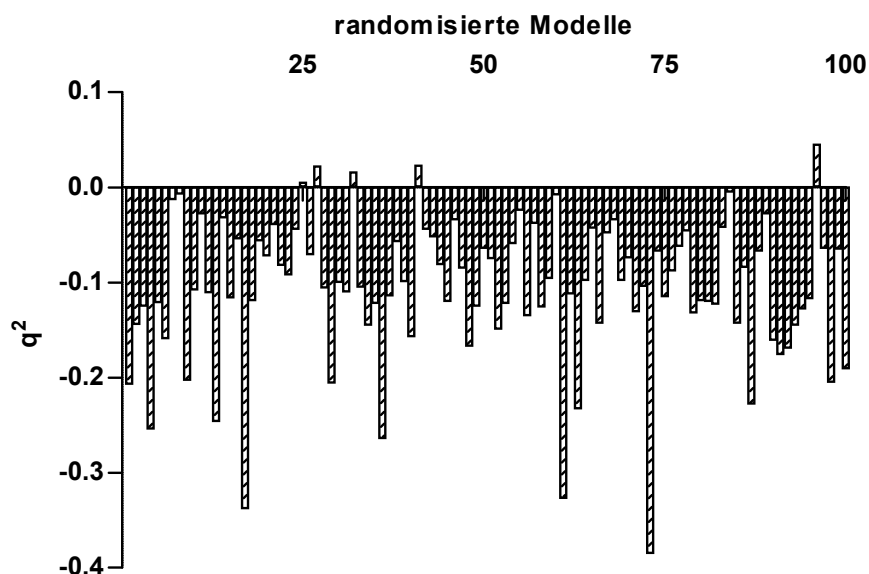


Abbildung 6.10 – Kreuzvalidierte Korrelationskoeffizienten (q^2) für die verschiedenen CoMSIA-Modelle der Feldkombinationen e + h + d mit randomisierten Aktivitätsdaten.

die experimentell bestimmten biologischen Daten aufgetragen (s. Abb. 6.11).

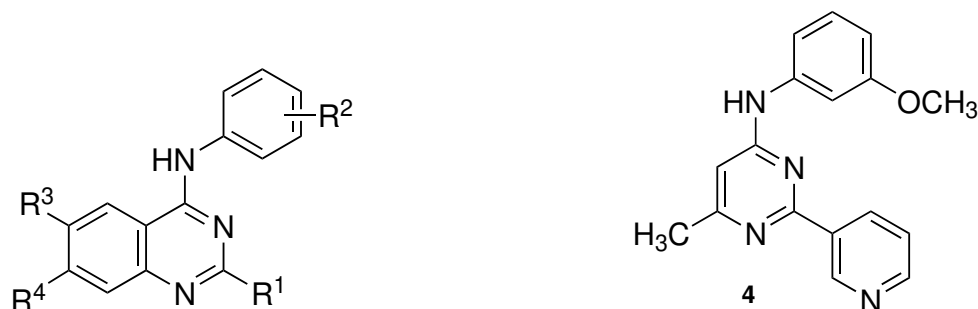
Nach Golbraikh und Tropsha [428] muss ein QSAR-Modell folgende Parameter erfüllen, um als hinreichend validiert zu gelten:

- a) $q_{intern}^2 > 0.5$
- b) $R_{extern}^2 > 0.6$
- c) $\frac{r^2 - r_0^2}{r^2} < 0.1$ und $0.85 \leq k \leq 1.15$ oder
 $\frac{r^2 - r_0'^2}{r^2} < 0.1$ und $0.85 \leq k' \leq 1.15$
- d) $|r_0^2 - r_0'^2| < 0.3$

Der Parameter q_{intern}^2 entspricht dem nicht-kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten zur Erstellung des QSAR-Modells und berechnete sich für das CoMSIA-Feld e + h + d zu einem Wert von 0,881, welcher sich aus folgender Gleichung ergab:

$$q_{intern}^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{pred.(int)} - Y_{exp.(int)})^2}{\sum (Y_{exp.(int)} - \bar{Y}_{int})^2}$$

Tabelle 6.6: Datensatz für die externe Validierung des CoMSIA-Modells e + h + d.



Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	pIC ₅₀ Hoechst 33342-Assay
1	Ph	3-NO ₂ -4-F	H	H	5,61
2	Ph	3-OH	H	H	6,83
3	3-OCH ₃ -Ph	4-NO ₂	H	H	7,07
4	s.o.				6,35
5	3-NO ₂ -Ph	4-OCH ₃	H	H	6,07
6	4-Py	4-OCH ₃	NO ₂	H	6,74
7	3,4-OCH ₃ -Ph	4-NO ₂	H	H	7,16
8	4-NO ₂ -Ph	3-NO ₂	H	H	6,63
9	4-NO ₂ -Ph	3-CN	H	H	6,47
10	4-Py	3-CN	H	H	6,90
11	3-OCH ₃ -Ph	3-CN	H	H	6,55
12	2-Py	3-OCH ₃	H	H	5,80
13	3-Py	3-OCH ₃	H	H	6,00
14	4-Py	3-OCH ₃	H	H	6,26
15	2-Py	3,4-OCH ₃	H	H	5,98

In einer analogen Weise wird der Korrelationskoeffizient für das Modell zur externen Vorhersage neuer Verbindungen (R_{extern}^2) berechnet. Mit dem Unterschied, dass im Nenner von den experimentellen Aktivitäten des externen Datensatzes aus Tabelle 6.6 die mittleren Aktivitäten des internen Datensatzes abgezogen werden. Es ergibt sich dann folgende Gleichung:

$$R_{\text{extern}}^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{\text{pred.}(ext)} - Y_{\text{exp.}(ext)})^2}{\sum (Y_{\text{exp.}(ext)} - \bar{Y}_{\text{int}})^2}$$

Zur genaueren Definition der Voraussagekraft wurde für das externe Modell die r_m^2 -Metrik berechnet. Diese Metrik beinhaltet einen neuen Parameter, das modifizierte r^2 (r_m^2), welcher den tatsächlichen Unterschied zwischen den beobachteten und vorhergesagten Aktivitätsdaten berechnet ohne die Mittelwerte des Trainingsdatensatzes zu berücksichtigen. Dadurch ergibt sich ein strengeres Maß für die Bewertung der Modellvorhersage.[429, 430]

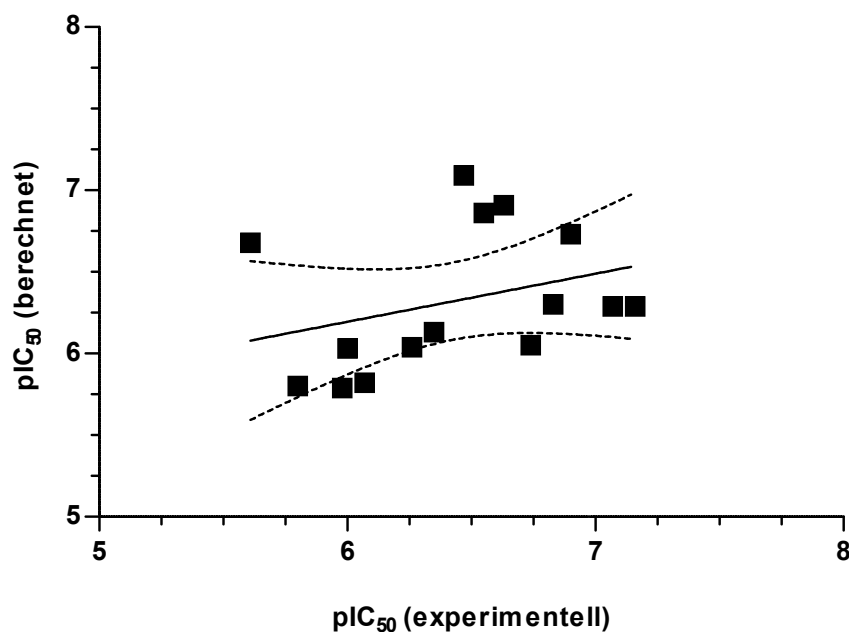


Abbildung 6.11 – Auftragung der berechneten gegen die experimentellen pIC_{50} -Werte für den externen Datensatz aus Tabelle 6.6. Neben der Regressionsgeraden (durchgezogene Linie) ist das Konfidenzintervall von 95 % (gestrichelte Linie) abgebildet.

Die r_m^2 -Metrik berechnet sich nach folgenden Gleichungen:

$$r_m^2 = r_{reg}^2 \times (1 - \sqrt{(r_{reg}^2 - r_0^2)}) \quad \text{und} \quad r_{reg}^2 = r_m^2 \times (1 - \sqrt{(r_{reg}^2 - r_0^2)})$$

Dabei steht r_{reg}^2 für den quadrierten Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden bei einer Auftragung der experimentellen gegen die vorhergesagten Aktivitäten des externen Datensatzes mit dem jeweiligen y-Achsenabschnitt. Der Wert r_0^2 steht für den quadrierten Korrelationskoeffizienten bei einer Regression durch den Ursprung. Werden die Achsen miteinander vertauscht, so ergibt sich eine Auftragung der vorhergesagten gegen die experimentellen Aktivitäten. Die Werte für r_m^2 und r_0^2 ergeben sich aus dieser Auftragung in analoger Weise wie zur oben beschriebenen Ermittlung der Werte von r_{reg}^2 (Regression mit y-Achsenabschnitt) und r_0^2 (Regression durch den Ursprung). Aus der Auftragung der berechneten gegen die experimentellen Aktivitäten bzw. der umgekehrten Auftragung und unter einer Festsetzung der Regression durch den Ursprung ergaben sich aus der Steigung der Regressionsgeraden die Werte k bzw. k' .

Für die Berechnung der entsprechenden Parameter zur Erstellung der r_m^2 -Metrik wurden die folgenden Gleichungen verwendet:

$$r_0^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{exp.} - k \times Y_{pred.})^2}{\sum(Y_{exp.} - \bar{Y}_{exp.})^2}$$

$$r_0'^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{pred.} - k' \times Y_{exp.})^2}{\sum(Y_{pred.} - \bar{Y}_{pred.})^2}$$

$$k = \frac{\sum(Y_{exp.} \times Y_{pred.})}{\sum(Y_{pred.})^2}$$

$$k' = \frac{\sum(Y_{exp.} \times Y_{pred.})}{\sum(Y_{exp.})^2}$$

Eine Zusammenfassung der experimentellen und vorhergesagten Aktivitäten des externen Datensatzes und die korrespondierenden Residuen ($Y_{exp.} - Y_{pred.}$), sowie die aus den obigen Gleichungen berechneten Parameter sind in Tabelle 6.7 zusammengefasst. Aus der Tabelle geht hervor, dass die berechneten pIC₅₀-Werte der Substanzen sich in einigen Fällen gravierend von den experimentell bestimmten Aktivitäten unterschieden. Die größte Abweichung zeigte dabei Verbindung **1**, die um eine ganze logarithmische Einheit besser vorhergesagt wurde als ihr tatsächlicher pIC₅₀-Wert. Die Substanzen **3** (Res.: 0,78) und **7** (Res.: 0,87) hingegen wurden durch das Modell viel schlechter bewertet als ihre im Experiment gefundenen Inhibitionswerte. Eine Erklärung dafür könnte die Tatsache sein, dass die drei größten Ausreißer Extrema innerhalb des Wertebereichs des Datensatzes bildeten. Aufgrund der geringen Größe des externen Testsets fallen diese Extremwerte stärker ins Gewicht als bei einem Datensatz mit höherer Anzahl an Verbindungen.

Trotz der guten Korrelation des CoMSIA-Modells e + h + d in der internen Validierung mit einem q^2 -Wert von 0,676 folgte aus der Vorhersage der Verbindungen des externen Datensatzes ein negativer Korrelationskoeffizient ($R_{extern}^2 = -0.090$). Aufgrund der beträchtlichen Ausreißer resultierte aus der Auftragung der berechneten gegen die experimentellen Aktivitätsdaten ein entsprechend geringer Wert von 0,105 für den quadrierten Korrelationskoeffizienten $r_{reg.}^2$ der Regressionsgeraden.

Zwang man die Regressionsgerade durch den Ursprung, um die entsprechenden Werte für r_0^2 und $r_0'^2$ zu berechnen so folgten aus den Gleichungen ebenfalls negative Werte. Auch zeigten die beiden Resultate für die r_m^2 -Metrik mit Werten von 0,041 bzw. 0,027, dass sich für die externe Vorhersage des Testdatensatz keine signifikante Korrelation ergab.

Tabelle 6.7: Experimentelle (exp.) und vorhergesagte (pred.) pIC₅₀-Werte für den externen Datensatz, die mit Hilfe des CoMSIA-Modells e + h + d berechnet wurden, sowie die Ergebnisse aus den Berechnungen der r_m^2 -Metrik der externen Validierung.

Verb.	pIC ₅₀ (exp.)	pIC ₅₀ (pred.)	Residuen
1	5,61	6,68	-1,07
2	6,83	6,30	0,53
3	7,07	6,29	0,78
4	6,35	6,13	0,22
5	6,07	5,82	0,25
6	6,74	6,05	0,69
7	7,16	6,29	0,87
8	6,63	6,91	-0,28
9	6,47	7,09	-0,62
10	6,90	6,73	0,17
11	6,55	6,86	-0,31
12	5,80	5,80	0,00
13	6,00	6,03	-0,03
14	6,26	6,04	0,22
15	5,98	5,79	0,19
Berechnungen der r_m^2 -Metrik			
	q_{intern}^2	0,676	
	R_{extern}^2	-0,090	
	$r_{reg.}^2$	0,105	
	r_0^2	-0,265	
	r_0^{l2}	-0,453	
	r_m^2	0,041	
	r_m^{l2}	0,027	

Für die r_m^2 -Metrik ergaben sich die entsprechenden Werte zu:

a) $q_{intern}^2 = 0.676$

b) $R_{extern}^2 = -0.090$

c) $\frac{r^2 - r_0^2}{r^2} = 3.535$ und $k = 1.014$ oder

$$\frac{r^2 - r_0^{l2}}{r^2} = 5.325 \text{ und } k^l = 0.980$$

d) $|r_0^2 - r_0^{l2}| = 0.187$

Vergleicht man die berechneten Parameter der r_m^2 -Metrik mit den von Golbraikh und Tropsha [428] festgesetzten Größen, die als Grundbedingungen für ein valides QSAR-Modell gefordert werden so war festzustellen, dass lediglich die Bedingungen a) und d) vom CoMSIA-Modell für die externe Vorhersage erfüllt wurden.

6.6 Zusammenfassung

Bei der Anwendung der QSAR-Methodik auf die Substanzklasse der Chinazoline und verwandter Grundstrukturen zur Vorhersage der Aktivitäten dieser ABCG2-Inhibitoren ergaben sich Modelle mit unterschiedlicher Güte:

Projekt I

Die Unterteilung in einen Datensatz mit chinolin- und chinazolinbasierter Grundstrukturen, die einen Phenylsubstituenten in Position 2 trugen konnte keine zuverlässigen QSAR-Modelle liefern. Sowohl mit der CoMFA- als auch mit der CoMSIA-Methode wurden keine signifikanten Korrelationen mit den biologischen Aktivitäten beobachtet.

Einer der Gründe lag in den unterschiedlichen Aktivitätsdaten innerhalb des verwendeten Datensatzes. Die Chinoline waren im Vergleich zu den Chinazolinen in ihrer inhibitorischen Stärke um eine logarithmische Einheit schlechter. Zudem sind die Verbindungen Isostere und verfügen damit über ähnliche physikalische Eigenschaften.

Dies könnte darauf hinweisen, dass der bei den Chinazolinen vorhandene zusätzliche Stickstoff im aromatischen Systems eine spezifische Interaktion eingeht. Hierdurch ergibt sich wohlmöglich eine höhere Inhibitionsstärke. Dieser kleine Unterschied in der Struktur kann durch das QSAR-Modell nicht hinreichend aufgelöst werden.

Eine Möglichkeit dies zu überwinden könnte die Einbeziehung weiterer Parameter zu den CoMFA- und CoMSIA-Feldern sein. So wäre es möglich zusätzlich zu den CoMFA- und CoMSIA-Feldwerten andere physikochemische Deskriptoren zu verwenden, die den marginalen Unterschied in den Strukturen besser aufzulösen vermögen.

Eine Lösung hierfür wäre die Einbindung von numerischen Verfahren zur Quantifizierung der Diskontinuität in den Struktur-Wirkungsbeziehungen, wie sie z.B. der SALI liefert.[423, 431]

Projekt II

Der Datensatz aus Verbindungen mit Chinazolin- und Pyrimidingrundgerüst lieferte mit der CoMSIA-Methode Feldkombinationen, die bessere kreuzvalidierte Koeffizienten für die interne Vorhersage des QSAR-Modells ergaben. Eine Betrachtung der biologischen Daten zeigte jedoch, dass der zugrunde liegende Wertebereich sich nicht nach einer Normalverteilung verhielt. Vor allem im mittleren Aktivitätsbereich ergab sich eine gewisse Kontinuität in der Häufigkeitsverteilung. Darin lag einer der Gründe, dass die q^2 -Werte eine bessere Korrelation ($q^2 > 0,5$) mit Hilfe der CoMFA- und CoMSIA-Methode nicht erreichten.

Projekt III

Der Datensatz der Pyridopyrimidine konnte für die interne Validierung gute Vorhersagen der biologischen Aktivitäten liefern. Da dieser Wert jedoch nur als ein Indiz für die Güte des QSAR-Modells gelten konnte, müsste zur weiteren Bestätigung der Qualität der erstellten CoMFA- und CoMSIA-Modelle ein externer Datensatz untersucht werden.

Die geringe Größe des Datensatzes erlaubte keine zuverlässige Unterteilung in einen Trainings- und Testsatz von Pyrimidopyrimidinen, da sonst die Gefahr der Zufallskorrelation und des Overfitting gegeben war. Dennoch kann die interne Vorhersage durch die CoMSIA-Felder neue Anhaltspunkte liefern, welche die Optimierung von Pyridopyrimidinen als ABCG2-Inhibitoren vorantreiben können. So kann aus dem internen Modell eine schnelle Übersicht der positiv und negativ zur Aktivität beitragenden CoMSIA-Felder abgeleitet werden. Basierend darauf ist sofort ersichtlich an welchen Stellen des Molekülgerüsts Verbesserungen möglich sind, welche als Grundlage für das Design weiterer Inhibitoren dienen können.

Projekt IV

Die Ausweitung des Datensatzes in **Projekt IV** auf die Einbindung von disubstituierten Chinazolinstrukturen lieferte gute Ergebnisse für die interne Vorhersage der biologischen Aktivitäten. Die Stabilität des Modells konnte u.a. durch weitere Methoden wie der Randomisierung der experimentellen Inhibitions-werte bestätigt werden.

Anders sah der Fall der Validierung durch einen externen Datensatz neuer Chinazolinstrukturen aus. Hier konnte das QSAR-Modell keine zuverlässigen Aussagen zur Korrelation der berechneten und experimentellen Aktivitätsdaten treffen. Interessanterweise waren die größten Ausreißer Verbindungen, die innerhalb der Extremwerte des Datenbereichs der biologischen Aktivitäten lagen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Chinazoline und verwandte ABCG2-Inhibitoren die Ergebnisse der 3D-QSAR-Methodik stark von der Auswahl des Datensatzes abhängen und für die Bildung eines zuverlässigen Modells die folgenden Parameter beachtet werden sollten:

- Der Datensatz sollte groß genug sein, um eine Unterteilung in einen Trainings- und Testset zu erlauben
- Die biologischen Aktivitäten sollten einer Normalverteilung folgen und die Aktivitätsdaten im Wertebereich der Extrema sorgfältig überprüft werden
- Im Vorfeld der Erstellung eines QSAR-Modells sollte eine Untersuchung des Datensatz auf *activity cliffs* stattfinden und diese ggf. durch Berechnung eines weiteren Parameter (wie z.B. des SALI) erweitert werden
- Auf Grundlage der CoMFA- oder CoMSIA-Methode sollten neue Verbindungen vorgeschlagen und durch experimentelle Testung die Vorhersagekraft des Modells bestätigt werden

Zusammenfassung

Diese Arbeit verfolgte den Ansatz, mit Hilfe von Inhibitoren bzw. Modulatoren des ABC-Transporters ABCG2, die durch das Transportprotein vermittelte Multidrug-Resistenz aufzuheben und durch computerchemische Methoden Modelle zur Aufklärung quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erstellen. Zu diesem Zweck wurden Hemmstoffe dargestellt, die auf unterschiedlichen Substanzklassen basierten. Ihre biologische Wirkung hinsichtlich Inhibitionsstärke, Selektivität und Zytotoxizität wurde durch *in vitro* Experimente untersucht. Basierend auf verschiedenen Datensätzen wurden abschließend mit den 3D-QSAR-Methoden der CoMFA- und CoMSIA-Analyse Modelle entworfen, die eine Vorhersage neuer, potenter Hemmstoffe ermöglichen sollten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Botryllamiden synthetisiert und deren biochemischen Eigenschaften untersucht. Es wurden die Auswirkungen verschiedener struktureller Parameter auf die inhibitorische Wirkung der hergestellten Substanzen erörtert. Als Basis diente die in vorausgegangenen Publikationen entdeckte Grundstruktur natürlich vorkommender Botryllamide aus der marinen Seescheide *Botryllus tyreus*.

Zur biologischen Charakterisierung wurden Modifikationen am Substitutionsmuster, sowie an der amidischen Linkerstruktur vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass eine ungesättigte Kohlenstoffkette innerhalb der Amidstruktur für eine Hemmung von ABCG2 vorteilhaft, aber nicht zwingend erforderlich war. Ein Austausch der Methoxygruppe in α -Stellung zur Ketofunktion, die in den natürlich vorkommenden Botryllamiden stets vorhanden war, durch ein Wasserstoffatom führte sowohl zu einer Absenkung der Hemmwirkung der Substanzen als auch zur Beibehaltung der Inhibitionsfähigkeit der untersuchten Verbindungen. Ein elektronenziehender Rest an dieser Position wurde exemplarisch an einzelnen Vertretern durch eine Nitrilfunktion eingeführt. Dies hatte eine Inaktivität der entsprechenden Strukturen zur Folge. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Hydroxyfunktion am Phenylring des Molekülteils C4 – C9 der natürlichen Botryllamide keine essentielle Voraussetzung für die biologische Wirksamkeit darstellte, da auch andere Substituenten an dieser Position zu einer Inhibition von ABCG2 führten.

Die Untersuchungen zur Selektivität zeigten, dass keine signifikante Hemmwirkung der Botryllamide gegenüber ABCB1 zu beobachten war. Insgesamt erwiesen sich die hergestellten Botryllamide im Vergleich mit dem Standardinhibitor Ko143 nur als schwach hemmende ABCG2-Modulatoren. Die Substanzklasse war dadurch weniger geeignet, um die ABCG2-vermittelte MDR aufheben zu können. Daher wurde dieser Teil der Arbeit abgeschlossen und eine weitere Substanzklasse untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden unterschiedlich substituierte 2,6-Bis-(benzyliden)cyclohexanon-analoga als potentielle ABCG2-Inhibitoren untersucht. Die schlechte Bioverfügbarkeit und chemische Instabilität von Curcumin wurde durch den Ersatz der 1,3-Diketofunktion durch die cyclohexanonbasierten Monocarbonylanaloga umgangen. Die synthetisierten MACs stellten sich im Vergleich mit dem Standardinhibitor Ko143 als schwach aktive Modulatoren von BCRP heraus. Einige der untersuchten Verbindungen, wie Substanz 59, zeigten ebenfalls eine geringe Aktivität an ABCB1. Ein Einsatz zur Aufhebung der MDR erwies sich für die Monocarbonylanaloga aufgrund ihrer insgesamt schwachen Hemmwirkungen jedoch als nicht zielführend. Aufgrund dessen wurde ein weiterer Versuch unternommen mit einer anderen Substanzklasse wirksamere ABCG2-Inhibitoren zu finden.

Der dritte Teil der Arbeit widmete sich der Substanzklasse der Pyrimidine als potente Hemmstoffe für ABCG2. Es wurden die Auswirkungen von substituierten Anilinlinkern in den Positionen 2 und 4 des Pyrimidingrundgerüst untersucht. Ebenfalls wurde die Verknüpfung des Phenylrestes an Position 2 betrachtet, sowie der Einfluss von Substituenten auf die inhibitorische Aktivität der Substanzen erörtert. Es konnte herausgefunden werden, dass eine direkte C-C-Verbindung des Phenylrestes an Position 2 sich positiver auf die Hemmung von ABCG2 auswirkte als die Verbindung über einen zusätzlichen NH-Linker.

Elektronenziehende Substituenten am Phenylrest, sowohl in Position 2 als auch in Position 4, führten zu einer stärkeren Hemmwirkung als elektronenschiebende oder hydrophobe und große sterische Reste. Einige der untersuchten Verbindungen konnten den ABCG2-vermittelten Transport stärker hemmen als der Standardinhibitor Ko143. Experimente zur Selektivität zeigten zudem, dass durch die Pyrimidine bis zu einer Maximalkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ keine nennenswerte Inhibition der anderen ABC-Transporter ABCB1 und ABCC1 zu beobachten war. Die Zytotoxizitätstests ergaben für die beispielhaft untersuchten Substanzen günstige therapeutische Breiten, weshalb sich diese Derivate für *in vivo* Untersuchungen als geeignet herausstellten. Ebenso konnten die aktivsten Pyrimidinanaloga die durch ABCG2 vermittelte Multidrug-Resistenz komplett aufheben. Die Substanzklasse der Pyrimidine stellte somit einen vielversprechenden Ansatz dar, als potente und selektive ABCG2-Inhibitoren die durch das Transportprotein vermittelte Multidrug-Resistenz auch *in vivo* zu überwinden.

Das letzte Kapitel beschäftigte sich mit der Erstellung von 3D-QSAR-Modellen für verschiedene Datensätze von ABCG2-Inhibitoren. Die Projekte I und II konnten keine zuverlässige Korrelation der entwickelten Modelle mit den korrespondierenden Aktivitätsdaten herstellen. Dies lag zum einen an der Verteilung der Wertebereiche der biologischen Daten und zum anderen an den in den Datensätzen vorhandenen *activity cliffs*. Diese Diskontinuität in der Aktivitätslandschaft konnte durch die CoMFA- und CoMSIA-Analysen nicht ausreichend berücksichtigt werden. Der Datensatz der Pyridopyrimidine des

Projekts III lieferte vielversprechende kreuzvalidierte Korrelationskoeffizienten für die interne Vorhersage der biologischen Aktivitäten des Datensatzes. Aufgrund der Größe des Datensatzes war keine Möglichkeit gegeben die Güte des Modells an einem externen Set von Verbindungen zu testen, was mit einer größeren Datenbank in zukünftigen Arbeiten nachgeholt werden müsste.

Die Kombination der verschiedenen Grundstrukturen aus den vorherigen Datensätzen resultierte für Projekt IV in guten Korrelationen zwischen den vorhergesagten und experimentellen Aktivitäten. Stabilitätstests zeigten, dass die interne Voraussage valide und signifikant war. Das entwickelte Modell konnte allerdings die biologischen Daten für externe Verbindungen nicht zufriedenstellend vorhersagen. Substanzen, die an den extremen Rändern des Wertebereichs der Aktivitätsdaten lagen konnten nicht genau genug berechnet werden. Für eine genauere Vorhersage von neuen Verbindungen sind an dem bestehenden QSAR-Modell noch Verbesserungen notwendig. Eine Möglichkeit bestünde darin in zukünftigen Modellen die verwendeten Datensätze im Vorhinein auf *activity cliffs* zu untersuchen, um die Güte der Daten nochmals zu verbessern. Des Weiteren könnte ein weiterer Parameter den Modellen hinzugefügt werden, der die Stärke der gefundenen *activity cliffs* quantifiziert, um die Diskontinuität in den Struktur-Wirkungsbeziehungen besser zu berücksichtigen.

Experimentalteil

8.1 Chemische Synthesen

8.1.1 Material und Methoden

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der *abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)*, *Acros Organics BVBA (Geel, Belgien)*, *AlfaAesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)*, der *Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)*, *Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)*, der *Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)*, *Tokyo Chemical Industry Deutschland GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)* und der *VWR Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)* bezogen. Die Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lösungsmittel wurden ohne Reinheitskontrolle in der erworbenen Qualität genutzt und bei Bedarf nach den üblichen Verfahren getrocknet und über Molekularsieb gelagert.

Reaktions- und Reinheitskontrolle

Die Kontrolle des Reaktionsfortschritts und der Reinheit des Produktes erfolgte mittels [Dünnschichtchromatographie \(DC\)](#) unter Verwendung von Aluminiumplatten, welche mit Silicagel 60 F₂₅₄ (*Merck Millipore, Billerica, MA, USA*) beschichtet waren. Als Elutionsmittel dienten Gemische aus Dichlormethan/Methanol (9:1) oder Petrolether/Essigsäureethylester (1:1) bzw. Abwandlungen im Mischungsverhältnis der verwendeten Solventien. Die in die Silicapplatten integrierten Fluoreszenzindikatoren sorgten für eine UV-Detektion von farblosen Substanzen. Hierzu diente ein UV-Kabinett mit einer Anregungswellenlänge von 254 nm. Aufgetragene Substanzen wurden auf diese Weise durch Absorption als dunkle Flecken auf der Silicaplatte sichtbar.

Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung einiger Verbindungen wurde die Säulenchromatographie verwendet. Abhängig von den experimentellen Parametern wie Art des Laufmittels, Substanzmenge, etc. wurde eine Säule mit entsprechender Länge und Durchmesser, sowie integrierter Frittenplatte und Schliffhahn gewählt.

Als Adsorbens diente Kieselgel 60 (Porengröße 40–63 μm , *Merck*), welches in dem entsprechenden Laufmittel aufgeschlämmt wurde. Die Suspension wurde anschließend bei geöffnetem Schliffhahn in die Säule gefüllt. Zur Vermeidung von Blasen und Rissen wurde während des Absetzens der stationären Phase vorsichtig von allen Seiten gleichmäßig gegen die Säule geklopft. Zum Schluss wurde das Laufmittel etwa einen Zentimeter über der Säulenfüllung durch Schließen des Schliffhahns stehen gelassen und die Füllung mit einer etwa 1 cm dicken Schicht aus Seesand bedeckt. Danach wurde die zu trennende Substanz in einer geringen Menge des verwendeten Laufmittels gelöst und auf die Seesandschicht aufgetragen. Nach leichtem Öffnen des Schliffhahns wurde die Substanz aufgesogen und noch mehrmals mit reinem Lösungsmittel nachgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit dem Elutionsgemisch gefüllt und die Entwicklung des Chromatogramms durch leichten Überdruck mittels einer Handpumpe vorgenommen.

Im weiteren Verlauf wurden in regelmäßigen Abständen Fraktionen entnommen und mittels DC-Kontrolle auf ihren Inhalt hin untersucht. Fraktionen mit der aufgereinigten Substanz wurden anschließend vereinigt und das Laufmittel entfernt. Im Anschluß daran wurde die Ausbeute bestimmt und die üblichen analytischen Methoden zur Identifikation durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzpunkte der synthetisierten Verbindungen erfolgte mit einer Schmelzpunktapparatur (*Art.-Nr. MFB.595.010M*) der Firma *Gallenkamp (Leicestershire, Großbritannien)*. Es wurden Schmelzintervalle (Beginn der Tröpfchenbildung bis zur klaren Schmelze) protokolliert. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und Zersetzungsprozesse werden explizit angegeben.

Mikrowellensynthesen

Mikrowellenunterstützte Synthesen wurden in einer Mikrowelle des Typs *Discover-SP W/Activent (Modellnummer 909155)* der Firma *CEM GmbH (Kamp-Lintfort, Deutschland)* durchgeführt. Der Ansatzgröße entsprechend wurden Druckgefäße mit 10 oder 35 ml Reaktionsvolumen eingesetzt.

Kernspinresonanzspektroskopie

Zur Identitätskontrolle wurden von den synthetisierten Verbindungen ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren mit einem *Bruker Avance 500- (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz)* oder mit einem *Bruker Avance 600-Spektrometer (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 151 MHz)* der Firma *Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland)* bei 30 °C aufgenommen. Die Substanzen wurden in $\text{DMSO-}d_6$ gelöst, welches gleichzeitig als

interner Standard diente (DMSO- d_6 : ^1H : δ 2.50, ^{13}C : δ 39.52). Die **chemischen Verschiebungen (δ)** sind in Millionstel (ppm) und **Kopplungskonstanten (J)** in Hertz (Hz) angegeben.

Die aufgenommenen ^{13}C -Spektren sind ^1H -Breitband-entkoppelt und die Zuordnung der ^{13}C -Signale erfolgte über das **attached proton test (APT)**-Verfahren. Beim APT-Verfahren fehlende Kohlenstoffe wurden durch ein zusätzliches ^{13}C -Spektrum nachgewiesen. Im Falle der Pyrimidinderivate wurde dies für einige Vertreter durchgeführt, um deren Existenz zweifelsfrei zu überprüfen. Dies betraf zumeist die quartären Kohlenstoffatome in direkter Nachbarschaft zu Stickstoff. Im Folgenden wurde bei den weiteren Derivaten auf zusätzliche ^{13}C -Spektren verzichtet. Fehlende Kohlenstoffsignale sind bei den entsprechenden Einträgen gekennzeichnet (*).

Die Signalmultiplizitäten der ^1H -Spektren sind mit *s* für Singulett, *bs* für ein breites Singulett, *d* für ein Dublett, *dd* für ein Dublett vom Dublett, *ddd* für ein Dublett vom Dublett vom Dublett, *t* für ein Triplett, *td* für ein Triplett vom Dublett, *dt* für ein Dublett vom Triplett, *q* für ein Quartett, *qi* für ein Quintett und *m* für ein Multipllett angegeben.

Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)

Zur weiteren Reinheits- und Identitätskontrolle wurden die biologisch getesteten Endstufen mittels LC/MS analysiert. Die Massenspektren wurden mit einem API2000-Massenspektrometer der Firma *AB Sciex GmbH (Darmstadt, Deutschland)* mit Elektronensprayionisations-Quelle, gekoppelt mit einer HPLC der 1100-Serie der Firma *Agilent Technologies GmbH & Co. KG (Waldbronn, Deutschland)* unter Verwendung einer EC50/2 Nucleodur C₁₈ Gravity Säule mit einer Partikelgröße von 3 μm der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)* aufgenommen. Die Säulentemperatur während der **Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)** betrug 25 °C.

Die HPLC begann mit 90 % Wasser, welches eine Konzentration von 2 mM Ammoniumacetat enthielt. Der Gradient verlief über 10 Minuten zu 100 % Methanol mit 2 mM Ammoniumacetat. Anschließend wurde weitere 10 Minuten mit 100 % Methanol, welches 2 mM Ammoniumacetat enthielt, gespült. Die Proben wurden in Methanol gelöst, welches Ammoniumacetat (1 mg/ml) enthielt. 8 μl der Probenlösung wurden bei einer Flussrate von 0,3 ml/min injiziert.

Die Detektion der positiven Gesamtionen erfolgte in einem Bereich von 150–800 *m/z*. Die UV-Absorption wurde mit einem **Diodenarraydetektor (DAD)** im Bereich von 190–900 nm detektiert. Die Reinheit wurde von 220–400 nm bestimmt.

8.1.2 Synthesevorschriften

Phenylacrylsäure-Derivate

Methode A

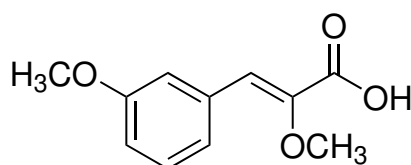
Zu einer Lösung aus Natriummethanolat in Methanol (30 %ige Lösung, 5 ml, 1,35 g, 25 mmol) wurde Methyl-2-methoxyacetat (1,39 g, 13,4 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Benzaldehydderivat (0,64 g, 4,7 mmol) in trockenem Methanol gelöst, zur Reaktionslösung hinzugegeben und unter Rückfluss erhitzt.

Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Das überschüssige Methanol wurde entfernt und die verbliebene Lösung mit verdünnter HCl auf einen pH von 2 eingestellt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und nach Abfiltration aus Toluol umkristallisiert.

Methode B

Zu einer Lösung aus Benzaldehyd (1 ml, 1,05 g, 9,89 mmol) und Cyanessigsäuremethylester (0,9 ml, 1,01 g, 10,20 mmol) in Methanol (70 %ig in H₂O) wurde Piperidin (0,2 ml, 0,17 g, 2,02 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Der erhaltene Feststoff wurde filtriert und ohne weitere Aufreinigung in einer NaOH-Lösung (30 %ig in MeOH) gerührt, um den Ester zu spalten und die freie Säure zu erhalten. Nach erfolgter Hydrolyse (DC-Kontrolle) wurde die Reaktionslösung mit 1M HCl auf pH 2 eingestellt. Der dabei erhaltene Feststoff wurde nach Filtration mit demineralisiertem Wasser gewaschen, getrocknet und die Ausbeute bestimmt.

(1) 3-(3-Methoxyphenyl)-2-methoxyacrylsäure



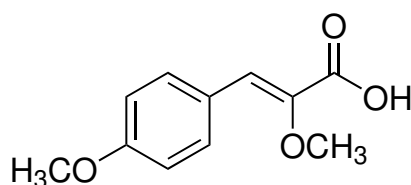
wurde nach Methode A aus Natriummethanolat (10,80 g, 0,2 mol), Methyl-2-methoxyacetat (5,70 ml, 6,00 g, 0,06 mol) und 3-Methoxybenzaldehyd (2,50 ml, 2,80 g, 0,02 mol) hergestellt und aus Toluol umkristallisiert (farbloses Pulver, 1,72 g, 8,26 mmol, 40 % d. Th.).

Smp.: 101 – 102 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,96 (bs, 1H, COOH), 7,36–7,34 (m, 1H, ArH), 7,33–7,29 (m, 2H, ArH), 6,92 (dt, ³*J*_{HH} = 6,6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,6 Hz, 1H, ArH), 6,88 (s, 1H, =CH-), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,86 (C_q), 159,18 (C_q), 146,30 (C_q), 134,55 (C_q), 129,53 (CH), 122,21 (CH), 121,75 (CH), 114,80 (CH), 114,53 (CH), 58,53 (CH₃), 54,98 (CH₃).

(2) 3-(4-Methoxyphenyl)-2-methoxyacrylsäure



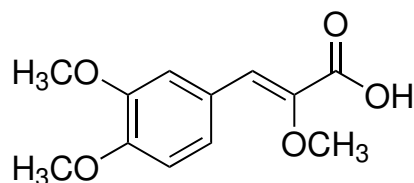
wurde nach Methode A aus Natriummethanolat (10,80 g, 0,2 mol), Methyl-2-methoxyacetat (12,0 ml, 12,61 g, 0,12 mol) und 4-Methoxybenzaldehyd (5,00 ml, 5,61 g, 0,04 mol) hergestellt und aus Toluol umkristallisiert (beiges Pulver, 4,22 g, 0,02 mol, 49 % d. Th.).

Smp.: 162 – 164 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,75 (bs, 1H, COOH), 7,72 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz 2H, ArH), 6,88 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,68 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,12 (C_q), 159,63 (C_q), 144,29 (C_q), 131,37 (2x CH), 125,85 (C_q), 122,19 (2x CH), 114,08 (CH), 58,34 (CH₃), 55,15 (CH₃).

(3) 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methoxyacrylsäure



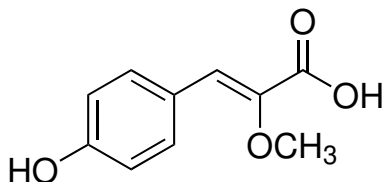
wurde nach Methode A aus Natriummethanolat (5,41 g, 0,10 mol), Methyl-2-methoxyacetat (6,20 ml, 6,52 g, 0,06 mol) und 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (3,42 g, 0,02 mol) hergestellt und aus Toluol umkristallisiert (farbloses Pulver, 2,65 g, 0,01 mol, 54 % d. Th.).

Smp.: 153 – 154 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,74 (bs, 1H, COOH), 7,43 (d, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz 1H, ArH), 7,32 (dd, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,8 Hz 1H, ArH), 6,98 (d, ³*J*_{HH} = 8,50 Hz 1H, ArH) 6,88 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,70 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,17 (C_q), 149,43 (C_q), 148,40 (C_q), 144,55 (C_q), 126,09 (C_q), 123,32 (CH), 122,39 (CH), 112,91 (CH), 111,63 (CH), 58,37 (CH₃), 55,46 (CH₃), 55,35 (CH₃).

(4) 3-(4-Hydroxyphenyl)-2-methoxyacrylsäure



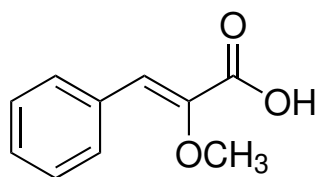
wurde nach Methode A aus Natriummethanolat (5,41 g, 0,10 mol), Methyl-2-methoxyacetat (6,20 ml, 6,52 g, 0,06 mol) und 4-Hydroxybenzaldehyd (2,46 g, 0,02 mol) hergestellt und aus Toluol umkristallisiert (beiges Pulver, 1,96 g, 0,01 mol, 50 % d. Th.).

Smp.: 157 – 158 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,67 (bs, 1H, COOH), 9,87 (s, 1H, ArOH), 7,61 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz 2H, ArH), 6,84 (s, 1H, =CH-), 6,79 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 3,66 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,35 (C_q), 158,33 (C_q), 143,54 (C_q), 131,65 (2x CH), 124,27 (C_q), 122,98 (CH), 115,56 (2x CH), 58,34 (CH₃).

(5) 2-Methoxy-3-phenylacrylsäure



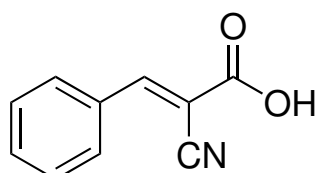
wurde nach Methode A aus Natriummethanolat (5,41 g, 0,10 mol), Methyl-2-methoxyacetat (6,20 ml, 6,52 g, 0,06 mol) und Benzaldehyd (2,0 ml, 2,10 g, 0,02 mol) hergestellt und aus Toluol umkristallisiert (farbloses Pulver, 1,16 g, 6,49 mmol, 33 % d. Th.).

Smp.: 126–128 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,94 (bs, 1H, COOH), 7,79–7,71 (m, 2H, ArH), 7,43–7,37 (m, 2H, ArH), 7,37–7,30 (m, 1H, ArH), 6,90 (s, 1H, =CH-), 3,72 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,92 (C_q), 146,14 (C_q), 133,31 (C_q), 129,68 (2x CH), 128,74 (CH), 128,57 (2x CH), 121,84 (CH), 58,52 (CH₃).

(6) 2-Cyano-3-phenylacrylsäure



wurde nach Methode B aus Benzaldehyd (1,0 ml, 1,05 g, 9,89 mmol), Cyanessigsäuremethylester (0,90 ml, 1,01 g, 10,20 mmol) und Piperidin (2,0 ml, 2,10 g, 0,02 mol) hergestellt (farbloses Pulver, 0,52 g, 3,03 mmol, 31 % d. Th.).

Smp.: 176–177 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,95 (bs, 1H, COOH), 8,34 (s, 1H, =CH-), 8,23–7,84 (m, 2H, ArH), 7,68–7,50 (m, 3H, ArH).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,14 (C_q), 154,37 (CH), 133,02 (CH), 131,49 (C_q), 130,55 (2x CH), 129,22 (2x CH), 115,97 (C_q), 103,82 (C_q).

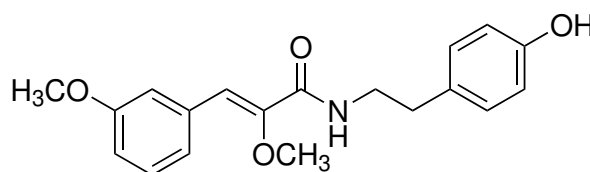
Synthese der gesättigten Botryllamide

Allgemeine Synthesevorschrift

Zu einer Lösung der entsprechenden Phenylacrylsäure (1 Äq.) und des 2-Phenethylaminderivats (1 Äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (THF) wurden TBTU (1,5 Äq) und Diisopropylethylamin (DIPEA) (3 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt bis eine vollständige Umsetzung (DC-Kontrolle) erreicht war. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegeben, wobei ein Feststoff ausfiel. Nach Filtration wurde ein meist DC-reines Produkt erhalten. Bei Verunreinigungen wurde aus einem Gemisch aus Ethanol/Wasser umkristallisiert, oder die Substanz säulenchromatographisch aufgereinigt.

Bei einigen Ansätzen wurde nach dem Gießen auf Eiswasser kein kristalliner Feststoff erhalten. In diesem Falle wurde der meist klebrige Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander mit 1M HCl, demineralisiertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde auf Reinheit kontrolliert und falls nötig mit den oben beschriebenen Methoden aufgereinigt.

(7) *N*-(4-Hydroxyphenethyl)-2-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)acrylamid



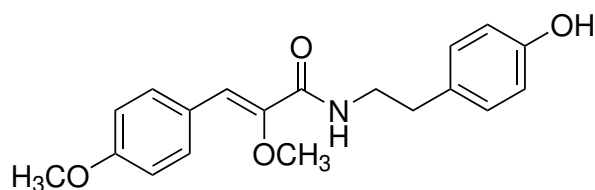
wurde aus **1** (0,110 g, 0,53 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,102 g, 0,59 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,074 g, 0,23 mmol, 43 % d. Th.).

Smp.: 134–138 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,14 (s, 1H, ArOH), 8,22 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz 1H, NH), 7,30 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,26–7,21 (m, 2H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,89 (dd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,6 Hz 1H, ArH), 6,68 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz 2H, ArH), 6,62 (s, 1H, =CH-), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,36 (q, ³*J*_{HH} = 6,8 Hz 2H, CH₂), 2,70 (t, ³*J*_{HH} = 7,5 Hz 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,81 (C_q), 159,20 (C_q), 155,58 (C_q), 150,00 (C_q), 134,81 (C_q), 129,52 (CH), 129,44 (2x CH), 129,35 (C_q), 121,75 (CH), 116,74 (CH), 115,06 (2x CH), 114,36 (CH), 113,82 (CH), 58,69 (CH₃), 54,95 (CH₃), 40,67 (CH₂), 34,11 (CH₂).

LC/MS t_r = 10,15 min (96,4 % AUC); **MS** *m/z* 328,0 [M + H]⁺.

(8) *N*-(4-Hydroxyphenethyl)-2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid

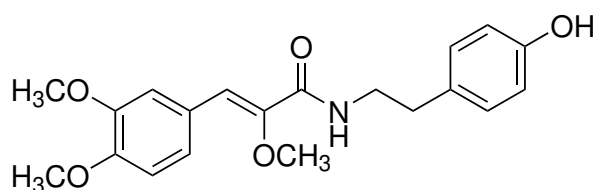
wurde aus **2** (0,065 g, 0,31 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,059 g, 0,34 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,066 g, 0,20 mmol, 65 % d. Th.).

Smp.: 133 – 136 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,13 (s, 1H, ArOH), 8,12 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz 1H, NH), 7,63 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,01 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,68 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,66 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (q, ³*J*_{HH} = 6,5 Hz 2H, CH₂), 2,69 (t, ³*J*_{HH} = 7,5 Hz 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,02 (C_q), 159,10 (C_q), 155,57 (C_q), 148,03 (C_q), 130,82 (2x CH), 129,43 (2x CH), 125,97 (C_q), 117,23 (CH), 115,06 (2x CH), 114,08 (2x CH), 58,54 (CH₃), 55,10 (CH₃), 40,65 (CH₂), 34,19 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,18 min (95,8 % AUC); **MS** *m/z* 327,9 [M + H]⁺.

(9) *N*-(4-Hydroxyphenethyl)-2-methoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamid

wurde aus **3** (0,065 g, 0,37 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,053 g, 0,31 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,047 g, 0,13 mmol, 48 % d. Th.).

Smp.: 163 – 167 °C

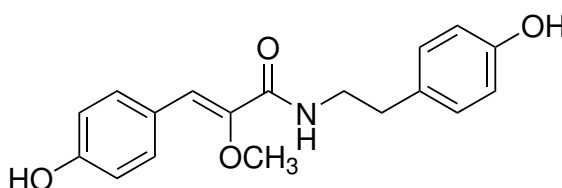
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,14 (s, 1H, ArOH), 8,10 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,34 (d, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 7,22 (dd, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 7,01 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,97 (dd, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, ⁴*J*_{HH} = 0,9 Hz, 1H, ArH), 6,68 (d, ³*J*_{HH} = 6,3 Hz, 2H, ArH), 6,67

(s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,36 (q, ³J_{HH} = 6,7, 2H, CH₂), 2,69 (t, ³J_{HH} = 7,4 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,99 (C_q), 155,58 (C_q), 148,94 (C_q), 148,47 (C_q), 148,06 (C_q), 129,43 (2x CH), 129,39 (C_q), 126,16 (C_q), 122,73 (CH), 117,69 (CH), 115,06 (2x CH), 112,55 (CH), 111,71 (CH), 58,65 (CH₃), 55,44 (CH₃), 55,34 (CH₃), 40,64 (CH₂), 34,19 (CH₂).

LC/MS t_R = 9,64 min (96,5 % AUC); MS *m/z* 357,8 [M + H]⁺.

(10) N-(4-Hydroxyphenethyl)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



wurde aus **4** (0,033 g, 0,17 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,033 g, 0,19 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,031 g, 0,10 mmol, 58 % d. Th.).

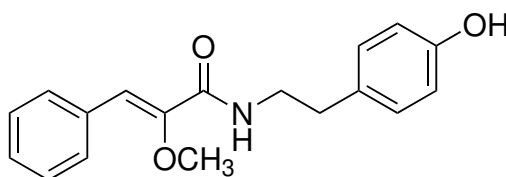
Smp.: 182 – 185 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,71 (s, 1H, ArOH), 9,14 (s, 1H, ArOH), 8,06 (t, ³J_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,51 (d, ³J_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,01 (d, ³J_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,78 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 6,68 (d, ³J_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,63 (s, 1H, =CH-), 3,51 (s, 3H, OCH₃), 3,34 (q, ³J_{HH} = 6,2 Hz, 2H, CH₂), 2,69 (t, ³J_{HH} = 7,4 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,15 (C_q), 157,61 (C_q), 155,57 (C_q), 147,28 (C_q), 131,00 (2x CH), 129,43 (2x CH), 124,35 (C_q), 117,86 (CH), 115,48 (2x CH), 115,06 (2x CH), 58,49 (CH₃), 40,65 (CH₂), 34,22 (CH₂).

LC/MS t_R = 9,02 min (95,9 % AUC); MS *m/z* 314,0 [M + H]⁺.

(11) N-(4-Hydroxyphenethyl)-2-methoxy-3-phenylacrylamid



wurde aus **5** (0,062 g, 0,35 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,073 g, 0,42 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,016 g, 0,05 mmol, 16 % d. Th.).

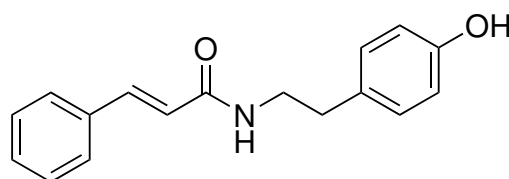
Smp.: 130–134 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,13 (s, 1H, ArOH), 8,22 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,66 (d, ³*J*_{HH} = 7,2 Hz, 2H, ArH), 7,39 (t, ³*J*_{HH} = 7,6 Hz, 2H, ArH), 7,30 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 1H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,68 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,64 (s, 1H, =CH-), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,36 (q, ³*J*_{HH} = 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,70 (t, ³*J*_{HH} = 7,5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,86 (C_q), 155,58 (C_q), 149,85 (C_q), 133,55 (C_q), 129,44 (2x CH), 129,36 (C_q), 129,21 (2x CH), 128,55 (2x CH), 128,03 (CH), 116,79 (CH), 115,06 (2x CH), 58,65 (CH₃), 40,68 (CH₂), 34,13 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,08 min (95,0 % AUC); **MS** *m/z* 297,9 [M + H]⁺.

(12) N-(4-Hydroxyphenethyl)zimtsäureamid



wurde aus Zimtsäure (0,075 g, 0,51 mmol) und Tyramin-Hydrochlorid (0,090 g, 0,52 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,130 g, 0,49 mmol, 96 % d. Th.).

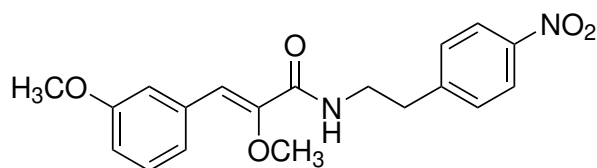
Smp.: 186–188 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,18 (s, 1H, ArOH), 8,14 (t, ³*J*_{HH} = 5,7 Hz, 1H, NH), 7,58–7,52 (m, 2H, ArH), 7,41 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,4 Hz, 1H, -CH=), 7,42–7,32 (m, 3H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,68 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,62 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,8 Hz, 1H, =CH-), 3,34 (q, ³*J*_{HH} = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 2,66 (t, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,82 (C_q), 155,64 (C_q), 138,44 (CH), 134,93 (C_q), 129,46 (2x CH), 129,37 (CH), 128,91 (2x CH), 127,47 (2x CH), 122,30 (CH), 115,11 (2x CH), 40,71 (CH₂), 34,36 (CH₂).

LC/MS t_R = 9,70 min (97,9 % AUC); **MS** *m/z* 267,8 [M + H]⁺.

(13) *N*-(4-Nitrophenethyl)-2-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)acrylamid



wurde aus **1** (0,066 g, 0,32 mmol) und 4-Nitrophenetylamin-Hydrochlorid (0,064 g, 0,32 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,093 g, 0,26 mmol, 81 % d. Th.).

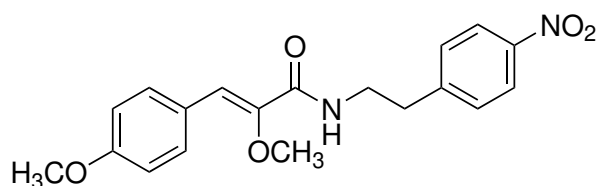
Smp.: 117–118 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,36 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 8,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,53 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,30 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,25–7,22 (m, 2H, ArH), 6,89 (ddd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,0 Hz, 1H, ArH), 6,63 (s, 1H, =CH-), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 3,50 (q, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 2,98 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,02 (C_q), 159,23 (C_q), 149,81 (C_q), 147,96 (C_q), 146,08 (C_q), 134,73 (C_q), 130,08 (2x CH), 129,59 (CH), 123,36 (2x CH), 121,82 (CH), 117,12 (CH), 114,42 (CH), 113,93 (CH), 58,78 (CH₃), 54,97 (CH₃), 39,69 (CH₂), 34,67 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,95 min (95,7 % AUC); **MS** *m/z* 356,9 [M + H]⁺.

(14) *N*-(4-Nitrophenethyl)-2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid



wurde aus **2** (0,060 g, 0,29 mmol) und 4-Nitrophenetylamin-Hydrochlorid (0,060 g, 0,30 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,074 g, 0,21 mmol, 72 % d. Th.).

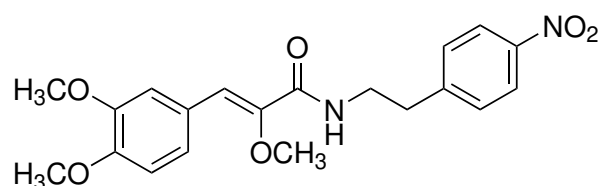
Smp.: 165–167 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,27 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 8,16 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,62 (d, ³*J*_{HH} = 9,0, 2H, ArH), 7,52 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,95 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,66 (s, 1H, =CH-), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,50 (s, 3H, OCH₃), 3,49 (q, ³*J*_{HH} = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 2,97 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,24 (C_q), 159,18 (C_q), 148,02 (C_q), 147,83 (C_q), 146,06 (C_q), 130,92 (2x CH), 130,07 (2x CH), 125,90 (C_q), 123,36 (2x CH), 117,58 (CH), 114,12 (2x CH), 58,62 (CH₃), 55,13 (CH₃), 39,69 (CH₂), 34,74 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,85 min (96,6 % AUC); MS m/z 356,9 [M + H]⁺.

(15) *N*-(4-Nitrophenethyl)-2-methoxy-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylamid



wurde aus **3** (0,105 g, 0,44 mmol) und 4-Nitrophenethylamin-Hydrochlorid (0,094 g, 0,46 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,164 g, 0,42 mmol, 96 % d. Th.).

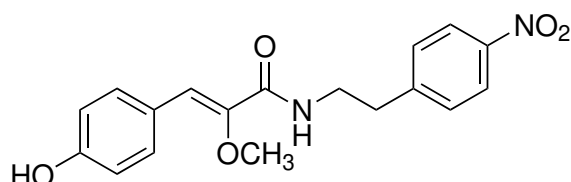
Smp.: 117 – 119 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,24 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,9$ Hz, 1H, NH), 8,16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,52 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,33 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 7,22 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 6,97 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 1H, ArH), 6,67 (s, 1H, =CH-), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 3,50 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,1$ Hz, 2H, CH₂), 2,98 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,23 (C_q), 149,02 (C_q), 148,49 (C_q), 147,98 (C_q), 147,86 (C_q), 146,07 (C_q), 130,04 (2x CH), 126,08 (C_q), 123,33 (2x CH), 122,82 (CH), 117,98 (CH), 112,58 (CH), 111,73 (CH), 58,71 (CH₃), 55,46 (CH₃), 55,35 (CH₃), 39,69 (CH₂), 34,74 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,41 min (98,3 % AUC); MS m/z 387,0 [M + H]⁺.

(16) *N*-(4-Nitrophenethyl)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



wurde aus **4** (0,056 g, 0,29 mmol) und 4-Nitrophenethylamin-Hydrochlorid (0,062 g, 0,31 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,054 g, 0,16 mmol, 55 % d. Th.).

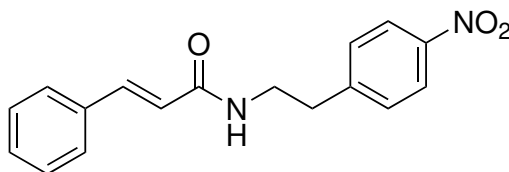
Smp.: 163–166 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,74 (s, 1H, ArOH), 8,21 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 8,16 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,52 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,51 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,78 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 6,63 (s, 1H, =CH-), 3,49 (s, 3H, OCH₃), 3,48 (q, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 2,97 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,36 (C_q), 157,70 (C_q), 148,04 (C_q), 147,09 (C_q), 146,06 (C_q), 131,10 (2x CH), 130,07 (2x CH), 124,28 (C_q), 123,36 (2x CH), 118,17 (CH), 115,52 (2x CH), 58,57 (CH₃), 39,68 (CH₂), 34,77 (CH₂).

LC/MS t_R = 9,97 min (97,3 % AUC); **MS** *m/z* 342,8 [M + H]⁺.

(17) N-(4-Nitrophenethyl)zimtsäureamid



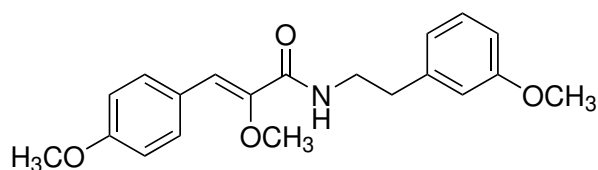
wurde aus Zimtsäure (0,072 g, 0,49 mmol) und 4-Nitrophenethylamin-Hydrochlorid (0,098 g, 0,48 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,121 g, 0,41 mmol, 85 % d. Th.).

Smp.: 149–150 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,21 (t, ³*J*_{HH} = 5,7 Hz, 1H, NH), 8,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,50–7,41 (m, 4H, ArH), 7,41 (d, ³*J*_{HH_{trans}} = 15,3 Hz, 1H, =CH-), 7,44–7,33 (m, 3H, ArH), 6,59 (d, ³*J*_{HH_{trans}} = 15,8 Hz, 1H, -CH=), 3,49 (q, ³*J*_{HH} = 6,9 Hz, 2H, CH₂), 2,94 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,97 (C_q), 147,96 (C_q), 146,09 (C_q), 138,68 (CH), 134,83 (C_q), 130,03 (2x CH), 129,43 (CH), 128,91 (2x CH), 127,49 (2x CH), 123,39 (2x CH), 122,01 (CH), 39,61 (CH₂), 34,88 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,60 min (97,8 % AUC); **MS** *m/z* 297,0 [M + H]⁺.

(18) *N*-(3-Methoxyphenethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methoxyacrylamid

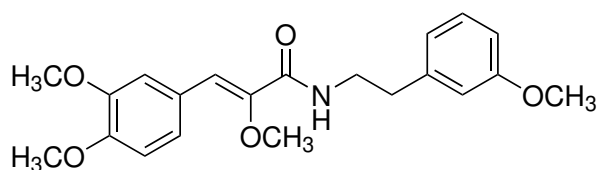
wurde aus **2** (0,379 g, 1,82 mmol) und 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (0,30 ml, 0,312 g, 2,06 mmol) hergestellt (farbloses Pulver, 0,30 g, 0,88 mmol, 48 % d. Th.).

Smp.: 74–75 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,17 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz 1H, NH), 7,63 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz 2H, ArH), 7,20 (t, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz 1H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz 2H, ArH), 6,86–6,73 (m, 3H, ArH), 6,67 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,52 (s, 3H, OCH₃), 3,42 (q, ³*J*_{HH} = 6,7 Hz 2H, CH₂), 2,79 (t, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,09 (C_q), 159,24 (C_q), 159,11 (C_q), 147,99 (C_q), 140,99 (C_q), 130,84 (2x CH), 129,25 (CH), 125,96 (C_q), 120,88 (CH), 117,29 (CH), 114,21 (CH), 114,09 (2x CH), 111,54 (CH), 58,53 (CH₃), 55,10 (CH₃), 54,85 (CH₃), 40,20 (CH₂), 34,96 (CH₂).

LC/MS *t*_R = 11,08 min (98,6 % AUC); **MS** *m/z* 341,9 [M + H]⁺.

(19) *N*-(3-Methoxyphenethyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyacrylamid

wurde aus **3** (0,450 g, 1,89 mmol) und 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (0,30 ml, 0,312 g, 2,06 mmol) hergestellt (farbloses Pulver, 0,282 g, 0,76 mmol, 40 % d. Th.).

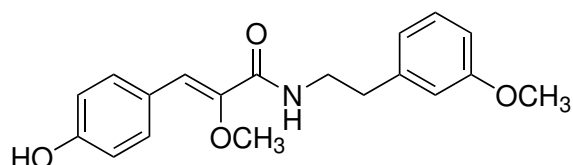
Smp.: 76–80 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 8,15 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,34 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 7,24–7,18 (m, 2H, ArH), 6,97 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 1H, ArH), 6,82–6,75 (m, 3H, ArH), 6,68 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,43 (q, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 2,80 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,06 (C_q), 159,25 (C_q), 148,96 (C_q), 148,48 (C_q), 148,02 (C_q), 140,98 (C_q), 129,25 (CH), 126,15 (C_q), 122,74 (CH), 120,87 (CH), 117,73 (CH), 114,22 (CH), 112,55 (CH), 111,72 (CH), 111,54 (CH), 58,63 (CH₃), 55,44 (CH₃), 55,33 (CH₃), 54,85 (CH₃), 40,18 (CH₂), 34,95 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,59 min (95,8 % AUC); **MS** m/z 371,9 [M + H]⁺.

(20) N-(3-Methoxyphenethyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyacrylamid



wurde aus **4** (0,358 g, 1,84 mmol) und 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (0,30 ml, 0,312 g, 2,06 mmol) hergestellt und säulenchromatographisch (Laufmittel: Dichlormethan (5 Vol-% MeOH)) aufgereinigt (farbloses Pulver, 0,211 g, 0,64 mmol, 35 % d. Th.).

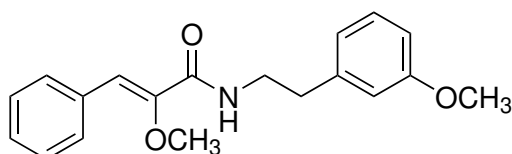
Smp.: 67–70 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,70 (s, 1H, ArOH), 8,10 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,51 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,24–7,15 (m, 1H, ArH), 6,86–6,70 (m, 5H, ArH), 6,64 (s, 1H, =CH-), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,50 (s, 3H, OCH₃), 3,42 (q, $^3J_{\text{HH}}$ = 6,7 Hz, 2H, CH₂), 2,79 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7,3 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,21 (C_q), 159,23 (C_q), 157,61 (C_q), 147,24 (C_q), 141,00 (C_q), 131,00 (2x CH), 129,24 (CH), 124,33 (C_q), 120,86 (CH), 117,88 (CH), 115,48 (2x CH), 114,21 (CH), 111,53 (CH), 58,47 (CH₃), 54,84 (CH₃), 40,18 (CH₂), 34,98 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,20 min (96,7 % AUC); **MS** m/z 327,9 [M + H]⁺.

(21) N-(3-Methoxyphenethyl)-2-methoxy-3-phenylacrylamid



wurde aus **5** (0,343 g, 1,93 mmol) und 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (0,30 ml, 0,312 g, 2,06 mmol) hergestellt und säulenchromatographisch (Laufmittel: Dichlormethan (5 Vol-% MeOH)) aufgereinigt

(farbloses Pulver, 0,334 g, 1,07 mmol, 37 % d. Th.).

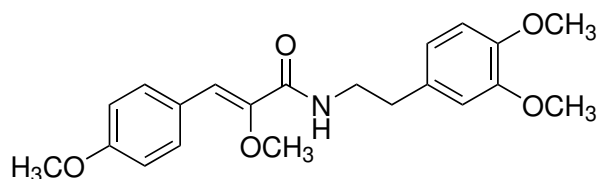
Smp.: 64–65 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,28 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz 1H, NH), 7,66 (dd, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,0 Hz 2H, ArH), 7,39 (t, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 2H, ArH), 7,32–7,28 (m, 1H, ArH), 7,21 (t, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 1H, ArH), 6,81 (dd, ³*J*_{HH} = 6,9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,6 Hz 2H, ArH), 6,79–6,76 (m, 1H, ArH), 6,65 (s, 1H, =CH-), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,43 (q, ³*J*_{HH} = 6,8 Hz 2H, CH₂), 2,80 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,94 (C_q), 159,25 (C_q), 149,82 (C_q), 140,96 (C_q), 133,54 (C_q), 129,27 (CH), 129,23 (2x CH), 128,58 (2x CH), 128,07 (CH), 120,89 (CH), 116,85 (CH), 114,24 (CH), 111,56 (CH), 58,63 (CH₃), 54,85 (CH₃), 40,23 (CH₂), 34,90 (CH₂).

LC/MS t_R = 11,05 min (97,5 % AUC); **MS** *m/z* 311,8 [M + H]⁺.

(22) N-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid



wurde aus **2** (0,092 g, 0,44 mmol) und 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin (0,09 ml, 0,097 g, 0,53 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,035 g, 0,09 mmol, 21 % d. Th.).

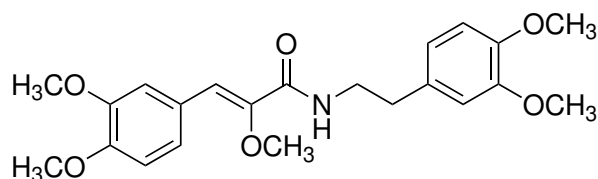
Smp.: 132–134 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,13 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,62 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,86 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 1H, ArH), 6,82 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 6,73 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 6,67 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 3,41 (q, ³*J*_{HH} = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 2,75 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,06 (C_q), 159,10 (C_q), 148,60 (C_q), 148,02 (C_q), 147,21 (C_q), 131,88 (C_q), 130,81 (2x CH), 125,96 (C_q), 120,46 (CH), 117,23 (CH), 114,08 (2x CH), 112,56 (CH), 111,95 (CH), 58,53 (CH₃), 55,51 (CH₃), 55,35 (CH₃), 55,09 (CH₃), 40,44 (CH₂), 34,50 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,55 min (97,5 % AUC); **MS** *m/z* 371,9 [M + H]⁺.

(23) *N*-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-methoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-acrylamid



wurde aus **3** (0,089 g, 0,37 mmol) und 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin (0,07 ml, 0,075 g, 0,41 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,036 g, 0,09 mmol, 24 % d. Th.).

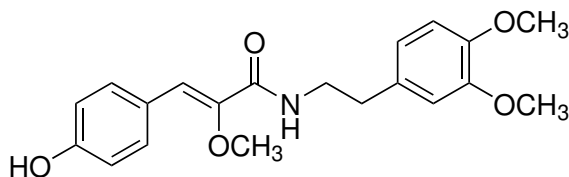
Smp.: 135 – 139 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,12 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,34 (d, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 7,23 (dd, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,7 Hz, 1H, ArH), 6,97 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 1H, ArH), 6,86 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 1H, ArH), 6,82 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 6,74 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 6,68 (s, 1H, =CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,41 (q, ³*J*_{HH} = 6,6 Hz, 2H, CH₂), 2,75 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,02 (C_q), 148,95 (C_q), 148,60 (C_q), 148,47 (C_q), 148,05 (C_q), 147,21 (C_q), 131,87 (C_q), 126,15 (C_q), 122,72 (CH), 120,46 (CH), 117,69 (CH), 112,56 (CH), 112,54 (CH), 111,95 (CH), 111,71 (CH), 58,64 (CH₃), 55,51 (CH₃), 55,44 (CH₃), 55,36 (CH₃), 55,33 (CH₃), 40,43 (CH₂), 34,51 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,06 min (97,5 % AUC); **MS** *m/z* 401,9 [M + H]⁺.

(24) *N*-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



wurde aus **4** (0,215 g, 1,11 mmol) und 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin (0,08 ml, 0,086 g, 0,47 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,319 g, 0,89 mmol, 81 % d. Th.).

Smp.: 137 – 139 °C

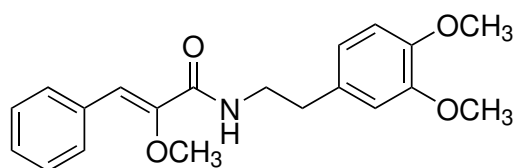
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,67 (s, 1H, ArOH), 8,07 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,51 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 6,86 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 1H, ArH), 6,82 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 6,78 (d,

$^3J_{\text{HH}} = 8,7 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,73 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, ArH), 6,64 (s, 1H, =CH-), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,40 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 2,74 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,3 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,18 (C_q), 157,62 (C_q), 148,60 (C_q), 147,27 (C_q), 147,21 (C_q), 131,91 (C_q), 130,99 (2x CH), 124,33 (C_q), 120,46 (CH), 117,85 (CH), 115,48 (2x CH), 112,56 (CH), 111,95 (CH), 58,49 (CH₃), 55,52 (CH₃), 55,36 (CH₃), 40,44 (CH₂), 34,54 (CH₂).

LC/MS $t_{\text{R}} = 9,62 \text{ min}$ (97,8 % AUC); MS m/z 357,8 [M + H]⁺.

(25) *N*-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-methoxy-3-phenylacrylamid



wurde aus **5** (0,106 g, 0,59 mmol) und 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin (0,11 ml, 0,118 g, 0,65 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,155 g, 0,45 mmol, 76 % d. Th.).

Smp.: 107 – 108 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,24 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,8 \text{ Hz}$, 1H, NH), 7,70 – 7,60 (m, 2H, ArH), 7,44 – 7,35 (m, 2H, ArH), 7,33 – 7,26 (m, 1H, ArH), 6,86 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$, 1H, ArH), 6,83 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, ArH), 6,74 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, ArH), 6,65 (s, 1H, =CH-), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,42 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,4 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 2,76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,3 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,90 (C_q), 149,84 (C_q), 148,61 (C_q), 147,23 (C_q), 133,54 (C_q), 131,84 (C_q), 129,20 (2x CH), 128,55 (2x CH), 128,04 (CH), 120,48 (CH), 116,79 (CH), 112,57 (CH), 111,95 (CH), 58,64 (CH₃), 55,52 (CH₃), 55,36 (CH₃), 40,48 (CH₂), 34,45 (CH₂).

LC/MS $t_{\text{R}} = 10,53 \text{ min}$ (97,6 % AUC); MS m/z 341,9 [M + H]⁺.

Synthese der ungesättigten Botryllamide

Allgemeine Synthesevorschrift

Die Synthese der ungesättigten Botryllamide erfolgte in insgesamt drei Stufen. Zunächst wurde die entsprechende Säure mit Octopamin zum entsprechenden Amid gekuppelt. Anschließend wurden die freien OH-Gruppen des Amids mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die acetylierten Vorstufen ließen sich anschließend unter Eliminierung von Essigsäure zur ungesättigten Endstufe umsetzen.

Schritt 1: Amidkupplung

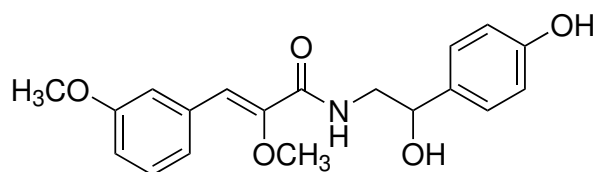
Zu einer Lösung der entsprechenden Phenylacrylsäure (1 Äq.) und Octopamin-Hydrochlorid (1 Äq.) in trockenem THF wurden TBTU (1,5 Äq.) und DIPEA (3 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt bis eine vollständige Umsetzung erreicht war. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 1M HCl, demineralisiertem Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Abtrennen der Phasen wurde die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, um einen Feststoff zu erhalten. Anschließend wurde das Produkt getrocknet und die Ausbeute bestimmt.

Schritt 2: Acetylierung der Amide

Das entsprechende Amid (1 Äq.) wurde in Essigsäureanhydrid (30 Äq.) gelöst und zu dieser Lösung Pyridin (5 Äq.) zugegeben. Die Menge an Base richtete sich nach der Anzahl, der im Amid vorhandenen OH-Gruppen. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts auf 100 °C erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde auf Eiswasser gegossen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit 1M HCl, demineralisiertem Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das DC-reine Produkt wurde getrocknet und die Ausbeute bestimmt.

Schritt 3: Eliminierung zur ungesättigten Endstufe

Die acetylierten Amide (1 Äq.) wurden in DMSO gelöst, Kaliumcarbonat (1 Äq.) zur Lösung zugegeben und auf 95 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 1M NaOH-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt bis zur Vollständigkeit der Hydrolyse der acetylierten OH-Gruppen. Anschließend wurde der Ansatz mehrmals mit Dichlormethan extrahiert, neutral gewaschen und die organische Phase abgetrennt und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der erhaltene Feststoff aus Ethanol/Wasser umkristallisiert oder säulenchromatographisch aufgereinigt.

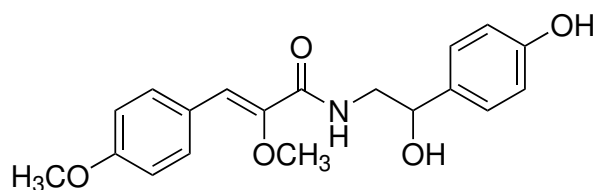
(26) *N*-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)acrylamid

wurde aus **1** (0,072 g, 0,34 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,074 g, 0,39 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,078 g, 0,23 mmol, 68 % d. Th.).

Smp.: 119 – 121 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,24 (s, 1H, ArOH), 8,01 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,30 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,25 – 7,23 (m, 2H, ArH), 7,15 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,89 (dd, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,5 Hz, 1H, ArH), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,65 (s, 1H, =CH-), 5,32 (d, ³*J*_{HH} = 4,5 Hz, 1H, OH), 4,68 – 4,61 (m, 1H, CH), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,41 – 3,35 (m, 1H, CHH), 3,30 – 3,24 (m, 1H, CHH).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,97 (C_q), 159,22 (C_q), 156,39 (C_q), 149,83 (C_q), 134,75 (C_q), 133,77 (C_q), 129,56 (CH), 127,15 (2x CH), 121,80 (CH), 117,01 (CH), 114,72 (2x CH), 114,40 (CH), 113,91 (CH), 70,69 (CH), 58,76 (CH₃), 54,96 (CH₃), 46,97 (CH₂).

(27) *N*-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid

wurde aus **2** (0,037 g, 0,18 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,033 g, 0,17 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,034 g, 0,10 mmol, 59 % d. Th.).

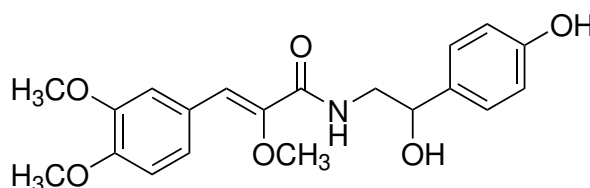
Smp.: 153 – 156 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,23 (s, 1H, ArOH), 7,88 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,63 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 7,15 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,69 (s, 1H, =CH-), 5,32 (d, ³*J*_{HH} = 4,4 Hz, 1H, OH), 4,64 (dt, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, ³*J*_{HH} = 4,8 Hz, 1H, CH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 3,38 (ddd, ²*J*_{HH} = 12,3 Hz, ³*J*_{HH} =

6,0 Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4,6$ Hz, 1H, **CHH**), 3,27 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 13,1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$ Hz, 1H, **CHH**).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,21 (C_q), 159,17 (C_q), 156,37 (C_q), 147,83 (C_q), 133,80 (C_q), 130,89 (2x CH), 127,13 (2x CH), 125,90 (C_q), 117,52 (CH), 114,73 (2x CH), 114,11 (2x CH), 70,76 (CH), 58,61 (CH₃), 55,12 (CH₃), 46,95 (CH₂).

(28) N-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-methoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamid



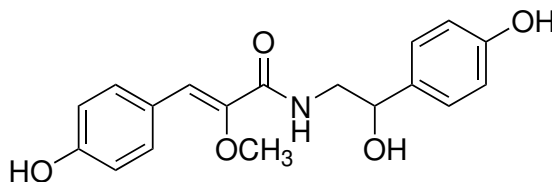
wurde aus **3** (0,066 g, 0,28 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,054 g, 0,28 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,038 g, 0,10 mmol, 36 % d. Th.).

Smp.: 140–143 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,23 (s, 1H, ArOH), 7,87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,8$ Hz, 1H, NH), 7,34 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 7,23 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz_{HH}, 1H, ArH), 7,15 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 6,97 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 6,72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H, ArH) 6,70 (s, 1H, =CH-), 5,32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,4$ Hz, 1H, OH), 4,64 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4,7$ Hz, 1H, CH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃) 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,43–3,34 (m, 1H, **CHH**), 3,29–3,19 (m, 1H, **CHH**).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163,15 (C_q), 156,37 (C_q), 149,01 (C_q), 148,48 (C_q), 147,85 (C_q), 133,78 (C_q), 127,13 (2x CH), 126,07 (C_q), 122,80 (CH), 117,96 (CH), 114,71 (2x CH), 112,57 (CH), 111,72 (CH), 70,75 (CH), 58,71 (CH₃), 55,45 (CH₃), 55,35 (CH₃), 46,93 (CH₂).

(29) N-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



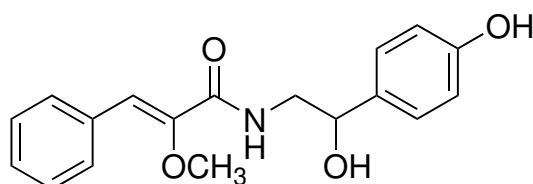
wurde aus **4** (0,058 g, 0,30 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,056 g, 0,30 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,050 g, 0,15 mmol, 50 % d. Th.).

Smp.: 205 – 207 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,77 (s, 1H, ArOH), 9,25 (s, 1H, ArOH), 7,82 (t, ³*J*_{HH} = 5,3 Hz, 1H, NH), 7,51 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,78 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 6,71 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,66 (s, 1H, =CH-), 5,32 (s, 1H, OH), 4,63 (dd, ³*J*_{HH} = 7,6 Hz, ³*J*_{HH} = 5,1 Hz, 1H, CH), 3,51 (s, 3H, OCH₃), 3,44–3,33 (m, 1H, CHH), 3,30–3,18 (m, 1H, CHH).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,32 (C_q), 157,70 (C_q), 156,37 (C_q), 147,06 (C_q), 133,79 (C_q), 131,05 (2x CH), 127,11 (2x CH), 124,24 (C_q), 118,11 (CH), 115,50 (2x CH), 114,71 (2x CH), 70,77 (CH), 58,54 (CH₃), 46,94 (CH₂).

(30) *N*-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-methoxy-3-phenylacrylamid



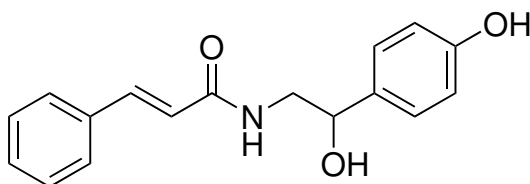
wurde aus **5** (0,065 g, 0,36 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,076 g, 0,40 mmol) hergestellt und säulenchromatographisch (Laufmittel: Dichlormethan (5 Vol-% Methanol)) aufgereinigt (farbloser Feststoff, 0,055 g, 0,18 mmol, 50 % d. Th.).

Smp.: 151 – 153 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,23 (s, 1H, ArOH), 8,00 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,66 (d, ³*J*_{HH} = 7,2 Hz, 2H, ArH), 7,39 (t, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 2H, ArH), 7,33–7,277,33 (m, 1H, ArH), 7,15 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,67 (s, 1H, =CH-), 5,32 (d, ³*J*_{HH} = 4,3 Hz, 1H, OH), 4,65 (dt, ³*J*_{HH} = 7,5 Hz, ³*J*_{HH} = 4,8 Hz, 1H, CH), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,38 (dt, ²*J*_{HH} = 13,1 Hz, ³*J*_{HH} = 5,6 Hz, 1H, CHH), 3,29–3,21 (m, 1H, CHH).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,01 (C_q), 156,38 (C_q), 149,67 (C_q), 133,77 (C_q), 133,48 (C_q), 129,24 (2x CH), 128,57 (2x CH), 128,10 (CH), 127,13 (2x CH), 117,03 (CH), 114,71 (2x CH), 70,69 (CH), 58,70 (CH₃), 46,96 (CH₂).

(31) *N*-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-zimtsäureamid



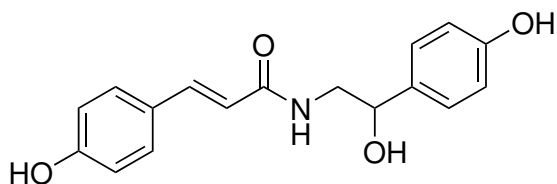
wurde aus Zimtsäure (0,449 g, 3,03 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,578 g, 3,05 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,761 g, 2,69 mmol, 89 % d. Th.).

Smp.: 103–105 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,23 (s, 1H, ArOH), 8,08 (t, ³*J*_{HH} = 5,7 Hz, 1H, NH), 7,56–7,53 (m, 2H, ArH), 7,43–7,34 (m, 4H, ArH), 7,15 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,72 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,8 Hz, 1H, -CH=CH-), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 5,32 (d, ³*J*_{HH} = 4,3 Hz, 1H, OH), 4,58–4,54 (m, 1H, CH), 3,40 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,3 Hz, ³*J*_{HH} = 6,3 Hz, ³*J*_{HH} = 4,7 Hz, 1H, CHH), 3,21 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,2 Hz, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, ³*J*_{HH} = 5,2 Hz, 1H, CHH).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,03 (C_q), 156,38 (C_q), 138,43 (CH), 134,97 (C_q), 133,97 (C_q), 129,30 (CH), 128,86 (2x CH), 127,42 (2x CH), 127,08 (2x CH), 122,41 (CH), 114,74 (2x CH), 71,09 (CH), 47,03 (CH₂).

(32) *N*-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-4-hydroxyzimtsäureamid



wurde aus 4-Hydroxyzimtsäure (0,141 g, 0,86 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,169 g, 0,89 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,194 g, 0,65 mmol, 76 % d. Th.).

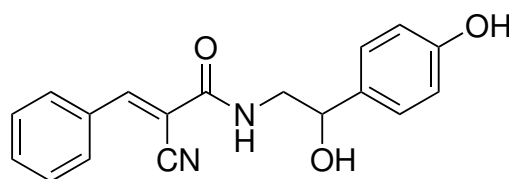
Smp.: 123–125 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,79 (s, 1H, ArOH), 9,23 (s, 1H, ArOH), 7,94 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,37 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,30 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,78 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,71 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,48 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 5,30 (d, ³*J*_{HH} = 4,3 Hz, 1H, OH), 4,56–4,52 (m, 1H, CH), 3,42–3,35 (m,

1H, CHH), 3,18 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 13,2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5,1$ Hz, 1H, CHH).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,60 (C_q), 158,75 (C_q), 156,38 (C_q), 138,62 (CH), 134,05 (C_q), 129,15 (2x CH), 127,11 (2x CH), 125,98 (C_q), 118,83 (CH), 115,72 (2x CH), 114,76 (2x CH), 71,21 (CH), 47,06 (CH₂).

(33) N-(2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)-2-cyano-3-phenylacrylamid



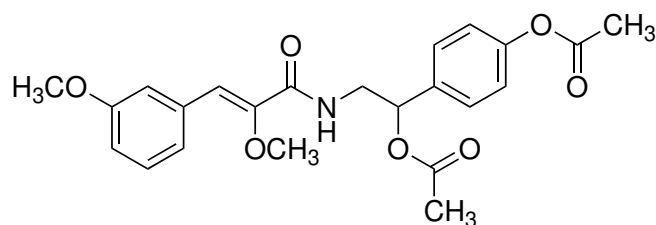
wurde aus **6** (0,331 g, 1,91 mmol) und Octopamin-Hydrochlorid (0,370 g, 1,95 mmol) hergestellt und aus Methanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,383 g, 1,24 mmol, 65 % d. Th.).

Smp.: 160–163 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,26 (s, 1H, ArOH), 8,30 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,6$ Hz, 1H, NH), 8,15 (s, 1H, =CH-), 7,93 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz 2H, ArH), 7,61–7,54 (m, 3H, ArH), 7,16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 6,73 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 5,37 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,3$ Hz, 1H, OH), 4,65 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4,4$ Hz, 1H, CH), 3,42–3,36 (m, 1H, CHH), 3,31–3,24 (m, 1H, CHH).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,90 (C_q), 156,46 (C_q), 150,35 (CH), 133,59 (C_q), 132,27 (CH), 131,92 (C_q), 129,91 (2x CH), 129,22 (2x CH), 127,05 (2x CH), 116,34 (C_q), 114,80 (2x CH), 106,45 (C_q), 70,50 CH, 47,80 (CH₂).

(34) 4-(1-Acetoxy-2-(2-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)acrylamido)ethyl)phenylacetat



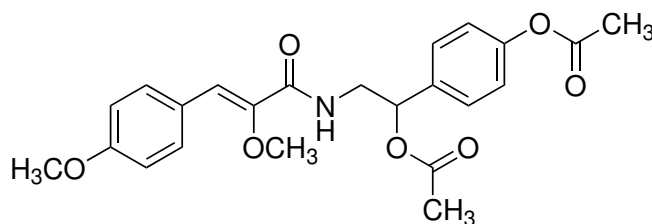
wurde aus **26** (0,104 g, 0,30 mmol), Essigsäureanhydrid (2,0 ml) und Pyridin (0,3 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,081 g, 0,19 mmol, 63 % d. Th.).

Smp.: 91–94 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,42 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,30 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,27–7,22 (m, 2H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,89 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,6 Hz, 1H, ArH), 6,62 (s, 1H, =CH-), 5,93 (dd, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz = 5,9 Hz, 1H, CH), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,60–3,55 (m, 2H, CH₂), 3,52 (s, 3H, OCH₃), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,07 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,70 (C_q), 169,07 (C_q), 163,28 (C_q), 159,21 (C_q), 150,16 (C_q), 149,61 (C_q), 135,72 (C_q), 134,66 (C_q), 129,54 (CH), 127,62 (2x CH), 121,83 (2x CH), 117,15 (CH), 114,42 (CH), 113,95 (CH), 72,93 (CH), 58,59 (CH₃), 54,95 (CH₃), 43,69 (CH₂), 20,83 (CH₃), 20,77 (CH₃).

(35) 4-(1-Acetoxy-2-(2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamido)ethyl)phenylacetat

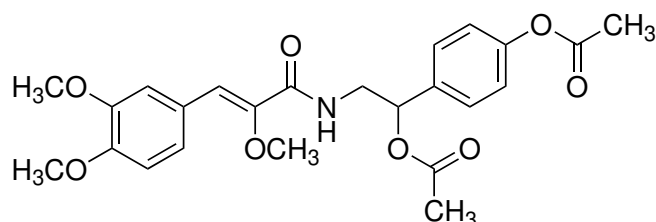


wurde aus **27** (0,164 g, 0,48 mmol), Essigsäureanhydrid (2,0 ml) und Pyridin (0,3 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,136 g, 0,32 mmol, 67 % d. Th.).

Smp.: 130–131 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,63 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 7,40 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,66 (s, 1H, =CH-), 5,93 (dd, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz, ³*J*_{HH} = 5,7 Hz, 1H, CH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,61–3,53 (m, 2H, CH₂), 3,49 (s, 3H, OCH₃), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,06 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,71 (C_q), 169,08 (C_q), 163,51 (C_q), 159,20 (C_q), 150,15 (C_q), 147,62 (C_q), 135,78 (C_q), 130,92 (2x CH), 127,61 (2x CH), 125,84 (C_q), 121,83 (2x CH), 117,67 (CH), 114,10 (2x CH), 72,99 (CH), 58,45 (CH₃), 55,11 (CH₃), 43,69 (CH₂), 20,84 (CH₃), 20,78 (CH₃).

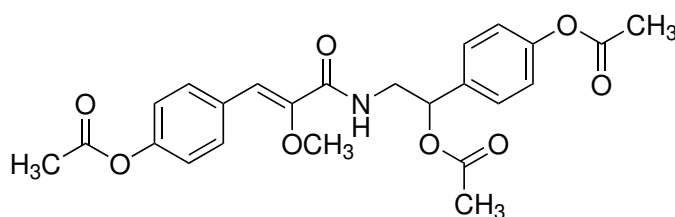
(36) 4-(1-Acetoxy-2-(2-methoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamido)ethyl)phenylacetat

wurde aus **28** (0,101 g, 0,27 mmol), Essigsäureanhydrid (1,0 ml) und Pyridin (0,15 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,051 g, 0,11 mmol, 42 % d. Th.).

Smp.: 114 – 117 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,34 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 7,24 (dd, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,98 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 1H, ArH), 6,68 (s, 1H, =CH-), 5,93 (dd, ³*J*_{HH} = 7,6 Hz, ³*J*_{HH} = 5,6 Hz, 1H, CH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,58 – 3,54 (m, 2H, CH₂), 3,51 (s, 3H, OCH₃), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,06 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,73 (C_q), 169,10 (C_q), 163,47 (C_q), 150,16 (C_q), 149,05 (C_q), 148,47 (C_q), 147,65 (C_q), 135,79 (C_q), 127,63 (2x CH), 126,02 (C_q), 122,86 (CH), 121,85 (2x CH), 118,17 (CH), 112,58 (CH), 111,70 (CH), 73,00 (CH), 58,57 (CH₃), 55,45 (CH₃), 55,34 (CH₃), 43,69 (CH₂), 20,85 (CH₃), 20,79 (CH₃).

(37) 4-(1-Acetoxy-2-(3-(4-acetoxyphenyl)-2-methoxyacrylamido)ethyl)phenylacetat

wurde aus **29** (0,048 g, 0,15 mmol), Essigsäureanhydrid (1,0 ml) und Pyridin (0,15 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,044 g, 0,10 mmol, 67 % d. Th.).

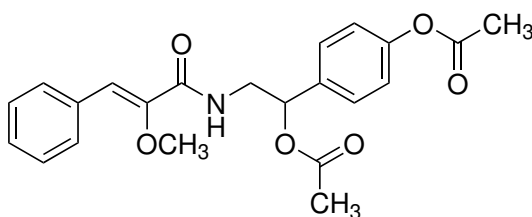
Smp.: 139 – 141 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,43 (t, ³*J*_{HH} = 5,9 Hz, 1H, NH), 7,71 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,15 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH),

6,64 (s, 1H, =CH-), 5,93 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7,3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5,9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3,57 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$ 2H, CH₂), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 2,27 (s, 3H, COCH₃), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,07 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,70 (C_q), 169,07 (C_q), 169,00 (C_q), 163,28 (C_q), 150,16 (C_q), 150,02 (C_q), 149,37 (C_q), 135,72 (C_q), 131,05 (C_q), 130,37 (2x CH), 127,61 (2x CH), 121,97 (2x CH), 121,83 (2x CH), 116,28 (CH), 72,92 (CH), 58,57 (CH₃), 43,69 (CH₂), 20,83 (CH₃), 20,81 (CH₃), 20,77 (CH₃).

(38) 4-(1-Acetoxy-2-(2-methoxy-3-(phenylacrylamido)ethyl)phenyl)acetat



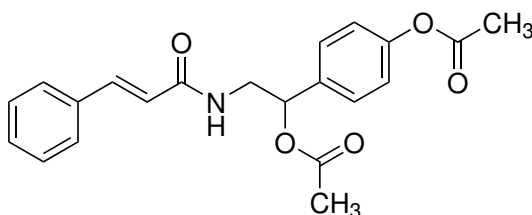
wurde aus **30** (0,220 g, 0,70 mmol), Essigsäureanhydrid (2,0 ml) und Pyridin (0,3 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,196 g, 0,49 mmol, 70 % d. Th.).

Smp.: 121 – 124 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,43 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,9 \text{ Hz}$, 1H, NH), 7,67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 7,46–7,36 (m, 4H, ArH), 7,35–7,27 (m, 1H, ArH), 7,14 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,64 (s, 1H, =CH-), 5,93 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7,4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5,8 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3,59–3,54 (m, 2H, CH₂), 3,52 (s, 3H, OCH₃), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,07 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,72 (C_q), 169,10 (C_q), 163,35 (C_q), 150,17 (C_q), 149,46 (C_q), 135,75 (C_q), 133,42 (C_q), 129,29 (2x CH), 128,59 (2x CH), 128,17 (CH), 127,63 (2x CH), 121,85 (2x CH), 117,22 (CH), 72,94 (CH), 58,56 (CH₃), 43,71 (CH₂), 20,85 (CH₃), 20,79 (CH₃).

(39) 4-(1-Acetoxy-2-(3-(phenylacrylamido)ethyl)phenyl)acetat



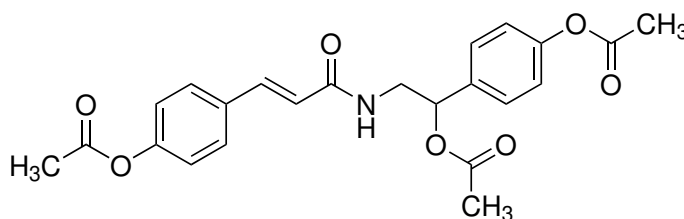
wurde aus **31** (0,70 g, 2,47 mmol), Essigsäureanhydrid (10,0 ml) und Pyridin (1,5 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,828 g, 2,41 mmol, 98 % d. Th.).

Smp.: 88 – 89 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,57–7,54 (m, 2H, ArH), 7,43 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,43–7,35 (m, 5H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,65 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,8 Hz, 1H, -CH=CH-), 5,81 (dd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ³*J*_{HH} = 4,5 Hz, 1H, CH), 3,62 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,9 Hz, ³*J*_{HH} = 6,1 Hz, ³*J*_{HH} = 4,6 Hz, 1H, CHH), 3,51 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,8 Hz, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ³*J*_{HH} = 5,4 Hz, 1H, CHH), 2,26 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,70 (C_q), 169,09 (C_q), 165,20 (C_q), 150,15 (C_q), 138,98 (CH), 135,87 (C_q), 134,77 (C_q), 129,45 (CH), 128,87 (2x CH), 127,52 (2x CH), 127,50 (2x CH), 121,82 (2x CH), 121,78 (CH), 73,30 (CH), 43,63 (CH₂), 20,88 (CH₃), 20,77 (CH₃).

(40) 4-(1-Acetoxy-2-(3-(4-acetoxyphenyl)-acrylamido)ethyl)phenylacetat



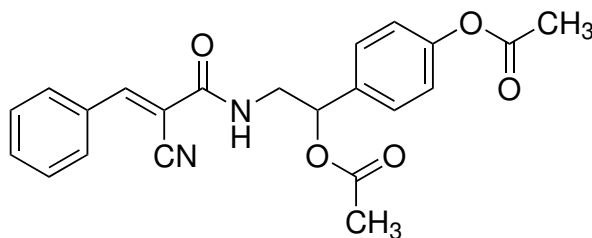
wurde aus **32** (0,184 g, 0,61 mmol), Essigsäureanhydrid (2,0 ml) und Pyridin (0,3 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,117 g, 0,28 mmol, 46 % d. Th.).

Smp.: 100 – 103 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (t, ³*J*_{HH} = 5,8 Hz, 1H, NH), 7,60 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,24 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,8 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,61 (d, ³*J*_{HHtrans} = 15,8 Hz, 1H, -CH=CH-), 5,81 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ³*J*_{HH} = 4,6 Hz, 1H, CH), 3,62 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,9 Hz, ³*J*_{HH} = 6,1 Hz, ³*J*_{HH} = 4,7 Hz, 1H, CHH), 3,51 (ddd, ²*J*_{HH} = 13,8 Hz, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ³*J*_{HH} = 5,5 Hz, 1H, CHH), 2,28 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,72 (C_q), 169,11 (C_q), 169,00 (C_q), 165,17 (C_q), 151,25 (C_q), 150,17 (C_q), 138,07 (CH), 135,88 (C_q), 132,45 (C_q), 129,62 (CH), 128,66 (2x CH), 127,54 (2x CH), 122,32 (2x CH), 121,84 (2x CH), 73,31 (CH), 43,66 (CH₂), 20,89 (CH₃), 20,81 (CH₃), 20,79 (CH₃).

(41) 4-(1-Acetoxy-2-(2-cyano-3-(phenylacrylamido)ethyl)phenyl)acetat

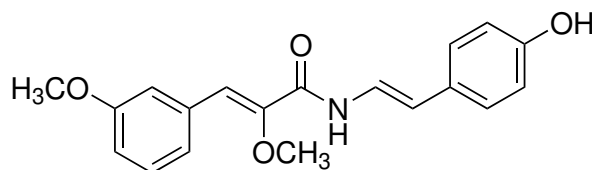


wurde aus **33** (0,213 g, 0,69 mmol), Essigsäureanhydrid (2,0 ml) und Pyridin (0,3 ml) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,196 g, 0,49 mmol, 71 % d. Th.).

Smp.: 118–120 °C

Das DC-reine Produkt wurde im nächsten Schritt vollständig umgesetzt und auf die Aufnahme von NMR-Spektren verzichtet.

(42) *N*-(4-Hydroxystyryl)-2-methoxy-3-(3-methoxyphenyl)acrylamid



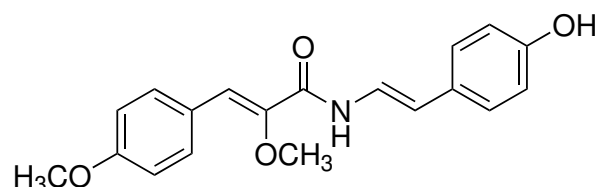
wurde aus **34** (0,396 g, 0,93 mmol) und Kaliumcarbonat (0,126 g, 0,91 mmol) hergestellt und säulenchromatographisch (Laufmittel: Dichlormethan (5 Vol-% MeOH)) aufgereinigt (gelber Feststoff, 0,048 g, 0,15 mmol, 16 % d. Th.).

Smp.: 140–145 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,27 (d, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, NH), 9,36 (s, 1H, ArOH), 7,37–7,29 (m, 3H, ArH), 7,30 (dd, ³*J*_{HHtrans} = 14,7, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,18 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,92 (ddd, ³*J*_{HH} = 7,8 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,6 Hz, 1H, ArH), 6,79 (s, 1H, =CH-), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 1H, ArH), 6,46 (d, ³*J*_{HHtrans} = 14,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,66 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,71 (C_q), 159,24 (C_q), 156,23 (C_q), 149,11 (C_q), 134,60 (C_q), 129,62 (CH), 127,24 (C_q), 126,50 (2x CH), 121,97 (CH), 120,78 (CH), 118,40 (CH), 115,58 (2x CH), 114,57 (CH), 114,22 (CH), 114,08 (CH), 59,07 (CH₃), 54,98 (CH₃).

LC/MS t_R = 10,37 min (90,1 % AUC); **MS** *m/z* 325,9 [M + H]⁺.

(43) *N*-(4-Hydroxystyryl)-2-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)acrylamid

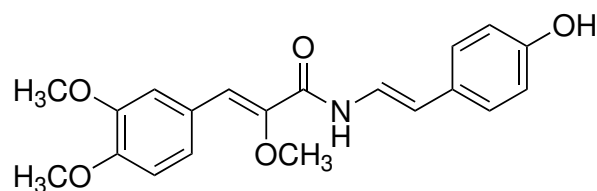
wurde aus **35** (0,119 g, 0,28 mmol) und Kaliumcarbonat (0,020 g, 0,14 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,047 g, 0,14 mmol, 52 % d. Th.).

Smp.: 207 – 210 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,18 (d, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, NH), 9,35 (s, 1H, ArOH), 7,69 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,30 (dd, ³*J*_{HHtrans} = 14,7, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,99 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,82 (s, 1H, =CH-), 6,71 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,45 (d, ³*J*_{HHtrans} = 14,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,63 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,96 (C_q), 159,39 (C_q), 156,16 (C_q), 147,11 (C_q), 131,13 (2x CH), 127,34 (C_q), 126,43 (2x CH), 125,80 (C_q), 120,92 (CH), 118,91 (CH), 115,57 (2x CH), 114,17 (2x CH), 113,72 (CH), 58,91 (CH₃), 55,14 (CH₃).

LC/MS t_R = 10,31 min (80,5 % AUC); **MS** *m/z* 326,0 [M + H]⁺; t_R = 10,85 min (13,7 % AUC); **MS** *m/z* 367,8 [M + Ac + H]⁺

(44) *N*-(4-Hydroxystyryl)-2-methoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylamid

wurde aus **36** (0,266 g, 0,58 mmol) und Kaliumcarbonat (0,116 g, 0,84 mmol) hergestellt und säulenchromatographisch (Laufmittel: Petrolether/Essigsäureethylestern 1:1) aufgereinigt (gelber Feststoff, 0,010 g, 0,03 mmol, 5 % d. Th.).

Smp.: 194 – 197 °C

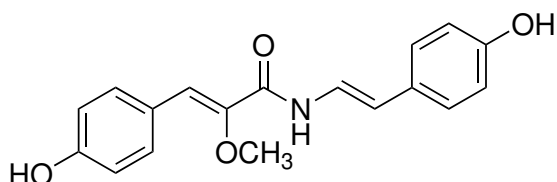
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,17 (d, ³*J*_{HH} = 10,1 Hz, 1H, NH), 9,35 (s, 1H, ArOH), 7,40

(d, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 7,31 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 7,31 (dd, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,8$, $^3J_{\text{HH}} = 10,1$ Hz, 1H, -CH=CH-), 7,17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,01 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 6,83 (s, 1H, =CH-), 6,71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 1H, ArH), 6,45 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,6$ Hz, 1H, -CH=CH-), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,65 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,93 (C_q), 156,15 (C_q), 149,25 (C_q), 148,50 (C_q), 147,15 (C_q), 127,34 (C_q), 126,43 (2x CH), 125,97 (C_q), 123,07 (CH), 120,93 (CH), 119,34 (CH), 115,57 (2x CH), 113,72 (CH), 112,74 (CH), 111,75 (CH), 59,01 (CH₃), 55,47 (CH₃), 55,36 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 9,80 min (92,8 % AUC); MS *m/z* 355,9 [M + H]⁺.

(45) N-(4-Hydroxystyryl)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



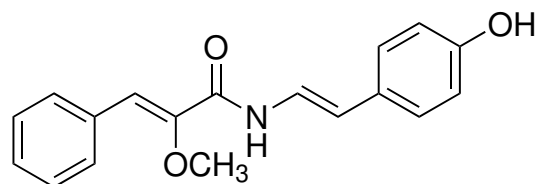
wurde aus **37** (0,289 g, 0,63 mmol) und Kaliumcarbonat (0,086 g, 0,62 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,083 g, 0,27 mmol, 42 % d. Th.).

Smp.: 234 – 237 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,13 (d, $^3J_{\text{HH}} = 10,1$ Hz, 1H, NH), 9,78 (s, 1H, ArOH), 9,34 (s, 1H, ArOH), 7,58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,30 (dd, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7$, $^3J_{\text{HH}} = 10,1$ Hz, 1H, -CH=CH-), 7,17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 6,81 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 6,79 (s, 1H, =CH-), 6,71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 6,45 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7$ Hz, 1H, -CH=CH-), 3,62 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,09 (C_q), 157,96 (C_q), 156,12 (C_q), 146,36 (C_q), 131,32 (2x CH), 127,40 (C_q), 126,40 (2x CH), 124,19 (C_q), 120,99 (CH), 119,54 (CH), 115,57 (4x CH), 113,55 (CH), 58,86 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 9,25 min (94,0 % AUC); MS *m/z* 312,0 [M + H]⁺.

(46) N-(4-Hydroxystyryl)-2-methoxy-3-phenylacrylamid

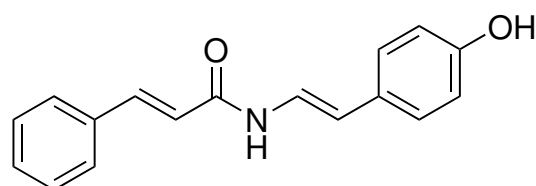
wurde aus **38** (0,156 g, 0,39 mmol) und Kaliumcarbonat (0,027 g, 0,20 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,027 g, 0,09 mmol, 23 % d. Th.).

Smp.: 165 – 168 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,27 (d, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, NH), 9,36 (s, 1H, ArOH), 7,73 (dd, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,5 Hz, 2H, ArH), 7,45 – 7,39 (m, 2H, ArH), 7,37 – 7,30 (m, 1H, ArH), 7,31 (dd, ³*J*_{HH,trans} = 14,7, ³*J*_{HH} = 10,0 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,18 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,81 (s, 1H, =CH-), 6,72 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,47 (d, ³*J*_{HH,trans} = 14,7 Hz, 1H, -CH=CH-), 3,66 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,76 (C_q), 156,22 (C_q), 148,95 (C_q), 133,35 (C_q), 129,44 (2x CH), 128,64 (2x CH), 128,40 (C_q), 127,25 (C_q), 126,49 (2x CH), 120,79 (CH), 118,44 (CH), 115,58 (2x CH), 114,05 (CH), 59,03 (CH₃).

LC/MS t_R = 10,32 min (86,9 % AUC); **MS** *m/z* 295,9 [M + H]⁺.

(47) N-(4-Hydroxystyryl)-3-phenylacrylamid

wurde aus **39** (0,250 g, 0,73 mmol) und Kaliumcarbonat (0,072 g, 0,52 mmol) hergestellt, säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: Essigsäureethylester) und anschließend nochmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,075 g, 0,28 mmol, 38 % d. Th.).

Smp.: 244 – 247 °C

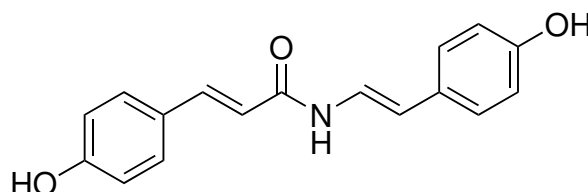
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,29 (d, ³*J*_{HH} = 10,2 Hz, 1H, NH), 9,35 (s, 1H, ArOH), 7,62 – 7,59 (m, 2H, ArH), 7,56 (d, ³*J*_{HH,trans} = 15,8 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,46 – 7,38 (m, 3H, ArH), 7,35 (dd,

$^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10,2 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-), 7,20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,69 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 15,8 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-), 6,18 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162,23 (C_q), 156,15 (C_q), 140,06 (CH), 134,69 (C_q), 129,72 (CH), 128,95 (2x CH), 127,65 (2x CH), 127,24 (C_q), 126,45 (2x CH), 121,08 (CH), 115,54 (2x CH), 112,55 (CH).

LC/MS $t_{\text{R}} = 9,90 \text{ min}$ (91,0 % AUC); **MS** m/z 266,0 [M + H]⁺.

(48) N-(4-Hydroxystyryl)-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid



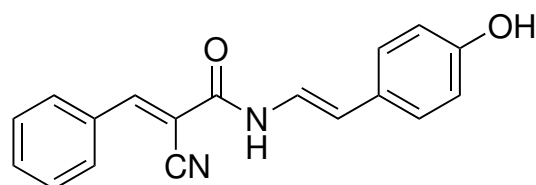
wurde aus **40** (0,107 g, 0,25 mmol) und Kaliumcarbonat (0,078 g, 0,56 mmol) hergestellt, säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 9:1) und anschließend nochmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,009 g, 0,03 mmol, 12 % d. Th.).

Smp.: 233 – 235 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 10,3 \text{ Hz}$, 1H, NH), 9,88 (s, 1H, ArOH), 9,32 (s, 1H, ArOH), 7,45 (t, 3H, ArH u. -CH=CH-), 7,33 (dd, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10,2 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-), 7,17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,81 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,70 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,46 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 15,7 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-), 6,13 (d, $^3J_{\text{HH}_{\text{trans}}} = 14,7 \text{ Hz}$, 1H, -CH=CH-).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162,70 (C_q), 159,17 (C_q), 156,03 (C_q), 140,28 (CH), 129,46 (2x CH), 127,39 (C_q), 126,34 (2x CH), 125,71 (C_q), 121,27 (CH), 117,39 (CH), 115,80 (2x CH), 115,53 (2x CH), 111,93 (CH).

LC/MS $t_{\text{R}} = 9,33 \text{ min}$ (93,0 % AUC); **MS** m/z 282,0 [M + H]⁺.

(49) N-(4-Hydroxystyryl)-2-cyano-3-phenylacrylamid

wurde aus **41** (0,220 g, 0,56 mmol) und Kaliumcarbonat (0,082 g, 0,59 mmol) hergestellt, säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 9:1) und das Produkt anschließend nochmals chromatographiert (Laufmittel: Dichlormethan (5 Vol-% MeOH)) (orangener Feststoff, 0,070 g, 0,24 mmol, 43 % d. Th.).

Smp.: 238–241 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,51 (d, ³*J*_{HH} = 9,5 Hz, 1H, NH), 9,40 (s, 1H, ArOH), 8,26 (s, 1H, -CH=), 8,00–7,97 (m, 2H, ArH), 7,62–7,57 (m, 3H, ArH), 7,29 (dd, ³*J*_{HH,trans} = 14,7 Hz, ³*J*_{HH} = 9,5 Hz, 1H, -CH=CH-), 7,22 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,73 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,45 (d, ³*J*_{HH,trans} = 14,7 Hz, 1H, -CH=CH-).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,93 (C_q), 156,49 (C_q), 150,95 (CH), 132,49 (CH), 131,86 (C_q), 130,08 (2x CH), 129,24 (2x CH), 126,81 (C_q), 126,74 (2x CH), 120,63 (CH), 115,98 (C_q), 115,59 (2x CH), 115,04 (CH), 106,08 (C_q).

LC/MS *t*_R = 10,18 min (93,0 % AUC); **MS** *m/z* 290,9 [M + H]⁺.

Synthese der Monocarbonylanaloga von Curcumin (MACs)

Allgemeine Synthesevorschrift

- **Schützung der eingesetzten Aldehyde mit OH-Funktionalitäten**

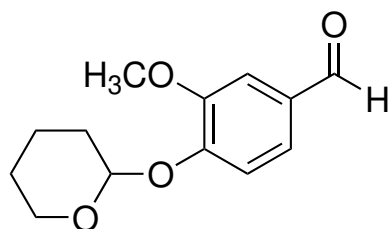
Für die Synthese der MACs, die über eine Alkoholgruppe verfügen, mussten zunächst die korrespondierenden Benzaldehyde mit einer Schutzgruppe versehen werden. Hierzu wurden die OH-Funktionen mit Dihydropyran zur entsprechenden 2-Tetrahydropyranylgruppe umgesetzt. Zu einer Lösung des entsprechenden Benzaldehyds (1 Äq.) in Dichlormethan wurde 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (1.5 Äq.) und eine katalytische Menge Pyridin-*p*-toluolsulfonat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bis zur Vollständigkeit der Reaktion bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung des Lösungsmittels wurde dieses entfernt und der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

- **Aldolkondensation zum 2,6-Bis-Benzylidenderivat**

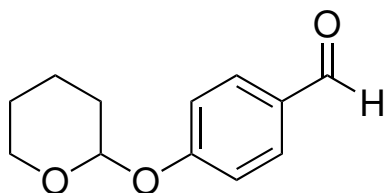
Zu einer Lösung des entsprechend substituierten Derivats des Benzaldehyds (2 Äq.) in Methanol (10 ml) wurde Cyclohexanon (1 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten gerührt und anschließend wurde NaOH (20 %ige Lösung, 2 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Lösung verfärbte sich mit der Zeit gelblich und es konnte eine einsetzende Trübung beobachtet werden. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt und der dabei entstandene Niederschlag zur Neutralisation in eine gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen. Danach wurde die Suspension für eine Stunde stehen gelassen. Der Feststoff wurde anschließend abgesaugt, mit kaltem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte durch Umkristallisation aus Ethanol oder mittels Säulenchromatographie.

- **Entschützung der MACs mit Alkoholfunktionen**

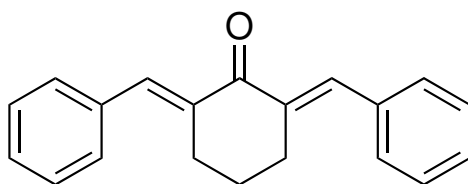
Zur Entfernung der Tetrahydropyranylgruppe wurden die Substanzen in Methanol (20 ml) suspendiert, eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und der Reaktionsansatz anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde mit einer Pasteurpipette wenig 1M HCl zugegeben, wobei sich nach einigen Minuten die Suspension auflöste. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit demineralisiertem Wasser versetzt und mit NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die wässrige Lösung wurde mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über NaSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das erhaltene Rohprodukt aus Ethanol/Wasser (9:1) umkristallisiert.

(50) 3-Methoxy-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldehyd

wurde aus Vanillin (2,202 g, 14,5 mmol), 3,4-Dihydro-2H-pyran (2,0 ml, 1,844 g, 22,0 mmol) und Pyridin-*p*-toluolsulfonat (0,041 g, 0,16 mmol) hergestellt und mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: Essigsäureethylester/Petrolether (1:1)) aufgereinigt. Es wurde auf die Aufnahme von NMR-Spektren verzichtet und das Produkt im nächsten Schritt direkt weiter umgesetzt.

(51) 4-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldehyd

wurde aus 4-Hydroxybenzaldehyd (1,750 g, 14,3 mmol), 3,4-Dihydro-2H-pyran (2,0 ml, 1,844 g, 22,0 mmol) und Pyridin-*p*-toluolsulfonat (0,045 g, 0,18 mmol) hergestellt und mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: Essigsäureethylester/Petrolether (1:1)) aufgereinigt. Es wurde auf die Aufnahme von NMR-Spektren verzichtet und das Produkt im nächsten Schritt direkt weiter umgesetzt.

(52) (2E,6E)-2,6-Bis-Benzylidencyclohexanon

wurde aus Benzaldehyd (0,39 ml, 0,410 g, 3,86 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,286 g, 1,04 mmol, 60 % d. Th.).

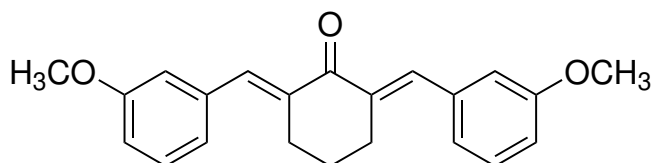
Smp.: 116–117 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,63 (s, 2H, 2x =CH), 7,55–7,52 (m, 4H, ArH), 7,48–7,43 (m, 4H, ArH), 7,41–7,37 (m, 2H, ArH), 2,90 (t, ³*J*_{HH} = 6,7 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,75–1,69 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,95 (C_q), 136,29 (2x C_q), 135,64 (2x CH), 135,29 (2x C_q), 130,23 (4x CH), 128,74 (2x CH), 128,49 (4x CH), 27,77 (2x CH_2), 22,35 (CH_2).

LC/MS t_R = 12,02 min (24,7 % AUC); MS m/z 274,9 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; t_R = 12,26 min (74,2 % AUC); MS m/z 274,9 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

(53) (2E,6E)-2,6-Bis(3-Methoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 3-Methoxybenzaldehyd (0,43 ml, 0,480 g, 3,53 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,227 g, 0,68 mmol, 39 % d. Th.).

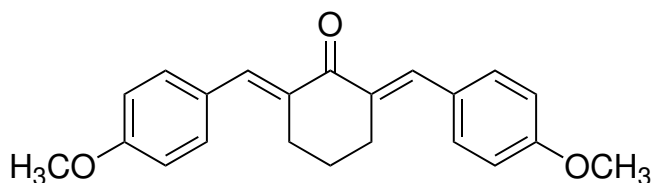
Smp.: 88–89 °C

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7,60 (s, 2H, 2x =CH), 7,37 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, 2H, ArH), 7,11 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, 2H, ArH), 7,07 (s, 2H, ArH), 6,97 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz 2H, ArH), 3,79 (2, 6H, 2x OCH_3), 2,89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz, 4H, 2x CH_2), 1,71 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C -APT NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 188,97 (C_q), 159,18 (2x C_q), 136,64 (2x C_q), 136,54 (2x C_q), 135,65 (2x CH), 129,55 (2x CH), 122,51 (2x CH), 115,52 (2x CH), 114,61 (2x CH), 55,12 (2x CH_3), 27,82 (2x CH_2), 22,34 (CH_2).

LC/MS t_R = 12,38 min (95,4 % AUC); MS m/z 334,7 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

(54) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Methoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Methoxybenzaldehyd (0,42 ml, 0,470 g, 3,45 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,132 g, 0,39 mmol, 22 % d.

Th.).

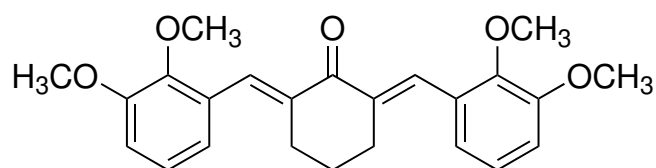
Smp.: 157–158 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,58 (s, 2H, 2x =CH), 7,52 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 4H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 4H, ArH), 3,81 (2, 6H, 2x OCH₃), 2,88 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,72 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,59 (C_q), 159,71 (2x C_q), 135,39 (2x CH), 134,20 (2x C_q), 132,20 (4x CH), 127,85 (2x C_q), 114,10 (4x CH), 55,24 (2x CH₃), 27,87 (2x CH₂), 22,45 (CH₂).

LC/MS t_R = 11,97 min (21,4 % AUC); **MS** *m/z* 334,7 [M + H]⁺, t_R = 12,18 min (77,6 % AUC); **MS** *m/z* 334,7 [M + H]⁺.

(55) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis(2,3-Dimethoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 2,3-Dimethoxybenzaldehyd (0,583 g, 3,51 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,30 g, 0,76 mmol, 44 % d. Th.).

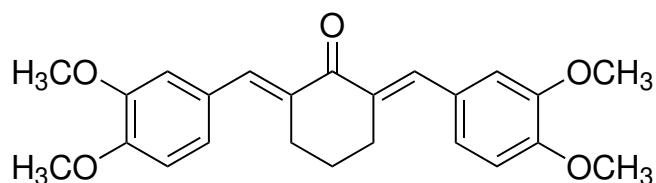
Smp.: 127–129 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,76 (s, 2H, 2x =CH), 7,22–7,07 (m, 4H, ArH), 7,00 (dd, ³*J*_{HH} = 6,8 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, 2H, ArH), 3,83 (s, 6H, 2x OCH₃), 3,73 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,78 (td, ³*J*_{HH} = 6,4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,1 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,67 (qi, ³*J*_{HH} = 6,5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,82 (C_q), 152,45 (2x C_q), 147,78 (2x C_q), 136,98 (2x C_q), 131,16 (2x CH), 129,27 (2x C_q), 123,68 (2x CH), 121,60 (2x CH), 113,75 (2x CH), 60,47 (2x CH₃), 55,75 (2x CH₃), 27,89 (2x CH₂), 22,65 (CH₂).

LC/MS t_R = 11,47 min (37,0 % AUC); **MS** *m/z* 395,0 [M + H]⁺; t_R = 11,67 min (62,0 % AUC); **MS** *m/z* 395,1 [M + H]⁺. Die unterschiedlichen Retentionszeiten können auf eine E/Z-Isomerie hinweisen. Diese ist im NMR nicht ersichtlich, da die Methingruppe (=CH) keine Kopplung zu benachbarten Protonen aufweist und ein Singulett ergibt.

(56) (2E,6E)-2,6-Bis(3,4-Dimethoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (0,568 g, 3,42 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,137 g, 0,35 mmol, 20 % d. Th.).

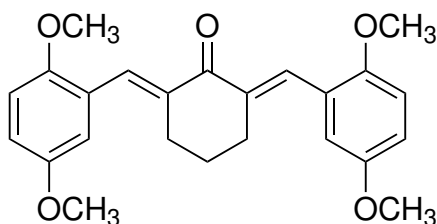
Smp.: 144 – 145 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,59 (s, 2H, 2x =CH), 7,14 (td, ⁴*J*_{HH} = 4,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,8 Hz, 4H, ArH), 7,03 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 3,81 (s, 6H, 2x OCH₃), 3,80 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,91 (m, 4H, 2x CH₂), 1,74 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,54 (C_q), 149,53 (2x C_q), 148,47 (2x C_q), 135,77 (2x CH), 134,30 (2x C_q), 128,14 (2x C_q), 123,73 (2x CH), 114,09 (2x CH), 111,59 (2x CH), 55,52 (4x CH₃), 27,84 (2x CH₂), 22,47 (CH₂).

LC/MS t_R = 11,40 min (98,0 % AUC); **MS** *m/z* 395,0 [M + H]⁺.

(57) (2E,6E)-2,6-Bis(2,5-Dimethoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 2,5-Dimethoxybenzaldehyd (0,579 g, 3,48 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,081 g, 0,21 mmol, 12 % d. Th.).

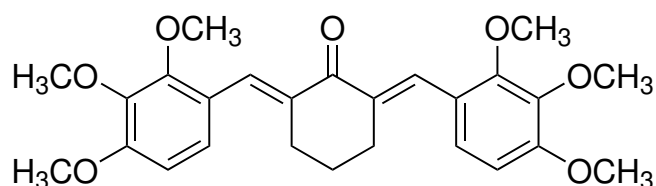
Smp.: 137 – 138 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,73 (s, 2H, 2x =CH), 7,00 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, 2H, ArH), 6,96 (dd, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 3,0 Hz, 2H, ArH), 6,92 (d, ⁴*J*_{HH} = 3,0 Hz, 2H, ArH), 3,78 (s, 6H, 2x OCH₃), 3,74 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,80 (t, ³*J*_{HH} = 7,0 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,67 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,94 (C_q), 152,48 (2x C_q), 152,18 (2x C_q), 136,44 (2x C_q), 131,12 (2x CH), 124,57 (2x C_q), 115,57 (2x CH), 115,11 (2x CH), 112,07 (2x CH), 55,85 (2x CH_3), 55,46 (2x CH_3), 27,86 (2x CH_2), 22,72 (CH_2).

LC/MS t_R = 12,01 min (95,4 % AUC); MS m/z 395,1 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

(58) (2E,6E)-2,6-Bis(2,3,4-Trimethoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 2,3,4-Trimethoxybenzaldehyd (0,727 g, 3,71 mmol) und Cyclohexanon (0,19 ml, 0,181 g, 1,84 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,370 g, 0,81 mmol, 44 % d. Th.).

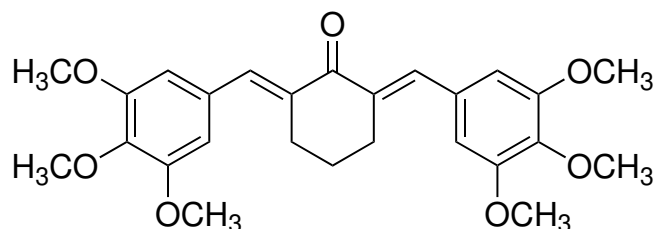
Smp.: 170–171 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,73 (s, 2H, 2x =CH), 7,18 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 6,88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 3,85 (s, 6H, 2x OCH_3), 3,80 (s, 6H, 2x OCH_3), 3,77 (s, 6H, 2x OCH_3), 2,81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$ Hz, 4H, 2x CH_2), 1,69 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,5$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,55 (C_q), 154,30 (2x C_q), 152,79 (2x C_q), 141,73 (2x C_q), 135,25 (2x C_q), 130,66 (2x CH), 124,99 (2x CH), 121,85 (2x C_q), 107,59 (2x CH), 61,19 (2x CH_3), 60,42 (2x CH_3), 55,92 (2x CH_3), 28,03 (2x CH_2), 22,83 (CH_2).

LC/MS t_R = 11,67 min (96,9 % AUC); MS m/z 454,9 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

(59) (2E,6E)-2,6-Bis(3,4,5-Trimethoxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (0,684 g, 3,45 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,420 g, 0,92 mmol, 53 % d. Th.).

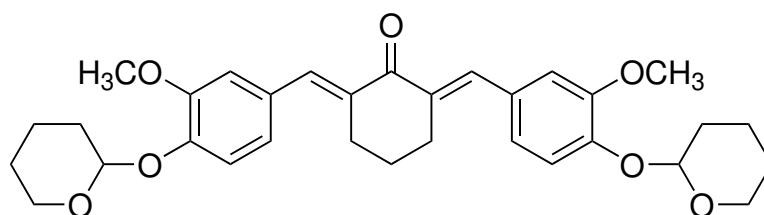
Smp.: 196–203 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,58 (s, 2H, 2x =CH), 7,26 (s, 2H, ArH), 6,85 (s, 2H, ArH), 3,82 (s, 12H, 4x OCH₃), 3,71 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,97–2,93 (m, 4H, 2x CH₂), 1,84 (qi, ³J_{HH} = 6,5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,82 (C_q), 152,68 (2x C_q), 152,05 (2x C_q), 138,29 (2x C_q), 135,95 (2x CH), 135,59 (2x C_q), 130,82 (2x C_q), 108,08 (2x CH), 106,76 (2x CH), 56,06 (2x CH₃), 55,99 (2x CH₃), 27,71 (2x CH₂), 22,60 (CH₂).

LC/MS t_R = 11,46 min (96,3 % AUC); **MS** m/z 454,9 [M + H]⁺.

(60) (2E,6E)-2,6-Bis(3-methoxy-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-cyclohexanon

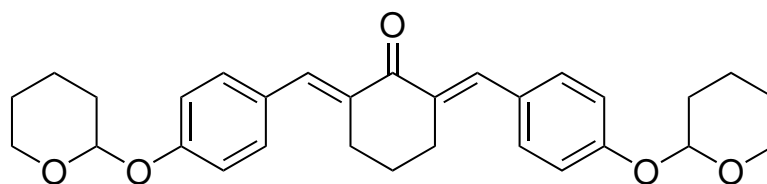


wurde aus **50** (3,43 g, 14,5 mmol) und Cyclohexanon (0,75 ml, 0,713 g, 7,26 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser (9:1) umkristallisiert (gelber Feststoff, 1,267 g, 2,37 mmol, 33 % d. Th.).

Smp.: 136–138 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,59 (s, 2H, 2x =CH), 7,17 (d, ⁴J_{HH} = 1,9 Hz, 2H, ArH), 7,15 (d, ³J_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,10 (dd, ³J_{HH} = 8,6 Hz, ⁴J_{HH} = 1,8 Hz, 2H, ArH), 5,48 (t, ³J_{HH} = 3,3 Hz, 2H, 2x CH), 3,83 (s, 6H, 2x OCH₃), 3,82–3,78 (m, 2H, 2x CH(THP)), 3,55 (dt, ³J_{HH} = 8,7 Hz, ⁴J_{HH} = 4,1 Hz, 2H, 2x CH(THP)), 2,91 (t, ³J_{HH} = 5,3 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,94–1,70 (m, 8H, CH₂(THP)), 1,66–1,50 (m, 6H, CH₂(THP)).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,64 (C_q), 149,43 (2x C_q), 146,38 (2x C_q), 135,67 (2x CH), 134,75 (2x C_q), 129,50 (2x C_q), 123,40 (2x CH), 116,69 (2x CH), 114,88 (2x CH), 96,45 (2x CH), 61,48 (2x CH₂), 55,77 (2x CH₃), 29,76 (2x CH₂), 27,81 (2x CH₂), 24,63 (2x CH), 22,44 (CH₂), 18,45 (2x CH₂).

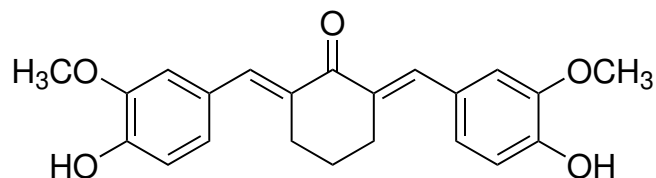
(61) (2E,6E)-2,6-Bis(4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzyliden)-cyclohexanon

wurde aus **51** (3,00 g, 14,5 mmol) und Cyclohexanon (0,75 ml, 0,713 g, 7,26 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser (9:1) umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,899 g, 1,89 mmol, 26 % d. Th.).

Smp.: 158–160 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,58 (s, 2H, 2x =CH), 7,50 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 4H, ArH), 7,09 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 4H, ArH), 5,54 (t, ³*J*_{HH} = 3,2 Hz, 2H, 2x CH), 3,76 (ddd, ²*J*_{HH} = 12,4 Hz, ³*J*_{HH} = 9,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 3,5 Hz, 2H, 2x CH(THP)), 3,60–3,54 (m, 2H, 2x CH(THP)), 2,88 (t, ³*J*_{HH} = 5,3 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,93–1,69 (m, 8H, CH₂(THP)), 1,67–1,51 (m, 6H, CH₂(THP)).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,65 (C_q), 156,93 (2x C_q), 135,29 (2x CH), 134,51 (2x C_q), 131,99 (2x CH), 128,71 (2x C_q), 116,33 (2x CH), 95,63 (2x CH), 61,59 (2x CH₂), 29,68 (2x CH₂), 27,83 (2x CH₂), 24,58 (2x CH₂), 22,41 (CH₂), 18,49 (2x CH₂).

(62) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Hydroxy-3-methoxybenzyliden)-cyclohexanon

wurde aus **60** (0,530 g, 0,99 mmol) und einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure hergestellt und aus Ethanol/Wasser (9:1) umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,223 g, 0,61 mmol, 62 % d. Th.).

Smp.: 176–178 °C

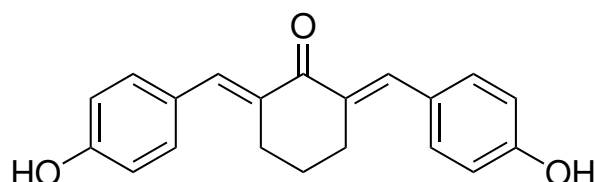
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,49 (bs, 2H, 2x ArOH), 7,56 (s, 2H, 2x =CH), 7,11 (d, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 2H, ArH), 7,03 (dd, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,8 Hz, 2H, ArH), 6,85 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, ArH), 3,81 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,89 (t, ³*J*_{HH} = 5,3 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,73 (qi, ³*J*_{HH} = 5,5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,45 (C_q), 147,82 (2x C_q), 147,41 (2x C_q), 136,06 (2x CH), 133,47 (2x C_q), 126,88 (2x C_q), 124,18 (2x CH), 115,52 (2x CH), 114,81 (2x CH), 55,64 (2x CH₃),

27,90 (2x CH₂), 22,53 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,57 min (98,8 % AUC); MS m/z 366,8 [M + H]⁺.

(63) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Hydroxybenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus **61** (0,530 g, 1,12 mmol) und einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure hergestellt und aus Ethanol/Wasser (9:1) umkristallisiert (grünlicher Feststoff, 0,279 g, 0,91 mmol, 81 % d. Th.).

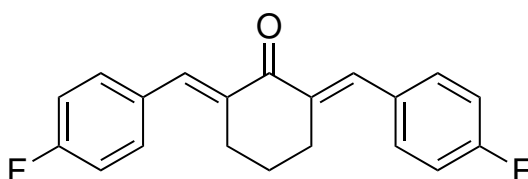
Smp.: 280–285 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,97 (bs, 2H, 2x ArOH), 7,54 (s, 2H, 2x =CH), 7,40 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 4H, ArH), 6,85 (d, ³J_{HH} = 8,7 Hz, 4H, ArH), 2,85 (t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,71 (qi, ³J_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,49 (C_q), 158,34 (2x C_q), 135,73 (2x CH), 133,27 (2x C_q), 132,35 (4x CH), 126,37 (2x C_q), 115,51 (4x CH), 27,91 (2x CH₂), 22,50 (CH₂).

LC/MS t_R = 10,53 min (98,6 % AUC); MS m/z 307,1 [M + H]⁺.

(64) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Fluorbenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Fluorbenzaldehyd (0,37 ml, 0,428 g, 3,45 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,363 g, 1,17 mmol, 67 % d. Th.).

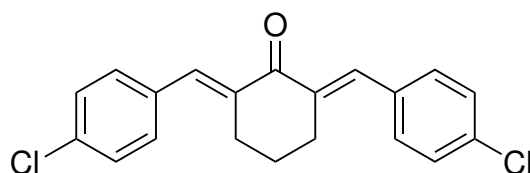
Smp.: 154–155 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,63–7,58 (m, 6H, 2x =CH u. 4x ArH), 7,28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,9$ Hz, 4H, ArH), 2,87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,1$ Hz, 4H, 2x CH₂), 1,72 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,5$ Hz, 2H, CH₂).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,79 (C_q), 163,01–161,04 (d, $^1J_{\text{CF}} = 248,2$ Hz, 2x C_q), 136,02 (C_q), 134,55 (2x CH), 132,59–132,53 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7,6$ Hz, 4x CH), 131,80 (C_q), 115,59–115,42 (d, $^2J_{\text{CF}} = 21,4$ Hz, 4x CH), 27,63 (2x CH₂), 22,26 (CH₂).

LC/MS $t_{\text{R}} = 12,42$ min (97,6 % AUC); MS m/z 310,8 [M + H]⁺.

(65) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Chlorbenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Chlorbenzaldehyd (0,491 g, 3,49 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,444 g, 1,29 mmol, 74 % d. Th.).

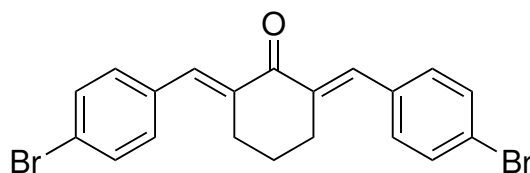
Smp.: 144 – 145 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,59 (s, 2H, 2x =CH), 7,56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 4H, ArH), 7,51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 4H, ArH), 2,89–2,85 (m, 4H, 2x CH₂), 1,72 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 2H, CH₂).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,73 (C_q), 136,84 (2x C_q), 134,40 (2x CH), 134,12 (2x C_q), 133,41 (2x C_q), 132,00 (4x CH), 128,55 (4x CH), 27,66 (2x CH₂), 22,16 (CH₂).

LC/MS $t_{\text{R}} = 13,17$ min (96,3 % AUC); MS m/z 342,7 [M + H]⁺.

(66) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Brombenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Brombenzaldehyd (0,648 g, 3,50 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,671 g, 1,55 mmol, 89 % d. Th.).

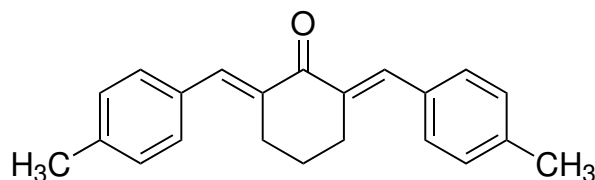
Smp.: 162–163 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,64 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 4H, ArH), 7,56 (s, 2H, 2x =CH), 7,49 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 4H, ArH), 2,87 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,72 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,75 (C_q), 136,92 (2x C_q), 134,48 (2x CH), 134,46 (2x C_q), 132,22 (4x CH), 131,48 (4x CH), 122,19 (2x C_q), 27,67 (2x CH₂), 22,15 (CH₂).

LC/MS t_R = 13,38 min (95,2 % AUC); **MS** *m/z* 432,8 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 434,9 [M + H]⁺ (⁸¹Br).

(67) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis(4-Methylbenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Methylbenzaldehyd (0,41 ml, 0,418 g, 3,48 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,236 g, 0,78 mmol, 45 % d. Th.).

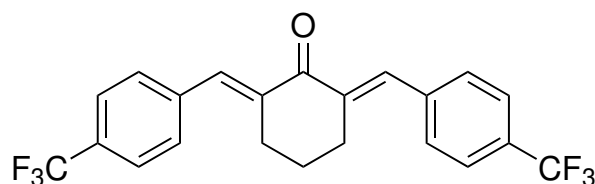
Smp.: 163–166 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,59 (s, 2H, 2x =CH), 7,44 (d, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 4H, ArH), 7,27 (d, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 4H, ArH) 2,88 (t, ³*J*_{HH} = 6,2 Hz, 4H, 2x CH₂), 2,34 (2, 6H, 2x CH₃), 1,72 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,85 (C_q), 138,58 (2x C_q), 135,61 (2x CH), 135,52 (2x C_q), 132,54 (2x C_q), 130,34 (4x CH), 129,15 (4x CH), 27,85 (2x CH₂), 22,38 (CH₂), 20,91 (2x CH₃).

LC/MS t_R = 13,20 min (97,1 % AUC); **MS** *m/z* 302,8 [M + H]⁺.

(68) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis(4-(Trifluormethyl)benzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 4-Trifluormethylbenzaldehyd (0,26 ml, 0,332 g, 1,90 mmol) und Cyclohexanon (0,10 ml, 0,095 g, 0,97 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,215 g, 0,52 mmol, 54 % d. Th.).

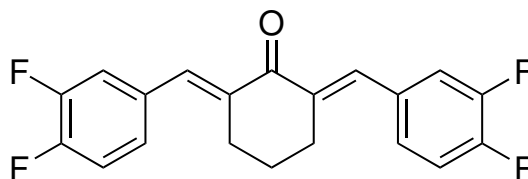
Smp.: 147–150 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,80 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 4H, ArH), 7,74 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 4H, ArH), 7,67 (s, 2H, 2x =CH), 2,91 (t, ³*J*_{HH} = 7,2 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,73 (qi, ³*J*_{HH} = 6,0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,85 (C_q), 139,31 (2x C_q), 138,31 (2x C_q), 134,15 (2x CH), 130,77 (4x CH), 128,57 (q, ²*J*_{CF} = 31,5 Hz, 2x C_q), 125,24 (q, ³*J*_{CF} = 3,8 Hz, 4x CH), 124,05 (q, ¹*J*_{CF} = 272,2 Hz, 2x C_q), 27,87 (2x CH₂), 22,45 (CH₂).

LC/MS t_R = 12,63 min (21,9 % AUC); **MS** *m/z* 411,2 [M + H]⁺, t_R = 12,85 min (75,6 % AUC); **MS** *m/z* 411,0 [M + H]⁺.

(69) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis(3,4-Difluorbenzyliden)-cyclohexanon



wurde aus 3,4-Difluorbenzaldehyd (0,40 ml, 0,516 g, 3,63 mmol) und Cyclohexanon (0,18 ml, 0,171 g, 1,74 mmol) hergestellt und mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: Petrolether/Essigsäureethylester (9:1)) aufgereinigt (gelber Feststoff, 0,285 g, 0,82 mmol, 47 % d. Th.).

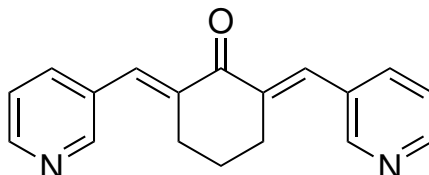
Smp.: 100–104 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,63 (dd, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,1 Hz, 2H, ArH), 7,56 (s, 2H, 2x =CH), 7,50 (dt, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,42–7,28 (m, 2H, ArH), 2,87 (t, ³*J*_{HH} = 7,2 Hz, 4H, 2x CH₂), 1,72 (qi, ³*J*_{HH} = 6,5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,65 (C_q), 149,34 (dd, ¹*J*_{CF} = 248,2 Hz, ²*J*_{CF} = 21,4 Hz, 2x C_q), 149,24 (dd, ¹*J*_{CF} = 248,9 Hz, ²*J*_{CF} = 22,1 Hz, 2x C_q), 137,05 (2x C_q), 133,64 (2x CH), 132,88 (dd, ³*J*_{CF} = 6,3 Hz, ⁴*J*_{CF} = 3,8 Hz, 2x C_q), 127,56 (dd, ³*J*_{CF} = 6,3 Hz, ⁴*J*_{CF} = 3,8 Hz, 2x CH), 119,02 (d, ²*J*_{CF} = 17,6 Hz, 2x CH), 117,61 (d, ²*J*_{CF} = 17,6 Hz, 2x CH), 27,45 (2x CH₂), 22,00 (CH₂).

LC/MS $t_R = 12,41$ min (96,0 % AUC); MS m/z 347,0 $[M + H]^+$.

(70) (2E,6E)-2,6-Bis(3-Pyridinylmethyl)-cyclohexanon



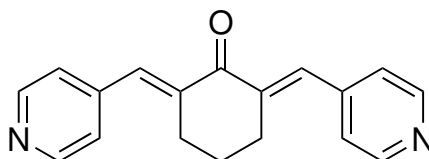
wurde aus 3-Pyridincarboxaldehyd (0,94 ml, 1,072 g, 10,0 mmol) und Cyclohexanon (0,52 ml, 0,494 g, 5,0 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,473 g, 1,71 mmol, 34 % d. Th.).

Smp.: 134 – 136 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,74 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,3$ Hz, 2H, ArH), 8,57 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,6$ Hz, 2H, ArH), 7,97 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,7$ Hz, 2H, ArH), 7,63 (s, 2H, 2x =CH), 7,49 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4,8$ Hz, $^5J_{\text{HH}} = 0,5$ Hz, 2H, ArH), 2,91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,5$ Hz, 4H, 2x CH₂), 1,75 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 2H, CH₂).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 188,44 (C_q), 150,90 (2x CH), 149,14 (2x CH), 138,02 (2x C_q), 137,06 (2x CH), 132,47 (2x CH), 131,16 (2x C_q), 123,53 (2x CH), 27,64 (2x CH₂), 22,10 (CH₂).

(71) (2E,6E)-2,6-Bis(4-Pyridinylmethyl)-cyclohexanon



wurde aus 4-Pyridincarboxaldehyd (0,95 ml, 1,080 g, 10,1 mmol) und Cyclohexanon (0,50 ml, 0,475 g, 4,84 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,768 g, 2,78 mmol, 57 % d. Th.).

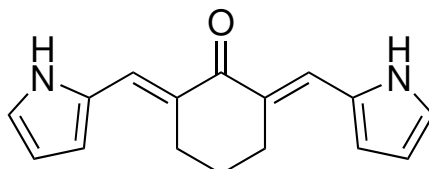
Smp.: 192 – 194 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,65 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,6$ Hz, 4H, ArH), 7,54 (s, 2H, 2x =CH), 7,49 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,4$ Hz, 4H, ArH), 2,91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 4H, 2x CH₂), 1,73

(qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188,71 (C_q), 149,72 (2x CH), 142,55 (2x C_q), 139,73 (2x C_q), 133,11 (2x CH), 124,15 (2x CH), 27,53 (2x CH₂), 21,79 (CH₂).

(72) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-cyclohexanon



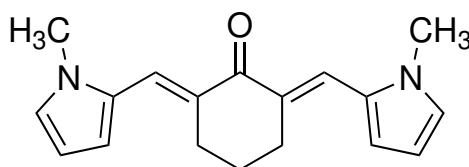
wurde aus 2-Pyrrolcarbaldehyd (0,220 g, 2,31 mmol) und Cyclohexanon (0,10 ml, 0,095 g, 0,97 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelbe Nadeln, 0,043 g, 0,17 mmol, 18 % d. Th.).

Smp.: 183 – 185 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,39 (bs, 2H, NH), 7,60 (s, 2H, 2x =CH), 7,05 (td, $^3J_{\text{HH}} = 2,7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1,2 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,52 (s, 2H, ArH), 6,26 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 5,5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2,0 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 2,76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,5 \text{ Hz}$, 4H, 2x CH₂), 1,81 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 186,87 (C_q), 129,34 (2x C_q), 128,97 (2x C_q), 125,85 (2x CH), 122,08 (2x CH), 113,09 (2x CH), 110,71 (2x CH), 27,73 (2x CH₂), 21,56 (CH₂).

(73) (2*E*,6*E*)-2,6-Bis((1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-cyclohexanon



wurde aus *N*-Methyl-2-pyrrolcarboxaldehyd (0,20 ml, 0,214 g, 1,96 mmol) und Cyclohexanon (0,10 ml, 0,095 g, 0,97 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (rötliche Nadeln, 0,045 g, 0,16 mmol, 16 % d. Th.).

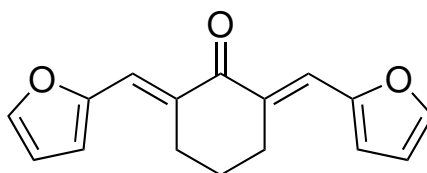
Smp.: 175 – 176 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,63 (s, 2H, 2x =CH), 7,07 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2,3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1,6 \text{ Hz}$,

2H, ArH), 6,53 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,0 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1,1 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,20 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 3,9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2,6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 0,6 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 3,71 (s, 6H, 2x CH₃), 2,76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,5 \text{ Hz}$, 4H, 2x CH₂), 1,79 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 186,79 (C_q), 130,49 (2x C_q), 129,04 (2x C_q), 127,03 (2x CH), 122,94 (2x CH), 114,23 (2x CH), 108,93 (2x CH), 33,81 (2x CH₃), 27,92 (2x CH₂), 21,72 (CH₂).

(74) (2E,6E)-2,6-Bis(Furan-2-yl-methylen)-cyclohexanon



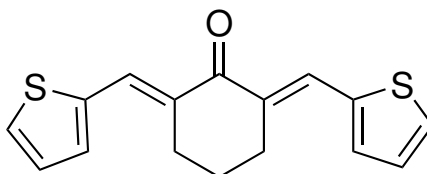
wurde aus Furan-2-carbaldehyd (0,16 ml, 0,186 g, 1,93 mmol) und Cyclohexanon (0,10 ml, 0,095 g, 0,97 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelbe Nadeln, 0,146 g, 0,57 mmol, 59 % d. Th.).

Smp.: 145 – 147 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,91 (d, $^3J_{\text{HH}} = 1,7 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 7,40 (s, 2H, 2x =CH), 6,94 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3,5 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 6,69 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3,5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1,8 \text{ Hz}$, 2H, ArH), 2,95 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,5 \text{ Hz}$, 4H, 2x CH₂), 1,81 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$, 2H, CH₂).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187,32 (C_q), 151,68 (2x C_q), 145,64 (2x CH), 132,67 (2x C_q), 122,37 (2x CH), 116,69 (2x CH), 112,78 (2x CH), 27,40 (2x CH₂), 21,07 (CH₂).

(75) (2E,6E)-2,6-Bis(2-Thienyliden)-cyclohexanon



wurde aus 2-Thiophencarboxaldehyd (0,18 ml, 0,216 g, 1,93 mmol) und Cyclohexanon (0,10 ml, 0,095 g, 0,97 mmol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,241 g, 0,84 mmol, 87 % d. Th.).

Smp.: 153 – 154 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5,0$ Hz, 2H, ArH), 7,86 (s, 2H, 2x =CH), 7,58 (d, $^4J_{\text{HH}} = 3,3$ Hz, 2H, ArH), 7,24 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5,1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3,7$ Hz, 2H, ArH), 2,88 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,3$ Hz, 4H, 2x CH₂), 1,89 (qi, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 2H, CH₂).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 187,46 (C_q), 138,57 (2x C_q), 133,76 (2x CH), 132,62 (2x C_q), 131,23 (2x CH), 128,73 (2x CH), 127,98 (2x CH), 27,48 (2x CH₂), 21,13 (CH₂).

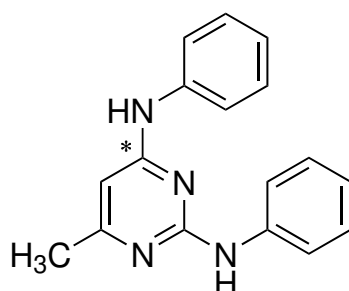
LC/MS $t_{\text{R}} = 12,45$ min (99,1 % AUC); MS m/z 286,8 [M + H]⁺.

Synthese der symmetrischen 2,4-Bis-anilinopyrimidine

Allgemeine Synthesevorschrift

2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (1 Äq.) und das korrespondierende Anilin (2.5 Äq.) wurden in Isopropanol (5 ml) gelöst und in ein Mikrowellengefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und bei einer Mikrowellenleistung von 70 W und 140 °C Reaktionstemperatur bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC-Kontrolle) für 30–60 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Isopropanol nachgewaschen. Verunreinigungen wurden durch Umkristallisation aus Ethanol/Wasser entfernt. Das Produkt wurde anschließend getrocknet und die Ausbeute bestimmt.

(76) N^2, N^4 -Diphenyl-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,062 g, 0,38 mmol) und Anilin (0,10 ml, 0,102 g, 1,10 mmol) hergestellt (hellrosafarbener Feststoff, 0,068 g, 0,25 mmol, 66 % d. Th.).

Smp.: 238 – 242 °C

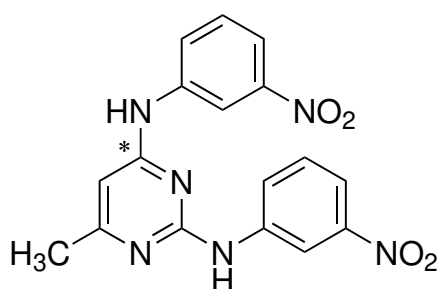
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,81 (s, 1H, NH), 10,28 (s, 1H, NH), 7,58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz,

2H, ArH), 7,53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, 2H, ArH), 7,40–7,32 (m, 4H, ArH), 7,17 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$ Hz, 2H, ArH), 6,33 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,24 (C_q), 153,16 (C_q), 137,51 (C_q), 136,93 (C_q), 129,35 (CH), 128,80 (2x CH), 128,70 (2x CH), 124,83 (CH), 124,54 (CH), 122,09 (CH), 121,77 (CH), 18,94 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,67 min (97,0 % AUC); **MS** m/z 276,8 [M + H]⁺.

(77) ***N*²,*N*⁴-Bis(3-Nitrophenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin**



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 3-Nitroanilin (0,345 g, 2,50 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,357 g, 0,97 mmol, 97 % d. Th.).

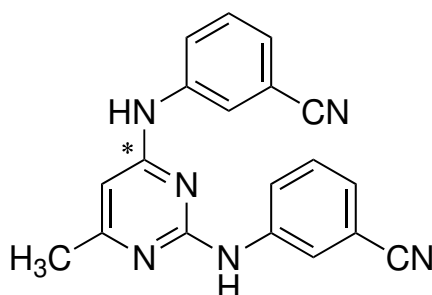
Smp.: 276–279 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,24 (s, 1H, NH), 10,69 (s, 1H, NH), 8,55 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1,8$ Hz, 2H, ArH), 7,96 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 3H, ArH), 7,86 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 1H, ArH), 7,63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 7,59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, 1H, ArH), 6,48 (s, 1H, PyrH), 2,41 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,23 (C_q), 153,88 (C_q), 148,00 (C_q), 147,89 (C_q), 139,07 (C_q), 138,65 (C_q), 130,15 (CH), 130,13 (CH), 127,28 (CH), 118,63 (CH), 118,46 (CH), 115,42 (CH), 115,26 (CH), 99,03 (CH), 19,69 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,42 min (97,0 % AUC); **MS** m/z 366,8 [M + H]⁺.

(78) 3,3'-((6-Methylpyrimidin-2,4-diyl)bis(azadiyl))dibenzonitril



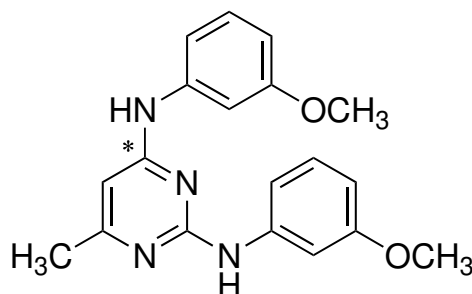
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,085 g, 0,52 mmol) und 3-Aminobenzonitril (0,157 g, 1,33 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,167 g, 0,51 mmol, 98 % d. Th.).

Smp.: 250–253 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,31 (s, 1H, NH), 10,61 (s, 1H, NH), 8,04 (d, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 8,00 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,84 (dt, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 7,77 (dt, ³*J*_{HH} = 6,7 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,4 Hz, 1H, ArH), 7,64–7,52 (m, 4H, ArH), 6,47 (s, 1H, PyrH), 2,39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,29 (C_q), 153,35 (C_q), 138,53 (C_q), 137,93 (C_q), 130,26 (CH), 130,14 (CH), 128,16 (CH), 126,52 (CH), 126,35 (CH), 124,75 (CH), 124,55 (CH), 118,27 (2x C_q), 111,87 (C_q), 111,80 (C_q), 98,68 (CH), 19,19 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 11,17 min (98,3 % AUC); **MS** *m/z* 326,9 [M + H]⁺.

(79) *N*²,*N*⁴-Bis(3-Methoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und *m*-Anisidin (0,28 ml, 0,307 g, 2,49 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser (3:1) umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,095 g, 0,28 mmol, 28 % d. Th.).

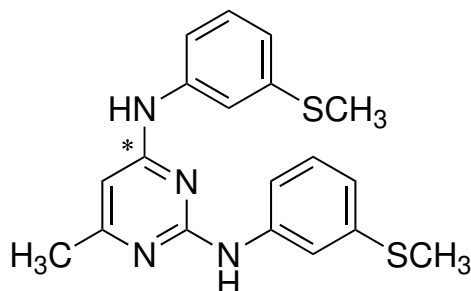
Smp.: 195–197 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,88 (s, 1H, NH), 10,37 (s, 1H, NH), 7,27 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 1H, ArH), 7,25–7,11 (m, 4H, ArH), 7,07 (d, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 1H, ArH), 6,76 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,8 Hz 2H, ArH), 6,34 (s, 1H, PyrH), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,28 (C_q), 159,72 (C_q), 159,57 (C_q), 152,76 (C_q), 138,51 (C_q), 137,81 (C_q), 129,71 (2x CH), 129,58 (CH), 114,27 (CH), 113,91 (CH), 110,51 (CH), 110,20 (CH), 107,60 (CH), 55,04 (CH₃), 55,01 (CH₃), 18,68 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,62 min (98,9 % AUC); **MS** *m/z* 336,7 [M + H]⁺.

(80) N²,N⁴-Bis(3-(Thiomethyl)phenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



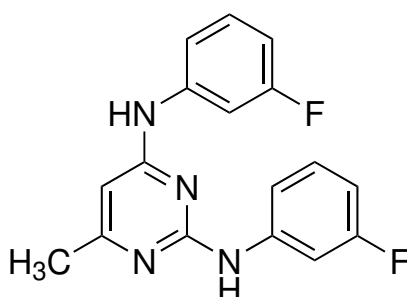
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,086 g, 0,53 mmol) und 3-(Thiomethyl)anilin (0,16 ml, 0,181 g, 1,30 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,177 g, 0,48 mmol, 91 % d. Th.).

Smp.: 202–204 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,93 (s, 1H, NH), 10,38 (s, 1H, NH), 7,42 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 7,37 (s, 1H, ArH), 7,34–7,27 (m, 3H, ArH), 7,08–7,05 (m, 2H, ArH), 6,35 (s, 1H, PyrH), 2,39 (s, 3H, SCH₃), 2,38 (s, 3H, SCH₃), 2,36 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,28 (C_q), 152,90 (C_q), 139,17 (C_q), 139,06 (C_q), 138,02 (C_q), 137,31 (C_q), 129,43 (2x CH), 129,28 (CH), 122,19 (CH), 122,00 (CH), 118,76 (CH), 118,16 (CH), 18,78 (CH₃), 14,50 (2x CH₃).

LC/MS t_R = 12,40 min (97,3 % AUC); **MS** *m/z* 368,7 [M + H]⁺.

(81) *N*²,*N*⁴-Bis(3-Fluorphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

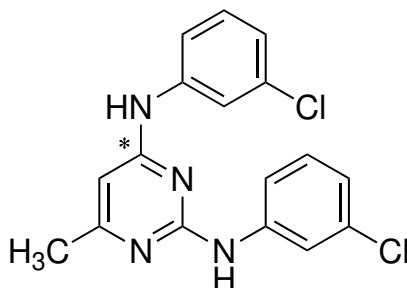
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,156 g, 0,96 mmol) und 3-Fluoranilin (0,23 ml, 0,266 g, 2,39 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,281 g, 0,90 mmol, 94 % d. Th.).

Smp.: 246–250 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,09 (s, 1H, NH), 10,52 (s, 1H, NH), 7,60 (d, ³*J*_{HH} = 11,0 Hz, 1H, ArH), 7,54 (d, ³*J*_{HH} = 10,7 Hz, 1H, ArH), 7,44–7,33 (m, 3H, ArH), 7,25 (d, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 1H, ArH), 7,00 (d, ³*J*_{HH} = 9,2 Hz, ³*J*_{HH} = 6,8 Hz, 2H, ArH), 6,41 (s, 1H, PyrH), 2,37 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,19 (d, ¹*J*_{CF} = 242,9 Hz, C_q), 162,04 (d, ¹*J*_{CF} = 242,9 Hz, C_q), 161,26 (C_q), 154,92 (C_q), 153,11 (C_q), 139,27 (d, ³*J*_{CF} = 10,5 Hz, C_q), 138,66 (d, ³*J*_{CF} = 10,4 Hz, C_q), 130,45 (d, ³*J*_{CF} = 9,5 Hz, CH), 130,32 (d, ³*J*_{CF} = 9,4 Hz, CH), 117,64 (CH), 117,53 (CH), 111,20 (t, ²*J*_{CF} = 21,7 Hz, 2x CH), 108,90 (d, ²*J*_{CF} = 24,4 Hz, CH), 108,79 (d, ²*J*_{CF} = 25,2 Hz, CH), 98,35 (CH), 19,02 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 11,98 min (97,6 % AUC); MS *m/z* 313,0 [M + H]⁺.

(82) *N*²,*N*⁴-Bis(3-Chlorphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,153 g, 0,94 mmol) und 3-Chloranilin (0,25 ml, 0,305 g, 2,40 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,308 g, 0,89 mmol, 95 % d. Th.).

Smp.: 255 – 258 °C

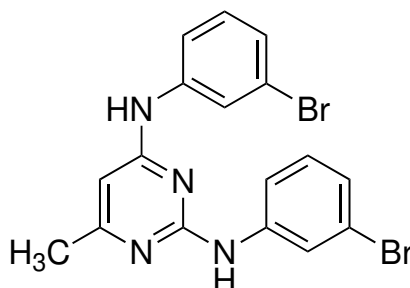
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,08 (s, 1H, NH), 10,49 (s, 1H, NH), 7,72 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,2 Hz, 1H, ArH), 7,65 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,53 (dd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 7,46 – 7,35 (m, 3H, ArH), 7,27 – 7,18 (m, 2H, ArH), 6,41 (s, 1H, PyrH), 2,37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,27 (C_q), 153,17 (C_q), 139,07 (C_q), 138,43 (C_q), 133,30 (C_q), 133,22 (C_q), 130,56 (2x CH), 130,42 (2x CH), 124,47 (CH), 124,37 (CH), 121,31 (CH), 120,21 (CH), 98,44 (CH), 19,01 (CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,27 (C_q), **154,89 (C_q^{*})**, 153,16 (C_q), 139,07 (C_q), 138,43 (C_q), 133,31 (C_q), 133,22 (C_q), 130,56 (2x CH), 130,42 (2x CH), 124,47 (CH), 124,36 (CH), 121,31 (CH), 120,21 (CH), 98,44 (CH), 19,01 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,75 min (98,7 % AUC); **MS** *m/z* 344,7 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 348,9 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(83) N²,N⁴-Bis(3-Bromphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,174 g, 1,07 mmol) und 3-Bromanilin (0,29 ml, 0,461 g, 2,68 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,399 g, 0,92 mmol, 86 % d. Th.).

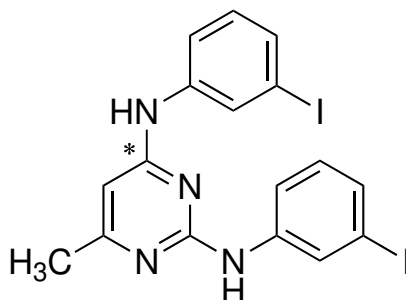
Smp.: 262 – 264 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,00 (s, 1H, NH), 10,43 (s, 1H, NH), 7,81 (s, 1H, ArH), 7,75 (s, 1H, ArH), 7,60 (d, ³*J*_{HH} = 7,2 Hz, 1H, ArH), 7,54 – 7,48 (m, 1H, ArH), 7,39 – 7,30 (m, 4H, ArH), 6,39 (s, 1H, PyrH), 2,37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,25 (C_q), 153,29 (C_q), 153,26 (C_q), 139,25 (C_q), 138,63 (C_q), 130,89 (2x CH), 130,77 (2x CH), 127,32 (CH), 127,22 (CH), 124,07 (CH), 121,65 (C_q), 121,58 (C_q), 120,55 (CH), 98,45 (CH), 19,08 (CH₃).

LC/MS $t_R = 12,86$ min (97,2 % AUC); MS m/z 435,0 $[M + H]^+$, MS m/z 436,9 $[M + H]^+$ (^{81}Br).

(84) N^2, N^4 -Bis(3-Iodphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,164 g, 1,00 mmol) und 3-Iodanilin (0,30 ml, 0,546 g, 2,49 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,452 g, 0,86 mmol, 86 % d. Th.).

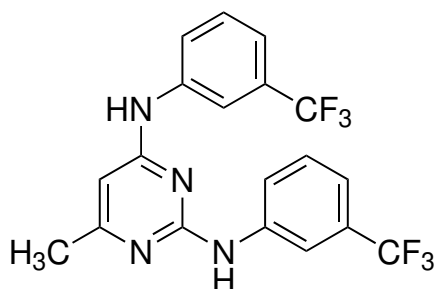
Smp.: 286–288 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,89 (s, 1H, NH), 10,35 (s, 1H, NH), 7,91 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,1$ Hz, 1H, ArH), 7,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 1,9$ Hz, 1H, ArH), 7,64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, 1H, ArH), 7,57–7,49 (m, 3H, ArH), 7,25–7,13 (m, 2H, ArH), 6,36 (s, 1H, PyrH), 2,36 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161,20 (C_q), 153,18 (C_q), 139,02 (C_q), 138,37 (C_q), 133,25 (CH), 133,16 (CH), 131,01 (2x CH), 130,90 (2x CH), 129,79 (CH), 120,95 (CH), 94,62 (C_q), 94,54 (C_q), 19,04 (CH₃).

LC/MS $t_R = 13,13$ min (98,9 % AUC); MS m/z 528,7 $[M + H]^+$.

(85) N^2, N^4 -Bis(3-(Trifluormethyl)phenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,161 g, 0,99 mmol) und 3-Trifluormethylanilin (0,30 ml, 0,387 g, 2,40 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,337 g, 0,82 mmol, 83 % d. Th.).

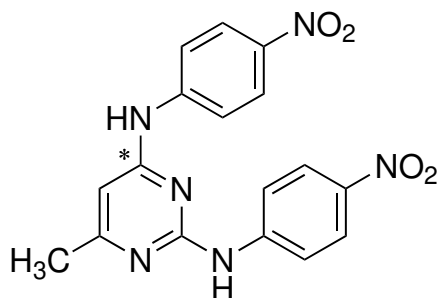
Smp.: 261 – 264 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,21 (s, 1H, NH), 10,58 (s, 1H, NH), 7,91 – 7,82 (m, 3H, ArH), 7,76 (d, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 1H, ArH), 7,61 – 7,45 (m, 4H, ArH), 6,45 (s, 1H, PyrH), 2,39 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,43 (C_q), 155,27 (C_q), 153,48 (C_q), 138,45 (C_q), 137,85 (C_q), 130,05 (CH), 129,91 (CH), 129,72 (q, ²*J*_{CF} = 31,7 Hz, C_q), 129,62 (q, ²*J*_{CF} = 31,7 Hz, C_q), 125,58 (CH), 125,31 (CH), 123,80 (q, ¹*J*_{CF} = 272,5 Hz, C_q), 123,76 (q, ¹*J*_{CF} = 272,4 Hz, C_q), 120,97 (CH), 118,11 (CH), 117,91 (CH), 98,69 (CH), 19,08 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,77 min (97,7 % AUC); **MS** *m/z* 412,7 [M + H]⁺.

(86) N²,N⁴-Bis(4-Nitrophenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 4-Nitroanilin (0,340 g, 2,46 mmol) hergestellt und mehrmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (gelber Feststoff, 0,040 g, 0,11 mmol, 11 % d. Th.).

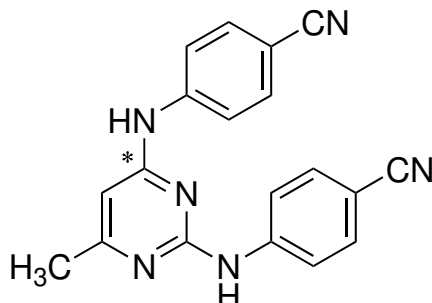
Smp.: >300 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,79 (s, 1H, NH), 10,51 (s, 1H, NH), 8,26 – 8,18 (m, 4H, ArH), 7,96 (d, ³*J*_{HH} = 9,3 Hz, 2H, ArH), 7,93 (d, ³*J*_{HH} = 9,2 Hz, 2H, ArH), 6,49 (s, 1H, PyrH), 2,38 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,67 (C_q), 156,11 (C_q), 145,75 (C_q), 145,50 (C_q), 141,74 (C_q), 141,33 (C_q), 124,88 (2x CH), 124,82 (2x CH), 119,79 (2x CH), 119,03 (2x CH), 99,95 (CH), 21,87 (CH₃).

LC/MS $t_R = 11,40$ min (99,3 % AUC); MS m/z 366,8 $[M + H]^+$.

(87) 4,4'-((6-Methylpyrimidin-2,4-diyl)bis(azadiyl))dibenzonitril



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,097 g, 0,60 mmol) und 4-Aminobenzonitril (0,182 g, 1,54 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,099 g, 0,30 mmol, 50 % d. Th.).

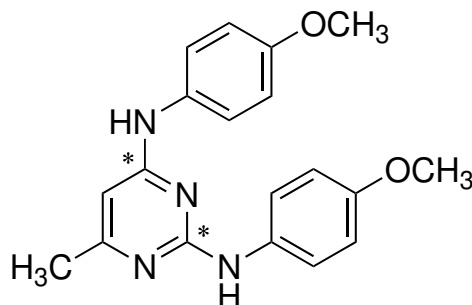
Smp.: 286 – 293 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,07 (s, 1H, NH), 10,62 (s, 1H, NH), 7,85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 6H, ArH), 7,78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 6,48 (s, 1H, PyrH), 2,38 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161,06 (C_q), 154,25 (C_q), 142,52 (C_q), 142,30 (C_q), 133,24 (2x CH), 133,18 (2x CH), 121,12 (2x CH), 120,59 (2x CH), 119,06 (C_q), 119,00 (C_q), 105,61 (C_q), 105,18 (C_q), 99,42 (CH), 20,28 (CH₃).

LC/MS $t_R = 11,41$ min (98,8 % AUC); MS m/z 326,9 $[M + H]^+$.

(88) N^2, N^4 -Bis(4-Methoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und *p*-Anisidin (0,305 g, 2,48 mmol) hergestellt und mehrmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (lilafarbener Feststoff, 0,101 g, 0,30 mmol,

30 % d. Th.).

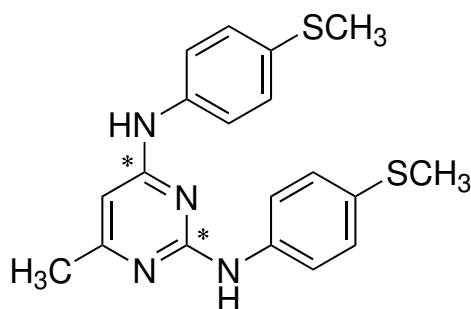
Smp.: 239–242 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76 (s, 1H, NH), 10,09 (s, 1H, NH), 7,47 (s, 2H, ArH), 7,43–7,31 (m, 2H, ArH), 6,96 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, 2H, ArH), 6,89 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 6,22 (s, 1H, PyrH), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 2,31 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,56 (C_q), 156,70 (C_q), 152,92 (C_q), 129,37 (C_q), 124,45 (C_q), 124,18 (2x CH), 114,81 (2x CH), 114,08 (4x CH), 113,88 (CH), 55,33 (CH₃), 55,27 (CH₃), 18,53 (CH₃).

LC/MS t_R = 10,72 min (96,7 % AUC); **MS** *m/z* 336,7 [M + H]⁺.

(89) N²,N⁴-Bis(4-(Thiomethyl)phenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



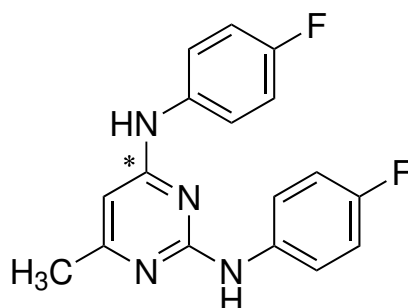
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 4-(Thiomethyl)anilin (0,30 ml, 0,336 g, 2,41 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,075 g, 0,20 mmol, 20 % d. Th.).

Smp.: 288–292 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,73 (s, 1H, NH), 9,96 (s, 1H, NH), 7,46 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, ArH), 7,40 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, ArH), 7,28 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,20 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, ArH), 6,24 (s, 1H, PyrH), 2,47 (s, 3H, SCH₃), 2,45 (s, 3H, SCH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,00 (C_q), 152,87 (C_q), 134,63 (C_q), 134,15 (C_q), 133,93 (C_q), 126,80 (4x CH), 126,52 (4x CH), 122,91 (CH), 18,69 (CH₃), 15,26 (CH₃), 15,14 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,29 min (97,8 % AUC); **MS** *m/z* 368,8 [M + H]⁺.

(90) N^2,N^4 -Bis(4-Fluorphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

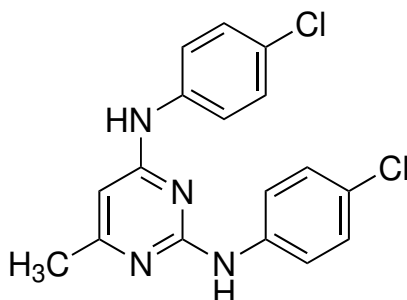
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 4-Fluoranilin (0,25 ml, 0,293 g, 2,64 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,040 g, 0,13 mmol, 13 % d. Th.).

Smp.: 283 – 287 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,97 (s, 1H, NH), 10,32 (s, 1H, NH), 7,57 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 4,9$ Hz, 2H, ArH), 7,50 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 4,9$ Hz, 2H, ArH), 7,27–7,17 (m, 4H, ArH), 6,32 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161,17 (C_q), 160,17 (C_q), 158,25 (C_q), 153,08 (C_q), 133,72 (C_q), 132,97 (C_q), 124,40 (2x CH), 124,34 (2x CH), 115,63 (2x CH), 115,45 (2x CH), 115,29 (CH), 18,71 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 11,73$ min (97,5 % AUC); **MS** m/z 312,7 [M + H]⁺.

(91) N^2,N^4 -Bis(4-Chlorphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 4-Chloranilin (0,310 g, 2,43 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,312 g, 0,90 mmol, 90 % d. Th.).

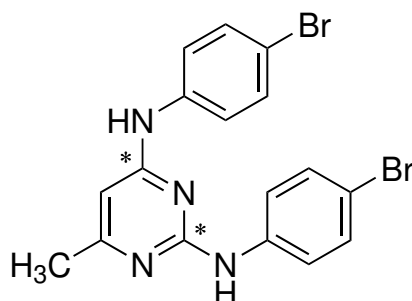
Smp.: 284 – 288 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,06 (s, 1H, NH), 10,46 (s, 1H, NH), 7,59 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 7,52 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,45 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,37 (s, 1H, PyrH), 2,36 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,16 (C_q), 152,94 (C_q), 136,41 (C_q), 135,75 (C_q), 128,79 (4x CH), 128,63 (2x CH), 123,69 (CH), 18,81 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,60 min (97,6 % AUC); **MS** *m/z* 344,7 [M + H]⁺; **MS** *m/z* 348,0 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(92) *N*²,*N*⁴-Bis(4-Bromphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



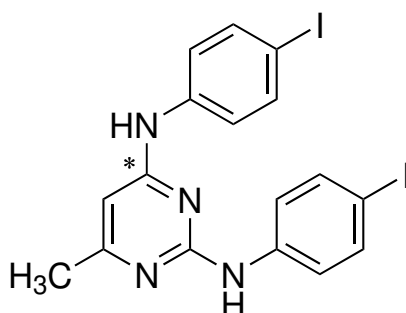
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,066 g, 0,40 mmol) und 4-Bromanilin (0,185 g, 1,08 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,127 g, 0,29 mmol, 73 % d. Th.).

Smp.: >300 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,95 (s, 1H, NH), 10,37 (s, 1H, NH), 7,58 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,53 (s, 4H, ArH), 7,47 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,35 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,15 (C_q), 153,21 (C_q), 136,98 (C_q), 136,40 (C_q), 131,72 (4x CH), 131,59 (3x CH), 124,06 (CH), 123,92 (CH), 116,75 (C_q), 19,04 (CH₃).

LC/MS t_R = 13,00 min (98,5 % AUC); **MS** *m/z* 435,0 [M + H]⁺.

(93) N^2,N^4 -Bis(4-Iodphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

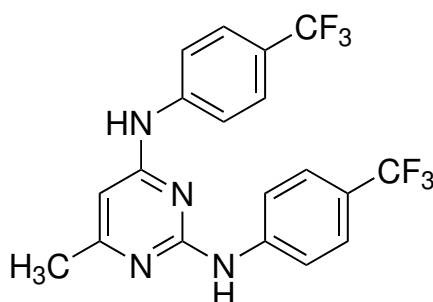
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,163 g, 1,00 mmol) und 4-Iodanilin (0,541 g, 2,47 mmol) hergestellt und mehrmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,038 g, 0,07 mmol, 7 % d. Th.).

Smp.: 258 – 262 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9,76 (s, 1H, NH), 9,53 (s, 1H, NH), 7,63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,60 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 7,47 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 6,17 (s, 1H, PyrH), 2,25 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161,12 (C_q), 160,92 (C_q), 160,82 (C_q), 157,38 (C_q), 139,70 (C_q), 139,28 (C_q), 137,22 (2x CH), 137,02 (2x CH), 128,69 (CH), 128,60 (CH), 122,75 (CH), 122,23 (CH), 97,63 (CH), 22,29 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 12,63$ min (94,8 % AUC); **MS** m/z 528,7 [M + H]⁺.

(94) N^2,N^4 -Bis(4-(Trifluormethyl)phenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,048 g, 0,29 mmol) und 4-(Trifluormethyl)anilin (0,10 ml, 0,128 g, 0,80 mmol) hergestellt und mehrmals aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,021 g, 0,05 mmol, 17 % d. Th.).

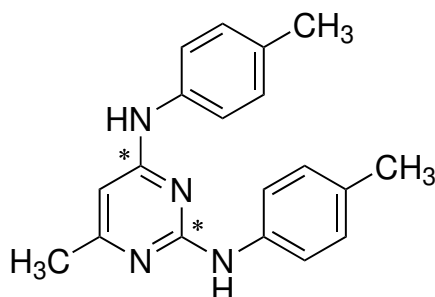
Smp.: 103–105 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,27 (s, 1H, NH), 9,98 (s, 1H, NH), 7,85 (t, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 4H, ArH), 7,65 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 4H, ArH), 6,33 (s, 1H, PyrH), 2,33 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,80 (C_q), 161,14 (C_q), 143,65 (C_q), 142,96 (C_q), 129,76 (CH), 126,01 (d, ³*J*_{CF} = 3,0 Hz, 2x CH), 125,94 (d, ³*J*_{CF} = 4,5 Hz, 2x CH), 124,71 (q, ¹*J*_{CF} = 271,3 Hz, C_q), 124,60 (q, ¹*J*_{CF} = 271,3 Hz, C_q), 119,89 (CH), 113,28 (CH), 113,02 (CH), 98,82 (CH), 22,00 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,23 min (93,4 % AUC); **MS** *m/z* 412,7 [M + H]⁺.

(95) N²,N⁴-Bis(*p*-Tolyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



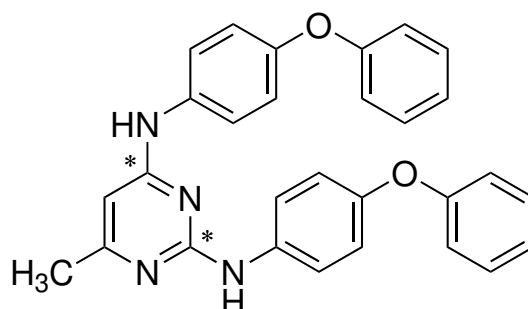
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,086 g, 0,53 mmol) und *p*-Toluidin (0,138 g, 1,29 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,003 g, 0,01 mmol, 2 % d. Th.).

Smp.: 214–218 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76 (s, 1H, NH), 10,22 (s, 1H, NH), 7,65–7,43 (m, 2H, ArH), 7,39 (dd, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,7 Hz 2H, ArH), 7,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 4H, ArH), 6,27 (s, 1H, PyrH), 2,33 (s, 3H, CH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃), 2,31 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,08 (C_q), 152,81 (C_q), 134,87 (C_q), 134,15 (C_q), 133,98 (C_q), 129,27 (2x CH), 129,16 (2x CH), 128,87 (2x CH), 128,00 (2x CH), 121,85 (CH), 20,48 (CH₃), 20,44 (CH₃), 18,65 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,18 min (98,4 % AUC); **MS** *m/z* 304,8 [M + H]⁺.

(96) *N*²,*N*⁴-Bis(4-Phenoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

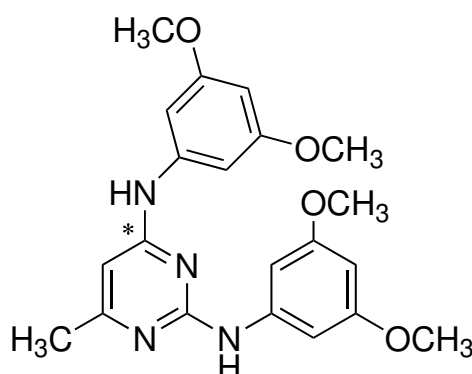
wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,165 g, 1,01 mmol) und 4-Phenoxyanilin (0,465 g, 2,51 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (farbloser Feststoff, 0,201 g, 0,44 mmol, 44 % d. Th.).

Smp.: 207 – 209 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,94 (s, 1H, NH), 10,28 (s, 1H, NH), 7,56 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 7,49 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 7,33 (dt, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 4H, ArH), 7,14 – 7,07 (m, 2H, ArH), 7,04 – 6,99 (m, 2H, ArH), 6,96 (dd, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, ⁴*J*_{HH} = 5,6 Hz, 5H, ArH), 6,31 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,05 (C_q), 156,88 (C_q), 156,82 (C_q), 153,47 (C_q), 153,01 (C_q), 133,00 (C_q), 132,15 (C_q), 129,94 (4x CH), 124,41 (CH), 123,94 (CH), 123,28 (2x CH), 119,19 (4x CH), 118,99 (2x CH), 118,10 (4x CH), 18,63 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 13,36 min (98,2 % AUC); MS *m/z* 460,9 [M + H]⁺.

(97) *N*²,*N*⁴-Bis(3,5-Dimethoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin

wurde aus 2,4-Dichlor-6-methylpyrimidin (0,165 g, 1,01 mmol) und 3,5-Dimethoxyanilin (0,387 g, 2,51 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (grauer Feststoff, 0,137 g, 0,35 mmol, 35 % d. Th.).

Smp.: 210–212 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,94 (s, 1H, NH), 10,44 (s, 1H, NH), 6,81 (s, 1H, ArH), 6,73–6,65 (m, 1H, ArH), 6,48–6,42 (m, 2H, ArH), 6,40–6,35 (m, 1H, ArH), 6,32 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, 2H, ArH), 3,66 (s, 6H, 2x OCH₃), 3,65 (s, 6H, 2x OCH₃), 2,34 (s, 3H, CH₃).

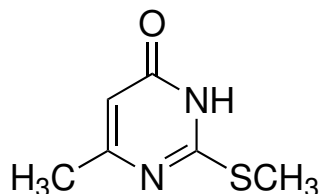
¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,36 (C_q), 160,99 (C_q), 160,72 (C_q), 160,55 (C_q), 152,57 (C_q), 138,99 (C_q), 138,23 (C_q), 135,63 (C_q), 100,52 (CH), 99,89 (CH), 97,90 (CH), 97,04 (CH), 96,76 (CH), 61,96 (CH), 55,09 (2x CH₃), 55,06 (2x CH₃), 18,54 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,48 min (98,9 % AUC); **MS** *m/z* 396,7 [M + H]⁺.

Synthese der asymmetrischen Bis-Anilinopyrimidine

Synthesevorschrift

Im ersten Schritt wurden S-Methylisothioharnstoff-Hemisulfat, Acetessigsäureethylester und Natriumcarbonat in Wasser gelöst und bei Raumtemperatur bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC-Kontrolle) gerührt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 8 wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Substitution des Methylthiolrestes durch Anilin. Hierzu wurde das im ersten Schritt synthetisierte 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3*H*)-pyrimidinon mit Anilin in ein Mikrowellengefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und bei einer Mikrowellenleistung von 120 W und 140 °C Reaktionstemperatur bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC-Kontrolle) für 60 Minuten erhitzt. Der Rückstand wurde anschließend aus Ethanol/Wasser umkristallisiert. Das substituierte Produkt des zweiten Schritts wurde zur Chlorierung in Phosphoroxychlorid gelöst und nach Rühren bei Raumtemperatur für 20 Minuten bis zur Vollständigkeit der Reaktion unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Rückstand in Eiswasser gegossen, mit Ammoniak (25 %ige Lösung) neutralisiert und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt. Das chlorierte Produkt aus diesem Schritt wurde mit dem entsprechenden Anilinderivat in Isopropanol gelöst und in ein Mikrowellengefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und bei einer Mikrowellenleistung von 70 W und 140 °C Reaktionstemperatur bis zur Vollständigkeit der Reaktion (DC-Kontrolle) für 30 Minuten erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, mehrmals mit Isopropanol gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

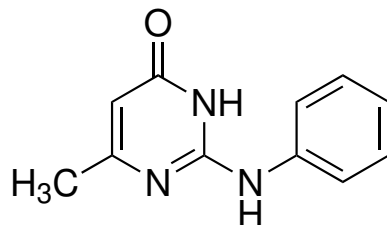
(98) 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon

wurde aus S-Methylisothioharnstoff-Hemisulfat (5,870 g, 0,04 mol), Acetessigsäureethylester (4,9 ml, 5,047 g, 0,04 mol) und Natriumcarbonat (8,140 g, 0,08 mol) hergestellt und aus Ethanol umkristallisiert (farblose Plättchen, 3,666 g, 0,02 mol, 50 % d. Th.).

Smp.: 222 – 223 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,43 (bs, 1H, NH), 5,95 (s, 1H, PyrH), 2,46 (s, 3H, CH₃), 2,16 (s, 3H, CH₃).

LC/MS t_R = 4,40 min (99,2 % AUC); **MS** m/z 156,8 [M + H]⁺.

(99) 6-Methyl-2-(Phenylamino)-4(3H)-pyrimidinon

wurde aus **98** (0,780 g, 4,99 mmol) und Anilin (0,50 ml, 0,510 g, 5,48 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (bräunliche Plättchen, 0,878 g, 4,36 mmol, 87 % d. Th.).

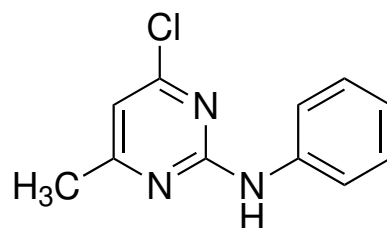
Smp.: 241 – 243 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,58 (s, 1H, NH), 8,79 (s, 1H, NH), 7,64 (d, ³J_{HH} = 7,9 Hz, 2H, ArH), 7,30 (t, ³J_{HH} = 7,9 Hz, 2H, ArH), 7,00 (t, ³J_{HH} = 7,3 Hz, 1H, ArH), 5,71 (s, 1H, PyrH), 2,13 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,66 (C_q), 138,99 (C_q), 128,84 (C_q), 128,67 (2x CH), 128,47 (C_q), 122,33 (CH), 119,39 (2x CH), 113,85 (CH), 23,83 (CH₃).

LC/MS t_R = 8,84 min (96,4 % AUC); **MS** m/z 201,7 [M + H]⁺.

(100) 4-Chlor-6-Methyl-N-Phenylpyrimidin-2-amin



wurde aus **99** (0,860 g, 4,27 mmol) und Phosphoroxychlorid (5,0 ml, 8,400 g, 0,05 mol) hergestellt (bräunlicher Feststoff, 0,422 g, 1,92 mmol, 45 % d. Th.).

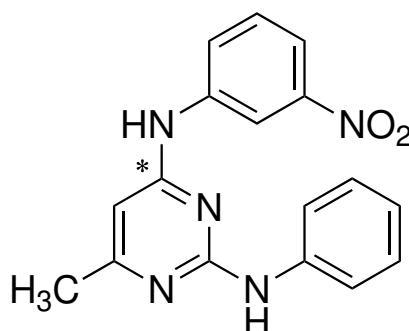
Smp.: 88–89 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,91 (s, 1H, NH), 7,72 (d, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 2H, ArH), 7,29 (d, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz, 2H, ArH), 6,98 (t, ³*J*_{HH} = 7,3 Hz, 1H, ArH), 6,86 (s, 1H, PyrH), 2,36 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,00 (C_q), 159,65 (C_q), 159,38 (C_q), 139,72 (C_q), 128,50 (2x CH), 122,01 (CH), 119,13 (2x CH), 110,50 (CH), 23,44 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,38 min (74,0 % AUC); **MS** *m/z* 219,7 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 221,8 [M + H]⁺ (³⁷Cl); t_R = 11,58 min (23,3 % AUC); **MS** *m/z* 276,9 [M + H]⁺ ≡ **76**.

(101) N-(Phenyl)-N'-(3-Nitrophenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-diamin



wurde aus **100** (0,034 g, 0,15 mmol) und 3-Nitroanilin (0,021 g, 0,15 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,025 g, 0,08 mmol, 53 % d. Th.).

Smp.: 220–221 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,27 (s, 1H, NH), 10,32 (s, 1H, NH), 8,43 (d, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz,

1H, ArH), 8,02 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,1$ Hz, 1H, ArH), 7,98 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,2$ Hz, $^5J_{\text{HH}} = 0,7$ Hz, 1H, ArH), 7,60 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, 1H, ArH), 7,48 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 2H, ArH), 7,36–7,31 (m, 2H, ArH), 7,18 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$ Hz, 1H, ArH), 6,41 (s, 1H, PyrH), 2,39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,48 (C_q), 153,31 (C_q), 147,93 (C_q), 138,85 (C_q), 136,59 (C_q), 130,11 (CH), 128,91 (2x CH), 127,84 (CH), 124,95 (CH), 122,15 (2x CH), 119,03 (CH), 116,17 (CH), 98,26 (CH), 18,97 (CH₃).

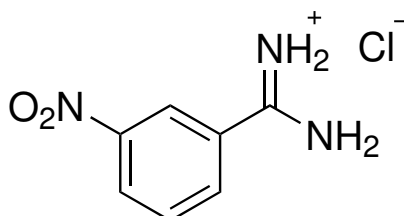
LC/MS t_R = 11,52 min (95,0 % AUC); MS *m/z* 321,8 [M + H]⁺.

Synthese der 4-Anilino-2-Aryl-6-methylpyrimidine

Synthese von 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid

3-Nitrobenzonnitril (1,050 g, 7,09 mmol) wurde in Methanol (5 ml) gelöst und eine Lösung aus Natriummethanolat (0,038 g, 0,71 mmol) in Methanol (25 %ige Lösung, 0,16 ml) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde Ammoniumchlorid (0,420 g, 7,85 mmol) zur Reaktionslösung zugegeben und der Ansatz für einen weiteren Tag bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Das DC-reine Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,060 g, 5,26 mmol, 74 % d. Th.).

(102) 3-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid



Smp.: 245–247 °C

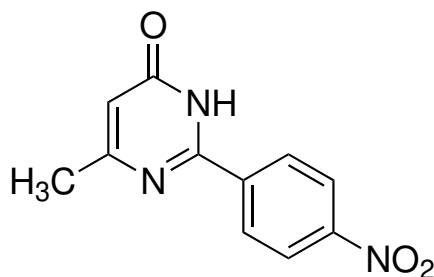
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,56 (bs, 4H, =NHNH₃), 8,69 (t, $^4J_{\text{HH}} = 1,9$ Hz, 1H, ArH), 8,55 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,2$ Hz, $^5J_{\text{HH}} = 0,9$ Hz, 1H, ArH), 8,30 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 1H, ArH), 7,91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 1H, ArH).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,12 (C_q), 147,58 (C_q), 134,67 (CH), 130,66 (CH), 129,56 (C_q), 128,00 (CH), 123,38 (CH).

Synthese der 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone

Zu einer Lösung des korrespondierenden Benzamidin-Hydrochlorids (1 Äq.) in Methanol (5 ml) wurde eine Lösung aus Natriummethanolat (2 Äq.) in Methanol (25 %ige Lösung) zugegeben. Die Lösung wurde in ein Mikrowellengefäß überführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Acetessigsäuremethylester (10 Äq.) zugetropft und das Mikrowellengefäß verschlossen. Der Ansatz wurde bei einer Mikrowellenleistung von 40 W bei 70 °C bis zur Vollständigkeit der Reaktion für 2–4 Stunden erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Reaktionsansatz in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 1 M Salzsäure-Lösung auf pH 2 eingestellt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Das DC-reine Produkt wurde als Feststoff erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt umgesetzt.

(103) 2-(4-Nitrophenyl)-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon



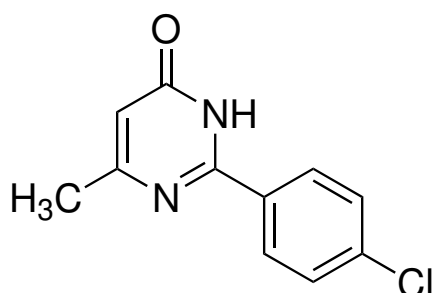
wurde aus 4-Nitrobenzamidin-Hydrochlorid (0,405 g, 2,00 mmol), Natriummethanolat (0,243 g, 4,49 mmol) und Acetessigsäuremethylester (2,2 ml, 2,376 g, 0,02 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,401 g, 1,73 mmol, 87 % d. Th.).

Smp.: 296–299 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,55 (bs, 1H, NH), 8,40 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 8,34 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 6,40 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 148,89 (C_q), 129,06 (2x CH), 123,60 (2x CH), 23,42 (CH₃).

LC/MS t_R = 6,88 min (39,0 % AUC); **MS** *m/z* 231,8 [M + H]⁺, t_R = 7,32 min (59,5 % AUC); **MS** *m/z* 231,8 [M + H]⁺. Die unterschiedlichen Retentionszeiten sind auf die Amid-Imid-Tautomerie des Pyrimidinons zurückzuführen.

(104) 2-(4-Chlorphenyl)-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon

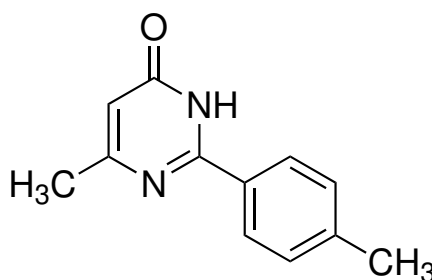
wurde aus 4-Chlorbenzamidin-Hydrochlorid (0,774 g, 4,00 mmol), Natriummethanolat (0,485 g, 8,98 mmol) und Acetessigsäuremethylester (4,4 ml, 4,752 g, 0,04 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,814 g, 3,69 mmol, 92 % d. Th.).

Smp.: 229–230 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,49 (bs, 1H, NH), 8,14 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,58 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 6,24 (s, 1H, PyrH), 2,28 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,87 (C_q), 163,88 (C_q), 156,45 (C_q), 136,25 (C_q), 131,97 (C_q), 129,51 (2x CH), 128,60 (2x CH), 109,45 (CH), 23,42 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 9,46 min (98,9 % AUC); **MS** *m/z* 220,8 [M + H]⁺.

(105) 2-(*p*-Tolyl)-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon

wurde aus 4-Methylbenzamidin-Hydrochlorid (0,896 g, 5,25 mmol), Natriummethanolat (0,631 g, 11,67 mmol) und Acetessigsäuremethylester (5,75 ml, 6,210 g, 0,05 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,860 g, 4,29 mmol, 82 % d. Th.).

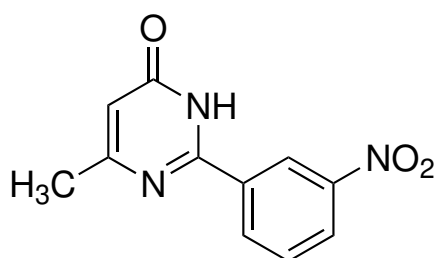
Smp.: 214–215 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12,45 (bs, 1H, NH), 8,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, 2H, ArH), 7,32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 2H, ArH), 6,17 (s, 1H, PyrH), 2,37 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164,57 (C_q), 141,53 (C_q), 129,11 (2x CH), 127,62 (2x CH), 23,55 (CH_3), 20,92 (CH_3).

LC/MS $t_{\text{R}} = 9,20$ min (98,5 % AUC); MS m/z 200,8 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(106) 2-(3-Nitrophenyl)-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon



wurde aus **102** (0,404 g, 2,00 mmol), Natriummethanolat (0,243 g, 4,49 mmol) und Acetessigsäuremethylester (2,2 ml, 2,376 g, 0,02 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,384 g, 1,66 mmol, 83 % d. Th.).

Smp.: 258 – 261 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12,57 (bs, 1H, NH), 8,98 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 2H, ArH), 8,59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 2H, ArH), 8,38 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz, $^5J_{\text{HH}} = 1,0$ Hz, 1H, ArH), 7,81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 1H, ArH), 6,39 (s, 1H, PyrH), 2,35 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 148,02 (C_q), 133,83 (2x CH), 130,28 (2x CH), 125,59 (CH), 122,41 (CH), 23,42 (CH_3).

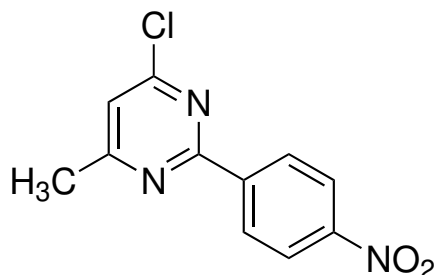
LC/MS $t_{\text{R}} = 8,28$ min (99,1 % AUC); MS m/z 231,8 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Synthese der 4-Chlor-6-methyl-2-arylpyrimidine

Zum korrespondierenden 2-Aryl-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon (1 Äq.) wurde Phosphoroxychlorid (30 Äq.) gegeben und der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bis zur Vollständigkeit der Reaktion unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Phosphoroxychlorid mittels Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde in Eiswasser

gegossen und mit Ammoniak (25 %ige Lösung) neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und nach Abtrennung der wässrigen Phase getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel entfernt und das DC-reine Produkt als Feststoff erhalten.

(107) 4-Chlor-6-methyl-2-(4-nitrophenyl)pyrimidin



wurde aus **103** (0,370 g, 1,60 mmol) und Phosphoroxychlorid (5,0 ml, 8,20 g, 0,05 mol) hergestellt (hautfarbener Feststoff, 0,336 g, 1,35 mmol, 84 % d. Th.).

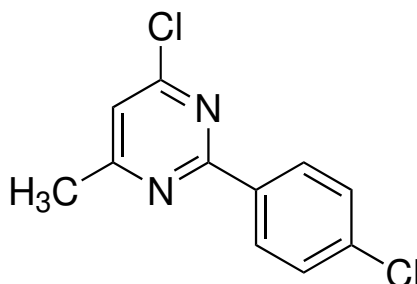
Smp.: 184–185 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,55 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, 2H, ArH), 8,36 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, 2H, ArH), 7,66 (s, 1H, PyrH), 2,59 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,35 (C_q), 161,70 (C_q), 160,61 (C_q), 149,15 (C_q), 141,40 (C_q), 129,16 (2x CH), 123,93 (2x CH), 120,08 (CH), 23,55 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 12,21 min (97,2 % AUC); **MS** *m/z* 249,9 [M + H]⁺.

(108) 4-Chlor-6-methyl-2-(4-chlorphenyl)pyrimidin



wurde aus **104** (0,841 g, 3,81 mmol) und Phosphoroxychlorid (15,0 ml, 24,60 g, 0,16 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,798 g, 3,34 mmol, 88 % d. Th.).

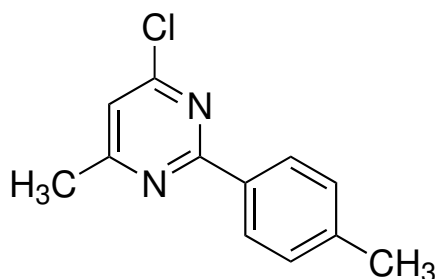
Smp.: 105 – 107 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,33 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,59 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,55 (s, 1H, PyrH), 2,55 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,00 (C_q), 162,62 (C_q), 160,43 (C_q), 136,35 (C_q), 134,54 (C_q), 129,64 (2x CH), 128,86 (2x CH), 119,10 (CH), 23,54 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,81 min (98,5 % AUC); **MS** *m/z* 238,6 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 240,7 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(109) 4-Chlor-6-methyl-2-(*p*-tolyl)pyrimidin



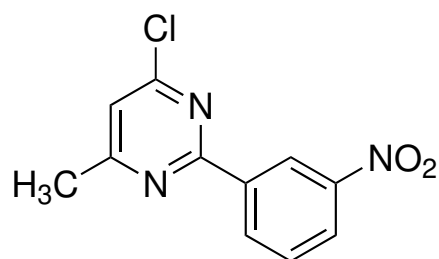
wurde aus **105** (0,860 g, 4,29 mmol) und Phosphoroxychlorid (20,0 ml, 49,20 g, 0,32 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,820 g, 3,75 mmol, 87 % d. Th.).

Smp.: 104 – 106 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,24 (d, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, 2H, ArH), 7,48 (s, 1H, PyrH), 7,34 (d, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 2H, ArH), 2,53 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,75 (C_q), 163,72 (C_q), 160,31 (C_q), 141,43 (C_q), 133,05 (C_q), 129,35 (2x CH), 127,91 (2x CH), 118,45 (CH), 23,57 (CH₃), 20,97 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,38 min (98,4 % AUC); **MS** *m/z* 218,8 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 220,8 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(110) 4-Chlor-6-methyl-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin

wurde aus **106** (0,551 g, 2,38 mmol) und Phosphoroxychlorid (10,0 ml, 16,40 g, 0,11 mol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,529 g, 2,12 mmol, 89 % d. Th.).

Smp.: 137 – 139 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,99 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, 1H, ArH), 8,69 (d, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 1H, ArH), 8,39 (d, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz, 1H, ArH), 7,82 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,64 (s, 1H, PyrH), 2,58 (s, 3H, CH₃).

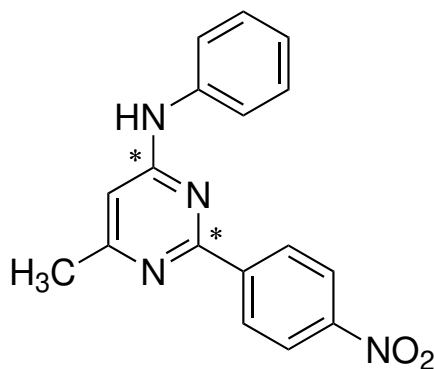
¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,36 (C_q), 161,48 (C_q), 160,62 (C_q), 148,21 (C_q), 137,26 (C_q), 133,87 (CH), 130,60 (CH), 125,86 (CH), 122,15 (CH), 119,97 (CH), 23,56 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 12,02 min (96,8 % AUC); **MS** *m/z* 249,9 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 251,8 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

Allgemeine Synthese der 4-Anilino-2-Aryl-6-methylpyrimidine

Die entsprechenden 4-Chlor-6-methyl-2-(aryl)pyrimidine (1 Äq.) und das korrespondierende Anilin (1 Äq.) wurden in Isopropanol (5 ml) gelöst und in ein Mikrowellengefäß überführt. Anschließend wurden 5 Tropfen konz. HCl (35 %ige Lösung) zugegeben und das Reaktionsgefäß verschlossen. Der Ansatz wurde bei einer Mikrowellenleistung von 70 W bei 140 °C bis zur Vollständigkeit der Reaktion für 30–60 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Isopropanol gewaschen. Der Rückstand wurde, sofern er nicht DC-rein war, aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

(111) 6-Methyl-2-(4-nitrophenyl)-*N*-phenylpyrimidin-4-amin



wurde aus **107** (0,049 g, 0,20 mmol) und Anilin (30,0 μ L, 0,031 g, 0,33 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,050 g, 0,16 mmol, 80 % d. Th.).

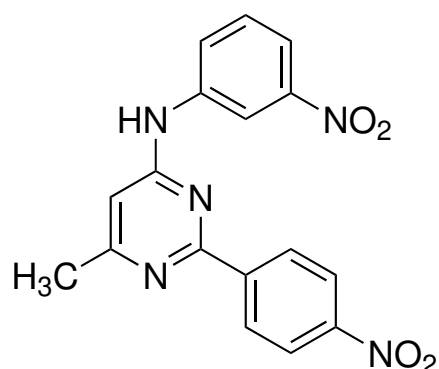
Smp.: 269–272 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,79 (s, 1H, NH), 8,52 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 2H, ArH), 8,41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 2H, ArH), 7,73 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, 1H, ArH), 7,46–7,41 (m, 2H, ArH), 7,17 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,4$ Hz, 1H, ArH), 6,87 (s, 1H, PyrH), 2,52 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,78 (C_q), 158,89 (C_q), 149,24 (C_q), 138,30 (C_q), 129,64 (2x CH), 128,99 (2x CH), 124,11 (CH), 123,76 (2x CH), 121,16 (2x CH), 104,35 (CH), 21,22 (CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,78 (C_q), **160,52 (C_q^{*})**, 158,89 (C_q), 149,24 (C_q), **140,14 (C_q^{*})**, 138,30 (C_q), 129,64 (2x CH), 128,99 (2x CH), 124,11 (CH), 123,76 (2x CH), 121,16 (2x CH), 104,35 (CH), 21,22 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 12,41$ min (96,3 % AUC); **MS** m/z 307,0 [M + H]⁺.

(112) 6-Methyl-*N*-(3-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin

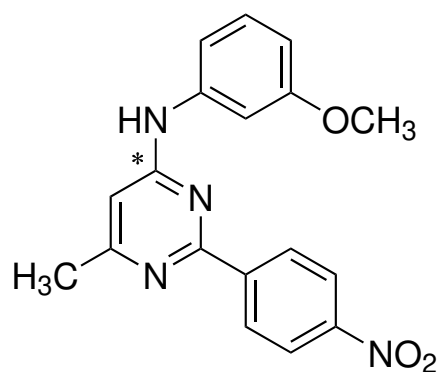
wurde aus **107** (0,048 g, 0,19 mmol) und 3-Nitroanilin (0,035 g, 0,25 mmol) hergestellt (hellgelber Feststoff, 0,035 g, 0,10 mmol, 53 % d. Th.).

Smp.: 276–277 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,83 (s, 1H, NH), 9,04 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,2 Hz, 1H, ArH), 8,56 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 8,33 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 8,02 (ddd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 0,9 Hz, 1H, ArH), 7,90 (ddd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, ⁴*J*_{HH} = 0,9 Hz, 1H, ArH), 7,65 (t, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 1H, ArH), 6,83 (s, 1H, PyrH), 2,49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,59 (C_q), 160,48 (C_q), 159,64 (C_q), 148,94 (C_q), 147,99 (C_q), 141,78 (C_q), 140,56 (C_q), 130,13 (2x CH), 129,20 (2x CH), 125,74 (CH), 123,65 (CH), 117,07 (CH), 114,03 (CH), 105,41 (CH), 22,62 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 12,70 min (97,8 % AUC); **MS** *m/z* 351,8 [M + H]⁺.

(113) 6-Methyl-*N*-(3-methoxyphenyl)-2-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin

wurde aus **107** (0,041 g, 0,16 mmol) und *m*-Anisidin (30,0 μ L, 0,033 g, 0,27 mmol) hergestellt (gelber Feststoff, 0,044 g, 0,13 mmol, 81 % d. Th.).

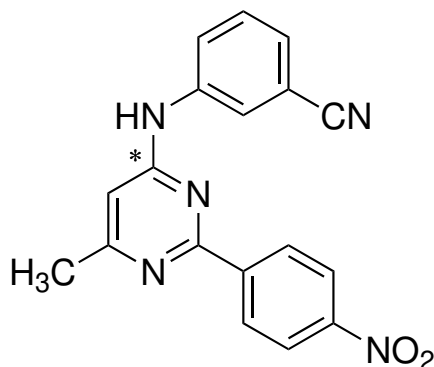
Smp.: 250–252 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,90 (s, 1H, NH), 8,51 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 8,41 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,44 (s, 1H, ArH), 7,32 (t, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,28 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 1H, ArH), 6,90 (s, 1H, PyrH), 6,74 (dd, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,2 Hz, 1H, ArH), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,53 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,73 (C_q), 159,63 (C_q), 158,73 (C_q), 149,30 (C_q), 139,84 (C_q), 139,46 (C_q), 129,77 (2x CH), 129,66 (2x CH), 123,75 (CH), 113,30 (CH), 110,00 (CH), 106,59 (CH), 104,60 (CH), 55,12 (CH₃), 21,01 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 12,34 min (98,2 % AUC); **MS** *m/z* 336,8 [M + H]⁺.

(114) 3-((6-Methyl-2-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-yl)amino)benzonitril



wurde aus **107** (0,047 g, 0,19 mmol) und 3-Aminobenzonitril (0,035 g, 0,30 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (beiger Feststoff, 0,005 g, 0,02 mmol, 11 % d. Th.).

Smp.: 272–273 °C

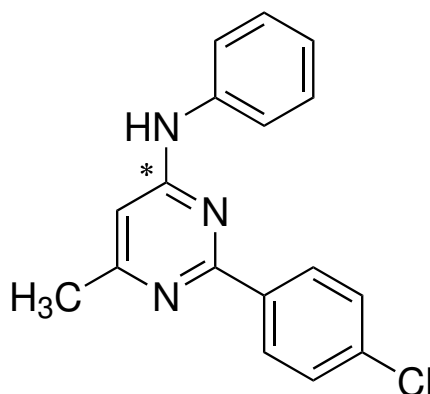
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,14 (s, 1H, NH), 8,52 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 8,36 (d, ³*J*_{HH} = 8,9 Hz, 2H, ArH), 8,17 (t, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 8,06 (ddd, ³*J*_{HH} = 8,4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,0 Hz, 1H, ArH), 7,60 (t, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,51 (dt, ³*J*_{HH} = 7,6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,3 Hz, 1H, ArH), 6,73 (s, 1H, PyrH), 2,46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,34 (C_q), 160,46 (C_q), 148,68 (C_q), 143,27 (C_q), 140,51

(C_q), 130,30 (CH), 128,80 (2x CH), 125,81 (2x CH), 124,38 (CH), 123,71 (CH), 122,53 (CH), 118,78 (C_q), 111,65 (C_q), 104,93 (CH), 23,50 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,02 min (97,9 % AUC); MS m/z 331,8 [M + H]⁺.

(115) 6-Methyl-2-(4-chlorphenyl)-N-phenylpyrimidin-4-amin



wurde aus **108** (0,043 g, 0,18 mmol) und Anilin (20,0 µL, 0,020 g, 0,22 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,045 g, 0,15 mmol, 83 % d. Th.).

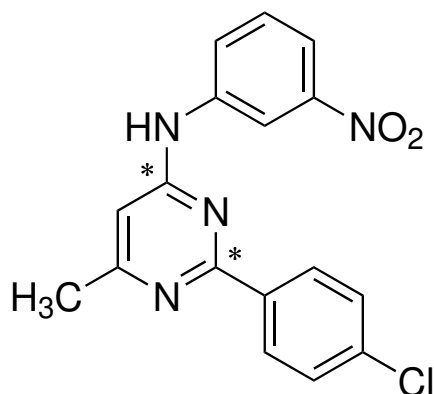
Smp.: 279 – 283 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,15 (s, 1H, NH), 8,30 (d, ³J_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,78 – 7,64 (m, 4H, ArH), 7,45 (t, ³J_{HH} = 7,8 Hz, 2H, ArH), 7,21 (t, ³J_{HH} = 7,4 Hz, 1H, ArH), 6,88 (s, 1H, PyrH), 2,54 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,76 (C_q), 158,69 (C_q), 137,68 (C_q), 137,47 (C_q), 130,40 (2x CH), 129,03 (2x CH), 128,94 (4x CH), 127,90 (C_q), 124,77 (CH), 121,70 (CH), 20,00 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,59 min (98,6 % AUC); MS m/z 295,9 [M + H]⁺, MS m/z 298,0 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(116) 6-Methyl-2-(4-chlorophenyl)-N-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **108** (0,029 g, 0,12 mmol) und 3-Nitroanilin (0,023 g, 0,17 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,030 g, 0,09 mmol, 75 % d. Th.).

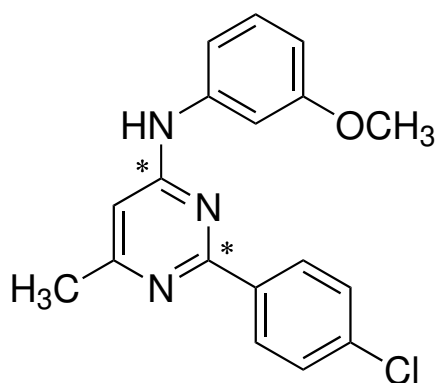
Smp.: 270–272 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,42 (s, 1H, NH), 9,02 (s, 1H, ArH), 8,35 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 8,05 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,96 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,3 Hz, 1H, ArH), 7,79–7,58 (m, 3H, ArH), 6,92 (s, 1H, PyrH), 2,54 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,62 (C_q), 159,40 (C_q), 147,97 (C_q), 139,82 (C_q), 137,22 (C_q), 130,27 (2x CH), 128,89 (2x CH), 126,50 (CH), 118,03 (CH), 114,84 (CH), 104,93 (CH), 21,05 (CH₃).

LC/MS t_R = 13,05 min (99,5 % AUC); **MS** *m/z* 340,8 [M + H]⁺.

(117) 6-Methyl-2-(4-chlorophenyl)-N-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **108** (0,037 g, 0,15 mmol) und *m*-Anisidin (20,0 μ L, 0,022 g, 0,18 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,045 g, 0,14 mmol, 93 % d. Th.).

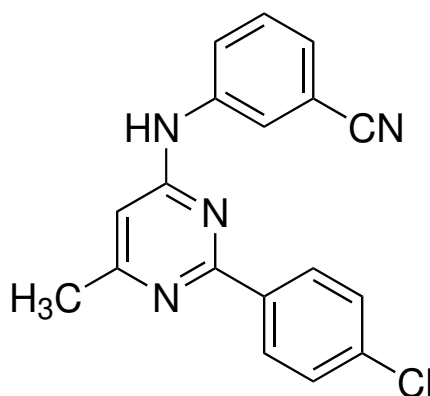
Smp.: 258–261 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,89 (s, 1H, NH), 8,29 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,69 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,44 (s, 1H, ArH), 7,33 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 1H, ArH), 7,25 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 1H, ArH), 6,84 (s, 1H, PyrH), 6,77 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,5$ Hz, 1H, ArH), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,52 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,76 (C_q), 159,63 (C_q), 159,10 (C_q), 139,25 (C_q), 137,21 (C_q), 130,19 (2x CH), 129,80 (CH), 128,90 (2x CH), 113,52 (CH), 110,25 (CH), 106,83 (CH), 104,02 (CH), 55,13 (CH₃), 20,56 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 12,63$ min (97,7 % AUC); **MS** m/z 325,9 [M + H]⁺.

(118) 3-((2-(4-chlorophenyl)-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzonnitril



wurde aus **108** (0,035 g, 0,15 mmol) und 3-Aminobenzonnitril (0,025 g, 0,21 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,035 g, 0,11 mmol, 73 % d. Th.).

Smp.: 272–276 °C

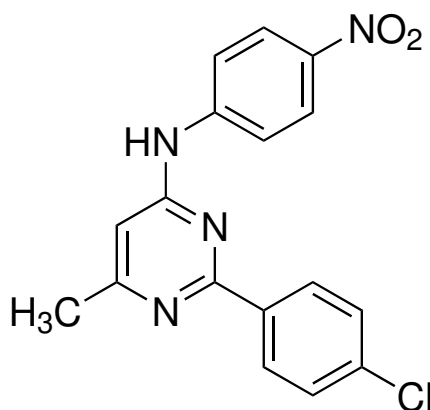
^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,24 (s, 1H, NH), 8,27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 8,19 (t, $^4J_{\text{HH}} = 1,8$ Hz, 1H, ArH), 8,10–8,01 (m, 1H, ArH), 7,66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,63 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, 1H, ArH), 7,59 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,4$ Hz, 1H, ArH), 6,90 (s, 1H, PyrH), 2,53 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161,30 (C_q), 160,76 (C_q), 159,82 (C_q), 139,51 (C_q), 136,96 (C_q), 133,16 (C_q), 130,47 (CH), 130,10 (2x CH), 128,94 (2x CH), 127,23 (CH), 125,58 (CH), 123,80

(CH), 118,67 (C_q), 111,81 (C_q), 104,45 (CH), 21,39 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,59 min (95,4 % AUC); MS m/z 320,9 [M + H]⁺.

(119) 6-Methyl-2-(4-chlorophenyl)-N-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



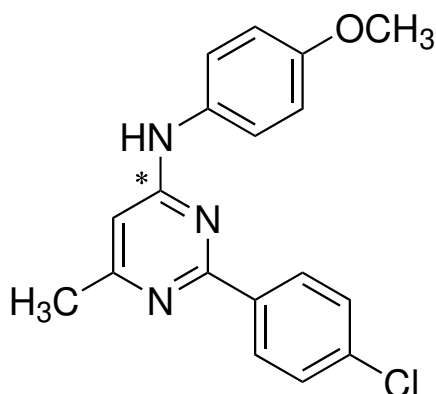
wurde aus **108** (0,033 g, 0,14 mmol) und 4-Nitroanilin (0,021 g, 0,15 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,020 g, 0,06 mmol, 43 % d. Th.).

Smp.: 274–276 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,06 (s, 1H, NH), 8,35 (d, ³J_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 8,30 (d, ³J_{HH} = 9,1 Hz, 2H, ArH), 8,07 (d, ³J_{HH} = 9,1 Hz, 2H, ArH), 7,64 (d, ³J_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,91 (s, 1H, PyrH), 2,51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,23 (C_q), 160,46 (C_q), 160,39 (C_q), 145,71 (C_q), 141,61 (C_q), 136,45 (C_q), 134,12 (C_q), 130,07 (2x CH), 128,86 (2x CH), 125,10 (2x CH), 119,51 (2x CH), 105,44 (CH), 22,27 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,87 min (98,8 % AUC); MS m/z 340,7 [M + H]⁺.

(120) 6-Methyl-2-(4-chlorphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin

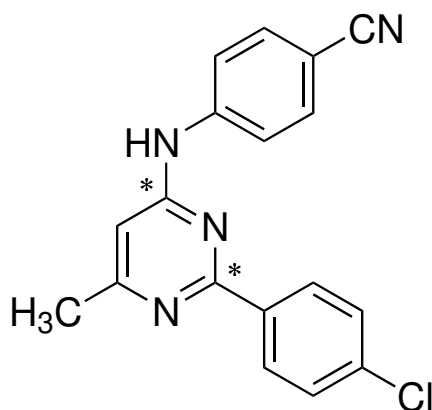
wurde aus **108** (0,077 g, 0,32 mmol) und *p*-Anisidin (0,039 g, 0,32 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,062 g, 0,19 mmol, 59 % d. Th.).

Smp.: 262 – 266 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,06 (s, 1H, NH), 8,26 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,71 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,59 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,78 (s, 1H, PyrH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 2,52 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,44 (C_q), 156,72 (C_q), 137,62 (C_q), 136,36 (C_q), 130,44 (2x CH), 130,26 (C_q), 129,62 (2x CH), 128,99 (2x CH), 128,77 (C_q), 128,66 (2x CH), 114,32 (CH), 55,32 (CH₃), 23,25 (CH₃).

LC/MS *t*_R = 11,93 min (96,6 % AUC); **MS** *m/z* 325,9 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 329,2 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(121) 4-((2-(4-chlorophenyl)-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzonnitril

wurde aus **108** (0,038 g, 0,16 mmol) und 4-Aminobenzonitril (0,025 g, 0,21 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,013 g, 0,04 mmol, 25 % d. Th.).

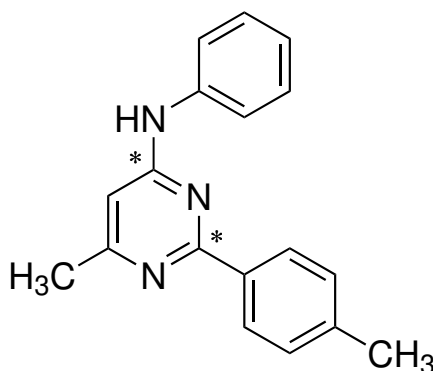
Smp.: 251 – 253 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,04 (s, 1H, NH), 8,32 (d, ³*J*_{HH} = 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,99 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,84 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,64 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,90 (s, 1H, PyrH), 2,51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,54 (C_q), 160,08 (C_q), 143,30 (C_q), 136,67 (C_q), 133,28 (2x CH), 130,11 (2x CH), 128,86 (2x CH), 120,34 (2x CH), 119,09 (C_q), 105,11 (CH), 104,68 (C_q), 21,76 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,34 min (95,3 % AUC); **MS** *m/z* 320,9 [M + H]⁺.

(122) 6-Methyl-2-(*p*-tolyl)-*N*-phenylpyrimidin-4-amin



wurde aus **109** (0,043 g, 0,20 mmol) und Anilin (20,0 μL, 0,020 g, 0,22 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,036 g, 0,13 mmol, 65 % d. Th.).

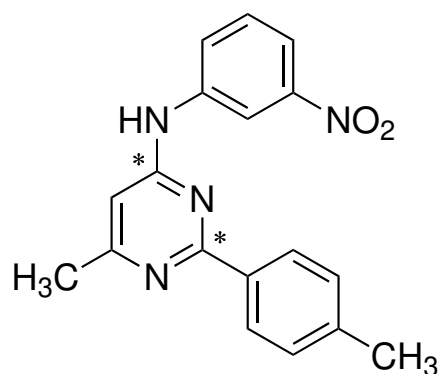
Smp.: 257 – 260 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,43 (s, 1H, NH), 8,20 (d, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2H, ArH), 7,74 (d, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 2H, ArH), 7,50 – 7,39 (m, 4H, ArH), 7,23 (t, ³*J*_{HH} = 7,4 Hz, 1H, ArH), 6,92 (s, 1H, PyrH), 2,57 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,76 (C_q), 159,04 (C_q), 143,46 (C_q), 137,48 (C_q), 129,60 (CH), 129,49 (2x CH), 129,02 (2x CH), 128,84 (CH), 128,75 (2x CH), 125,09 (CH), 121,88 (CH), 21,10 (CH₃), 19,37 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,20 min (97,8 % AUC); MS m/z 275,9 $[M + H]^+$.

(123) 6-Methyl-2-(*p*-tolyl)-*N*-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **109** (0,032 g, 0,15 mmol) und 3-Nitroanilin (0,027 g, 0,20 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,035 g, 0,11 mmol, 73 % d. Th.).

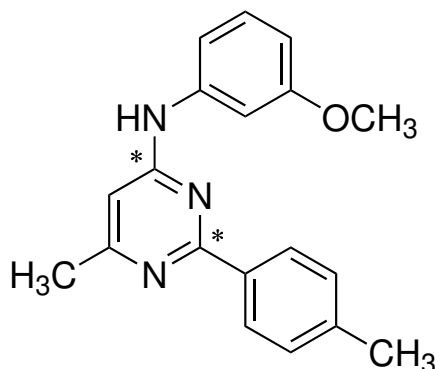
Smp.: 294 – 297 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,47 (s, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, ArH) 8,27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, 2H, ArH), 8,04 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,2$ Hz, 1H, ArH), 7,99 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,5$ Hz, 1H, ArH), 7,70 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, 1H, ArH), 7,42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 2H, ArH), 6,92 (s, 1H, PyrH), 2,56 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 160,71 (C_q), 159,84 (C_q), 147,98 (C_q), 143,20 (C_q), 139,58 (C_q), 130,26 (CH), 129,49 (2x CH), 128,66 (2x CH), 126,73 (CH), 118,36 (CH), 115,11 (CH), 104,66 (CH), 21,10 (CH₃), 20,38 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,60 min (98,7 % AUC); MS m/z 320,9 $[M + H]^+$.

(124) 6-Methyl-2-(*p*-tolyl)-*N*-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **109** (0,031 g, 0,14 mmol) und *m*-Anisidin (20,0 μ L, 0,022 g, 0,18 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,035 g, 0,11 mmol, 79 % d. Th.).

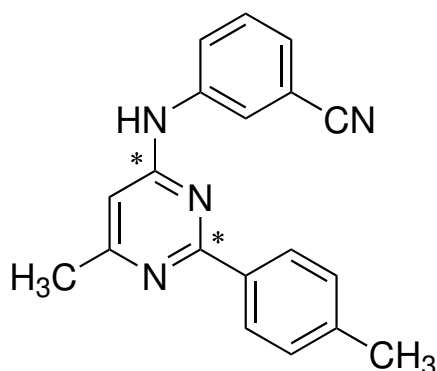
Smp.: 259–262 °C

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,26 (s, 1H, NH), 8,20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, 2H, ArH), 7,50 (s, 1H, ArH), 7,43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 2H, ArH), 7,34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 1H, ArH), 7,28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, 1H, ArH), 6,89 (s, 1H, PyrH), 6,79 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,5$ Hz, 1H, ArH), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,55 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,80 (C_q), 159,65 (C_q), 142,93 (C_q), 139,11 (C_q), 129,83 (CH), 129,46 (2x CH), 128,49 (2x CH), 113,61 (CH), 110,35 (CH), 107,04 (CH), 103,73 (CH), 55,14 (CH₃), 21,08 (CH₃), 20,15 (CH₃).

^{13}C -APT NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 160,89 (C_q), 159,71 (C_q), 159,41 (C_q), 143,42 (C_q), 138,92 (C_q), 129,96 (CH), 129,59 (2x CH), 128,63 (2x CH), 113,90 (CH), 110,77 (CH), 107,35 (CH), 55,22 (CH₃), 21,15 (CH₃), 19,76 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 11,98$ min (96,4 % AUC); **MS** m/z 305,9 [M + H]⁺.

(125) 3-((6-Methyl-2-(*p*-tolyl)pyrimidin-4-yl)amino)benzonnitril

wurde aus **109** (0,032 g, 0,15 mmol) und 3-Aminobenzonnitril (0,023 g, 0,19 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,019 g, 0,06 mmol, 40 % d. Th.).

Smp.: 272–275 °C

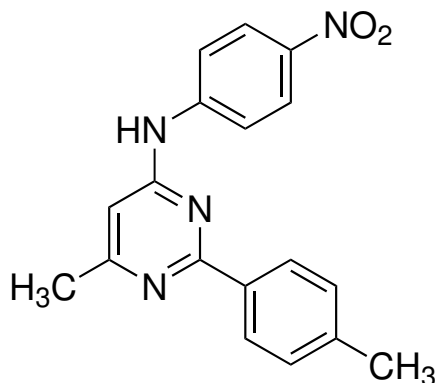
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,94 (s, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, ArH), 8,17 (d, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 2H, ArH), 8,01 (d, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 1H, ArH), 7,63 (t, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,59 (d, ³*J*_{HH} = 7,7 Hz, 1H, ArH), 7,40 (d, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 2H, ArH), 6,81 (s, 1H, PyrH), 2,51 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,87 (C_q), 160,06 (C_q), 143,07 (C_q), 139,11 (C_q), 130,50 (CH), 129,56 (2x CH), 128,52 (2x CH), 127,73 (CH), 125,98 (CH), 124,29 (CH), 118,61 (C_q), 111,82 (C_q), 104,18 (CH), 21,12 (CH₃), 20,48 (CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,71 (C_q), 142,39 (C_q), 139,54 (C_q), 130,41 (CH), 129,43 (2x CH), 128,29 (2x CH), 127,01 (CH), 125,39 (CH), 123,70 (CH), 118,68 (C_q), 111,73 (C_q), 104,12 (CH), 21,08 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,15 min (95,7 % AUC); **MS** *m/z* 300,9 [M + H]⁺.

(126) 6-Methyl-2-(*p*-tolyl)-*N*-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **109** (0,036 g, 0,16 mmol) und 4-Nitroanilin (0,027 g, 0,20 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,033 g, 0,10 mmol, 63 % d. Th.).

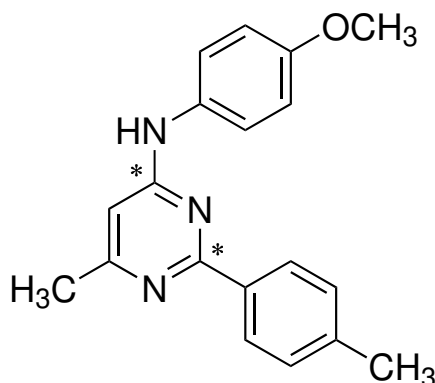
Smp.: >300 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,79 (s, 1H, NH), 8,27 (d, ³*J*_{HH} = 9,3 Hz, 2H, ArH), 8,22 (d, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, 2H, ArH), 8,04 (d, ³*J*_{HH} = 9,1 Hz, 2H, ArH), 7,39 (d, ³*J*_{HH} = 7,6 Hz, 2H, ArH), 6,86 (s, 1H, PyrH), 2,52 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,45 (C_q), 145,56 (C_q), 141,77 (C_q), 129,45 (2x CH), 128,35 (2x CH), 125,13 (2x CH), 119,66 (2x CH), 105,00 (CH), 25,47 (CH₃), 21,10 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,43 min (96,8 % AUC); **MS** *m/z* 320,9 [M + H]⁺.

(127) 6-Methyl-2-(*p*-tolyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **109** (0,085 g, 0,39 mmol) und *p*-Anisidin (0,048 g, 0,39 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,068 g, 0,22 mmol, 56 % d. Th.).

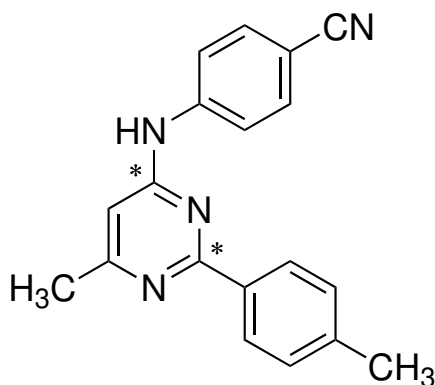
Smp.: 260–266 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,35 (s, 1H, NH), 8,17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, 2H, ArH), 7,62 (s, 2H, ArH), 7,64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 2H, ArH), 7,03 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 2H, ArH), 6,81 (s, 1H, PyrH), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,54 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158,79 (C_q), 156,74 (C_q), 151,64 (C_q), 143,54 (C_q), 129,50 (4x CH), 128,73 (4x CH), 128,43 (C_q), 114,28 (CH), 55,32 (CH₃), 21,10 (CH₃), 19,10 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 11,83$ min (96,1 % AUC); MS m/z 305,8 [M + H]⁺.

(128) 4-((2-(*p*-tolyl)-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzonitril



wurde aus **109** (0,040 g, 0,18 mmol) und 4-Aminobenzonitril (0,023 g, 0,19 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,040 g, 0,13 mmol, 72 % d. Th.).

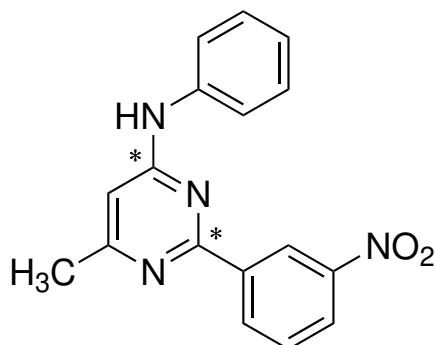
Smp.: 274–277 °C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,62 (s, 1H, NH), 8,20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, 2H, ArH), 8,02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, ArH), 7,00 (s, 1H, PyrH), 2,57 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C-APT NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160,73 (C_q), 159,90 (C_q), 143,12 (C_q), 142,58 (C_q), 133,28 (2x CH), 129,52 (2x CH), 128,72 (2x CH), 121,03 (2x CH), 118,92 (C_q), 105,66 (C_q), 104,91 (CH), 21,11 (CH₃), 20,24 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 11,95$ min (95,3 % AUC); MS m/z 300,9 [M + H]⁺.

(129) 6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-*N*-phenylpyrimidin-4-amin



wurde aus **110** (0,084 g, 0,34 mmol) und Anilin (31,0 μ L, 0,032 g, 0,34 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,076 g, 0,25 mmol, 74 % d. Th.).

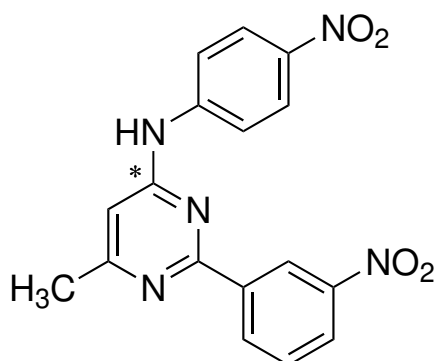
Smp.: 245 – 247 °C

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,50 (s, 1H, NH), 9,09 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H, ArH), 8,71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 1H, ArH), 8,42 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1,6$ Hz, 1H, ArH), 7,86 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, 1H, ArH), 7,72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 2H, ArH), 7,43 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz, 2H, ArH), 7,16 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,3$ Hz, 1H, ArH), 6,80 (s, 1H, PyrH), 2,49 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -APT NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 160,81 (C_q), 158,99 (C_q), 148,06 (C_q), 138,57 (C_q), 134,16 (CH), 130,41 (2x CH), 128,94 (2x CH), 125,83 (CH), 123,86 (CH), 122,68 (CH), 121,05 (CH), 104,12 (CH), 21,84 (CH₃).

LC/MS $t_{\text{R}} = 11,70$ min (95,1 % AUC); **MS** m/z 307,0 [M + H]⁺.

(130) 6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-*N*-(4-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **110** (0,032 g, 0,13 mmol) und 4-Nitroanilin (0,018 g, 0,13 mmol) hergestellt (gelber Feststoff, 0,025 g, 0,07 mmol, 54 % d. Th.).

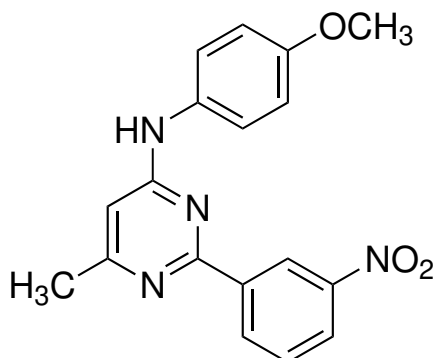
Smp.: >300 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,37 (s, 1H, NH), 9,10 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 8,75 (d, ³*J*_{HH} = 7,8 Hz, 1H, ArH), 8,37 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,4 Hz, 1H, ArH), 8,27 (d, ³*J*_{HH} = 9,2 Hz, 2H, ArH), 8,02 (d, ³*J*_{HH} = 9,2 Hz, 2H, ArH), 7,90–7,77 (m, 1H, ArH), 6,78 (s, 1H, PyrH), 2,49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,42 (C_q), 166,37 (C_q), 160,10 (C_q), 148,17 (C_q), 146,39 (C_q), 139,07 (C_q), 133,79 (CH), 130,42 (CH), 130,27 (CH), 125,07 (2x CH), 122,13 (CH), 118,68 (2x CH), 105,83 (CH), 23,81 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,92 min (97,6 % AUC); **MS** *m/z* 351,8 [M + H]⁺.

(131) 6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **110** (0,029 g, 0,12 mmol) und *p*-Anisidin (0,015 g, 0,12 mmol) hergestellt (gelber Feststoff, 0,008 g, 0,02 mmol, 17 % d. Th.).

Smp.: 263–265 °C

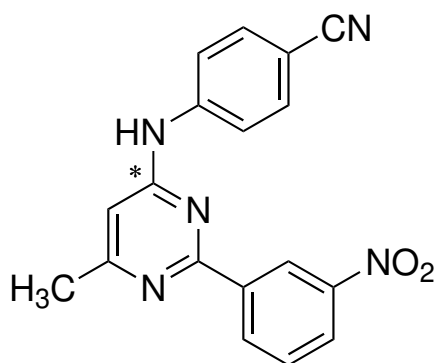
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,72 (s, 1H, NH), 9,06 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 8,68 (d, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 8,46 (dd, ³*J*_{HH} = 8,3 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,4 Hz, 1H, ArH), 7,89 (t, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,57 (s, 2H, ArH), 7,02 (d, ³*J*_{HH} = 9,0 Hz, 2H, ArH), 6,76 (s, 1H, PyrH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 2,51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,23 (C_q), 148,02 (C_q), 134,46 (CH), 130,52 (2x CH),

126,36 (CH), 123,00 (CH), 114,28 (2x CH), 55,32 (CH₃), 20,70 (CH₃).

LC/MS $t_R = 11,88$ min (95,3 % AUC); MS m/z 336,7 [M + H]⁺.

(132) 4-((6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-yl)amino)benzonnitril



wurde aus **110** (0,076 g, 0,30 mmol) und 4-Aminobenzonnitril (0,039 g, 0,33 mmol) hergestellt und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert (beiger Feststoff, 0,078 g, 0,24 mmol, 80 % d. Th.).

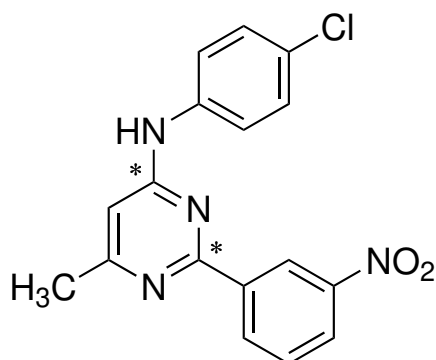
Smp.: 280–282 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,31 (s, 1H, NH), 9,10 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 8,73 (dt, ³*J*_{HH} = 7,8 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,3 Hz, 1H, ArH), 8,38 (ddd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2,5 Hz, ⁵*J*_{HH} = 1,0 Hz, 1H, ArH), 7,97 (d, ³*J*_{HH} = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,85 (d, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,82 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 6,79 (s, 1H, PyrH), 2,48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,69 (C_q), 160,33 (C_q), 148,18 (C_q), 144,10 (C_q), 138,91 (C_q), 133,77 (CH), 133,22 (2x CH), 130,41 (CH), 125,17 (CH), 122,19 (CH), 119,52 (2x CH), 119,24 (C_q), 105,47 (CH), 103,64 (C_q), 23,56 (CH₃).

LC/MS $t_R = 11,46$ min (99,2 % AUC); MS m/z 331,9 [M + H]⁺.

(133) 6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-N-(4-chlorphenyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **110** (0,072 g, 0,29 mmol) und 4-Chloranilin (0,043 g, 0,34 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,060 g, 0,18 mmol, 62 % d. Th.).

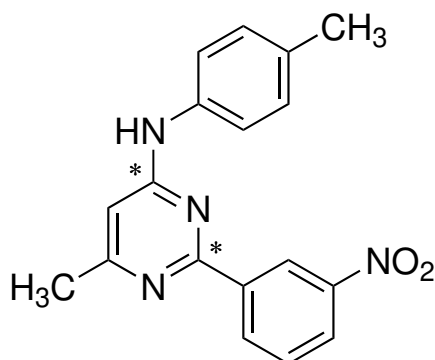
Smp.: 241 – 243 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,67 (s, 1H, NH), 9,08 (t, ⁴*J*_{HH} = 1,9 Hz, 1H, ArH), 8,70 (d, ³*J*_{HH} = 7,8 Hz, 1H, ArH), 8,43 (dd, ³*J*_{HH} = 8,1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,8 Hz, 1H, ArH), 7,87 (t, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,76 (d, ³*J*_{HH} = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,46 (d, ³*J*_{HH} = 8,8 Hz, 2H, ArH), 6,82 (s, 1H, PyrH), 2,50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,66 (C_q), 159,02 (C_q), 148,07 (C_q), 137,62 (C_q), 134,25 (CH), 130,49 (2x CH), 128,79 (2x CH), 127,40 (C_q), 125,91 (CH), 122,72 (CH), 122,53 (CH), 104,48 (CH), 21,82 (CH₃).

LC/MS t_R = 12,23 min (99,1 % AUC); **MS** *m/z* 340,8 [M + H]⁺, **MS** *m/z* 344,0 [M + H]⁺ (³⁷Cl).

(134) 6-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-*N*-(*p*-tolyl)pyrimidin-4-amin



wurde aus **110** (0,082 g, 0,33 mmol) und *p*-Toluidin (0,040 g, 0,37 mmol) hergestellt (farbloser Feststoff, 0,049 g, 0,15 mmol, 45 % d. Th.).

Smp.: 255 – 256 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,84 (s, 1H, NH), 9,07 (t, ⁴*J*_{HH} = 2,0 Hz, 1H, ArH), 8,70 (d, ³*J*_{HH} = 7,9 Hz, 1H, ArH), 8,46 (dd, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1,6 Hz, 1H, ArH), 7,89 (t, ³*J*_{HH} = 8,0 Hz, 1H, ArH), 7,58 (d, ³*J*_{HH} = 6,1 Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, ArH), 6,83 (s, 1H, PyrH), 2,52 (s, 3H, CH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃).

¹³C-APT NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,78 (C_q), 158,24 (C_q), 148,02 (C_q), 135,38 (C_q), 134,48 (CH), 133,80 (C_q), 130,51 (2x CH), 129,44 (2x CH), 126,36 (CH), 123,03 (CH), 121,64 (CH), 103,36 (CH), 20,82 (CH₃), 20,51 (CH₃).

LC/MS t_R = 11,97 min (98,8 % AUC); **MS** *m/z* 320,9 [M + H]⁺.

8.2 Biologische Untersuchungen

8.2.1 Materialien

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Calcein-AM	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-dihydrat	Merck
CASYton-Elektrolytlösung	Schärfe System
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich
D-Glukose-monohydrat	Merck
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Fluka
Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich
HEPES	Appllichem
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Ko143	Tocris
L-Glutamin (0,2 M-Lösung)	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Appllichem
Nährmedium DMEM, phenolrothaltig	Sigma-Aldrich
Nährmedium RPMI-1640, phenolrothaltig	PAN Biotech
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Appllichem
Natronlauge (1 M-Lösung)	Grüssing
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10^4 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin in 0,9%iger NaCl-Lösung)	Sigma-Aldrich
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
Thiazolylblau-tetrazoliumbromid (MTT)	Appllichem
Trypsin/EDTA-Lösung, phenolrothaltig (0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA)	PAN Biotech
XR9577	synthetisiert von Dr. S. C. Köhler[389]

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
CASY-Röhrchen mit Deckel	Schärfe System
Kryoröhrchen mit Schraubverschluss (aus PP)	Greiner bio-one
Membranfilter (steril, Porengröße 0,2 µm)	Whatman
Mikrotiterplatten (aus PS, klar, 96 Vertiefungen mit flachem Boden)	Greiner bio-one
Mikrotiterplatten (aus PS, schwarz, 96 Vertiefungen mit flachem Boden)	Nunc
Pasteurpipetten (aus Glas, 230 mm Länge)	VWR
Pipetten, serologisch (aus PS, steril, pyrogenfrei, 10 oder 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (aus PP, 0,1 – 10,0 µL)	Starlab
Pipettenspitzen (aus PP, 0,2, 1,0 oder 5,0 ml)	Starlab
Reagentienreservoir, steril	Roth
Reagentienreservoir, unsteril	Roth
Spritzen (aus PP, steril, pyrogenfrei, 10 oder 20 ml)	B. Braun
Gewebekulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss (aus PS, 25 cm ² , 75 cm ² Fläche, steril)	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen (aus PP, steril, 15 oder 50 ml)	Greiner bio-one

Gerätschaften

Gerät	Hersteller
Absaugvorrichtung mit Pumpe	Vacuubrand
Autoklav Systec VX-95	Systec
elektronische Feinwaage R160P	Sartorius
elektronische Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
elektronische 8-Kanalpipette (10 – 200 µL)	Brand
elektronische 12-Kanalpipette (15 – 300 µL)	Eppendorf
Heizblockthermostat ThermoStat plus	Eppendorf
Inkubator	IBS Integra Bioscience
Kohlendioxid-Gasflasche	Air liquide
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Magnetrührer RH basic	IKA Labortechnik
Mikrotiterplattenfluorometer FLUOstar Optima	BMG Lab Tech.
Mikrotiterplattenfluorometer POLARstar Galaxy	BMG Lab Tech.

Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf
Pipetten unterschiedlicher Volumina	Eppendorf
Sicherheitswerkbank Safe 2010	Holten LaminAir
Vortexschüttler Minishaker	IKA Labortechnik
Wasserbad (Typ 1083)	Gesellschaft für Labortechnik
Zellzähler CASY1Modell TT	Schärfe System
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman

8.2.2 Zellkulturarbeit

Die Zellkulturarbeit wurde unter sterilen Bedingungen und Verwendung einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Alle zur Kultivierung verwendeten Mittel wurden entweder steril gekauft oder unter sterilen Bedingungen zubereitet, um Bakterienwachstum und andere Kontaminationen zu vermeiden.

MDCK II Wildtyp und ABCG2 transfizierte Zelllinien

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2 wurde die MDCK II-Zelllinie (Madin-Darby-Hundenierenzellen) herangezogen. Die aus Hundenieren stammenden sensitiven MDCK II Wildtyp- und MDCK II BCRP Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. A. Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die MDCK II BCRP-Zellen wurden durch Transfektion der caninen Nierenepithelzelllinie MDCK II mit humaner ABCG2-cDNS erzeugt. Die verwendete cDNS war zudem am C-terminalen Ende mit dem Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verbunden.

Inkulturnahme

Zum Auftauen der Zellen wurde zunächst das in flüssigem Stickstoff gelagerte Kryoröhrchen entnommen und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Sobald sich der Inhalt verflüssigt hatte, wurde die erhaltene Zellsuspension sofort zusammen mit 20 ml Zellkulturmedium in eine T75-Gewebekulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden für ein bis zwei weitere Passagen kultiviert, bevor sie in der biologischen Testung verwendet wurden.

Zellkultur

Für die Zellkultur der MDCK Zelllinien wurde das Nährmedium des Typs [Dulbecco's modified Eagle medium \(DMEM\)](#) verwendet. Dieses enthielt 10 % fötales Kälberserum, Streptomycin (50 µg/ml), Penicillin G (50 U/ml) und L-Glutamin (2 mmol/L). Die Zellen wurden, je nach Zellzahl, in T75- oder T175-Gewebekulturflaschen mit 20 bzw. 30 ml Kulturmedium in einer 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % bei 37 °C in einem Inkubator in Kultur gehalten. Bei

einer Konfluenz von 80–90 % wurden die Zellen geerntet und weiter kultiviert. Zusätzlich wurde durch optische Kontrolle der Säuregehalt des Mediums kontrolliert. Der dem Medium zugesetzte Indikator Phenylrot wechselte bei pH-Veränderungen in den sauren Bereich die Farbe von rosa zu gelb. Die Zellen wurden maximal für 25–30 Zyklen passagiert, da sich die Messergebnisse darüber hinaus erfahrungsgemäß verschlechterten.

Passagieren

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte ab einer Konfluenz der Zellen von 80–90 % in einer sterilen Werkbank mit laminarem Luftstrom. Das alte Medium wurde abgesaugt und die verbliebenen Zellen mehrmals durch Zugabe von 5 ml PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach Entfernen des Puffers wurden 3–5 ml Trypsinlösung, je nach Größe der Kulturflasche, zugegeben und die Zellen für 10 Minuten inkubiert, um diese vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten wurden 7–10 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen nach Resuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Zur Sedimentation der Zellen wurde das Zentrifugenröhrchen bei 1 200 U/min für 4 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vom gebildeten Zellpellet abgesaugt und dieses in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte so weiter kultiviert oder für die biologische Testung verwendet werden. Die Zellzahl wurde mit einem CASY1 Modell TT durchgeführt. Dafür wurden 20 µL der Zellsuspension mit 10 ml steril gefilterter Casyton-Lösung gemischt und vermessen. Hierzu wird der elektrische Widerstand der Suspension vermessen, welche mit definiertem Volumen bei einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare mit definiertem Durchmesser (150 µm) fließt. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Größe (8–40 µm) gezählt. Durch diesen Größenbereich können Zelltrümmer und Agglomerate ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde die benötigte Zellmenge zur weiteren Kultivierung in eine neue Kulturflasche der gewünschten Größe mit frischem Medium (20–25 ml) überführt und in den Inkubator gestellt. Für die Verwendung in den biologischen Assays wurde das benötigte Volumen der Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mehrmals mit [Krebs-HEPES-Puffer \(KHP\)](#) gewaschen, um schließlich eine Zellsuspension zu erhalten, die für die biologische Testung verwendet werden konnte.

A2780 Adr (ABCB1 exprimierende Zellen)

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie A280 Adr (A2780ADR (ECACC 93112520)) wurde von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)* bezogen. Die Zellen zeigen eine Überexpression von ABCB1, sowie eine Resistenz gegenüber Doxorubicin.

Zellkultur

Die Zellkultur der A2780 Adr Zellen erfolgte mit dem Nährmedium RPMI-1640, welchem 10 % fötales Kälberserum, Streptomycin (50 µg/ml), Penicillin G (50 U/ml) und L-Glutamin (2 mmol/L) zugesetzt wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter einer 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchte von 95 % und bei 37 °C.

Subkultivierung

Das Passagieren der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 8.2.2 beschrieben. Nach einer Ablösezeit von 2–5 Minuten wurden 4–6 Millionen Zellen in neue Gewebekulturflaschen mit frischem Medium überführt. Um die Überexpression von ABCB1 zu gewährleisten, wurden die Zellen regelmäßig (ca. alle 10 Passagen) mit Doxorubicin (0,1 µmol/L) während einer Passage behandelt. Änderungen des pH-Wertes des Mediums konnten durch Zusatz des Indikators Phenylrot optisch kontrolliert werden.

H69 AR (ABCC1 exprimierende Zellen)

Die aus dem kleinzelligen Lungenkarzinom stammende Zelllinie H69 AR (ATCC[®] CRL-11351[™]) wurde von der *American Type Culture Collection (ATCC)* bezogen. Resistente H69 AR Zellen wurden aus NCI-H69-Zellen hergestellt, die in Gegenwart von zunehmenden Konzentrationen von Doxorubicin über 14 Monate gewachsen sind.

Zellkultur

Die Zellen wurden mit RPMI-1640-Medium, welches 20 % fötales Kälberserum, Streptomycin (50 µg/ml), Penicillin G (50 U/ml) und L-Glutamin (2 mmol/L) enthielt unter einer mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % bei 37 °C in Kultur gehalten. Die Ansäuerung des Mediums durch zelluläre Prozesse wurde zusätzlich visuell kontrolliert. Das Nährmedium wurde täglich gewechselt.

Subkultivierung

Die Passagierung der Zellen erfolgte gemäß den im Abschnitt 8.2.2 beschriebenen Bedingungen. Nach einer Ablösezeit von 3–5 Minuten wurden mindestens 10 Millionen Zellen zur weiteren Kultivierung in Gewebekulturflaschen mit frischem Medium überführt, da sonst kein inselartiges Zellwachstum zu verzeichnen war.

8.2.3 Zellbasierte Assays

Stammlösungen

Für alle zellbasierten Assays wurden Stammlösungen der Testverbindungen unter Verwendung von DMSO mit einer Endkonzentration von 10^{-2} mol/l hergestellt. Die so hergestellten Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert und für eine Versuchsreihe in einem Heizblockthermostat bei 37°C aufgetaut. Die Verdünnungen der Stammlösungen wurde mit steril gefiltertem KHP durchgeführt. Für Verbindungen mit geringer Löslichkeit im Puffer wurde Methanol hinzugefügt. Die Endkonzentration betrug weniger als 5 % MeOH in der höchsten Konzentration der entsprechenden Verdünnungsreihe. Ebenso betrug die Konzentration an DMSO weniger als 0,1 % in der höchsten Konzentration der jeweiligen Verdünnungsreihe.

Verdünnungsreihen

Fluoreszenzfarbstoffe (Substrate)

Aus der Stammlösung von Hoechst 33342 (10 mmol/l) wurden zunächst 10 μl entnommen und mit 990 μl KHP aufgefüllt, um auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l zu kommen. Die Konzentration der Stammlösung von Calcein AM betrug 1 mmol/l. Die für die biologischen Assays benötigten Substratkonzentrationen an Fluoreszenzfarbstoff wurden dann folgenderweise hergestellt:

Tabelle 8.3: Herstellung der Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe für die biologische Testung.

Anzahl Platten	Volumina μl			
	Hoechst 33342 (0,1 mmol/l)	KHP	Calcein AM (1 mmol/l)	KHP
1	225	2025	10	3190
2	450	4050	15	4785
3	675	6075	25	7975

Modulator

In den biologischen Assays betrug die höchste Konzentration einer Substanz auf der Platte 10^{-5} mol/l. Bei der Herstellung dieser Konzentration wurde Methanol (bis zu 49 Vol.-%) verwendet, um eine Präzipitation in der Pufferlösung während des Assays zu vermeiden. Die Konzentrationen wurden nach Auswertung der IC_{50} -Werte an die jeweilige Substanz angepasst. Dies war insbesondere für sehr aktive Verbindungen notwendig, um einen kompletten Kurvenverlauf und eine gleichmäßige Verteilung der Messwerte um den IC_{50} -Wert herum zu gewährleisten.

Tabelle 8.4: Pipettierschema zur Herstellung der Verdünnungsreihen der Modulatoren.

Zielverdünnung [log(10 ^{-x} mol/l)]	Volumina µl			Endkonz. auf der Platte [log(10 ^{-x} mol/l)]
	Modulator (10 ^{-x} mol/l)	KHP	Methanol	
-4,0	10 (10 ⁻²)	590	400	-5,0
-4,25	224 (10 ⁻⁴)	176	-	-5,25
-4,4	199 (10 ⁻⁴)	301	-	-5,4
-4,5	158 (10 ⁻⁴)	342	-	-5,5
-4,75	89 (10 ⁻⁴)	411	-	-5,75
-5,0	50 (10 ⁻⁴)	450	-	-6,0
-5,25	50 (10 ^{-4,25})	450	-	-6,25
-5,5	50 (10 ^{-4,5})	450	-	-6,5
-5,75	50 (10 ^{-4,75})	450	-	-6,75
-6,0	50 (10 ⁻⁵)	450	-	-7,0
usw.				

Pufferlösungen

Herstellung des Krebs-HEPES-Puffer (KHP)

Für die meisten zellbasierten Assays wurde der Krebs-HEPES-Puffer (KHP) verwendet. Sowohl die Verdünnungsreihen als auch die verwendete Zellsuspension wurden mit KHP hergestellt, um eine entsprechende Zellvitalität während der Assays zu gewährleisten. KHP enthält keine Zusätze von Farbstoffen oder Enzymen, die den entsprechenden Test beeinflussen könnten. Die Herstellung des KHP wurde mit den Chemikalien durchgeführt, welche in Tabelle 8.5 aufgelistet sind. Aus diesen ergab sich eine 5-fach konzentrierte Lösung, die bei -20 °C gelagert wurde. Für die Herstellung des Krebs-HEPES-Puffer

Tabelle 8.5: Chemikalien für die Herstellung eines Krebs-HEPES-Puffer.

Chemikalie	Molekulargewicht [g/mol]	Konz. (5-fache Lösung) [mmol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	58,44	593,00	17,330
Kaliumchlorid	74,55	5,64	0,876
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	6,00	0,408
Natriumhydrogencarbonat	84,01	21,00	0,882
D-Glucose-monohydrat	198,17	58,50	5,796
HEPES	238,31	50,00	5,958

wurden die in Tabelle 8.5 aufgelisteten Chemikalien in einen 500 ml Maßkolben eingewogen und mit 450 ml demineralisiertem Wasser versetzt. Die Mischung wurde auf einem Magnetrührer bis zur vollständigen Auflösung der Bestandteile gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Der Messkolben wurde dann mit demineralisiertem Wasser auf das

Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Der erhaltene 5-fache KHP-Puffer wurde zu Aliquoten von je 50 ml abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Die Herstellung von einfachem KHP wurde durchgeführt indem 100 ml des 5-fachen Puffers in einen 500 ml Messkolben überführt wurden. Die Lösung wurde dann mit 650 μL 1 M Calciumchloridlösung (Endkonzentration 2,50 mmol/l) versetzt und 350 ml demineralisiertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde geschüttelt und 600 μl 1 M Magnesiumsulfat-Heptahydratlösung (Endkonzentration 1,20 mmol/l) hinzugefügt. Anschließend wurde mit demineralisiertem Wasser bis auf das Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Der so erhaltene einfache Puffer wurde unter Verwendung eines Membranfilters (0,2 μm) steril filtriert, zu Aliquoten von je 50 ml abgefüllt und für die spätere Verwendung in den biologischen Assays bei -20°C eingefroren.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Die zum Waschen und Verdünnen der Zellkulturen benutzte [phosphatgepufferte Kochsalzlösung \(PBS\)](#) wurde von der Firma *Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)* in der Qualität PREMIUM bezogen. Die steril-gefilterten 1 000 ml Flaschen wurden bei -4°C gelagert und unter sterilen Bedingungen verwendet.

Hoechst 33342 Akkumulationsassay

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol-trihydrochlorid) besitzt die Eigenschaft sich an die DNA von Zellen zu binden. Im ungebundenen Zustand besitzt das Bisbenzimidazol-Derivat Hoechst 33342 eine Anregungswellenlänge von ca. 340 nm und eine Emissionswellenlänge von etwa 510 nm. Durch die Interaktion mit der DNA verschieben sich Anregungs- und Emissionswellenlänge zu 355 nm bzw. 465 nm. Des Weiteren erhöht sich bei diesem Prozess die Fluoreszenzintensität um den Faktor 750–1 500.[432–436] Die hohe Lipophilie von Hoechst 33342 ermöglicht es dem Molekül sich leicht in die Zellmembran einzulagern bzw. diese zu überwinden und in den intrazellulären Raum zu gelangen. Hoechst 33342 ist ein Substrat von ABCB1 und ABCG2 und eignet sich daher zur Charakterisierung dieser Transportproteine und findet in funktionellen Assays seine Anwendung. Die erwähnte Zunahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle korreliert dabei mit der Konzentrationszunahme von Hoechst 33342 im Zellinneren. Die erhöhte Expression der Transportproteine in den resistenten Zelllinien führt dazu, dass Hoechst 33342 von diesen als Substrat erkannt wird und vermehrt aus dem Zellinneren bzw. aus der Zellmembran in den extrazellulären Raum heraustransportiert wird. Im Vergleich zum Wildtyp zeichnen sich die resistenten Zellen durch eine wesentlich geringere Fluoreszenz aus, wenn sie mit Hoechst 33342 behandelt werden.

Versetzt man nun die resistenten Zellen mit einem Inhibitor des entsprechenden Transportproteins wird dieses in seiner Funktion gehemmt. Dadurch kann mehr Hoechst 33342 in die Zelle gelangen und es kommt zu einem Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von der eingesetzten Modulatorkonzentration. Die Fluoreszenzzunahme folgt dabei einer Reaktionskinetik 1. Ordnung.

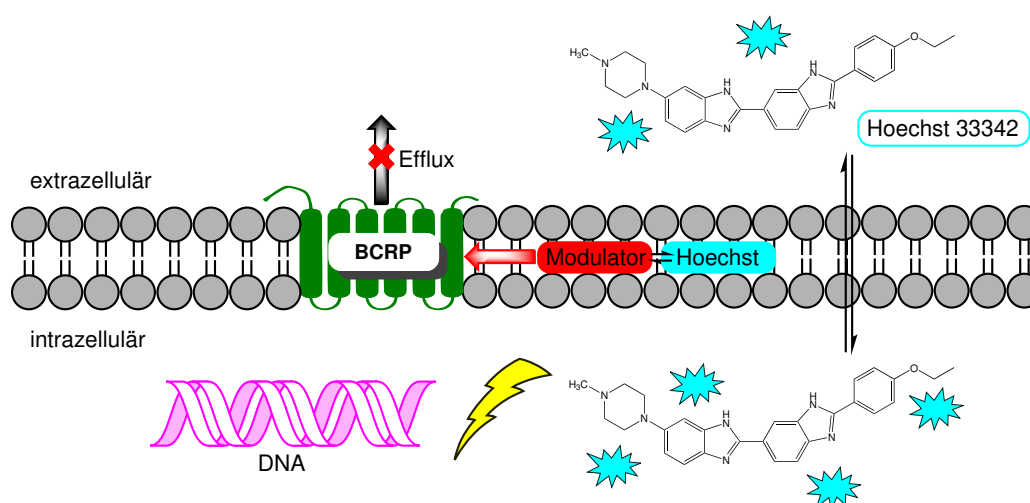


Abbildung 8.1 – Prinzip des Hoechst 33342 Akkumulationsassays mit ABCG2 überexprimierenden Zellen.

Durchführung

Zunächst wurden für die zu untersuchenden Substanzen Verdünnungsreihen nach dem Schema in Tabelle 8.4 hergestellt. Von diesen Verdünnungen wurden je 20 µl in die Vertiefungen einer schwarzen, flachbödigen Mikrotiterplatte pipettiert (Spalten 2 – 12). In die erste Spalte wurden 20 µl KHP überführt, um den Nullwert zu definieren. Zusätzlich wurden in die letzten beiden Reihen Verdünnungen der Referenzsubstanzen XR9577 oder Ko143 hinzugefügt.

Anschließend wurden sensitive Zellen (MDCK II Wildtyp) und resistente Zellen (MDCK II BCRP) nach den in Abschnitt 8.2.2 beschriebenen Methoden gewaschen, geerntet und ihre Anzahl mittels des Zellzählers bestimmt. Der Zellsuspension wurde ein Volumen entnommen, dass der pro Platte benötigten Zellzahl (3 Mio.) entsprach. Dieses wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (2 ml) überführt und mittels Zentrifugation (10,000 U/min) und mehrmaligem Aufnehmen in KHP gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in KHP (1 ml) aufgenommen und resuspendiert. Die Pufferlösung mit den Zellen wurde daraufhin mit KHP (17 ml) verdünnt. Diese Lösung wurde in ein unsteriles Reagentienreservoir überführt und mittels einer Multikanalpipette 160 µl dieser Lösung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Dadurch ergab sich letztlich eine Zahl von ca. 27,000 Zellen pro Vertiefung.

Nachdem die Zellen auf die Mikrotiterplatte überführt waren wurde dieser mit einem Deckel versehen und für ca. 30 Minuten in den Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde in jede Vertiefung 20 µl des Fluoreszenzfarbstoffs (vgl. Tabelle 8.3, Seite 238) pipettiert, sodass sich eine Endkonzentration des Farbstoffs von 1 µmol/l ergab. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung ergibt sich damit zu insgesamt 200 µl. Dann wurde die Platte zügig in eines der Mikrotiterplattenfluorometer gestellt und vermessen.

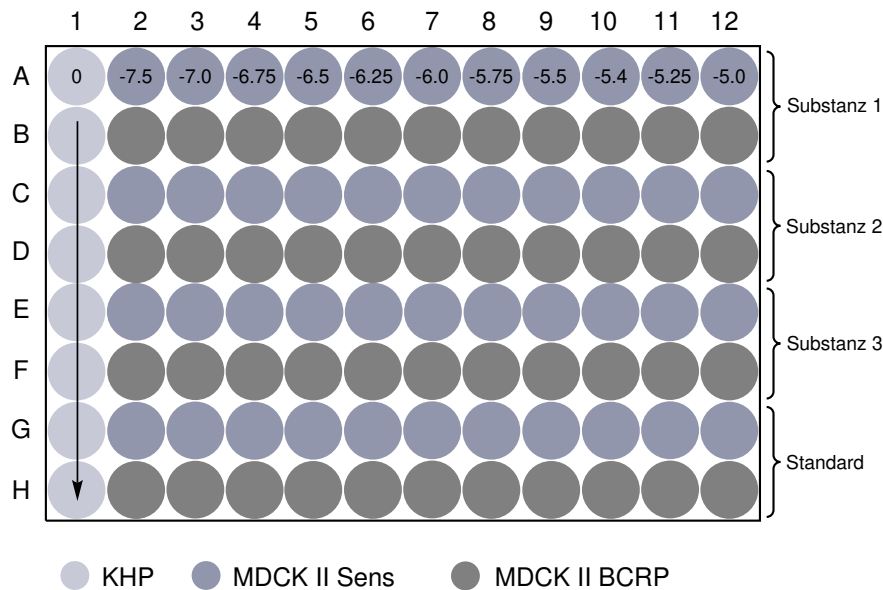


Abbildung 8.2 – Pipettierschema für einen standardmäßigen Hoechst 33342 Akkumulationsassay. Die Konzentrationen in den Spalten sind als $\log(c)$ angegeben. In die Reihen wurden alternierend sensitive und resistente Zellen pipettiert.

Vermessung

Die Vermessung der Platten erfolgte sofort in konstanten Zeitintervallen von 60 s für 120 min unter Verwendung eines BMG POLARstar oder FLUOstar Mikrotiterplattenfluorometer. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm mit einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Die weiteren Messparameter sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Parameter	POLARstar	FLUOstar
Plattenstellung	horizontal	
Messtemperatur	37 °C	
Schüttelfunktion	30 s	
Messdauer	120 min	
Messwerterfassung	60 s	
Intervallzeit zw. zwei Reihen	0,2 s	
Anregungswellenlänge	355 nm	
Emissionswellenlänge	460 nm	
Lichtblitze	10 s ⁻¹	
Signalverstärkung (Gain)	43	1 500

Auswertung der Messdaten

Die Messwerte vom Fluorometer wurden von diesem in einer Exceltabelle erfasst. Die Fluoreszenzwerte wurden in eine neue Exceltabelle übertragen und die Mittelwerte von Minute 100–109 gebildet, als auch die Messwerte von Minute 110 entnommen. Diese Daten wurden in das Programm GraphPad Prism übertragen und gegen die Modulatorkonzentration aufgetragen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der Drei-Parameter- oder Vier-Parameter-logistischen Gleichung mit variabler Steigung für sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven. Ziel von Prism ist es dabei den IC_{50} -Wert des Inhibitors zu bestimmen, also die Konzentration, die auf halbem Weg zwischen dem minimalem (Bottom) und dem maximal Inhibitionseffekt (Top) liegt. Es wurde jeweils der IC_{50} -Wert des statistisch bevorzugten Modells als Ergebnis des Assays herangezogen. Eine Betrachtung der Ergebnisse wenn man die Messwerte der Mittelwerte der Daten (Minute 100–109) bzw. diejenigen der Minute 110 zur Auswertung heranzieht ergab, dass zwischen beiden auf diese Weise ermittelten IC_{50} -Werten kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. In den meisten Assays wurden die Mittelwerte zur Auswertung verwendet.

Calcein AM Akkumulationsassay

Calcein AM (Fluorescein-2,7-bis(methyleniminodiessigsäure-acetoxymethylester)) ist eine nicht-fluoreszierende Verbindung, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften leicht in intakte Zellen eindringen kann. Im Zellinneren wird Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert (s. Abb. 8.3).

Dies führt zu einer starken Fluoreszenz von Calcein. Die freie Säure bzw. ihr mehrfach negativ geladenes Carboxylation wird im Zytoplasma zurückgehalten und kann bei einer Wellenlänge von 485 bzw. 520 nm für die Extinktion bzw. Emission vermessen werden. Calcein AM ist ein Substrat für die beiden Transportproteine ABCB1 und ABCC1. Zwar ist für ABCC1 bekannt, dass es in der Lage ist ionische Verbindungen zu transportieren, jedoch erfolgt der Transport so langsam, dass dieser vernachlässigt werden kann. Durch Hemmung der beiden ABC Transportproteine akkumuliert Calcein innerhalb des Zytoplasmas, was sich in einer Fluoreszenzzunahme widerspiegelt. Die Konzentrationszunahme des Fluorophors Calcein in der Zelle hängt dabei ab von der Geschwindigkeit der Diffusion des Acetoxymethylesters in das Zellinnere, sowie der Umsatzrate durch die intrazellulären Esterasen, dem Efflux von Calcein AM durch die Transportproteine und der Konzentration von Calcein AM an sich. Der Transport von Calcein AM wird durch Zusatz eines Inhibitors von ABCB1 bzw. ABCC1 eingeschränkt, wobei das Ausmaß durch die inhibitorische Potenz des eingesetzten Modulators bestimmt wird. Daher korreliert der Anstieg der Fluoreszenz mit der inhibitorischen Potenz einer Verbindung und kann somit für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes herangezogen werden.

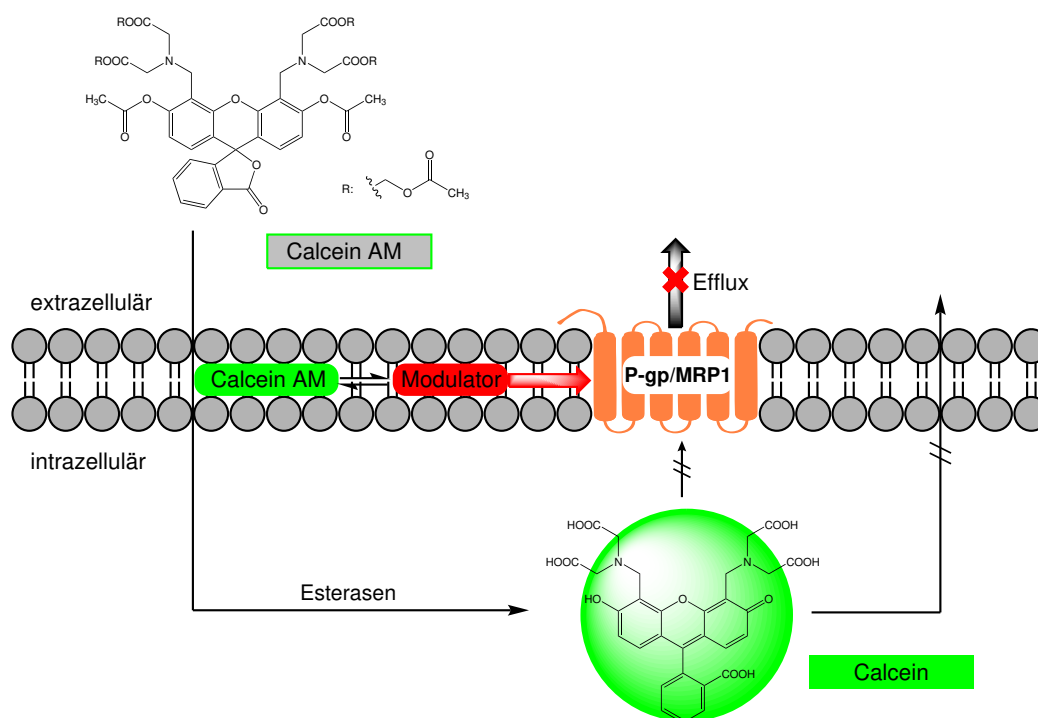


Abbildung 8.3 – Prinzip des Calcein AM Akkumulationsassay mit ABCB1 bzw. ABCC1 überexprimierenden Zellen.

Durchführung

Zur Untersuchung der Selektivität der synthetisierten ABCG2 Inhibitoren wurden die aktivsten Verbindungen im Calcein AM Akkumulationsassay vermessen. Hierzu wurden die Zelllinien A2780 Adr zur ABCB1-Bestimmung bzw. H69 AR zur ABCC1-Bestimmung verwendet. Einen typischen Aufbau einer vorbereiteten Platte zeigt [Abbildung 8.4](#).

Zunächst wurden aus den Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen die entsprechenden Verdünnungsreihen vorbereitet (vgl. [Tabelle 8.4](#), S. 239). Als Referenzsubstanz diente in diesem Assay der Arzneistoff Cyclosporin A. Von den Verdünnungen wurden jeweils 20 µl in die Vertiefungen einer klaren Mikrotiterplatte mit flachen Boden pipettiert.

Die für den Assay benötigte Zelllinie wurde wie in [Abschnitt 8.2.2](#) beschrieben geerntet und mittels CASY Zellzähler gezählt. Von der Zellsuspension wurde das für den Assay benötigte Zellvolumen entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Medium wurde nach Zentrifugation entfernt und das Zellpellet mehrmals mit KHP gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit KHP auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in eine Ausplattierschale überführt. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden 160 µl Zellvolumen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben, wodurch ca. 30.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät wurden. Die Platte wurde anschließend mit einem Deckel versehen und für 30 Minuten in den Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) gestellt.

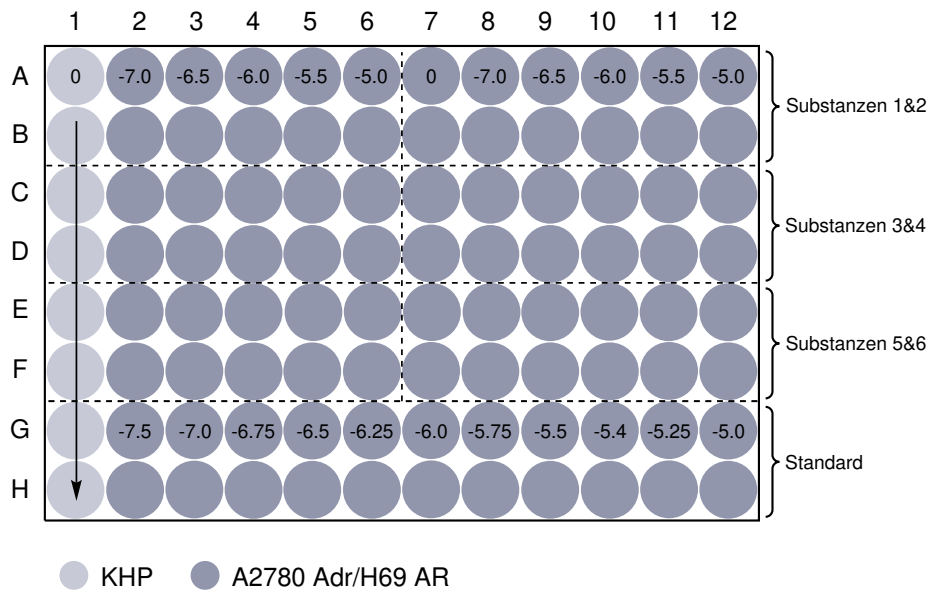


Abbildung 8.4 – Pipettierschema für einen standardmäßigen Calcein AM Assay. Die Konzentrationen sind als $\log(c)$ angegeben. Die Substanzen wurden jeweils als Duplikate vermessen.

Vermessung

Nach der Inkubationszeit wurden $20\ \mu\text{l}$ der entsprechenden Calcein AM Verdünnung (vgl. Tabelle 8.3, Seite 238) mit einer Multikanalpipette hinzugefügt. Die Endkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffs entsprach $0,31\ \mu\text{mol/l}$ und das Gesamtvolumen pro Vertiefung $200\ \mu\text{l}$. Die Platte wurde anschließend zügig in eines der Mikrotiterplattenfluorometer gestellt und mit folgenden Parametern vermessen:

Parameter	POLARstar	FLUOstar
Plattenstellung		horizontal
Messtemperatur		$37\ ^\circ\text{C}$
Schüttelfunktion		30 s
Messdauer		60 min
Messwerterfassung		60 s
Intervallzeit zw. zwei Reihen		0,2 s
Anregungswellenlänge		485 nm
Emissionswellenlänge		520 nm
Lichtblitze		$10\ \text{s}^{-1}$
Signalverstärkung (Gain)	15	1 400

Datenauswertung

Die Messwerte aus der vom Fluorometer geschriebenen Exceltabelle wurden zunächst in eine neue Tabelle übertragen. Da die Fluoreszenz in diesem Akkumulationsassay anfangs linear verläuft wurde

aus diesem Anstieg im Intervall von jeweils 10 Minuten die Steigung berechnet. Daraus konnte eine Konzentrations-Effektkurve für jede Konzentration berechnet werden. Hierzu wurden bevorzugt die Minuten 10–39 verwendet.

Die Hemmstärke der Substanzen bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurde relativ zum Effekt der Referenzsubstanz bei gleicher Konzentration bestimmt. Hierzu wurde vom Steigungswert der jeweiligen Substanz bei 10 $\mu\text{mol/l}$ der Nullwert (KHP-Wert) der Substanz in derselben Reihe abgezogen. Dieselbe Subtraktion erfolgte für die Referenzsubstanz. Die auf diese Weise bereinigten Werte der Substanzen wurden anschließend in Bezug auf den Standard gesetzt. Vollständige Konzentrations-Effektkurven wurden für diejenigen Substanzen aufgenommen, die bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ einen durchschnittlichen Effekt von mehr als 25 % im Vergleich zur Referenz aufwiesen.

MTT-Test zur Überprüfung der Zelltoxizität

Die Versuche wurden von K. Silbermann (AG Wiese, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) durchgeführt und ausgewertet.

Der MTT-Test nutzt die Reduktion des namensgebenden Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), ein gelbes Tetrazoliumsalz, durch lebende Zellen zum purpur gefärbten Formazan-Derivat ((*E,Z*)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan). Da die metabolische Aktivität der Zellen stark mit deren Viabilität korreliert kann der MTT-Test zur Überprüfung der Zelltoxizität von Substanzen herangezogen werden. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz kann die Zellmembran durchdringen und wird anschließend durch intrazelluläre Oxidoreduktasen zum wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Reduktion findet in Abhängigkeit von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH ab (s. Abb. 8.5).

Verantwortlich für die Reduktion sind hauptsächlich Enzyme des endoplasmatischen Retikulums und nur zum Teil die Succinat-Dehydrogenasen in den Mitochondrien. Der gebildete purpurne Farbstoff ist wasserunlöslich und kann nach Solubilisierung photometrisch vermessen werden. Aus diesen Daten kann anschließend die Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt und mit einer Referenzsubstanz verglichen werden.

Durchführung

Zunächst wurde in einem sterilen Reagentienreservoir mit zwölf Fächern die Verdünnungsreihen der Testsubstanzen entsprechend des Pipettierschemas (s. Tabelle 8.6) hergestellt.

In das erste Fach wurde reines Nährmedium pipettiert (Negativkontrolle), in den folgenden Fächern wurden die jeweiligen Verdünnungen in steigender Konzentration und zuletzt reines DMSO (Positivkontrolle) hinzugefügt. Aus den Fächern wurden anschließend mittels Multikanalpipette jeweils 20 μL in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt.

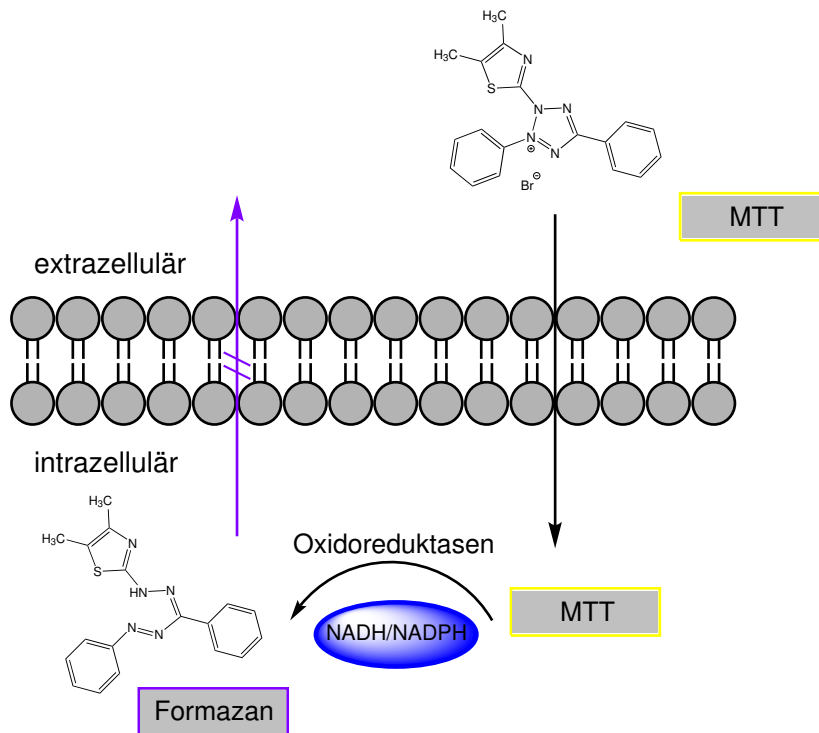


Abbildung 8.5 – Prinzip des MTT-Test. Der Assay beruht auf der Reduktion des namensgebenden Farbstoffs MTT durch lebende Zellen in ein purpurnes Formazan-Derivat.

Tabelle 8.6: Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihen für den MTT-Test.

Zielverdünnung [log(10 ^{-x} mol/l)]	Volumina µl		Endkonz. auf der Platte [log(10 ^{-x} mol/L)]
	Modulator (10 ^{-x} mol/l)	Nährmedium	
-3,0	150 (10 ⁻²)	1 350	-4,0
-3,25	448 (10 ⁻³)	352	-4,25
-3,5	316 (10 ⁻³)	684	-4,5
-3,75	178 (10 ⁻³)	822	-4,75
-4,0	100 (10 ⁻³)	900	-5,0
-4,25	100 (10 ⁻⁴)	900	-5,25
-4,5	100 (10 ^{-4,25})	900	-5,5
-4,75	100 (10 ^{-4,5})	900	-5,75
-5,0	100 (10 ^{-4,75})	900	-6,0
-5,5	100 (10 ⁻⁵)	900	-6,5

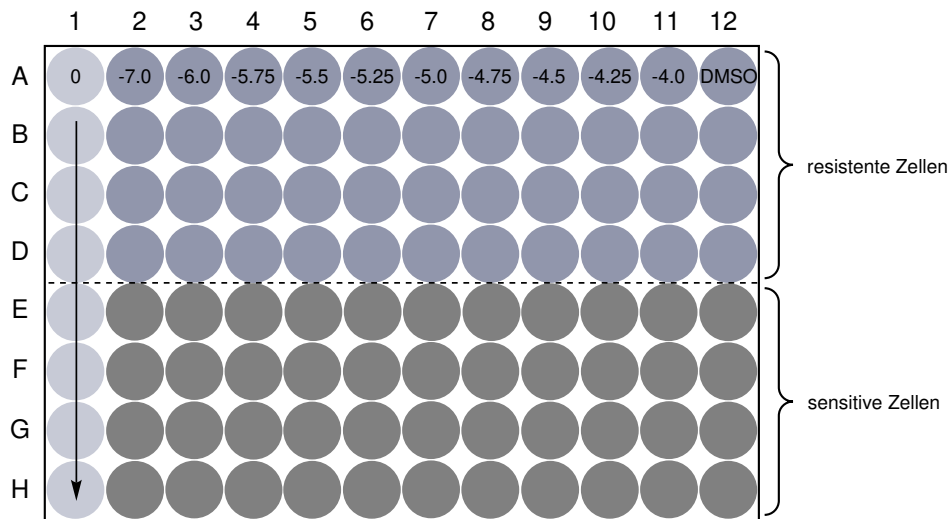


Abbildung 8.6 – Pipettierschema für den MTT-Test zur Überprüfung der Zelltoxizität. Die Konzentrationen der Substanzen sind in den jeweiligen Spalten als $\lg(c)$ angegeben.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 8.2.2 beschrieben vorbereitet und 180 μl Zellsuspension in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Zum Schluss wurden die Zwischenräume neben den Vertiefungen der Mikrotiterplatte bis zur Hälfte mit sterilem PBS aufgefüllt. Dies sollte verhindern, dass das Volumen in den Vertiefungen während der langen Inkubationszeit durch Verdunstungsprozesse verringert wird. Die so präparierte Mikrotiterplatte wurde für 72 Stunden im Inkubator (5 % CO_2 , 37 °C) gelagert.

MTT-Test zur Überprüfung der Resistenzaufhebung

Die Versuche wurden von K. Silbermann (AG Wiese, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) durchgeführt und ausgewertet.

Zur Überprüfung, ob die Substanzen die Resistenz der Zellen gegenüber einem Zytostatikum (SN-38) aufheben können, wurde der MTT-Test etwas modifiziert. Aus der Stammlösung der zu untersuchenden Modulatoren wurden vier unterschiedliche Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,001 $\mu\text{mol/l}$) im Nährmedium hergestellt. In die ersten zwei, sowie in die letzten beiden Reihen der Mikrotiterplatte wurde kein Modulator, sondern nur Kulturmedium (20 μl) zugegeben. In den Reihen dazwischen wurden jeweils 20 μl der unterschiedlichen Konzentrationen der Modulatoren in die Vertiefungen hinzugefügt. Die Zellen wurden wie beschrieben vorbereitet (s.o.) und jeweils 160 μl Zellsuspension in alle Reihen der Mikrotiterplatte hinzugefügt. Anschließend wurde aus der Stammlösung des Zytostatikums eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt und von dieser jeweils 20 μL in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt (s. Abbildung 8.7).

Zum Schluss wurde wiederum PBS in die Zwischenräume der Vertiefungen, sowie an den Rand der Mikrotiterplatte hinzugefügt. Die Platte wurde dann ebenfalls für 72 Stunden in den Inkubator (5 % CO_2 , 37 °C) gestellt.

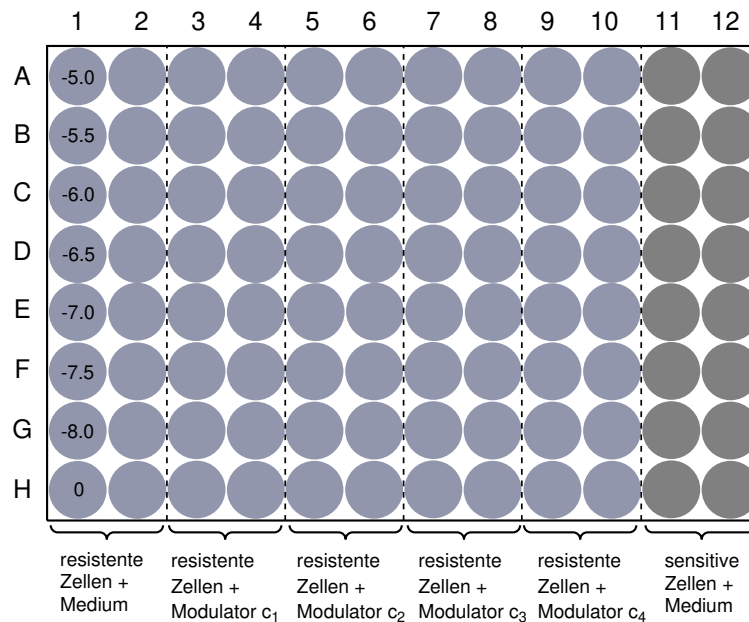


Abbildung 8.7 – Pipettierschema für den MTT-Test zur Resistenzhebung. Die Konzentration des Zytostatikums sind als $\lg(c)$ in den Spalten angegeben.

Nach der Inkubationszeit wurden 40 μL einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) mit Hilfe einer Multikanalpipette in die Vertiefungen der Platte überführt. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte für eine weitere Stunden in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Überstände aus den Vertiefungen entfernt, indem die Platte kopfüber auf Zellstoffpapier gelegt und vorsichtig abgeklopft wurde. Durch Zugabe von 100 μL DMSO in jede der Vertiefungen wurden die Zellen lysiert, um die in ihnen gebildeten, wasserunlöslichen Formazankristalle zu lösen. Die Platte wurde anschließend mit Hilfe des Photometers Multiscan bei einer Absorption von 570 nm vermessen. Von dieser wurde die Hintergrundabsorption bei 690 nm abgezogen.

Datenauswertung

Die Messdaten wurden mit dem Photometerprogramm Ascent in einer Exceltabelle zusammengefasst. Nach Substraktion der Hintergrundextinktion von der Gesamtextinktion konnten die Daten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism statistisch ausgewertet werden. Hierzu wurden die bereinigten Extinktionswerte gegen die Modulatorkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der Vier-Parameter- bzw. Drei-Parameter-logistischen Gleichung für Konzentrations-Effektkurven. Aus der statistisch präferierten Gleichung konnte dann der GI_{50} -Wert abgeleitet werden.

Literatur

- (1) Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* 6 (2014) 1769–1792.
- (2) *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*; Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016.
- (3) Coley, H. M. Multi-Drug Resistance in Cancer, Zhou, J., Hrsg.; Humana Press: 2010 341.
- (4) Longley, D. B.; Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology* 205 (2005) 275–292.
- (5) Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 7 (2017) 339–348.
- (6) Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports* 7 (2015).
- (7) Licht, A.; Schneider, E. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Open Life Sciences* 6 (2011) 785–801.
- (8) Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8 (1992) 67–113.
- (9) Saurin, W.; Hofnung, M.; Dassa, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of Molecular Evolution* 48 (1999) 22–41.
- (10) Dassa, E.; Bouige, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* 152 (2001) 211–229.
- (11) Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6 (2005) 123–142.
- (12) Verrier, P. J. et al. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13 (2008) 151–159.
- (13) Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 11 (2001) 1156–1166.

- (14) Higgins, C. F.; Hiles, I. D.; Salmond, G. P. C.; Gill, D. R.; Downie, J. A.; Evans, I. J.; Holland, I. B.; Gray, L.; Buckel, S. D.; Bell, A. W.; Hermodson, M. A. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323** (1986) 448–450.
- (15) Swier, L. J. Y. M.; Slotboom, D.-J.; Poolman, B. *ABC Transporters - 40 Years on*, George, A. M., Hrsg.; Springer International Publishing: 2016 3.
- (16) Locher, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* **23** (2016) 487–493.
- (17) Vasiliou, V.; Vasiliou, K.; Nebert, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics* **3** (2009) 281–290.
- (18) Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O. ABC transporters: The power to change. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10** (2009) 218–227.
- (19) Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological Research* **48** (2003) 347–359.
- (20) Altenberg, G. A.; Vanoye, C. G.; Horton, J. K.; Reuss, L. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (1994) 4654–4657.
- (21) Higgins, C. F.; Gottesman, M. M. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* **17** (1992) 18–21.
- (22) Raviv, Y.; Pollard, H. B.; Bruggemann, E. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **265** (1990) 3975–3980.
- (23) Higgins, C. F.; Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* **11** (2004) 918–926.
- (24) Linton, K. J.; Higgins, C. F. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **453** (2007) 555–567.
- (25) Lin, J. H.; Yamazaki, M. Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy. *Drug Metabolism Reviews* **35** (2003) 417–454.
- (26) Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica Et Biophysica Acta* **455** (1976) 152–162.
- (27) Inaba, M.; Johnson, R. K. Decreased Retention of Actinomycin D as the Basis for Cross-resistance in Anthracycline-resistant Sublines of P388 Leukemia. *Cancer Research* **37** (1977) 4629–4634.

-
- (28) Inaba, M.; Kobayashi, H.; Sakurai, Y.; Johnson, R. K. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Research* **39** (1979) 2200–2203.
- (29) Beck, W. T. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochemical Pharmacology* **36** (1987) 2879–2887.
- (30) Beck, W. T. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treatment Reviews, Proceedings of International Symposium on Modication of Drug Resistance* **17** (1990) 11–20.
- (31) Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* **41** (1981) 1967–1972.
- (32) Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84** (1987) 7735–7738.
- (33) Schinkel, n. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* **36** (1999) 179–194.
- (34) Sharom, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry* **50** (2011) 161–178.
- (35) Grandjean-Forestier, F.; Stenger, C.; Robert, J.; Verdier, M.; Ratinaud, M.-H. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*; Wiley-Blackwell: 2009 15.
- (36) Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews, Drug efflux transporters: Implications in drug delivery, disposition and response* **55** (2003) 3–29.
- (37) Jones, P.; George, A. A New Structural Model for P-Glycoprotein. *The Journal of Membrane Biology* **166** (1998) 133–147.
- (38) Chang, G.; Roth, C. B. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293** (2001) 1793–1800.
- (39) Dawson, R. J. P.; Locher, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443** (2006) 180–185.
- (40) Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* **323** (2009) 1718–1722.
- (41) Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V.; Xia, D. Structure of a multidrug transporter. *Nature Biotechnology* **27** (2009) 546–547.

- (42) Mitra, R.; Coyle, E. M.; Callaghan, R. ABC Transporters - 40 Years on, George, A. M., Hrsg.; Springer International Publishing: 2016 153.
- (43) Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M.
Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 13603–13606.
- (44) Shapiro, A. B.; Ling, V. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 16167–16175.
- (45) Shapiro, A. B.; Ling, V.
Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* 53 (1997) 587–596.
- (46) Shapiro, A. B.; Ling, V.
Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *European Journal of Biochemistry* 250 (1997) 130–137.
- (47) Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R.
Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology* 58 (2000) 624–632.
- (48) Bruggemann, E. P.; Germann, U. A.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.
Two different regions of P-glycoprotein [corrected] are photoaffinity-labeled by azidopine. *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989) 15483–15488.
- (49) Greenberger, L. M. Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 11417–11425.
- (50) Ayes, S.; Shao, Y. M.; Stein, W. D. Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1316 (1996) 8–18.
- (51) Orłowski, S.; Mir, L. M.; Belehradek, J.; Garrigos, M.
Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity: progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non-exclusive modulators. *The Biochemical Journal* 317 (Pt 2) (1996) 515–522.
- (52) Pascaud, C.; Garrigos, M.; Orłowski, S. Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *The Biochemical Journal* 333 (Pt 2) (1998) 351–358.
- (53) Gros, P.; Ben Neriah, Y. B.; Croop, J. M.; Housman, D. E.
Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 323 (1986) 728–731.

-
- (54) Croop, J. M.; Guild, B. C.; Gros, P.; Housman, D. E. Genetics of multidrug resistance: relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistant phenotype. *Cancer Research* 47 (1987) 5982–5988.
- (55) Ak, I.; Aslan, V.; Vardareli, E.; Gülbaş, Z. Assessment of the P-glycoprotein expression by ^{99m}Tc-MIBI bone marrow imaging in patients with untreated leukaemia. *Nuclear Medicine Communications* 24 (2003) 397–402.
- (56) Jekerle, V.; Wang, J.-H.; Scollard, D. A.; Reilly, R. M.; Wiese, M.; Piquette-Miller, M. ^{99m}Tc-Sestamibi, a sensitive probe for in vivo imaging of P-glycoprotein inhibition by modulators and *mdr1* antisense oligodeoxynucleotides. *Molecular imaging and biology* 8 (2006) 333–339.
- (57) Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *British Journal of Pharmacology* 128 (1999) 403–411.
- (58) Pusztai, L.; Wagner, P.; Ibrahim, N.; Rivera, E.; Theriault, R.; Booser, D.; Symmans, F. W.; Wong, F.; Blumenschein, G.; Fleming, D. R.; Rouzier, R.; Boniface, G.; Hortobagyi, G. N. Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer* 104 (2005) 682–691.
- (59) Walker, J.; Martin, C.; Callaghan, R. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *European Journal of Cancer* 40 (2004) 594–605.
- (60) Benson, A. B.; Trump, D. L.; Koeller, J. M.; Egorin, M. I.; Olman, E. A.; Witte, R. S.; Davis, T. E.; Tormey, D. C. Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent iv infusion. *Cancer Treatment Reports* 69 (1985) 795–799.
- (61) Tsuruo, T.; Iida, H.; Yamashiro, M.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Enhancement of vincristine- and adriamycin-induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochemical Pharmacology* 31 (1982) 3138–3140.
- (62) Ganapathi, R.; Grabowski, D. Enhancement of sensitivity to adriamycin in resistant P388 leukemia by the calmodulin inhibitor trifluoperazine. *Cancer Research* 43 (1983) 3696–3699.
- (63) Goldberg, H.; Ling, V.; Wong, P. Y.; Skorecki, K. Reduced cyclosporin accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 152 (1988) 552–558.
- (64) Ramu, A.; Fuks, Z.; Gatt, S.; Glaubiger, D. Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by perhexiline maleate. *Cancer Research* 44 (1984) 144–148.

- (65) Tsuruo, T.; Iida, H.; Kitatani, Y.; Yokota, K.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells. *Cancer Research* **44** (1984) 4303–4307.
- (66) Bartlett, N. L.; Lum, B. L.; Fisher, G. A.; Brophy, N. A.; Ehsan, M. N.; Halsey, J.; Sikic, B. I. Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *Journal of Clinical Oncology* **12** (1994) 835–842.
- (67) Berman, E.; McBride, M.; Lin, S.; Menedez-Botet, C.; Tong, W. Phase I trial of high-dose tamoxifen as a modulator of drug resistance in combination with daunorubicin in patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leukemia* **9** (1995) 1631–1637.
- (68) Verweij, J.; Herweijer, H.; Oosterom, R.; van der Burg, M. E.; Planting, A. S.; Seynaeve, C.; Stoter, G.; Nooter, K. A phase II study of epidoxorubicin in colorectal cancer and the use of cyclosporin-A in an attempt to reverse multidrug resistance. *British Journal of Cancer* **64** (1991) 361–364.
- (69) Deferme, S.; Van Gelder, J.; Augustijns, P. Inhibitory effect of fruit extracts on P-glycoprotein-related efflux carriers: an in-vitro screening. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54** (2002) 1213–1219.
- (70) Ford, J. M.; Prozialeck, W. C.; Hait, W. N. Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Molecular Pharmacology* **35** (1989) 105–115.
- (71) Hyafil, F.; Vergely, C.; Du Vignaud, P.; Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Research* **53** (1993) 4595–4602.
- (72) Kane, G. C.; Lipsky, J. J. Drug–Grapefruit Juice Interactions. *Mayo Clinic Proceedings* **75** (2000) 933–942.
- (73) Newman, M. J.; Rodarte, J. C.; Benbatoul, K. D.; Romano, S. J.; Zhang, C.; Krane, S.; Moran, E. J.; Uyeda, R. T.; Dixon, R.; Guns, E. S.; Mayer, L. D. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Research* **60** (2000) 2964–2972.
- (74) Nogae, I.; Kohno, K.; Kikuchi, J.; Kuwano, M.; Akiyama, S.; Kiue, A.; Suzuki, K.; Yoshida, Y.; Cornwell, M. M.; Pastan, I. Analysis of structural features of dihydropyridine analogs needed to reverse multidrug resistance and to inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* **38** (1989) 519–527.

-
- (75) Roe, M.; Folkes, A.; Ashworth, P.; Brumwell, J.; Chima, L.; Hunjan, S.; Pretswell, I.; Dangerfield, W.; Ryder, H.; Charlton, P.
Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9** (1999) 595–600.
- (76) Sadzuka, Y.; Sugiyama, T.; Sonobe, T. Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance. *Toxicology Letters* **114** (2000) 155–162.
- (77) Twentyman, P. R.; Bleehen, N. M.
Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin. *European Journal of Cancer* **27** (1991) 1639–1642.
- (78) Matheny, C. J.; Lamb, M. W.; Brouwer, K. R.; Pollack, G. M.
Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* **21** (2001) 778–796.
- (79) Kim, R. B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metabolism Reviews* **34** (2002) 47–54.
- (80) Zhou, S.-F.
Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* **38** (2008) 802–832.
- (81) Fox, E.; Bates, S. E. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Review of Anticancer Therapy* **7** (2007) 447–459.
- (82) Stewart, A.; Steiner, J.; Mellows, G.; Laguda, B.; Norris, D.; Bevan, P.
Phase I trial of XR9576 in healthy volunteers demonstrates modulation of P-glycoprotein in CD56+ lymphocytes after oral and intravenous administration. *Clinical Cancer Research* **6** (2000) 4186–4191.
- (83) Baer, M. R.; George, S. L.; Dodge, R. K.; O’Loughlin, K. L.; Minderman, H.; Caligiuri, M. A.; Anastasi, J.; Powell, B. L.; Kolitz, J. E.; Schiffer, C. A.; Bloomfield, C. D.; Larson, R. A.
Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* **100** (2002) 1224–1232.
- (84) Giaccone, G.; Linn, S. C.; Welink, J.; Catimel, G.; Stieltjes, H.; van der Vijgh, W. J.; Eeltink, C.; Vermorken, J. B.; Pinedo, H. M.
A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research* **3** (1997) 2005–2015.

- (85) Gruber, A. et al.
A phase I/II study of the MDR modulator Valspodar (PSC 833) combined with daunorubicin and cytarabine in patients with relapsed and primary refractory acute myeloid leukemia.
Leukemia Research 27 (2003) 323–328.
- (86) Crowley, E.; McDevitt, C. A.; Callaghan, R.
Generating inhibitors of P-glycoprotein: where to, now?
Methods in Molecular Biology 596 (2010) 405–432.
- (87) Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G.
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.
Science 258 (1992) 1650–1654.
- (88) Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.; Keppler, D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates.
The Journal of Biological Chemistry 269 (1994) 27807–27810.
- (89) Müller, M.; Meijer, C.; Zaman, G. J.; Borst, P.; Scheper, R. J.; Mulder, N. H.; de Vries, E. G.; Jansen, P. L. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport.
Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (1994) 13033–13037.
- (90) Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Barnouin, K.; Kurz, G.; Keppler, D.
Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Research* 56 (1996) 988–994.
- (91) Deeley, R. G.; Cole, S. P. C.
Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1).
FEBS letters 580 (2006) 1103–1111.
- (92) Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*, Bertino, J. R., Hrsg.; Academic Press: 2002 255.
- (93) Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. *ABC Proteins*, Holland, I. B., Cole, S. P. C., Kuchler, K., Higgins, C. F., Hrsg.; Academic Press: 2003 393.
- (94) Kruh, G. D.; Belinsky, M. G. The MRP family of drug efflux pumps.
Oncogene 22 (2003) 7537–7552.
- (95) Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P. C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins.
Physiological Reviews 86 (2006) 849–899.

-
- (96) Bakos, E.; Evers, R.; Szakács, G.; Tusnády, G. E.; Welker, E.; Szabó, K.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Borst, P.; Váradi, A.; Sarkadi, B.
Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 32167–32175.
- (97) He, S.-M.; Li, R.; Kanwar, J. R.; Zhou, S.-F.
Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current Medicinal Chemistry* 18 (2011) 439–481.
- (98) Johnson, Z. L.; Chen, J.
Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell* 168 (2017) 1075–1085.
- (99) Slot, A. J.; Molinski, S. V.; Cole, S. P. C. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays in Biochemistry* 50 (2011) 179–207.
- (100) Li, J.; Jaimes, K. F.; Aller, S. G. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Science* 23 (2014) 34–46.
- (101) Oldham, M. L.; Hite, R. K.; Steffen, A. M.; Damko, E.; Li, Z.; Walz, T.; Chen, J.
A mechanism of viral immune evasion revealed by cryo-EM analysis of the TAP transporter. *Nature* 529 (2016) 537–540.
- (102) Shintre, C. A. et al. Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013) 9710–9715.
- (103) Loe, D. W.; Almquist, K. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P.
Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 9675–9682.
- (104) Zaman, G. J.; Versantvoort, C. H.; Smit, J. J.; Eijdem, E. W.; de Haas, M.; Smith, A. J.; Broxterman, H. J.; Mulder, N. H.; de Vries, E. G.; Baas, F.
Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Research* 53 (1993) 1747–1750.
- (105) Burger, H.; Nooter, K.; Zaman, G. J.; Sonneveld, P.; van Wingerden, K. E.; Oostrum, R. G.; Stoter, G.
Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 8 (1994) 990–997.
- (106) Giraud, C.; Manceau, S.; Treluyer, J.-M. ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6 (2010) 571–589.

- (107) Aye, I. L. M. H.; Paxton, J. W.; Evseenko, D. A.; Keelan, J. A. Expression, Localisation and Activity of ATP Binding Cassette (ABC) Family of Drug Transporters in Human Amnion Membranes. *Placenta* 28 (2007) 868–877.
- (108) Bosquillon, C. Drug transporters in the lung—do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (2010) 2240–2255.
- (109) Dallas, S.; Miller, D. S.; Bendayan, R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacological Reviews* 58 (2006) 140–161.
- (110) Shen, S.; Zhang, W. ABC transporters and drug efflux at the blood-brain barrier. *Reviews in the Neurosciences* 21 (2010) 29–53.
- (111) Miller, D. S. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends in Pharmacological Sciences* 31 (2010) 246–254.
- (112) Zaman, G. J.; Lankelma, J.; van Tellinghen, O.; Beijnen, J.; Dekker, H.; Paulusma, C.; Oude Elferink, R. P.; Baas, F.; Borst, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995) 7690–7694.
- (113) Versantvoort, C. H.; Broxterman, H. J.; Bagrij, T.; Scheper, R. J.; Twentyman, P. R. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *British Journal of Cancer* 72 (1995) 82–89.
- (114) Schneider, E.; Yamazaki, H.; Sinha, B. K.; Cowan, K. H. Buthionine sulphoximine-mediated sensitisation of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein involves increased drug accumulation. *British Journal of Cancer* 71 (1995) 738–743.
- (115) Holló, Z.; Homolya, L.; Davis, C. W.; Sarkadi, B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1191 (1994) 384–388.
- (116) Hooijberg, J. H.; Broxterman, H. J.; Kool, M.; Assaraf, Y. G.; Peters, G. J.; Noordhuis, P.; Scheper, R. J.; Borst, P.; Pinedo, H. M.; Jansen, G. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Research* 59 (1999) 2532–2535.
- (117) Lautier, D.; Canitrot, Y.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochemical Pharmacology* 52 (1996) 967–977.

-
- (118) Keppler, D.; Jedlitschky, G.; Leier, I.
Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein.
Methods in Enzymology 292 (1998) 607–616.
- (119) Zeng, H.; Chen, Z. S.; Belinsky, M. G.; Rea, P. A.; Kruh, G. D.
Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Research* 61 (2001) 7225–7232.
- (120) Cole, S. P.; Sparks, K. E.; Fraser, K.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Wilson, G. M.; Deeley, R. G.
Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research* 54 (1994) 5902–5910.
- (121) Grant, C. E.; Valdimarsson, G.; Hipfner, D. R.; Almquist, K. C.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.
Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Research* 54 (1994) 357–361.
- (122) Grzywacz, M. J.; Yang, J.-M.; Hait, W. N.
Effect of the Multidrug Resistance Protein on the Transport of the Antiandrogen Flutamide. *Cancer Research* 63 (2003) 2492–2498.
- (123) Loe, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Research* 58 (1998) 5130–5136.
- (124) Allen, J. D.; Brinkhuis, R. F.; van Deemter, L.; Wijnholds, J.; Schinkel, A. H. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Research* 60 (2000) 5761–5766.
- (125) Smeets, M. E.; Raymakers, R. A.; Vierwinden, G.; Pennings, A. H.; Boezeman, J.; Minderman, H.; de Witte, T. M. Idarubicin DNA intercalation is reduced by MRP1 and not Pgp. *Leukemia* 13 (1999) 1390–1398.
- (126) Pham, A.-N.; Wang, J.; Fang, J.; Gao, X.; Zhang, Y.; Blower, P. E.; Sadée, W.; Huang, Y.
Pharmacogenomics approach reveals MRP1 (ABCC1)-mediated resistance to geldanamycins. *Pharmaceutical Research* 26 (2009) 936–945.
- (127) Srinivas, R. V.; Middlemas, D.; Flynn, P.; Fridland, A.
Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (1998) 3157–3162.
- (128) Olson, D. P.; Scadden, D. T.; D’Aquila, R. T.; De Pasquale, M. P. The protease inhibitor ritonavir inhibits the functional activity of the multidrug resistance related-protein 1 (MRP-1). *AIDS* 16 (2002) 1743–1747.

- (129) Shitan, N.; Tanaka, M.; Terai, K.; Ueda, K.; Yazaki, K.
Human MDR1 and MRP1 recognize berberine as their transport substrate.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 71 (2007) 242–245.
- (130) Michot, J.-M.; Bambeke, F. V.; Mingeot-Leclercq, M.-P.; Tulkens, P. M.
Active Efflux of Ciprofloxacin from J774 Macrophages through an MRP-Like Transporter.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (2004) 2673–2682.
- (131) Sasabe, H.; Kato, Y.; Suzuki, T.; Itose, M.; Miyamoto, G.; Sugiyama, Y.
Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and P-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310 (2004) 648–655.
- (132) Laochariyakul, P.; Ponglikitmongkol, M.; Mankhetkorn, S.
Functional study of intracellular P-gp- and MRP1-mediated pumping of free cytosolic pirarubicin into acidic organelles in intrinsic resistant SiHa cells.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 81 (2003) 790–799.
- (133) Tamai, I.; Yamashita, J.; Kido, Y.; Ohnari, A.; Sai, Y.; Shima, Y.; Naruhashi, K.; Koizumi, S.; Tsuji, A. Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 295 (2000) 146–152.
- (134) Ishikawa, T.; Bao, J. J.; Yamane, Y.; Akimaru, K.; Frindrich, K.; Wright, C. D.; Kuo, M. T.
Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 14981–14988.
- (135) Draper, M. P.; Martell, R. L.; Levy, S. B. Active efflux of the free acid form of the fluorescent dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein in multidrug-resistance-protein-overexpressing murine and human leukemia cells.
European Journal of Biochemistry 243 (1997) 219–224.
- (136) Essodaigui, M.; Broxterman, H. J.; Garnier-Suillerot, A.
Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* 37 (1998) 2243–2250.
- (137) Holló, Z.; Homolya, L.; Hegedüs, T.; Sarkadi, B.
Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS letters* 383 (1996) 99–104.
- (138) Paumi, C. M.; Ledford, B. G.; Smitherman, P. K.; Townsend, A. J.; Morrow, C. S.
Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity.
The Journal of Biological Chemistry 276 (2001) 7952–7956.

-
- (139) Barnouin, K.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; Pourtier-Manzanedo, A.; König, J.; Lehmann, W. D.; Keppler, D. Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. *British Journal of Cancer* 77 (1998) 201–209.
- (140) Loe, D. W.; Stewart, R. K.; Massey, T. E.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Molecular Pharmacology* 51 (1997) 1034–1041.
- (141) Leslie, E. M.; Ito, K.-i.; Upadhyaya, P.; Hecht, S. S.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Transport of the β -O-Glucuronide Conjugate of the Tobacco-specific Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 27846–27854.
- (142) Evers, R.; Cnubben, N. H.; Wijnholds, J.; van Deemter, L.; van Bladeren, P. J.; Borst, P. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS letters* 419 (1997) 112–116.
- (143) Renes, J.; de Vries, E. E.; Hooiveld, G. J.; Krikken, I.; Jansen, P. L.; Müller, M. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *The Biochemical Journal* 350 Pt 2 (2000) 555–561.
- (144) Bakos, E.; Evers, R.; Sinkó, E.; Váradi, A.; Borst, P.; Sarkadi, B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Molecular Pharmacology* 57 (2000) 760–768.
- (145) Sjölander, M.; Tornhamre, S.; Claesson, H. E.; Hydman, J.; Lindgren, J. Characterization of a leukotriene C4 export mechanism in human platelets: possible involvement of multidrug resistance-associated protein 1. *Journal of Lipid Research* 40 (1999) 439–446.
- (146) Keppler, D.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; König, J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chemico-Biological Interactions* 111-112 (1998) 153–161.
- (147) Bartosz, G.; König, J.; Keppler, D.; Haggmann, W. Human mast cells secreting leukotriene C4 express the MRP1 gene-encoded conjugate export pump. *Biological Chemistry* 379 (1998) 1121–1126.
- (148) Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Hummel-Eisenbeiss, J.; Burchell, B.; Keppler, D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochemical Journal* 327 (1 1997) 305–310.
- (149) Keppler, D.; Leier, I.; Jedlitschky, G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biological Chemistry* 378 (1997) 787–791.

- (150) Qian, Y. M.; Song, W. C.; Cui, H.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.
Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1.
The Journal of Biological Chemistry 276 (2001) 6404–6411.
- (151) Hooijberg, J. H.; Jansen, G.; Assaraf, Y. G.; Kathmann, I.; Pieters, R.; Laan, A. C.;
Veerman, A. J. P.; Kaspers, G. J. L.; Peters, G. J. Folate concentration dependent transport
activity of the Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1).
Biochemical Pharmacology 67 (2004) 1541–1548.
- (152) Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Center, M.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.; Keppler, D.
ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate
export pump. *The Biochemical Journal* 314 (2 1996) 433–437.
- (153) De Jong, M. C.; Slootstra, J. W.; Scheffer, G. L.; Schroeijers, A. B.; Puijk, W. C.; Dinkelberg, R.;
Kool, M.; Broxterman, H. J.; Meloen, R. H.; Scheper, R. J.
Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1.
Cancer Research 61 (2001) 2552–2557.
- (154) Watts, R. N.; Hawkins, C.; Ponka, P.; Richardson, D. R.
Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione
efflux via multidrug resistance-associated protein 1.
Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006) 7670–7675.
- (155) Rigato, I.; Pascolo, L.; Ferneti, C.; Ostrow, J. D.; Tiribelli, C.
The human multidrug-resistance-associated protein MRP1 mediates ATP-dependent transport of
unconjugated bilirubin. *The Biochemical Journal* 383 (2 2004) 335–341.
- (156) Falcão, A. S.; Bellarosa, C.; Fernandes, A.; Brito, M. A.; Silva, R. F. M.; Tiribelli, C.; Brites, D.
Role of multidrug resistance-associated protein 1 expression in the in vitro susceptibility of rat
nerve cell to unconjugated bilirubin. *Neuroscience* 144 (2007) 878–888.
- (157) Pascolo, L.; Ferneti, C.; Garcia-Mediavilla, M. V.; Ostrow, J. D.; Tiribelli, C.
Mechanisms for the transport of unconjugated bilirubin in human trophoblastic BeWo cells.
FEBS letters 495 (2001) 94–99.
- (158) Nieuwenhuis, B.; Lüth, A.; Chun, J.; Huwiler, A.; Pfeilschifter, J.; Schäfer-Korting, M.;
Kleuser, B.
Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype
S1P(3) in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone.
Journal of Molecular Medicine 87 (2009) 645–657.
- (159) Zhou, S.-F.; Wang, L.-L.; Di, Y. M.; Xue, C. C.; Duan, W.; Li, C. G.; Li, Y.
Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications
in drug development. *Current Medicinal Chemistry* 15 (2008) 1981–2039.

-
- (160) Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; Di Pietro, A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Medicinal Research Reviews* 25 (2005) 453–472.
- (161) Amiri-Kordestani, L.; Basseville, A.; Kurdziel, K.; Fojo, A. T.; Bates, S. E. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resistance Updates* 15 (2012) 50–61.
- (162) Shaffer, B. C.; Gillet, J.-P.; Patel, C.; Baer, M. R.; Bates, S. E.; Gottesman, M. M. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resistance Updates* 15 (2012) 62–69.
- (163) Yu, M.; Ocana, A.; Tannock, I. F. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Reviews* 32 (2013) 211–227.
- (164) Keppler, D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* (2011) 299–323.
- (165) Gekeler, V.; Ise, W.; Sanders, K. H.; Ulrich, W. R.; Beck, J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208 (1995) 345–352.
- (166) Norman, B. H.; Gruber, J. M.; Hollinshead, S. P.; Wilson, J. W.; Starling, J. J.; Law, K. L.; Self, T. D.; Tabas, L. B.; Williams, D. C.; Paul, D. C.; Wagner, M. M.; Dantzig, A. H. Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 (2002) 883–886.
- (167) Norman, B. H.; Lander, P. A.; Gruber, J. M.; Kroin, J. S.; Cohen, J. D.; Jungheim, L. N.; Starling, J. J.; Law, K. L.; Self, T. D.; Tabas, L. B.; Williams, D. C.; Paul, D. C.; Dantzig, A. H. Cyclohexyl-linked tricyclic isoxazoles are potent and selective modulators of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15 (2005) 5526–5530.
- (168) Burkhardt, C. A. et al. Small-molecule multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor reversan increases the therapeutic index of chemotherapy in mouse models of neuroblastoma. *Cancer Research* 69 (2009) 6573–6580.
- (169) Wang, S. et al. Studies on pyrrolopyrimidines as selective inhibitors of multidrug-resistance-associated protein in multidrug resistance. *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (2004) 1329–1338.
- (170) Wong, I. L. K.; Zhu, X.; Chan, K.-F.; Law, M. C.; Lo, A. M. Y.; Hu, X.; Chow, L. M. C.; Chan, T. H. Discovery of Novel Flavonoid Dimers To Reverse Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABC1) Mediated Drug Resistance in Cancers Using a High Throughput Platform with "Click Chemistry". *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (2018) 9931–9951.

- (171) Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998) 15665–15670.
- (172) Basseville, A.; Hall, M. D.; Chau, C. H.; Robey, R. W.; Gottesman, M.; Figg, W. D.; Bates, S. E. *ABC Transporters - 40 Years on*, George, A. M., Hrsg.; Springer International Publishing: 2016 195.
- (173) Bhatia, A.; Schäfer, H.-J.; Hrycyna, C. A. Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry* 44 (2005) 10893–10904.
- (174) Doyle, L. A.; Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22 (2003) 7340–7358.
- (175) Kage, K.; Tsukahara, S.; Sugiyama, T.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *International Journal of Cancer* 97 (2002) 626–630.
- (176) Nakanishi, T.; Doyle, L. A.; Hassel, B.; Wei, Y.; Bauer, K. S.; Wu, S.; Pumplin, D. W.; Fang, H.-B.; Ross, D. D. Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Molecular Pharmacology* 64 (2003) 1452–1462.
- (177) Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.; Zhang, J.-T. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 19781–19789.
- (178) Henriksen, U.; Fog, J. U.; Litman, T.; Gether, U. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 36926–36934.
- (179) Wakabayashi, K.; Nakagawa, H.; Tamura, A.; Koshihara, S.; Hoshijima, K.; Komada, M.; Ishikawa, T. Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 27841–27846.
- (180) McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I. D.; Ford, R. C.; Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14 (2006) 1623–1632.

-
- (181) Xu, J.; Peng, H.; Chen, Q.; Liu, Y.; Dong, Z.; Zhang, J.-T. Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Research* 67 (2007) 4373–4381.
- (182) Xie, Y.; Xu, K.; Linn, D. E.; Yang, X.; Guo, Z.; Shimelis, H.; Nakanishi, T.; Ross, D. D.; Chen, H.; Fazli, L.; Gleave, M. E.; Qiu, Y.
The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 3349–3356.
- (183) Taylor, N. M. I.; Manolaridis, I.; Jackson, S. M.; Kowal, J.; Stahlberg, H.; Locher, K. P. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature* 546 (2017) 504–509.
- (184) Jackson, S. M.; Manolaridis, I.; Kowal, J.; Zechner, M.; Taylor, N. M. I.; Bause, M.; Bauer, S.; Bartholomaeus, R.; Bernhardt, G.; Koenig, B.; Buschauer, A.; Stahlberg, H.; Altmann, K.-H.; Locher, K. P.
Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (2018) 333–340.
- (185) Manolaridis, I.; Jackson, S. M.; Taylor, N. M. I.; Kowal, J.; Stahlberg, H.; Locher, K. P. Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature* 563 (2018) 426–430.
- (186) Fetsch, P. A.; Abati, A.; Litman, T.; Morisaki, K.; Honjo, Y.; Mittal, K.; Bates, S. E. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Letters* 235 (2006) 84–92.
- (187) Bart, J.; Hollema, H.; Groen, H. J. M.; de Vries, E. G. E.; Hendrikse, N. H.; Sleijfer, D. T.; Wegman, T. D.; Vaalburg, W.; van der Graaf, W. T. A.
The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *European Journal of Cancer* 40 (2004) 2064–2070.
- (188) Cooray, H. C.; Blackmore, C. G.; Maskell, L.; Barrand, M. A.
Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 13 (2002) 2059–2063.
- (189) Taipalensuu, J.; Törnblom, H.; Lindberg, G.; Einarsson, C.; Sjöqvist, F.; Melhus, H.; Garberg, P.; Sjöström, B.; Lundgren, B.; Artursson, P.
Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2001) 164–170.
- (190) Gutmann, H.; Hruz, P.; Zimmermann, C.; Beglinger, C.; Drewe, J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochemical Pharmacology* 70 (2005) 695–699.

- (191) Hilgendorf, C.; Ahlin, G.; Seithel, A.; Artursson, P.; Ungell, A.-L.; Karlsson, J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metabolism and Disposition* **35** (2007) 1333–1340.
- (192) Tucker, T. G. H. A.; Milne, A. M.; Fournel-Gigleux, S.; Fenner, K. S.; Coughtrie, M. W. H. Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochemical Pharmacology* **83** (2012) 279–285.
- (193) Huls, M.; Brown, C. D. A.; Windass, A. S.; Sayer, R.; van den Heuvel, J. J. M. W.; Heemskerk, S.; Russel, F. G. M.; Masereeuw, R. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney International* **73** (2008) 220–225.
- (194) Robey, R. W.; To, K. K. K.; Polgar, O.; Dohse, M.; Fetsch, P.; Dean, M.; Bates, S. E. ABCG2: a perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61** (2009) 3–13.
- (195) Polgar, O.; Robey, R. W.; Bates, S. E. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4** (2008) 1–15.
- (196) Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Pérez, W. Y.; Robey, R. W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Research* **61** (2001) 6635–6639.
- (197) Robey, R. W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nadjem, T. A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynsky, M. S.; Bates, S. E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *British Journal of Cancer* **89** (2003) 1971–1978.
- (198) Ejendal, K. F. K.; Diop, N. K.; Schweiger, L. C.; Hrycyna, C. A. The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Science* **15** (2006) 1597–1607.
- (199) Miwa, M.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Asada, S.; Imai, Y.; Sugimoto, Y. Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *International Journal of Cancer* **107** (2003) 757–763.
- (200) Rajendra, R.; Gounder, M. K.; Saleem, A.; Schellens, J. H. M.; Ross, D. D.; Bates, S. E.; Sinko, P.; Rubin, E. H. Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin. *Cancer Research* **63** (2003) 3228–3233.

-
- (201) Maliepaard, M.; van Gastelen, M. A.; de Jong, L. A.; Pluim, D.; van Waardenburg, R. C.; Ruevekamp-Helmers, M. C.; Floot, B. G.; Schellens, J. H. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research* 59 (1999) 4559–4563.
- (202) Brangi, M.; Litman, T.; Ciotti, M.; Nishiyama, K.; Kohlhagen, G.; Takimoto, C.; Robey, R.; Pommier, Y.; Fojo, T.; Bates, S. E. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Research* 59 (1999) 5938–5946.
- (203) Yang, C. J.; Horton, J. K.; Cowan, K. H.; Schneider, E. Cross-resistance to camptothecin analogues in a mitoxantrone-resistant human breast carcinoma cell line is not due to DNA topoisomerase I alterations. *Cancer Research* 55 (1995) 4004–4009.
- (204) Ma, J.; Maliepaard, M.; Nooter, K.; Loos, W. J.; Kolker, H. J.; Verweij, J.; Stoter, G.; Schellens, J. H. Reduced cellular accumulation of topotecan: a novel mechanism of resistance in a human ovarian cancer cell line. *British Journal of Cancer* 77 (1998) 1645–1652.
- (205) Allen, J. D.; Brinkhuis, R. F.; Wijnholds, J.; Schinkel, A. H. The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Research* 59 (1999) 4237–4241.
- (206) Maliepaard, M.; van Gastelen, M. A.; Tohgo, A.; Hausheer, F. H.; van Waardenburg, R. C.; de Jong, L. A.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clinical Cancer Research* 7 (2001) 935–941.
- (207) Yang, C. H.; Schneider, E.; Kuo, M. L.; Volk, E. L.; Rocchi, E.; Chen, Y. C. BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 60 (2000) 831–837.
- (208) Litman, T.; Brangi, M.; Hudson, E.; Fetsch, P.; Abati, A.; Ross, D. D.; Miyake, K.; Resau, J. H.; Bates, S. E. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *Journal of Cell Science* 113 (11 2000) 2011–2021.
- (209) Ishii, M.; Iwahana, M.; Mitsui, I.; Minami, M.; Imagawa, S.; Tohgo, A.; Ejima, A. Growth inhibitory effect of a new camptothecin analog, DX-8951f, on various drug-resistant sublines including BCRP-mediated camptothecin derivative-resistant variants derived from the human lung cancer cell line PC-6. *Anti-Cancer Drugs* 11 (2000) 353–362.
- (210) Schellens, J. H.; Maliepaard, M.; Scheper, R. J.; Scheffer, G. L.; Jonker, J. W.; Smit, J. W.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 922 (2000) 188–194.

- (211) Elkind, N. B.; Szentpétery, Z.; Apáti, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Várady, G.; Ujhelly, O.; Szabó, K.; Homolya, L.; Váradi, A.; Buday, L.; Kéri, G.; Németh, K.; Sarkadi, B.
Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Research* **65** (2005) 1770–1777.
- (212) Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A. W. M.; Brok, M.; Wiemer, E. A. C.; Stoter, G.; Nooter, K.
Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **104** (2004) 2940–2942.
- (213) Brendel, C.; Scharenberg, C.; Dohse, M.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; Wang, Y.; Wennemuth, G.; Burchert, A.; Boudriot, U.; Neubauer, A.
Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* **21** (2007) 1267–1275.
- (214) Yanase, K.; Tsukahara, S.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Imai, Y.; Sugimoto, Y.
Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* **3** (2004) 1119–1125.
- (215) Scharenberg, C. W.; Harkey, M. A.; Torok-Storb, B.
The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99** (2002) 507–512.
- (216) Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E.
Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Research* **64** (2004) 1242–1246.
- (217) Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Van Der Valk, M. A.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R. P. J. O.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H.
The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** (2002) 15649–15654.
- (218) Özvegy-Laczka, C.; Köblös, G.; Sarkadi, B.; Váradi, A. Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1668** (2005) 53–63.
- (219) Liu, W.; Baer, M. R.; Bowman, M. J.; Pera, P.; Zheng, X.; Morgan, J.; Pandey, R. A.; Oseroff, A. R. The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate enhances the efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2. *Clinical Cancer Research* **13** (2007) 2463–2470.
- (220) Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Bates, S. E.
ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biology & Therapy* **4** (2005) 187–194.

-
- (221) Chen, Z.-S.; Robey, R. W.; Belinsky, M. G.; Shchaveleva, I.; Ren, X.-Q.; Sugimoto, Y.; Ross, D. D.; Bates, S. E.; Kruh, G. D. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Research* **63** (2003) 4048–4054.
- (222) Shafran, A.; Ifergan, I.; Bram, E.; Jansen, G.; Kathmann, I.; Peters, G. J.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Assaraf, Y. G. ABCG2 Harboring the Gly482 Mutation Confers High-Level Resistance to Various Hydrophilic Antifolates. *Cancer Research* **65** (2005) 8414–8422.
- (223) Huang, L.; Wang, Y.; Grimm, S. ATP-dependent transport of rosuvastatin in membrane vesicles expressing breast cancer resistance protein. *Drug Metabolism and Disposition* **34** (2006) 738–742.
- (224) Fujino, H.; Saito, T.; Ogawa, S.-I.; Kojima, J. Transporter-mediated influx and efflux mechanisms of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57** (2005) 1305–1311.
- (225) Deeken, J. F.; Robey, R. W.; Shukla, S.; Steadman, K.; Chakraborty, A. R.; Poonkuzhali, B.; Schuetz, E. G.; Holbeck, S.; Ambudkar, S. V.; Bates, S. E. Identification of compounds that correlate with ABCG2 transporter function in the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Molecular Pharmacology* **76** (2009) 946–956.
- (226) Wu, C.-P.; Shukla, S.; Calcagno, A. M.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V. Evidence for dual mode of action of a thiosemicarbazone, NSC73306: a potent substrate of the multidrug resistance linked ABCG2 transporter. *Molecular Cancer Therapeutics* **6** (2007) 3287–3296.
- (227) Heijden, J. v. d.; Jong, M. C. d.; Dijkmans, B. a. C.; Lems, W. F.; Oerlemans, R.; Kathmann, I.; Schalkwijk, C. G.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Jansen, G. Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNF α . *Annals of the Rheumatic Diseases* **63** (2004) 138–143.
- (228) Woodward, O. M.; Köttgen, A.; Coresh, J.; Boerwinkle, E.; Guggino, W. B.; Köttgen, M. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (2009) 10338–10342.
- (229) Rabindran, S. K.; Ross, D. D.; Doyle, L. A.; Yang, W.; Greenberger, L. M. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Research* **60** (2000) 47–50.
- (230) Rabindran, S. K.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K. I.; Annable, T.; Greenberger, L. M. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Research* **58** (1998) 5850–5858.

- (231) Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H. M.; Koomen, G.-J.; Schinkel, A. H.
Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C.
Molecular Cancer Therapeutics **1** (2002) 417–425.
- (232) Van Loevezijn, A.; Allen, J. D.; Schinkel, A. H.; Koomen, G. J.
Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **11** (2001) 29–32.
- (233) Qadir, M.; O’Loughlin, K. L.; Fricke, S. M.; Williamson, N. A.; Greco, W. R.; Minderman, H.; Baer, M. R. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator.
Clinical Cancer Research **11** (2005) 2320–2326.
- (234) De Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E.
Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR.
Cancer Letters **146** (1999) 117–126.
- (235) Minderman, H.; O’Loughlin, K. L.; Pendyala, L.; Baer, M. R.
VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein.
Clinical Cancer Research **10** (2004) 1826–1834.
- (236) Giri, N.; Agarwal, S.; Shaik, N.; Pan, G.; Chen, Y.; Elmquist, W. F.
Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in in vitro assay design.
Drug Metabolism and Disposition **37** (2009) 560–570.
- (237) Ozvegy-Laczka, C.; Hegedus, T.; Várady, G.; Ujhelly, O.; Schuetz, J. D.; Váradi, A.; Kéri, G.; Orfi, L.; Német, K.; Sarkadi, B.
High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter.
Molecular Pharmacology **65** (2004) 1485–1495.
- (238) Robey, R. W.; Shukla, S.; Steadman, K.; Obrzut, T.; Finley, E. M.; Ambudkar, S. V.; Bates, S. E.
Inhibition of ABCG2-mediated transport by protein kinase inhibitors with a bisindolylmaleimide or indolocarbazole structure. *Molecular Cancer Therapeutics* **6** (2007) 1877–1885.
- (239) Nakamura, Y.; Oka, M.; Soda, H.; Shiozawa, K.; Yoshikawa, M.; Itoh, A.; Ikegami, Y.; Tsurutani, J.; Nakatomi, K.; Kitazaki, T.; Doi, S.; Yoshida, H.; Kohno, S.
Gefitinib (Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance.
Cancer Research **65** (2005) 1541–1546.
- (240) Houghton, P. J.; Germain, G. S.; Harwood, F. C.; Schuetz, J. D.; Stewart, C. F.; Buchdunger, E.; Traxler, P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Research* **64** (2004) 2333–2337.

-
- (241) Braun, A. H.; Stark, K.; Dirsch, O.; Hilger, R. A.; Seeber, S.; Vanhoefer, U. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib sensitizes colon cancer cells to irinotecan. *Anti-Cancer Drugs* **16** (2005) 1099–1108.
- (242) Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M. E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular Pharmacology* **65** (2004) 1208–1216.
- (243) Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M. E. Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharmaceutical Research* **21** (2004) 1263–1273.
- (244) Imai, Y.; Tsukahara, S.; Asada, S.; Sugimoto, Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Research* **64** (2004) 4346–4352.
- (245) Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Muñoz-Martínez, F.; Bates, S. E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Pérez-Victoria, J. M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Research* **65** (2005) 4852–4860.
- (246) Katayama, R.; Koike, S.; Sato, S.; Sugimoto, Y.; Tsuruo, T.; Fujita, N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Science* **100** (2009) 2060–2068.
- (247) Henrich, C. J.; Robey, R. W.; Takada, K.; Bokesch, H. R.; Bates, S. E.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; McMahon, J. B.; Gustafson, K. R. Botryllamides: Natural Product Inhibitors of ABCG2. *ACS chemical biology* **4** (2009) 637–647.
- (248) Holland, M. L.; Lau, D. T. T.; Allen, J. D.; Arnold, J. C. The multidrug transporter ABCG2 (BCRP) is inhibited by plant-derived cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* **152** (2007) 815–824.
- (249) Chearwae, W.; Shukla, S.; Limtrakul, P.; Ambudkar, S. V. Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Molecular Cancer Therapeutics* **5** (2006) 1995–2006.
- (250) Ma, Y.; Wink, M. The beta-carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drugs mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells. *Phytotherapy research* **24** (2010) 146–149.
- (251) Cooray, H. C.; Janvilisri, T.; van Veen, H. W.; Hladky, S. B.; Barrand, M. A. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317** (2004) 269–275.

- (252) Morita, H.; Koyama, K.; Sugimoto, Y.; Kobayashi, J. Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15** (2005) 1051–1054.
- (253) DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* **22** (2003) 151–185.
- (254) Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews. Drug Discovery* **9** (2010) 203–214.
- (255) Jhoti, H.; Rees, S.; Solari, R. High-throughput screening and structure-based approaches to hit discovery: is there a clear winner? *Expert Opinion on Drug Discovery* **8** (2013) 1449–1453.
- (256) Lavecchia, A.; Di Giovanni, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current Medicinal Chemistry* **20** (2013) 2839–2860.
- (257) Griesenauer, R. H.; Kinch, M. S. 2016 in review: FDA approvals of new molecular entities. *Drug Discovery Today* **22** (2017) 1593–1597.
- (258) Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* **38** (2015) 1686–1701.
- (259) Anderson, A. C. The process of structure-based drug design. *Chemistry & Biology* **10** (2003) 787–797.
- (260) Chen, Y.-P. P.; Chen, F. Identifying targets for drug discovery using bioinformatics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **12** (2008) 383–389.
- (261) Kalyaanamoorthy, S.; Chen, Y.-P. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discovery Today* **16** (2011) 831–839.
- (262) Andricopulo, A. D.; Salum, L. B.; Abraham, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **9** (2009) 771–790.
- (263) Cavagnaro, J. A. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* **1** (2002) 469–475.
- (264) Silverman, R. B.; Holladay, M. W., *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action: Third Edition*; Elsevier Inc: 2015.
- (265) Prathipati, P.; Dixit, A.; Saxena, A. Computer-Aided Drug Design: Integration of Structure-Based and Ligand-Based Approaches in Drug Design. *Current Computer-Aided Drug Design* **3** (2007) 133–148.

-
- (266) Grinter, S. Z.; Zou, X. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. *Molecules* **19** (2014) 10150–10176.
- (267) Kutchukian, P. S.; Shakhnovich, E. I.
De novo design: balancing novelty and confined chemical space.
Expert Opinion on Drug Discovery **5** (2010) 789–812.
- (268) Rodrigues, T.; Schneider, G.
Flashback Forward: Reaction-Driven De Novo Design of Bioactive Compounds.
Synlett **25** (2014) 170–178.
- (269) Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen, Klebe, G., Hrsg.;
Spektrum Akademischer Verlag: 2009 303.
- (270) Lee, J.-Y.; Kinch, L. N.; Borek, D. M.; Wang, J.; Wang, J.; Urbatsch, I. L.; Xie, X.-S.;
Grishin, N. V.; Cohen, J. C.; Otwinowski, Z.; Hobbs, H. H.; Rosenbaum, D. M.
Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature* **533** (2016) 561–564.
- (271) Liu, F.; Zhang, Z.; Csanády, L.; Gadsby, D. C.; Chen, J.
Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell* **169** (2017) 85–95.
- (272) Zhang, Z.; Liu, F.; Chen, J. Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR.
Proceedings of the National Academy of Sciences (2018) 201815287.
- (273) Kim, Y.; Chen, J.
Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation.
Science **359** (2018) 915–919.
- (274) Jin, M. S.; Oldham, M. L.; Zhang, Q.; Chen, J.
Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *C. elegans*.
Nature **490** (2012) 566–569.
- (275) Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer, E. F.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.;
Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M.
The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures.
European Journal of Biochemistry **80** (1977) 319–324.
- (276) Xu, Y.; Shen, Q.; Liu, X.; Lu, J.; Li, S.; Luo, C.; Gong, L.; Luo, X.; Zheng, M.; Jiang, H.
Computational models for predicting interactions with membrane transporters.
Current Medicinal Chemistry **20** (2013) 2118–2136.
- (277) Seigneuret, M.; Garnier-Suillerot, A. A structural model for the open conformation of the mdr1
P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure.
The Journal of Biological Chemistry **278** (2003) 30115–30124.
- (278) Stenham, D. R.; Campbell, J. D.; Sansom, M. S. P.; Higgins, C. F.; Kerr, I. D.; Linton, K. J.
An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived
from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB journal* **17** (2003) 2287–2289.

- (279) Pleban, K.; Kopp, S.; Csaszar, E.; Peer, M.; Hrebicek, T.; Rizzi, A.; Ecker, G. F.; Chiba, P. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Molecular Pharmacology* 67 (2005) 365–374.
- (280) Qian, F.; Wei, D.; Zhang, Q.; Yang, S. Modulation of P-glycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59 (2005) 64–69.
- (281) O'Mara, M. L.; Tieleman, D. P. P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK. *FEBS letters* 581 (2007) 4217–4222.
- (282) Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model. *ChemMedChem* 3 (2008) 280–295.
- (283) Stockner, T.; de Vries, S. J.; Bonvin, A. M. J. J.; Ecker, G. F.; Chiba, P. Data-driven homology modelling of P-glycoprotein in the ATP-bound state indicates flexibility of the transmembrane domains. *The FEBS journal* 276 (2009) 964–972.
- (284) Harris, M. J.; Kuwano, M.; Webb, M.; Board, P. G. Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 20876–20881.
- (285) Campbell, J. D.; Koike, K.; Moreau, C.; Sansom, M. S. P.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 463–468.
- (286) Li, Y.-F.; Polgar, O.; Okada, M.; Esser, L.; Bates, S. E.; Xia, D. Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: a molecular modeling study. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 25 (2007) 837–851.
- (287) Hazai, E.; Bikádi, Z. Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Journal of Structural Biology* 162 (2008) 63–74.
- (288) Chang, G. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *Journal of Molecular Biology* 330 (2003) 419–430.
- (289) Reyes, C. L.; Chang, G. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 308 (2005) 1028–1031.
- (290) Ward, A.; Reyes, C. L.; Yu, J.; Roth, C. B.; Chang, G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007) 19005–19010.

-
- (291) Polgar, O.; Robey, R. W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Tarasova, N.; Bates, S. E. Mutational Analysis of ABCG2: Role of the GXXXG Motif. *Biochemistry* **43** (2004) 9448–9456, Publisher: American Chemical Society.
- (292) Chen, L.; Li, Y.; Yu, H.; Zhang, L.; Hou, T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discovery Today* **17** (2012) 343–351.
- (293) Dolgih, E.; Bryant, C.; Renslo, A. R.; Jacobson, M. P. Predicting Binding to P-Glycoprotein by Flexible Receptor Docking. *PLoS Computational Biology* **7** (2011).
- (294) Klepsch, F.; Chiba, P.; Ecker, G. F. Exhaustive sampling of docking poses reveals binding hypotheses for propafenone type inhibitors of P-glycoprotein. *PLoS computational biology* **7** (2011) 1002036.
- (295) Klepsch, F.; Vasanthanathan, P.; Ecker, G. F. Ligand and structure-based classification models for prediction of P-glycoprotein inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* **54** (2014) 218–229.
- (296) Ferreira, R. J.; Ferreira, M.-J. U.; dos Santos, D. J. V. A. Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein. *Journal of Chemical Information and Modeling* **53** (2013) 1747–1760.
- (297) Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen, Klebe, G., Hrsg.; Spektrum Akademischer Verlag: 2009 265.
- (298) Montanari, F.; Ecker, G. F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction—Recent advances and future challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews* **86** (2015) 17–26.
- (299) Broccatelli, F.; Carosati, E.; Neri, A.; Frosini, M.; Goracci, L.; Oprea, T. I.; Cruciani, G. A novel approach for predicting P-glycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields. *Journal of Medicinal Chemistry* **54** (2011) 1740–1751.
- (300) Chen, L.; Li, Y.; Zhao, Q.; Peng, H.; Hou, T. ADME evaluation in drug discovery. 10. Predictions of P-glycoprotein inhibitors using recursive partitioning and naive Bayesian classification techniques. *Molecular Pharmaceutics* **8** (2011) 889–900.
- (301) Montanari, F.; Ecker, G. F. BCRP Inhibition: from Data Collection to Ligand-Based Modeling. *Molecular Informatics* **33** (2014) 322–331.
- (302) Matsson, P.; Pedersen, J. M.; Norinder, U.; Bergström, C. A. S.; Artursson, P. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharmaceutical Research* **26** (2009) 1816–1831.

- (303) Ekins, S.; Kim, R. B.; Leake, B. F.; Dantzig, A. H.; Schuetz, E. G.; Lan, L.-B.; Yasuda, K.; Shepard, R. L.; Winter, M. A.; Schuetz, J. D.; Wikel, J. H.; Wrighton, S. A. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology* **61** (2002) 964–973.
- (304) Ekins, S.; Kim, R. B.; Leake, B. F.; Dantzig, A. H.; Schuetz, E. G.; Lan, L.-B.; Yasuda, K.; Shepard, R. L.; Winter, M. A.; Schuetz, J. D.; Wikel, J. H.; Wrighton, S. A. Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Molecular Pharmacology* **61** (2002) 974–981.
- (305) Penzotti, J. E.; Lamb, M. L.; Evensen, E.; Grootenhuys, P. D. J. A Computational Ensemble Pharmacophore Model for Identifying Substrates of P-Glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry* **45** (2002) 1737–1740.
- (306) Li, W.-X.; Li, L.; Eksterowicz, J.; Ling, X. B.; Cardozo, M. Significance analysis and multiple pharmacophore models for differentiating P-glycoprotein substrates. *Journal of Chemical Information and Modeling* **47** (2007) 2429–2438.
- (307) Palmeira, A.; Rodrigues, F.; Sousa, E.; Pinto, M.; Vasconcelos, M. H.; Fernandes, M. X. New uses for old drugs: pharmacophore-based screening for the discovery of P-glycoprotein inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design* **78** (2011) 57–72.
- (308) Pan, Y.; Chothe, P. P.; Swaan, P. W. Identification of novel breast cancer resistance protein (BCRP) inhibitors by virtual screening. *Molecular Pharmaceutics* **10** (2013) 1236–1248.
- (309) Chang, C.; Ekins, S.; Bahadduri, P.; Swaan, P. W. Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58** (2006) 1431–1450.
- (310) Bakken, G. A.; Jurs, P. C. Classification of Multidrug-Resistance Reversal Agents Using Structure-Based Descriptors and Linear Discriminant Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* **43** (2000) 4534–4541.
- (311) Gombar, V. K.; Polli, J. W.; Humphreys, J. E.; Wring, S. A.; Serabjit-Singh, C. S. Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure-activity relationship model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93** (2004) 957–968.
- (312) Cianchetta, G.; Singleton, R. W.; Zhang, M.; Wildgoose, M.; Giesing, D.; Fravolini, A.; Cruciani, G.; Vaz, R. J. A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *Journal of Medicinal Chemistry* **48** (2005) 2927–2935.
- (313) Li, Y.; Wang, Y.-H.; Yang, L.; Zhang, S.-W.; Liu, C.-H.; Yang, S.-L. Comparison of steroid substrates and inhibitors of P-glycoprotein by 3D-QSAR analysis. *Journal of Molecular Structure* **733** (2005) 111–118.

-
- (314) Cabrera, M. A.; González, I.; Fernández, C.; Navarro, C.; Bermejo, M.
A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates.
Journal of Pharmaceutical Sciences **95** (2006) 589–606.
- (315) Crivori, P.; Reinach, B.; Pezzetta, D.; Poggesi, I.
Computational models for identifying potential P-glycoprotein substrates and inhibitors.
Molecular Pharmaceutics **3** (2006) 33–44.
- (316) Osterberg, T.; Norinder, U. Theoretical calculation and prediction of P-glycoprotein-interacting drugs using MolSurf parametrization and PLS statistics.
European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences **10** (2000) 295–303.
- (317) Hammann, F.; Gutmann, H.; Jecklin, U.; Maunz, A.; Helma, C.; Drewe, J.
Development of decision tree models for substrates, inhibitors, and inducers of p-glycoprotein.
Current Drug Metabolism **10** (2009) 339–346.
- (318) Xue, Y.; Yap, C. W.; Sun, L. Z.; Cao, Z. W.; Wang, J. F.; Chen, Y. Z.
Prediction of P-Glycoprotein Substrates by a Support Vector Machine Approach.
Journal of Chemical Information and Computer Sciences **44** (2004) 1497–1505.
- (319) De Cerqueira Lima, P.; Golbraikh, A.; Oloff, S.; Xiao, Y.; Tropsha, A.
Combinatorial QSAR Modeling of P-Glycoprotein Substrates.
Journal of Chemical Information and Modeling **46** (2006) 1245–1254.
- (320) Huang, J.; Ma, G.; Muhammad, I.; Cheng, Y. Identifying P-glycoprotein substrates using a support vector machine optimized by a particle swarm.
Journal of Chemical Information and Modeling **47** (2007) 1638–1647.
- (321) Sun, H. A Naive Bayes Classifier for Prediction of Multidrug Resistance Reversal Activity on the Basis of Atom Typing. *Journal of Medicinal Chemistry* **48** (2005) 4031–4039.
- (322) Wang, Y.-H.; Li, Y.; Yang, S.-L.; Yang, L. Classification of substrates and inhibitors of P-glycoprotein using unsupervised machine learning approach.
Journal of Chemical Information and Modeling **45** (2005) 750–757.
- (323) Revalde, J. L.; Li, Y.; Hawkins, B. C.; Rosengren, R. J.; Paxton, J. W.
Heterocyclic cyclohexanone monocarbonyl analogs of curcumin can inhibit the activity of ATP-binding cassette transporters in cancer multidrug resistance.
Biochemical Pharmacology **93** (2015) 305–317.
- (324) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Wiese, M. 4-Anilino-2-pyridylquinazolines and -pyrimidines as Highly Potent and Nontoxic Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2).
Journal of Medicinal Chemistry **60** (2017) 4474–4495.
- (325) Juvale, K.; Wiese, M. 4-Substituted-2-phenylquinazolines as inhibitors of BCRP.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **22** (2012) 6766–6769.

- (326) Krapf, M. K.; Wiese, M. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Anilino-quinazolines and -quinolines as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *Journal of Medicinal Chemistry* **59** (2016) 5449–5461.
- (327) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Vahdati, S.; Wiese, M. New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Containing a 2,4-Disubstituted Pyridopyrimidine Scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry* **61** (2018) 3389–3408.
- (328) Henrich, C. J.; Robey, R. W.; Bokesch, H. R.; Bates, S. E.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; Dean, M.; McMahon, J. B. New inhibitors of ABCG2 identified by high-throughput screening. *Molecular Cancer Therapeutics* **6** (2007) 3271–3278.
- (329) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70** (2007) 461–477.
- (330) Lam, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology* **15** (2007) 279–289.
- (331) Tan, G.; Gyllenhaal, C.; Soejarto, D. D. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Current Drug Targets* **7** (2006) 265–277.
- (332) Karthikeyan, S.; Hoti, S. L. Development of Fourth Generation ABC Inhibitors from Natural Products: A Novel Approach to Overcome Cancer Multidrug Resistance. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **15** (2015) 605–615.
- (333) McDonald, L. A.; Christopher Swersey, J.; Ireland, C. M.; Carroll, A. R.; Coll, J. C.; Bowden, B. F.; Fairchild, C. R.; Cornell, L. Botryllamides A-D, new brominated tyrosine derivatives from styelid ascidians of the genus *Botryllus*. *Tetrahedron* **51** (1995) 5237–5244.
- (334) Rao, M. R.; Faulkner, D. J. Botryllamides E-H, Four New Tyrosine Derivatives from the Ascidian *Botrylloides tyreum*. *Journal of Natural Products* **67** (2004) 1064–1066.
- (335) Takada, K.; Imamura, N.; Gustafson, K. R.; Henrich, C. J. Synthesis and structure–activity relationship of botryllamides that block the ABCG2 multidrug transporter. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20** (2010) 1330–1333.
- (336) Gooßen, L. J.; Blanchot, M.; Arndt, M.; Salih, K. S. M. Synthesis of Botryllamides and Lansiumamides via Ruthenium-Catalyzed Hydroamidation of Alkynes. *Synlett* **2010** (2010) 1685–1687.
- (337) Becker, H. G. O.; Beckert, R.; Fanghänel, E.; Habicher, W. D.; Knölker, H.-J.; Metz, P.; Schwetlick, K., *Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum*, 24. Auflage; Wiley-VCH Verlag: 2015.
- (338) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.

-
- (339) Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **38** (2009) 606–631.
- (340) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **77** (1955) 1067–1068.
- (341) Sheehan, J. C.; Hlavka, J. J.
The Use of Water-Soluble and Basic Carbodiimides in Peptide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **21** (1956) 439–441.
- (342) Sheehan, J.; Cruickshank, P.; Boshart, G.
Notes - A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. *The Journal of Organic Chemistry* **26** (1961) 2525–2528.
- (343) Windridge, G.; Jorgensen, E. C. 1-Hydroxybenzotriazole as a racemization-suppressing reagent for the incorporation of im-benzyl-L-histidine into peptides. *Journal of the American Chemical Society* **93** (1971) 6318–6319.
- (344) Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent¹. *Journal of the American Chemical Society* **82** (1960) 4596–4600.
- (345) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews* **111** (2011) 6557–6602.
- (346) Staab, H. A. New Methods of Preparative Organic Chemistry IV. Syntheses Using Heterocyclic Amides (Azolides). *Angewandte Chemie* **1** (1962) 351–367.
- (347) Staab, H. A. Reaktionsfähige Heterocyclische Diamide Der Kohlensäure. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **609** (1957) 75–83.
- (348) Staab, H. A.; Lüking, M.; Dürr, F. H. Darstellung von Imidazoliden. Synthese von Amidien, Hydraziden und Hydroxamsäuren nach der Imidazolidmethode. *Chemische Berichte* **95** (1962) 1275–1283.
- (349) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A.
Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis¹. *The Journal of Organic Chemistry* **63** (1998) 9678–9683.
- (350) Snider, B. B.; Song, F.; Foxman, B. M.
Total Syntheses of (±)-Anchinopeptolide D and (±)-Cycloanchinopeptolide D. *The Journal of Organic Chemistry* **65** (2000) 793–800.
- (351) Palmeira, A.; Sousa, E.; Vasconcelos, M. H.; Pinto, M. M.
Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current Medicinal Chemistry* **19** (2012) 1946–2025.
- (352) Ozols, R. F.; Cunnion, R. E.; Klecker, R. W.; Hamilton, T. C.; Ostchega, Y.; Parrillo, J. E.; Young, R. C. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* **5** (1987) 641–647.

- (353) Li, Y.; Revalde, J. L.; Reid, G.; Paxton, J. W. Interactions of dietary phytochemicals with ABC transporters: possible implications for drug disposition and multidrug resistance in cancer. *Drug Metabolism Reviews* **42** (2010) 590–611.
- (354) Limtrakul, P. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Aggarwal, B. B., Surh, Y.-J., Shishodia, S., Hrsg.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer US: 2007 269.
- (355) Li, Y.; Revalde, J. L.; Reid, G.; Paxton, J. W. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **68** (2011) 603–610.
- (356) Zhao, C.; Liu, Z.; Liang, G. Promising curcumin-based drug design: mono-carbonyl analogues of curcumin (MACs). *Current Pharmaceutical Design* **19** (2013) 2114–2135.
- (357) Metzler, M.; Pfeiffer, E.; Schulz, S. I.; Dempe, J. S. Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors* **39** (2013) 14–20.
- (358) Cheng, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research* **21** (2001) 2895–2900.
- (359) Vareed, S. K.; Kakarala, M.; Ruffin, M. T.; Crowell, J. A.; Normolle, D. P.; Djuric, Z.; Brenner, D. E. Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **17** (2008) 1411–1417.
- (360) Chearwae, W.; Anuchapreeda, S.; Nandigama, K.; Ambudkar, S. V.; Limtrakul, P. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder. *Biochemical Pharmacology* **68** (2004) 2043–2052.
- (361) Chearwae, W.; Wu, C.-P.; Chu, H. .-.-Y.; Lee, T. R.; Ambudkar, S. V.; Limtrakul, P. Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **57** (2005) 376.
- (362) Liang, G.; Shao, L.; Wang, Y.; Zhao, C.; Chu, Y.; Xiao, J.; Zhao, Y.; Li, X.; Yang, S. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, Special Issue: Natural Products in Medicinal Chemistry* **17** (2009) 2623–2631.
- (363) Adams, B. K.; Ferstl, E. M.; Davis, M. C.; Herold, M.; Kurtkaya, S.; Camalier, R. F.; Hollingshead, M. G.; Kaur, G.; Sausville, E. A.; Rickles, F. R.; Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Shoji, M. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12** (2004) 3871–3883.

-
- (364) Weber, W. M.; Hunsaker, L. A.; Abcouwer, S. F.; Deck, L. M.; Vander Jagt, D. L. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13** (2005) 3811–3820.
- (365) Artico, M.; Di Santo, R.; Costi, R.; Novellino, E.; Greco, G.; Massa, S.; Tramontano, E.; Marongiu, M. E.; De Montis, A.; La Colla, P. Geometrically and Conformationally Restrained Cinnamoyl Compounds as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling. *Journal of Medicinal Chemistry* **41** (1998) 3948–3960.
- (366) Liang, G.; Li, X.; Chen, L.; Yang, S.; Wu, X.; Studer, E.; Gurley, E.; Hylemon, P. B.; Ye, F.; Li, Y.; Zhou, H. Synthesis and anti-inflammatory activities of mono-carbonyl analogues of curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 1525–1529.
- (367) Wang, Y. J.; Pan, M. H.; Cheng, A. L.; Lin, L. I.; Ho, Y. S.; Hsieh, C. Y.; Lin, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15** (1997) 1867–1876.
- (368) Wortelboer, H. M.; Usta, M.; van der Velde, A. E.; Boersma, M. G.; Spenkelink, B.; van Zanden, J. J.; Rietjens, I. M. C. M.; van Bladeren, P. J.; Cnubben, N. H. P. Interplay between MRP inhibition and metabolism of MRP inhibitors: the case of curcumin. *Chemical Research in Toxicology* **16** (2003) 1642–1651.
- (369) Gryniewicz, G.; Ślifirski, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica* **59** (2012) 201–212.
- (370) Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; König, B.; Buschauer, A. Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *Journal of Medicinal Chemistry* **52** (2009) 1190–1197.
- (371) Dunitz, J. D. Organic fluorine: odd man out. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* **5** (2004) 614–621.
- (372) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **53** (2010) 5061–5084.
- (373) Szakács, G.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M.; Boumendjel, A.; Kachadourian, R.; Day, B. J.; Baubichon-Cortay, H.; Di Pietro, A. Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance. *Chemical Reviews* **114** (2014) 5753–5774.
- (374) Juvale, K.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *European Journal of Medicinal Chemistry* **67** (2013) 115–126.

- (375) Valdameri, G.; Genoux-Bastide, E.; Peres, B.; Gauthier, C.; Guitton, J.; Terreux, R.; Winnischofer, S. M. B.; Rocha, M. E. M.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. *Journal of Medicinal Chemistry* **55** (2012) 966–970.
- (376) Pick, A.; Wiese, M. Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *ChemMedChem* **7** (2012) 650–662.
- (377) Tiwari, A. K.; Sodani, K.; Wang, S.-R.; Kuang, Y.-H.; Ashby, C. R.; Chen, X.; Chen, Z.-S. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochemical Pharmacology* **78** (2009) 153–161.
- (378) Juvale, K.; Gallus, J.; Wiese, M. Investigation of quinazolines as inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21** (2013) 7858–7873.
- (379) Li, J. Investigation of Phthalazine, Quinazoline and Pyrimidine Derivatives as ABCG2 Inhibitors., Dissertation: Universität Bonn, 2018.
- (380) Buhr, C. A.; Bajjalieh, W.; Joshi, A. A.; Lara, K.; Ma, S.; Marlowe, C. K.; Wang, L.; Yeung, B. K. S. (Exelixis, I.). Pyrido [2, 3-d] pyrimidin-7-one compounds as inhibitors of pi3k-alpha for the treatment of cancer. Pat., WO2008127678A1, 2008.
- (381) Erkin, A. V.; Krutikov, V. I. Effect of the structural modification of 2-benzylamino-4-(4-iodophenyl)amino-6-methylpyrimidine on the biological activity of its derivatives. *Russian Journal of General Chemistry* **82** (2012) 1567–1572.
- (382) Vilsmeier, A.; Haack, A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **60** (1927) 119–122.
- (383) Pinner, A. Ueber die Umwandlung der Nitrile in Imide. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **16** (1883) 1643–1655.
- (384) Golubev, P. R.; Pankova, A. S.; Kuznetsov, M. A. Transition-Metal-Free Approach to 4-Ethynylpyrimidines via Alkenynones. *European Journal of Organic Chemistry* **2014** (2014) 3614–3621.
- (385) Krapf, M. Investigation of Quinazoline Derivatives as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)., Dissertation: Universität Bonn, 2018.
- (386) Chiou, C. T.; Schmedding, D. W.; Block, J. H.; Manes, M. Substituent Contribution to the Partition Coefficients of Substituted Benzenes in Solvent-Water Mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **71** (1982) 1307–1309.

-
- (387) Free, S. M.; Wilson, J. W. A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **7** (1964) 395–399, Publisher: American Chemical Society.
- (388) Kubinyi, H. Free Wilson Analysis. Theory, Applications and its Relationship to Hansch Analysis. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **7** (1988) 121–133.
- (389) Köhler, S. C.
Über ABCG2-Inhibitoren mit Heteroaryl-phenylamid- und Carborancarboxamid-Grundstruktur.,
Dissertation: Universität Bonn, 2017.
- (390) Ramsden, C. A., *Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds Vol. 4, Vol. 4*, New York : Pergamon Press: 1990.
- (391) Kubinyi, H., *QSAR : Hansch analysis and related approaches*; VCH: 1993; 260 S.
- (392) Cramer, I. R. D.; Milne, M.
The Lattice Model: A general paradigm for shape-related structure/activity correlation.
Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc. *Computer Chemistry Section: no. 44* (1979).
- (393) Cramer, R. D.; Bunce, J. D. *QSAR in drug design and toxicology*; Elsevier: 1987 3.
- (394) Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins.
Journal of the American Chemical Society **110** (1988) 5959–5967.
- (395) Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity.
Journal of Medicinal Chemistry **37** (1994) 4130–4146.
- (396) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Wiese, M. Synthesis and biological investigation of 2,4-substituted quinazolines as highly potent inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2).
European Journal of Medicinal Chemistry **139** (2017) 587–611.
- (397) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Namasivayam, V.; Wiese, M.
2,4,6-Substituted Quinazolines with Extraordinary Inhibitory Potency toward ABCG2.
Journal of Medicinal Chemistry **61** (2018) 7952–7976.
- (398) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Spindler, A.; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives - A SAR study of novel inhibitors of ABCG2.
European Journal of Medicinal Chemistry **161** (2019) 506–525.
- (399) Molecular Operating Environment (MOE)., Version 2013.08, 2019.
- (400) Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **17** (1996) 490–519.
- (401) Halgren, T. A. Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions.
Journal of Computational Chemistry **17** (1996) 520–552.

- (402) Halgren, T. A.
Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94.
Journal of Computational Chemistry **17** (1996) 553–586.
- (403) Halgren, T. A.; Nachbar, R. B.
Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94.
Journal of Computational Chemistry **17** (1996) 587–615.
- (404) Halgren, T. A. Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules.
Journal of Computational Chemistry **17** (1996) 616–641.
- (405) Kim, K. H. 3D-Quantitative Structure-Activity Relationships: Nonlinear Dependence Described Directly from 3D Structures Using a Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Approach.
Quantitative Structure-Activity Relationships **11** (1992) 309–317.
- (406) Kim, K. H.
3D-Quantitative Structure-Activity Relationships: Investigation of Steric Effects with Descriptors Directly from 3D Structures Using a Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Approach.
Quantitative Structure-Activity Relationships **11** (1992) 453–460.
- (407) Kim, K. H.
3D-Quantitative Structure-Activity Relationships: Description of Electronic Effects Directly from 3D Structures Using a GRID-Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Approach.
Quantitative Structure-Activity Relationships **11** (1992) 127–134.
- (408) Kim, K. H.
3D-Quantitative Structure-Activity Relationships: Describing Hydrophobic Interactions Directly from 3D Structures Using a Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Approach.
Quantitative Structure-Activity Relationships **12** (1993) 232–238.
- (409) Chan, S. L.; Labute, P. Training a Scoring Function for the Alignment of Small Molecules.
Journal of Chemical Information and Modeling **50** (2010) 1724–1735.
- (410) Labute, P.; Williams, C.; Feher, M.; Sourial, E.; Schmidt, J. M.
Flexible Alignment of Small Molecules. *Journal of Medicinal Chemistry* **44** (2001) 1483–1490.
- (411) Batch FlexAlign., 2019.
- (412) Hechinger, M.; Leonhard, K.; Marquardt, W. What is Wrong with Quantitative Structure–Property Relations Models Based on Three-Dimensional Descriptors?
Journal of Chemical Information and Modeling **52** (2012) 1984–1993.
- (413) Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method.
Journal of Computational Chemistry **10** (1989) 209–220.
- (414) Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications.
Journal of Computational Chemistry **10** (1989) 221–264.

-
- (415) Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods. III Extension of PM3 to Be, Mg, Zn, Ga, Ge, As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Te, Hg, Tl, Pb, and Bi.
Journal of Computational Chemistry **12** (1991) 320–341.
- (416) Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D.
- (417) Kubinyi, H. *Encyclopedia of Computational Chemistry*; American Cancer Society: 2002.
- (418) Sybyl-X Molecular Modeling Software Packages., Version 1.3, 2019.
- (419) Stumpfe, D.; Bajorath, J. Exploring Activity Cliffs in Medicinal Chemistry.
Journal of Medicinal Chemistry **55** (2012) 2932–2942.
- (420) Offermanns, H. Azalogie-Prinzip: hin und zurück.
Nachrichten aus der Chemie **59** (2011) 1152–1153.
- (421) Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation.
Molecular Informatics **29** (2010) 476–488.
- (422) Zhao, L.; Wang, W.; Sedykh, A.; Zhu, H.
Experimental Errors in QSAR Modeling Sets: What We Can Do and What We Cannot Do.
ACS Omega **2** (2017) 2805–2812.
- (423) Guha, R.; Van Drie, J. H.
Structure–activity landscape index: identifying and quantifying activity cliffs.
Journal of Chemical Information and Modeling **48** (2008) 646–658.
- (424) Rogers, D.; Hahn, M. Extended-Connectivity Fingerprints.
Journal of Chemical Information and Modeling **50** (2010) 742–754.
- (425) R Development Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*;
R Foundation for Statistical Computing: 2008.
- (426) Guha, R. Chemical Informatics Functionality in R.
Journal of Statistical Software **18** (2007) 1–16.
- (427) Yasri, A.; Hartsough, D.
Toward an optimal procedure for variable selection and QSAR model building.
Journal of Chemical Information and Computer Sciences **41** (2001) 1218–1227.
- (428) Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of q^2 !
Journal of Molecular Graphics and Modelling, QSAR in vivo **20** (2002) 269–276.
- (429) Roy, P. P.; Roy, K.
On Some Aspects of Variable Selection for Partial Least Squares Regression Models.
QSAR & Combinatorial Science **27** (2008) 302–313.
- (430) Roy, K.; Mitra, I. On the use of the metric rm^2 as an effective tool for validation of QSAR models in computational drug design and predictive toxicology.
Mini Reviews in Medicinal Chemistry **12** (2012) 491–504.

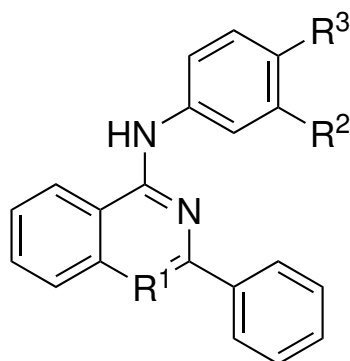
- (431) Cruz-Monteagudo, M.; Medina-Franco, J. L.; Pérez-Castillo, Y.; Nicolotti, O.; Cordeiro, M. N. D. S.; Borges, F. Activity cliffs in drug discovery: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Drug Discovery Today* **19** (2014) 1069–1080.
- (432) Lheureux, S. et al. Expected Benefits of Topotecan Combined With Lapatinib in Recurrent Ovarian Cancer According to Biological Profile: A Phase 2 Trial. *International Journal of Gynecological Cancer* **22** (2012) 1483–1488.
- (433) Molina, J. R.; Kaufmann, S. H.; Reid, J. M.; Rubin, S. D.; Gálvez-Peralta, M.; Friedman, R.; Flatten, K. S.; Koch, K. M.; Gilmer, T. M.; Mullin, R. J.; Jewell, R. C.; Felten, S. J.; Mandrekar, S.; Adjei, A. A.; Erlichman, C. Evaluation of Lapatinib and Topotecan Combination Therapy: Tissue Culture, Murine Xenograft, and Phase I Clinical Trial Data. *Clinical cancer research* **14** (2008) 7900–7908.
- (434) Stewart, C. F.; Tagen, M.; Schwartzberg, L. S.; Blakely, L. J.; Tauer, K. W.; Smiley, L. M. Phase I dosage finding and pharmacokinetic study of intravenous topotecan and oral erlotinib in adults with refractory solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **73** (2014) 561–568.
- (435) Lewis, C. W.; Anderson, J. G.; Smith, J. E. *Aspergillus*, Smith, J. E., Hrsg.; Biotechnology Handbooks; Springer US: 1994 219.
- (436) Shukla, S.; Zaher, H.; Hartz, A.; Bauer, B.; Ware, J. A.; Ambudkar, S. V. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice. *Pharmaceutical Research* **26** (2009) 480–487.

Anhang

Tabellen der verwendeten Datensätze für die 3D-QSAR-Modelle

A.1 Projekt I

Tabelle A.1: Datensatz für die CoMFA- und CoMSIA-Modelle von **Projekt I**.



Verb.	R ¹	R ²	R ³	pIC ₅₀ Hoechst 33342-Assay
1	N	H	H	6,05
2	N	H	CN	7,15
3	N	H	OH	6,68
4	N	H	SO ₂ F	6,25
5	N	NO ₂	OH	7,09
6	N	NO ₂	H	6,89
7	N	CN	H	6,85
8	N	NHCOCH ₃	H	6,55

9	N	SCH ₃	H	5,93
10	N	OCH ₃	H	5,88
11	N	H	OCH ₃	5,71
12	N	OCH ₃	OCH ₃	6,81
13	N	F	OCH ₃	6,05
14	N	OCH ₃	Br	6,54
15	N	CH ₃	I	5,84
16	N	F	H	6,45
17	N	H	F	5,97
18	N	H	Cl	6,08
19	N	I	H	6,09
20	N	H	I	6,21
21	N	H	COOCH ₃	6,02
22	N	H	COOC(CH ₃) ₃	5,24
23	N	H	COOH	5,23
24	N	CCH	H	6,17
25	N	CH ₃	H	5,94
26	N	H	CH ₃	5,82
27	N	C(CH ₃) ₃	H	5,97
28	N	H	C(CH ₃) ₃	5,97
29	CH	OCH ₃	H	6,04
30	CH	SCH ₃	H	5,72
31	CH	NHCOCH ₃	H	5,78
32	CH	H	CN	6,06
33	CH	F	H	5,66

Tabelle A.2: Vollständige Ergebnisse der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von Projekt I.

CoMFA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q ²	n _{opt}	S _{PRESS}
Both	-0,460	1	0,575
Elektrostatisches (e)	-0,799	1	0,638
Sterisches (s)	-0,065	1	0,491
H-Brücken (hb)	-0,054	3	0,505
e + s + hb	-0,245	3	0,549

CoMSIA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
----------------	--------------------------------	--	--

Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}
Elektrostatisches (e)	0,104	2	0,458
Sterisches (s)	-0,043	1	0,486
Hydrophobes (h)	0,172	1	0,433
H-Brücken Donor (d)	0,012	4	0,498
H-Brücken Akzeptor (a)	0,147	4	0,462
e + s	0,019	1	0,471
e + h	0,189	1	0,428
e + d	0,230	3	0,432
e + a	0,133	2	0,450
s + h	0,160	1	0,436
s + d	-0,101	2	0,507
s + a	-0,058	2	0,497
h + d	0,159	1	0,436
h + a	0,139	2	0,449
d + a	0,156	4	0,460
e + s + d	0,003	1	0,475
e + s + a	-0,008	2	0,485
e + s + h	0,178	1	0,431
e + h + d	0,203	4	0,447
e + h + a	0,132	1	0,443
e + d + a	0,222	5	0,450
s + h + d	0,149	1	0,439
s + h + a	0,110	2	0,456
s + d + a	-0,002	2	0,484
h + d + a	0,124	4	0,468
e + h + d + a	0,181	4	0,453
e + s + d + a	0,013	2	0,481
e + h + s + d	0,166	1	0,435
e + h + s + a	0,124	1	0,445
h + s + d + a	0,090	1	0,454
e + s + h + d + a	0,117	1	0,447

A.2 Projekt II

Tabelle A.3: Datensatz für die CoMFA- und CoMSIA-Modelle von **Projekt II**.



Verb.	R ¹	R ²	Grundstruktur	pIC ₅₀ Hoechst 33342-Assay
1	2-Py	3-NO ₂	A	6,44
2	3-Py	3-NO ₂	A	7,00
3	4-Py	3-NO ₂	A	6,95
4	3-Py	4-NO ₂	A	7,20
5	2-Py	3-CN	A	6,30
6	3-Py	3-CN	A	6,97
7	4-Py	3-CN	A	6,87
8	3-Py	4-CN	A	6,79
9	2-Py	3-OCH ₃	A	5,80
10	3-Py	3-OCH ₃	A	6,00
11	4-Py	3-OCH ₃	A	6,26
12	4-Py	4-OCH ₃	A	6,57
13	2-Py	3,4-OCH ₃	A	5,98
14	3-Py	3,4-OCH ₃	A	6,13
15	4-Py	3,4-OCH ₃	A	6,27
16	4-Py	3-CF ₃	A	6,67
17	4-Py	4-CF ₃	A	6,31
18	4-Py	3-CF ₃ -4-OCH ₃	A	6,84
19	3-Py	3-F	A	6,82
20	4-Py	3-SO ₂ F	A	5,86
21	3-Py	3-N(CH ₃) ₂	A	5,93
22	4-Py	3-OH	A	5,98
23	4-Py	4-OH	A	5,39
24	3-Py	3-CH ₂ OH	A	6,11
25	4-Py	3-CH ₂ OH	A	6,05

26	3-Py	3-NO ₂ -4-OH	A	6,61
27	3-Py	3-COOCH ₃	A	6,45
28	4-Py	3-COOCH ₃	A	6,41
29	4-Py	3-COOC(CH ₃) ₃	A	6,55
30	4-Py	3-CN	B	6,89
31	4-Py	3-OCH ₃	B	6,57
32	4-Py	4-OCH ₃	B	6,07
33	Ph	3-CN	B	6,92
34	Ph	4-CN	B	6,91
35	Ph	3-NO ₂ -4-OH	B	7,01
36	Ph	H	B	6,20
37	Ph	3-CN	A	6,85
38	Ph	4-CN	A	7,15
39	Ph	3-NO ₂ -4-OH	A	7,09
40	Ph	4-OH	A	6,68
41	Ph	3-F	A	6,45
42	Ph	4-F	A	5,97
43	Ph	3-Cl	A	5,71
44	Ph	4-Cl	A	6,08
45	Ph	3-I	A	6,09
46	Ph	4-I	A	6,21
47	Ph	3-CH ₃ -4-I	A	5,84
48	Ph	H	A	6,05

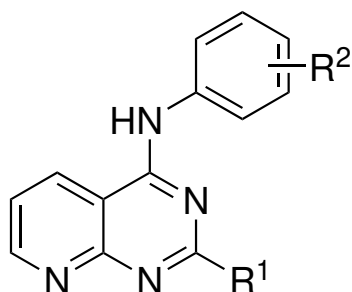
Tabelle A.4: Vollständige Ergebnisse der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von Projekt II.

CoMFA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}	
Both	0,265	2	0,388	
Elektrostatisches (e)	0,275	6	0,404	
Sterisches (s)	-0,011	1	0,451	
H-Brücken (hb)	0,280	1	0,380	
e + s + hb	0,331	1	0,366	
CoMSIA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q^2	n_{opt}	S_{PRESS}	
Elektrostatisches (e)	0,397	2	0,352	
Sterisches (s)	-0,100	1	0,470	
Hydrophobes (h)	0,175	6	0,431	
H-Brücken Donor (d)	-0,046	2	0,463	
H-Brücken Akzeptor (a)	0,434	3	0,345	
e + s	0,390	2	0,354	
e + h	0,501	4	0,327	
e + d	0,364	1	0,357	
e + a	0,385	2	0,355	
s + h	0,093	2	0,431	
s + d	-0,092	2	0,473	
s + a	0,289	4	0,391	
h + d	0,085	1	0,429	
h + a	0,486	5	0,336	
d + a	0,166	3	0,418	
e + s + d	0,364	1	0,357	
e + s + a	0,387	2	0,355	
e + s + h	0,473	3	0,332	
e + h + d	0,423	2	0,344	
e + h + a	0,514	4	0,323	
e + d + a	0,347	2	0,366	
s + h + d	0,086	1	0,428	
s + h + a	0,412	5	0,359	
s + d + a	0,114	1	0,422	

h + d + a	0,291	5	0,395
e + h + d + a	0,428	3	0,346
e + s + d + a	0,350	2	0,365
e + h + s + d	0,431	2	0,342
e + h + s + a	0,484	4	0,333
h + s + d + a	0,219	3	0,405
e + s + h + d + a	0,413	3	0,351

A.3 Projekt III

Tabelle A.5: Datensatz für die CoMFA- und CoMSIA-Modelle von **Projekt III**.



Verb.	R ¹	R ²	pIC ₅₀ Hoechst 33342-Assay
1	Ph	H	6,83
2	Ph	3-NO ₂	6,29
3	Ph	3-NO ₂ -4-OH	6,28
4	Ph	4-NO ₂	4,72
5	Ph	3-CN	6,40
6	Ph	4-CN	5,92
7	Ph	3-OCH ₃	6,85
8	Ph	4-OCH ₃	6,63
9	Ph	3,4-OCH ₃	6,47
10	Ph	3-SCH ₃	6,69
11	Ph	3-OH	5,91
12	Ph	4-OH	5,69
13	Ph	3-NHCOCH ₃	5,29
14	Ph	3-CF ₃	6,75
15	Ph	3-F	6,77
16	Ph	3-Cl	6,36
17	3-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂	6,14

18	3-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂ -4-OH	5,90
19	3-OCH ₃ -Ph	3-CN	6,46
20	3-OCH ₃ -Ph	4-CN	6,07
21	3-OCH ₃ -Ph	3-OH	6,03
22	3-OCH ₃ -Ph	4-OH	5,88
23	3-OCH ₃ -Ph	3,4-OCH ₃	6,24
24	3-OCH ₃ -Ph	4-SCH ₃	6,11
25	3-OCH ₃ -Ph	3-NHCOCH ₃	5,22
26	3-OCH ₃ -Ph	3-F	6,59
27	3-OCH ₃ -Ph	4-F	6,28
28	3-OCH ₃ -Ph	3,4-F	6,21
29	3-OCH ₃ -Ph	3-CF ₃	6,75
30	3-OCH ₃ -Ph	4-CF ₃	6,37
31	3-OCH ₃ -Ph	3-Cl	6,20
32	3-OCH ₃ -Ph	3-Br	5,82
33	3-Py	3-F	5,91
34	3-Py	3-OH	4,78

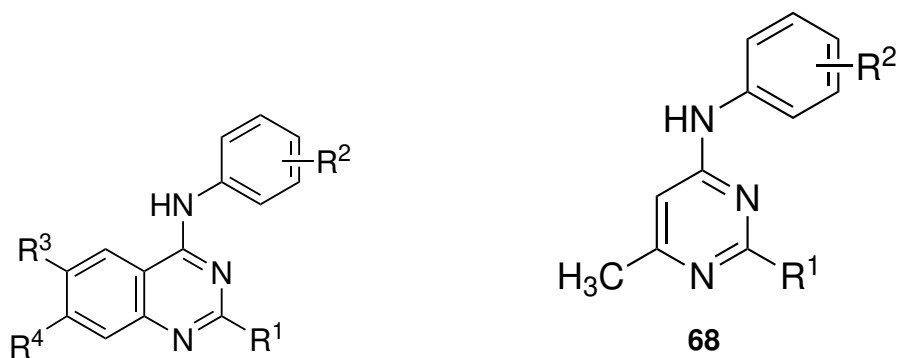
Tabelle A.6: Vollständige Ergebnisse der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von Projekt III.

CoMFA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q ²	n _{opt}	S _{PRESS}	
Both	0,230	3	0,490	
Elektrostatisches (e)	0,230	3	0,490	
Sterisches (s)	0,185	2	0,496	
H-Brücken (hb)	0,280	6	0,500	
e + s + hb	0,205	3	0,498	
CoMSIA-Modelle		Leave-One-Out-Kreuzvalidierung		
Felder	q ²	n _{opt}	S _{PRESS}	
Elektrostatisches (e)	0,200	4	0,508	
Sterisches (s)	-0,008	2	0,552	
Hydrophobes (h)	0,330	6	0,482	
H-Brücken Donor (d)	0,270	1	0,462	
H-Brücken Akzeptor (a)	0,535	6	0,402	
e + s	0,186	3	0,504	

e + h	0,406	6	0,454
e + d	0,308	1	0,450
e + a	0,454	6	0,435
s + h	0,316	5	0,478
s + d	0,260	1	0,465
s + a	0,552	6	0,407
h + d	0,568	6	0,387
h + a	0,546	3	0,376
d + a	0,640	6	0,353
e + s + d	0,296	1	0,454
e + s + a	0,433	4	0,428
e + s + h	0,385	6	0,462
e + h + d	0,539	6	0,400
e + h + a	0,727	6	0,308
e + d + a	0,520	6	0,408
s + h + d	0,383	6	0,463
s + h + a	0,550	4	0,381
s + d + a	0,571	6	0,386
h + d + a	0,722	6	0,311
e + h + d + a	0,659	6	0,344
e + s + d + a	0,504	6	0,415
e + h + s + d	0,524	6	0,406
e + h + s + a	0,686	6	0,330
h + s + d + a	0,655	6	0,346
e + s + h + d + a	0,646	6	0,350

A.4 Projekt IV

Tabelle A.7: Datensatz für die CoMFA- und CoMSIA-Modelle von **Projekt IV**.



Verb.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	pIC ₅₀ Hoechst 33342-Assay
1	Ph	H	H	H	6,05
2	Ph	2-Br	H	H	5,43
3	Ph	3-Br	H	H	6,24
4	Ph	4-Br	H	H	5,17
5	Ph	3-Cl	H	H	5,72
6	Ph	3-Cl-4-F	H	H	5,78
7	Ph	2-OCH ₃	H	H	5,65
8	Ph	3-OCH ₃	H	H	5,88
9	Ph	4-OCH ₃	H	H	5,72
10	Ph	3,4-OCH ₃	H	H	6,71
11	Ph	2-NO ₂	H	H	5,23
12	Ph	3-NO ₂	H	H	6,90
13	Ph	4-NO ₂	H	H	6,01
14	Ph	3-CN	H	H	6,85
15	Ph	3-CF ₃	H	H	6,59
16	Ph	4-CF ₃	H	H	5,82
17	3,4-OCH ₃ -Ph	H	H	H	5,70
18	3,4-OCH ₃ -Ph	3-Br	H	H	6,54
19	3,4-OCH ₃ -Ph	3-OCH ₃	H	H	6,00
20	3,4-OCH ₃ -Ph	3,4-OCH ₃	H	H	6,38
21	3,4-OCH ₃ -Ph	2-NO ₂	H	H	6,20
22	3,4-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂	H	H	7,13
23	3,4-OCH ₃ -Ph	4-NO ₂	H	H	6,53
24	3,4-OCH ₃ -Ph	3,5-NO ₂	H	H	6,22
25	3,4-OCH ₃ -Ph	3-CF ₃	H	H	6,53
26	3,4-OCH ₃ -Ph	3-SO ₂ F	H	H	6,25
27	3,4-OCH ₃ -Ph	3-CN	H	H	6,72
28	3,4-OCH ₃ -Ph	2-OH	H	H	6,60
29	3,4-OCH ₃ -Ph	3-OH	H	H	6,87
30	3,4-OCH ₃ -Ph	4-OH	H	H	6,33
31	H	3-Br	H	H	5,98
32	H	3-CN	H	H	5,93
33	H	3-NO ₂	H	H	5,96
34	H	3-CF ₃	H	H	6,03
35	H	3,4-OCH ₃	H	H	5,32
36	H	3-Br	OCH ₃	OCH ₃	5,76

37	H	3-CF ₃	OCH ₃	OCH ₃	5,64
38	H	3-CN	OCH ₃	OCH ₃	5,98
39	H	2-NO ₂	OCH ₃	OCH ₃	5,42
40	H	3-NO ₂	OCH ₃	OCH ₃	6,09
41	H	4-NO ₂	OCH ₃	OCH ₃	5,54
42	H	3,4-OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	5,14
43	3-NO ₂ -Ph	3-NHCOCH ₃	H	H	6,87
44	3-NO ₂ -Ph	3-NO ₂	H	H	6,63
45	3-NO ₂ -Ph	3-CN	H	H	6,92
46	3-NO ₂ -Ph	3-OCH ₃	H	H	6,90
47	3-NO ₂ -Ph	3,4-OCH ₃	H	H	7,23
48	3-CN-Ph	4-Py	H	H	5,78
49	3-CN-Ph	3,4-OCH ₃	H	H	6,67
50	2-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂	H	H	6,20
51	3-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂	H	H	6,78
52	3-OCH ₃ -Ph	3-OCH ₃	H	H	6,10
53	3-OCH ₃ -Ph	3,4-OCH ₃	H	H	6,33
54	4-OCH ₃ -Ph	3-NO ₂	H	H	6,43
55	4-OCH ₃ -Ph	3-OCH ₃	H	H	5,66
56	4-OCH ₃ -Ph	3,4-OCH ₃	H	H	6,35
57	4-NO ₂ -Ph	3-OCH ₃	H	H	6,19
58	2-Py	3-NO ₂	H	H	6,44
59	2-Py	3-CN	H	H	6,30
60	3-Py	3,4-OCH ₃	H	H	6,13
61	3-Py	4-CN	H	H	6,27
62	3-Py	3-CH ₂ OH	H	H	6,11
63	3-Py	3-COOCH ₃	H	H	6,45
64	3-Py	3-NO ₂	H	H	6,93
65	4-Py	3-SO ₂ F	H	H	5,86
66	4-Py	3-CF ₃ -4-OCH ₃	H	H	6,84
67	4-Py	3-CH ₂ OH	H	H	5,99
68	4-Py	3-CN	-	-	6,74
69	4-Py	3-COOCH ₃	H	H	6,41
70	4-Py	3-COOC(CH ₃) ₃	H	H	6,56
71	4-Py	3-NO ₂	H	H	6,72
72	4-Py	3,4-OCH ₃	H	H	6,27
73	4-Py	3-CF ₃	H	H	6,67
74	4-Py	4-CF ₃	H	H	6,15

75	2-Pyrrol	4-OCH ₃	H	H	6,20
76	2-Pyrrol	3,4-OCH ₃	H	H	6,20
77	2-Pyrrol	3-CN	H	H	6,81
78	2-Thiophen	3-NO ₂	H	H	6,49
79	2-Thiophen	3-CN	H	H	6,71
80	2-Thiophen	3-OCH ₃	H	H	5,81
81	3-CN-Ph	4-Py	NO ₂	H	5,77
82	4-Py	3-CN	NO ₂	H	6,60

Tabelle A.8: Vollständige Ergebnisse der PLS-Analyse der CoMFA- und CoMSIA-Modelle des Datensatzes von **Projekt IV**.

CoMFA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung			No Validation		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	r²	SD	F
Both	0,476	2	0,354	0,902	0,160	73,6
Elektrostatisches (e)	0,387	3	0,385	0,880	0,177	58,8
Sterisches (s)	0,356	4	0,397	0,793	0,233	30,7
H-Brücken (hb)	0,417	2	0,373	0,847	0,200	44,4
e + s + hb	0,490	2	0,349	0,939	0,126	123,1
CoMSIA-Modelle	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung			No Validation		
Felder	q²	n_{opt}	S_{PRESS}	r²	SD	F
Elektrostatisches (e)	0,531	5	0,341	0,844	0,202	43,1
Sterisches (s)	0,245	6	0,436	0,725	0,268	21,1
Hydrophobes (h)	0,225	3	0,433	0,617	0,317	12,9
H-Brücken Donor (d)	-0,012	1	0,488	0,185	0,462	1,8
H-Brücken Akzeptor (a)	0,227	5	0,438	0,578	0,332	11,0
e + s	0,504	4	0,348	0,860	0,191	49,2
e + h	0,632	6	0,304	0,847	0,200	44,4
e + d	0,587	6	0,322	0,869	0,186	52,8
e + a	0,503	6	0,353	0,841	0,204	42,3
s + h	0,327	2	0,401	0,685	0,287	17,4
s + d	0,213	5	0,442	0,658	0,299	15,4
s + a	0,402	6	0,388	0,786	0,237	29,3
h + d	0,226	2	0,430	0,679	0,290	16,9
h + a	0,370	9	0,406	0,771	0,245	27,0
d + a	0,296	5	0,418	0,619	0,316	13,0

e + s + d	0,558	6	0,333	0,873	0,182	55,0
e + s + a	0,513	6	0,350	0,854	0,196	46,7
e + s + h	0,623	6	0,308	0,848	0,199	44,7
e + h + d	0,676	6	0,285	0,881	0,176	59,4
e + h + a	0,614	7	0,314	0,851	0,198	45,6
e + d + a	0,593	6	0,320	0,877	0,179	57,2
s + h + d	0,329	2	0,400	0,731	0,265	21,8
s + h + a	0,476	8	0,368	0,813	0,221	34,9
s + d + a	0,453	9	0,378	0,813	0,222	34,7
h + d + a	0,456	9	0,377	0,798	0,230	31,5
e + h + d + a	0,660	7	0,294	0,883	0,175	60,3
e + s + d + a	0,578	6	0,326	0,880	0,178	58,5
e + h + s + d	0,660	6	0,293	0,879	0,178	58,2
e + h + s + a	0,599	6	0,317	0,852	0,197	46,0
h + s + d + a	0,503	8	0,358	0,838	0,206	41,5
e + s + h + d + a	0,629	6	0,306	0,881	0,177	59,2

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mechanismen der Multidrug-Resistenz.	2
1.2	Transportmodelle von ABC-Transportern.	5
1.3	Das ATP-switch Modell.	6
1.4	Schematische Darstellung von ABCB1.	8
1.5	Schematische Darstellung von ABCC1.	11
1.6	Schematische Darstellung von ABCG2.	15
1.7	Arbeitsablauf im Wirkstoffdesign.	20
2.1	Allgemeine Struktur und vorgenommene Modifikationen der Botryllamide.	34
2.2	Struktur von Curcumin und der synthetisierten MACs.	34
2.3	Substitutionsmuster der untersuchten Pyrimidinstrukturen.	34
3.1	Ausgewählte Strukturen der untersuchten Botryllamide.	38
3.2	Modifikationen der Botryllamide.	39
3.3	Darstellung der Phenylacrylsäurederivate.	40
3.4	Peptidkupplung mit DCC.	41
3.5	Aktivierung mit HOBt als Additiv bei der Kupplung mit DCC.	42
3.6	Mechanismus der Bildung des Acylimidazols bei der Peptidkupplung mit CDI.	43
3.7	Mechanismus der Peptidkupplung mit 1H-Benzotriazolderivaten.	44
3.8	Darstellung der zwischen C10 und C11 gesättigten Botryllamide 7 – 25	44
3.9	Mechanismus zur Darstellung der acetylierten Vorstufen.	45
3.10	Darstellung der zwischen C10 und C11 ungesättigten Botryllamid-Endstufen 42 – 49	45
3.11	Fluoreszenz- und Dosis-Effekt-Kurven für den Standardinhibitor Ko143.	47
3.12	Ausgewählte Vertreter der Botryllamide.	48
3.13	Fluoreszenz- und Dosis-Effekt-Kurven für Verbindung 10	49
3.14	Ergebnisse der Testsubstanzen mit gesättigtem Amidlinker.	56
3.15	Ergebnisse der Testsubstanzen mit ungesättigtem Amidlinker.	57
4.1	Struktur von Curcumin.	60
4.2	Struktur der MACs von Curcumin.	60
4.3	Allgemeine Synthese der Monocarbonylanaloga von Curcumin (MACs).	62

4.4	Fluoreszenz-Zeit-Kurven für Verbindung 56	63
4.5	Konzentrations-Effekt-Kurve von 56 im Vergleich zur Referenzsubstanz XR9577.	64
4.6	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der ausgewählten MACs.	70
5.1	Beispiele von Tyrosinkinase-Inhibitoren.	74
5.2	Variationen am Substitutionsmuster der Pyrimidine.	74
5.3	Allgemeine Syntheseroute der symmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.	75
5.4	Reaktionsmechanismus der nukleophilen aromatischen Substitution.	76
5.5	Allgemeine Syntheseroute der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.	77
5.6	Reaktionsmechanismus der Bildung von 6-Methyl-2-(Thiomethyl)-4(3H)-pyrimidinon.	78
5.7	Reaktionsmechanismus der Bildung der 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinone.	79
5.8	Chlorierung von 2-Anilino-6-methyl-4(3H)-pyrimidinon.	79
5.9	Reaktionsmechanismus der Bildung der asymmetrischen 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.	80
5.10	Allgemeine Syntheseroute der 4-Anilino-2-aryl-6-methylpyrimidine.	80
5.11	Synthese von 3-Nitrobenzamidin.	81
5.12	Mechanismus der Synthese von 3-Nitrobenzamidin.	82
5.13	Reaktionsmechanismus der Bildung der Pyrimidinone.	82
5.14	Reaktionsmechanismus der S_NAr	83
5.15	Konzentrations-Effekt-Kurven der Verbindungen 112 , 113 und 114	92
5.16	Strukturmerkmale der Pyrimidine.	98
5.17	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der ausgewählten Pyrimidinderivate an ABCB1.	99
5.18	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der ausgewählten Pyrimidinderivate an ABCC1.	100
5.19	Dosis-Effektkurven aus dem MTT-Test für die Verbindungen 114 und 132	101
5.20	Dosis-Effektkurven zur Resistenzaufhebung.	102
5.21	Regressionsgeraden der pGI_{50} -Werte gegen die eingesetzten Konzentrationen.	105
6.1	Überlagerung aller Strukturen des Datensatz von Projekt II	112
6.2	Coulomb- und Lennard-Jones-Potentiale.	113
6.3	Vergleich der Gauß-Kurve mit den Potentialen der CoMFA-Analyse.	114
6.4	Überlagerung aller Strukturen des Datensatz von Projekt I	115
6.5	<i>activity cliffs</i> des Datensatz von Projekt I	117
6.6	Häufigkeitsverteilung der biologischen Aktivitäten von Projekt II	119
6.7	Häufigkeitsverteilung der biologischen Aktivitäten von Projekt III	120
6.8	Auftragung der vorhergesagten gegen die exp. Aktivitäten des CoMSIA-Modells.	124
6.9	SALI-Werte, Strukturen und Aktivitätsdaten der Ausreißer des CoMSIA-Modells.	126
6.10	q^2 -Werte für das CoMSIA-Modell mit randomisierten Aktivitätsdaten.	127
6.11	Auftragung der berechneten gegen die exp. Aktivitäten des externen Datensatz.	129
8.1	Prinzip des Hoechst 33342 Akkumulationsassay.	241
8.2	Pipettierschema für einen Hoechst 33342 Akkumulationsassay.	242

8.3	Prinzip des Calcein AM Akkumulationsassay.	244
8.4	Pipettierschema für einen standardmäßigen Calcein AM Assay.	245
8.5	Prinzip des MTT-Test.	247
8.6	Pipettierschema für den MTT-Test zur Überprüfung der Zelltoxizität.	248
8.7	Pipettierschema für den MTT-Test zur Resistenzaufhebung.	249

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über die ABC-Gene.	4
1.2	Substrate und Inhibitoren von ABCB1.	10
1.3	Substrate von ABCC1.	13
1.4	Substrate von ABCG2.	16
1.5	Inhibitoren von ABCG2.	18
1.6	Homologiemodelle von ABC-Transportern.	22
1.7	Pharmakophormodelle von ABCB1.	28
1.8	QSAR-Modelle von ABCB1.	30
3.1	Vergleich der IC ₅₀ -Werte der nachsynthetisierten Botryllamide.	50
3.2	IC ₅₀ -Werte der Testsubstanzen mit gesättigtem Amidlinker.	51
3.3	IC ₅₀ -Werte der Testsubstanzen mit ungesättigtem Amidlinker.	54
4.1	IC ₅₀ -Werte der Monocarbonylanaloga.	66
4.2	IC ₅₀ -Werte der Monocarbonylanaloga an ABCB1.	70
5.1	IC ₅₀ -Werte der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.	85
5.2	Vergleich der IC ₅₀ -Werte der 2,4-Bis-Anilino-6-methylpyrimidine.	89
5.3	IC ₅₀ -Werte der Endstufen.	91
5.4	Free-Wilson Matrix der Pyrimidine.	96
5.5	GI ₅₀ -Werte der ausgewähltenPyrimidine.	103
6.1	Einstellungen für das flexible Alignment	111
6.2	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt I	116
6.3	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt II	118
6.4	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt III	121
6.5	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt IV	123
6.6	Datensatz für die externe Validierung	128
6.7	Experimentelle und vorhergesagte pIC ₅₀ -Werte des externen Datensatz	131
8.3	Herstellung der Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe für die biologische Testung.	238
8.4	Pipettierschema zur Herstellung der Verdünnungsreihen der Modulatoren.	239

8.5	Chemikalien für die Herstellung eines Krebs-HEPES-Puffer.	239
8.6	Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihen für den MTT-Test.	247
A.1	Datensatz von Projekt I	291
A.2	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt I	292
A.3	Datensatz für Projekt II	294
A.4	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt II	296
A.5	Datensatz von Projekt III	297
A.6	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt III	298
A.7	Datensatz von Projekt IV	299
A.8	PLS-Analyse des Datensatzes von Projekt IV	302

Akronyme

POCl₃ Phosphoroxchlorid [82](#)

δ chemische Verschiebung [141](#)

F_{rel} relative Fluoreszenz [55](#)

J Kopplungskonstante [141](#)

p-TsOH *p*-Toluolsulfonsäure [61](#)

3D 3-dimensional [19](#)

ABC ATP-Bindungskassette [1](#)

ADP Adenosindiphosphat [5](#)

APT attached proton test [141](#)

ATP Adenosintriphosphat [2](#)

BCRP Breast Cancer Resistance Protein [2](#), [14](#)

BSO Buthioninsulfoximin [12](#)

CDI 1,1'-Carbonyldiimidazol [41](#)

cDNA komplementäre DNA [10](#)

CLM chronisch myeloische Leukämie [73](#)

CoMFA Comparative Molecular Field Analysis [29](#)

CoMSIA Comparative Molecular Similarity Indices Analysis [29](#)

DAD Diodenarraydetektor [141](#)

DC Dünnschichtchromatographie [139](#)

- DCC** Dicyclohexylcarbodiimid [40](#)
- DIPEA** Diisopropylethylamin [146](#)
- DMAP** 4-(Dimethylamino)-pyridin [41](#)
- DMEM** Dulbecco's modified Eagle medium [235](#)
- DMSO** Dimethylsulfoxid [45](#)
- DYLOMMS** *dynamic lattice-oriented molecular modeling system* [107](#)
- E. coli** Escherichia coli [7](#)
- E₁S** Estronsulfat [15](#)
- EC₅₀** mittlere effektive Konzentration [104](#)
- ECFP** Extended-connectivity fingerprints [125](#)
- EDC** 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid [43](#)
- FDA** Food and Drug Administration [18](#)
- FTC** Fumitremorgin C [16](#), [37](#)
- GSH** Glutathion [10](#)
- HGNC** Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee [3](#)
- HOBt** Hydroxybenzotriazol [41](#)
- HPLC** Hochleistungsflüssigchromatographie [141](#)
- HTS** Hochdurchsatz-Screening [18](#)
- HVC** hydrophobic vacuum cleaner [3](#)
- I_{max}** Maximalinhibition [64](#)
- IC₅₀** halbmaximale inhibitorische Konzentration [46](#)
- IFD** induced-fit Docking [24](#)
- kDa** Kilodalton [7](#)
- KHP** Krebs-HEPES-Puffer [236](#)

-
- Kryo-EM** Kryoelektronenmikroskopie 11
- LC/MS** Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung 141
- LDA** lineare Diskriminanzanalyse 29
- LOO** Leave-One-Out 115
- LTC₄** Leukotrien C4 11
- MAC** Monocarbonylanaloga des Curcumin 60
- MDR** Multidrug-Resistenz 1
- MDR1** Multidrug-Resistance-Protein 1 2
- MeOH** Methanol 61
- MRP1** Multidrug Resistance-Related Protein 1 2
- MS-209** Dofequidar™ 14
- NBD** Nucleotidbindungsdomäne 3
- NCI** National Cancer Institute 38
- OAT** organische Anionentransporter 14
- P-gp** P-Glykoprotein 1
- P_i** Phosphat 5
- PBS** phosphatgepufferte Kochsalzlösung 240
- PCA** Hauptkomponentenanalyse 29
- PLS** Partial Least Squares 107
- PPTS** Pyridinium *p*-Toluolsulfonat 61
- PRESS** Standardabweichung der Summe der Abweichungsquadrate 115
- PSC833** Valspodar 9
- QSAR** quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen 26
- S. aureus** Staphylococcus aureus 7

SALI Structure-activity landscape index [125](#)

SAR Struktur-Wirkungsbeziehungen [25](#)

SN-38 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin [101](#)

SVM support vector machine [25](#)

TAP Antigen-Peptidtransporter [11](#)

TBTU *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborat [43](#), [146](#)

THF Tetrahydrofuran [146](#)

TKI Tyrosinkinaseinhibitor [17](#)

TMD Transmembrandomäne [3](#)

VX-710 Biricodar™ [14](#)

XR9576 Tariquidar [9](#)

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Wiese für die Möglichkeit, unter seiner Leitung diese Arbeit anfertigen zu können. Für die überlassenen Freiräume, um meine Ideen umzusetzen und die konstruktiven Diskussionen. Seine Anregungen und die stetige Unterstützung bei Problemstellungen haben einen wichtigen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas für die Übernahme des Koreferats, sowie Herrn Priv. Doz. Dr. Hubert Rein und Prof. Dr. Thomas Reiprich für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Ich bedanke mich bei Annette Reiner, Marion Schneider und Sabine Terhart-Krabbe für die Anfertigung der zahlreichen NMR-Spektren und LC/MS-Analysen. Iris Jusen und Dieter Baumert danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der Arbeiten im Zelllabor, sowie ihre Hilfsbereitschaft bei Fragestellungen jeglicher Art.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen aus dem Arbeitskreis mit denen ich in den letzten Jahren viele schöne Momente erleben durfte. Allen voran möchte ich Dr. Anna Spindler, Dr. Michael Krapf, Dr. Sebastian Köhler, Katja Silbermann, Sahel Vahdati und Dr. Jiyang Li für die gute Zusammenarbeit und zahlreichen Hilfestellungen danken und nicht zuletzt die vielen Jahre der Freundschaft. Bei allen Kollegen des organisch-chemischen Praktikums bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre bei der Betreuung der Pharmaziestudenten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin bedanken, die mich immer unterstützten und mir motivierend zur Seite standen.