

Design und Synthese photoaktivierbarer Schutzgruppen für Biomoleküle mit Carbonylfunktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin FUNDA KILIC

aus Berlin, Deutschland

August 2010

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. Volker Hagen in der Zeit von Dezember 2006 bis Oktober 2009 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Beate Koksch
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

Disputation am 10.12.2010

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "*Design und Synthese photoaktivierbarer Schutzgruppen für Biomoleküle mit Carbonylfunktion*" ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel selbständig angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, im August 2010

Funda Kilic

Aus dieser Dissertation gingen bisher folgende Veröffentlichungen hervor:

F. Kilic, N. D. Kashikar, R. Schmidt, L. Alvarez, L. Dai, I. Weyand, B. Wiesner, N. Goodwin, V. Hagen, U. B. Kaupp

"Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of progesterone"
J. Am. Chem. Soc. **2009**, 131, 4027–4030.

V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur

"{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl}methyl moieties as photoremovable protecting groups for compounds with COOH, NH₂, OH, and C=O functions"
J. Org. Chem. **2010**, 75, 2790–2797

F. Kilic, U. B. Kaupp, V. Hagen

"Designing coumarin-based aldehydes and ketones", in Vorbereitung

Posterpräsentationen:

"Synthesis, photochemistry and application of photoactivable progesterone derivatives", Funda Kilic, Nachiket D. Kashikar, Normann Goodwin, Ingo Weyand, U. Benjamin Kaupp, Volker Hagen, 22nd IUPAC Symposium on Photochemistry, 28.07.–01.08.2008, Göteborg, Schweden.

"Caged progesterone: a new tool for studying rapid non-genomic actions of progesterone", Funda Kilic, Nachiket D. Kashikar, Normann Goodwin, Ingo Weyand, U. Benjamin Kaupp, Volker Hagen, 15th International Congress on Photobiology, 18.06.–23.06.2009, Düsseldorf, Deutschland.

Vorträge:

"Caged progesterone: a new tool for studying rapid non-genomic actions of progesterone", Phd Retreat, 18.09.–20.09.2008, Döllnsee, Deutschland.

"Caged carbonyl compounds: synthesis, photochemistry and application", Wissenschaftliches Kolloquium, 20.11.2008, caesar, Bonn, Deutschland.

"Caged progesterone", 15th International Congress on Photobiology, 18.06.–23.06.2009, Düsseldorf, Deutschland.

"Caged progesterone: a new tool for studying rapid non-genomic actions of progesterone", 6th International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones (RRSH), 02.09.–05.09.2009, Elche, Alicante, Spanien

Kurzzusammenfassung

Die Verwendung von Phototriggern (*caged* Verbindungen) hat sich als äußerst nützliche Methode erwiesen, um zelluläre Prozesse *in situ* zu untersuchen. Bei den *caged* Verbindungen handelt es sich um photolabile inaktive Derivate von Biomolekülen, aus denen durch Bestrahlung mit Licht die natürliche, biologisch aktive Substanz schnell lokal freigesetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue effiziente photoaktivierbare Schutzgruppen für Carbonylfunktionen mit hoher Wasserlöslichkeit entwickelt und erprobt. Dafür wurden Syntheseverfahren für substituierte 4-(1,2-Dihydroxyethyl)cumarine erarbeitet, die zum Schutz von Verbindungen mit Carbonylfunktionen verwendet wurden. Die erhaltenen *caged* Carbonylverbindungen, chemisch Cumarinyl-substituierte 1,3-Dioxolane, wurden vollständig photophysikalisch und photochemisch charakterisiert. Die als optimal befundene Schutzgruppe leitet sich von 8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin ab. Der neuartige Chromophor zeichnet sich durch eine sehr gute Wasserlöslichkeit in wässrigen Pufferlösungen, einen hohen Extinktionskoeffizienten im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichts, sowie eine effiziente Photolysierbarkeit aus.

Es wurden erstmals *caged* Verbindungen von den Biomolekülen Bourgeonal und Progesteron sowie dessen Derivat Progesteron-3-O-(carboxymethyl)oxim (Progesteron-3-CMO) synthetisiert, und es wurde die Anwendbarkeit der neu entwickelten photolabilen Carbonyl-Schutzgruppen bei der Untersuchung der Chemotaxis menschlicher Spermien gezeigt. Schließlich wurden auf der Basis eines Progesteron-3-CMO-Peptid-Derivates Werkzeuge zur Identifizierung der Rezeptorbindungsstelle für Progesteron an menschlichen Spermien entwickelt.

Schlagnote: photoaktivierbare Schutzgruppen, Cumarine, Carbonyl-Schutzgruppen, *caged* Verbindungen

Abstract

The application of phototriggers (caged compounds) has proven to be a very useful method for *in situ* studies of cellular processes. Caged compounds are photolabile inactive derivatives of biologically active molecules which can release rapidly the active biomolecule by irradiation with light.

In this thesis new efficient and highly water soluble photoactivatable protecting groups for carbonyl functions were developed and tested. For this, the syntheses of substituted 4-(1,2-dihydroxyethyl)coumarins were developed and the compounds were used for the protection of carbonyl compounds. The obtained coumarinyl-substituted 1,3-dioxolanes have been completely characterized regarding their photophysical and photochemical properties. The optimal protection group found is derived from 8-[bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-bromo-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycoumarin. It combines very good water solubility in aqueous buffers, high extinction coefficients in the ultraviolet and visible range of light, and efficient photoreactivity.

For the first time, caged compounds of the biomolecules bourgeonal and progesterone and its derivative progesterone-3-O-(carboxymethyl) oxime (progesterone-3-CMO) were synthesized. Furthermore the applicability of the newly developed photolabile carbonyl protecting groups in the study of chemotaxis of human sperm was demonstrated. Finally, on the basis of a progesterone-3-CMO-peptide derivative tools to identify the receptor binding site for progesterone on human sperm were developed.

Keywords: photolabile protecting groups, coumarins, carbonyl protecting groups, caged compounds

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schutzgruppen.....	1
1.2	Photoaktivierbare Schutzgruppen.....	1
1.3	Photoaktivierbare Derivate von C=O-Verbindungen	5
1.3.1	<i>o</i> -Nitrobenzyl-substituierte 1,3-Dioxolane.....	5
1.3.2	(Cumarin-4-yl)-substituierte 1,3-Dioxolane	6
1.3.3	Sonstige.....	6
1.4	Photoaktivierbare Biomoleküle (caged Verbindungen).....	7
1.5	Progesteron und Bourgeonal als potentielle Lockstoffe für menschliche Spermien	9
2	Aufgabenstellung	13
3	Ergebnisse und Diskussion	15
3.1	Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Carbonylverbindungen.....	15
3.1.1	Synthesstrategien	15
3.1.2	Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diolen.....	17
3.1.3	Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Benzaldehyde	26
3.1.4	Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Phenylacetaldehyd, Acetophenon und Phenylacetone	28
3.1.5	Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Bourgeonale.....	30
3.1.6	Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Progesterone.....	31
3.1.7	Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Progesteron-3-CMO	35
3.2	Synthese von Progesteron-Tripeptidderivaten mit Crosslinking-Eigenschaften.....	37
3.3	Eigenschaften der Phototrigger	41
3.3.1	Photolyse und Mechanismus der Photospaltung	41
3.3.2	Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten.....	42
3.3.3	Absorptionsspektroskopische Charakterisierung und photochemische Quantenausbeuten	45
3.3.4	Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung und Fluoreszenzquantenausbeuten ..	57
3.3.5	pH-Abhängigkeit	64
3.3.6	Zwei-Photonen-Photolyse.....	66
3.3.7	Photokinetische Untersuchungen	66
3.4	Anwendungen von caged Progesteron- und Bourgeonal-Derivaten	68
3.5	Werkzeuge zur Untersuchung von Progesteron-Rezeptor Wechselwirkungen	72
4	Zusammenfassung und Ausblick	75
5	Experimenteller Teil	78
5.1	Physikalische Meßgeräte	78
5.2	Chromatographische Methoden.....	79
5.3	Arbeitsweise, Lösungsmittel und Chemikalien	79
5.4	Arbeitsvorschriften für Ausgangsstoffe und caged Verbindungen.....	83
5.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	83

5.4.2	Spezielle Arbeitsvorschriften	85
5.5	Peptidsynthesen.....	129
6	Literaturverzeichnis.....	132
7	Anhang.....	137

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. V. Hagen für die außerordentlich interessante und herausfordernde Themenstellung, für die Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung dieser Arbeit gewährte und für die zahlreichen Möglichkeiten, meine Ergebnisse national wie auch international präsentieren zu dürfen. Seine freundliche Betreuung und seine immerwährende Unterstützung bei Problemen sind besonders hervorzuheben. Neue Ideen wurden stets gefördert und die für ihre Ausführung nötige Unterstützung gewährt.

Herrn Prof. Dr. J. Rademann, Herrn Prof. Dr. M. Bienert und Frau Prof. Dr. B. Koksche danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und für die Übernahme der Gutachten.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und die äußerst hilfreichen Diskussionen zur Anwendung der *caged* Carbonylverbindungen möchte ich Herrn Prof. U. B. Kaupp (caesar, Bonn) und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Dr. N. Kashikar, Dr. T. Strünker, Dr. N. Goodwin, Dr. L. Alvarez, Dr. L. Dai und Dr. I. Weyand herzlichst danken.

Herrn Prof. Dr. R. Schmidt vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main danke ich für die Anleitung und Unterstützung bei der zeitaufgelösten fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeiten der Biomoleküle aus den *caged* Verbindungen.

Herr Prof. Dr. A. Barth von der Stockholm University in Schweden danke ich für die Messungen zur zeitaufgelösten IR-Spektroskopie.

Mein Dank für die Hilfen beim Zustandekommen der Arbeit gilt:

Frau B. Dekowski für die Unterstützung bei der Synthese.

Herrn Dr. M. Beyermann, Herrn Prof. Dr. M. Bienert und Herrn Dr. C. Hoppmann für ihre große Hilfe bei allen Fragen zur Peptidchemie.

Herrn Dr. B. Wiesner und Frau J. Eichhorst für die Unterstützung bei der Realisierung der Zwei-Photonen-Photolyseexperimente.

Herrn Dr. J. Geyer-Lippmann vom Landeskriminalamt Berlin für die Aufnahme einiger IR-Spektren. Für die Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen in allen wissenschaftlich chemischen Fragestellungen möchte ich ihm an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Meinen Laborkolleginnen J. Schaal, Dr. C. Vargas und meinen Laborkollegen Dr. N. Kotzur sowie Dr. D. Geißler sei ein Riesendank ausgesprochen. Die entspannte Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Ratschläge trugen einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit bei. Für die Einführung in die Messmethoden und die Hilfe bei PC-Problemen möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. N. Kotzur bedanken, ebenso für die unendlich vielen fachlichen Diskussionen im Labor.

Meinen Kollegen Dr. I. Coin, Dr. S. Pritz, M. Bagheri, N. Kamdem, G. Schäfer, Dr. B. Briand, C. Junkes und Dr. C. Hoppmann danke ich für das kollegiale und freundschaftliche Umfeld.

Frau M. Dreißigacker danke ich für die hervorragende Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen.

Mein Dank gilt auch der Investitionsbank Berlin und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung für die finanzielle Förderung der Arbeit im Rahmen des ProFIT-Projektes 10134688.

Besonders danke ich schließlich meiner Familie dafür, dass sie mich stets unterstützt und für mich da war.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Ac	Acetyl
ASA	4-Azidosalicylsäure
EtOAc	Essigsäureethylester
AIBN	<i>N,N'</i> -Azobisisobutyronitril
Äq	Äquivalent
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
bs	breites Singulett
3-CMO	3- <i>O</i> -(carboxymethyl)oxim
Cum	Cumarin
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett eines Dubletts
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ec	mit TMS substituierte Silanolgruppen einer RP-Chromatographiesäule (<i>endcapped</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
Fmoc	(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl
gef.	gefunden
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat bzw. 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid hexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	hoch aufgelöste Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HV	Hochvakuum
ICT	intramolekulare Ladungsübertragung (<i>intramolecular charge transfer</i>)
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IR	Infrarot
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazan
LCMS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LM	Lösungsmittel

Lit.	Literaturzitat
m	Multipllett
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NHS-ASA	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
ϕ_{chem}	photochemische Quantenausbeute
ϕ_{fl}	Fluoreszenzquantenausbeute
Pbf	2,2',4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl
Ph	Phenyl
PG	Schutzgruppe (<i>protecting group</i>)
PPG	photolabile Schutzgruppe (<i>photoremovable protecting group</i>)
ppm	10 ⁻⁶ (<i>parts per million</i>)
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonat
präp.	präparativ
Prog-3-CMO	Progesteron-3- <i>O</i> -(carboxymethyl)oxim
q	Quartett
R_{f}	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese (<i>solid-phase peptide synthesis</i>)
t	Tripllett
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
t_{R}	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Tf	Trifluormethansulfonyl
THF	Tetrahydrofuran
TICT	verdrillte intramolekulare Ladungsübertragung (<i>twisted intramolecular charge transfer</i>)
TMS	Trimethylsilyl
TMSE	2-(Trimethylsilyl)ethyl
UV	ultraviolett
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
Zers.	Zersetzung

Abkürzungen ausgewählter photolabiler Schutzgruppen

BBHC-ED	8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin
BBHCM-OH	8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin
BCC-ED	6-Brom-7-(carboxymethoxy)-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin
BCMAC-ED	7-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin
BCMACM	{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl
Bhc-ED	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin
BHCC-ED	6-Brom-8-carboxy-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin
BHCCM-OH	6-Brom-8-carboxy-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin
BhcM	(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl
BhcM-OH	6-Brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin
BHMCC-ED	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin
BHQ	(8-Brom-7-hydroxychinolin-2-yl)methyl
BMBHC-ED	8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin
BMCC-ED	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin
BMCMAC-ED	7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin
CM	(Cumarin-4-yl)methyl
CNB	α -Carboxy- <i>o</i> -nitrobenzyl
NDBF	(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)methyl
DEACM	[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl
Desyl	Desoxybenzoinyl
DMACM	[7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]methyl
NB	<i>o</i> -Nitrobenzyl
NI	7-Nitro-1 <i>H</i> -indolin-1-yl
<i>p</i>HP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl

1 Einleitung

1.1 Schutzgruppen

Die chemische Synthese eines komplexen Moleküls erfordert mitunter eine gezielt selektive Reaktionsführung. Um eine solche zu erreichen und unerwünschte Reaktionen zu unterdrücken, wurde im Laufe der Zeit ein ganzes Arsenal spezifischer Schutzgruppen (PGs, *protecting groups*), entwickelt.¹ Schutzgruppen sind organisch-chemische Reste, durch die bestimmte funktionelle Gruppen in einem mehrere funktionelle Gruppen enthaltenden Molekül vorübergehend gegen den Angriff von Reagenzien geschützt werden können. Dadurch können die gewünschten chemischen Reaktionen nur an den ungeschützten Stellen stattfinden. Die anschließende selektive Abspaltung der Schutzgruppen setzt wieder funktionelle Gruppen frei, die für weitere Syntheseschritte zur Verfügung stehen.

Der Einsatz von Schutzgruppen spielt in der Chemie eine wichtige Rolle. Eine besonders große Anwendungsbreite finden Schutzgruppen in der Naturstoffsynthese, wie z. B. bei der Herstellung von Steroiden, Zuckern und Peptiden.² Die richtige Auswahl der Schutzgruppen ist oft entscheidend für die erfolgreiche Synthese eines Zielmoleküls.

An Schutzgruppen wird eine Reihe von Ansprüchen gestellt. Sie sollten selektiv und mit hoher Ausbeute mit der zu schützenden Funktionalität reagieren, entsprechende Einführungsreagenzien sollten preiswert erhältlich sein, die Stabilität der Schutzgruppen sollte für die Dauer des Schutzes unter allen Bedingungen der durchgeführten Reaktionen und Reinigungsoperationen gewährleistet sein und die Schutzgruppen sollten unter milden und hochspezifischen Bedingungen mit hohen Ausbeuten selektiv abspaltbar sein.

Für die selektive Entschützung eines an mehreren funktionellen Gruppen geschützten Moleküls wurden zwei unterschiedliche Strategien entwickelt: das Konzept der abgestuften Labilität und das Konzept der Orthogonalität.¹ Die abgestufte Labilität beruht darauf, dass unterschiedliche Schutzgruppen, die mit demselben Reagenz abgespalten werden, dies bei deutlich unterschiedlichen Reaktionsbedingungen tun und folglich sequentiell entfernt werden können. Das Konzept der Orthogonalität hingegen verwendet Schutzgruppen, die durch unterschiedliche Reagenzien abgespalten werden und daher selektiv adressiert werden können. Typische Reagenzien sind hier Protonen (saure Abspaltung), Hydroxidionen (basische Abspaltung), Fluoridionen und Licht.

1.2 Photoaktivierbare Schutzgruppen

Durch Licht abspaltbare Schutzgruppen werden als photoaktivierbar bezeichnet. Photoaktivierbare Schutzgruppen (PPGs, *photoremovable protecting groups*) werden in der präparativen organischen³ und kombinatorischen Synthese,⁴ der Photolithographie⁵ und der Biochemie⁶ verwendet. Die Besonderheit dieser Schutzgruppen liegt darin, dass sie ohne Erwärmung und ohne Zusatz von Reagenzien einfach unter neutralen Bedingungen durch Licht (in der Praxis vorwiegend UV-Strahlung der Wellenlängen 300–400 nm) abgespalten werden können.

Das Konzept der orthogonalen Schutzgruppen erlangt also durch die Verwendung von Licht als Reagenz eine zusätzliche Dimension. Desweiteren eröffnet die Verwendung von Licht die Möglichkeit, die geschützte Funktionalität räumlich (durch Fokussierung und Belichtungsmasken) und zeitlich (durch einen Lichtimpuls) gezielt freizusetzen.

Idealerweise ist eine PPG orthogonal z. B. zu den säure- und basenlabilen Schutzgruppen. Es gibt auch vielversprechende Ansätze für chromatische Orthogonalität zwischen photoaktivierbaren Schutzgruppen, d. h. die Eigenschaft, dass zwei verschiedene photoaktivierbare Schutzgruppen durch die Wahl der Wellenlänge des Lichts unabhängig voneinander abgespalten werden können.⁷

Besonders beim Studium von schnell ablaufenden biologischen Prozessen haben sich PPGs in den letzten 30 Jahren als wichtiges Werkzeug bewährt.⁸ In biologischen Systemen einsetzbare PPGs werden als *caging*-Gruppen und die geschützten Biomoleküle als *caged* Verbindungen bezeichnet. Die an lebenden Zellen durchgeführten biophysikalischen Untersuchungen erfordern neben dem Design von PPGs mit einer ausreichenden Hydrophilie vor allem die Entwicklung von Chromophoren, deren Absorption gezielt bathochrom verschoben ist.

In Abb. 1-1 werden wichtige photolabile Schutzgruppen gezeigt.

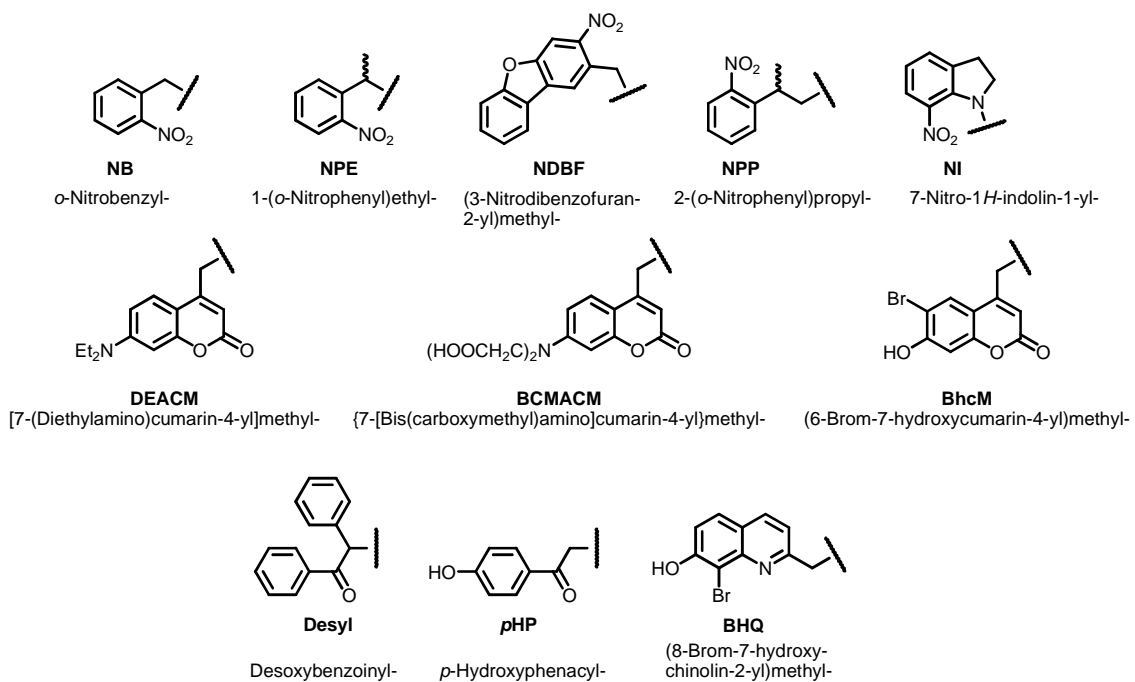


Abbildung 1-1: Wichtige photolabile Schutzgruppen

Die am häufigsten verwendete photolabile Schutzgruppe, die *o*-Nitrobenzyl-Gruppe (**NB**) mit ihren zahlreichen Derivaten (Abb. 1-1), ist 1966 von BARLTROP *et al.* eingeführt worden.⁹ Seither wurde eine Vielzahl von **NB**-Derivaten untersucht und erfolgreich angewendet, nicht zuletzt wegen der kommerziellen Verfügbarkeit der entsprechenden Einführungsreagenzien. **NB**-Schutzgruppen und deren Abkömmlinge lassen sich zum Schützen von Säuren,⁹ Aminen,¹⁰ Alkoholen,¹¹ Thioalkoholen¹² und Carbonylverbindungen¹³ einsetzen. **NB**-Derivate haben auch als photolabile Linker in Festphasensystemen Anwendung gefunden.¹⁴ Nachteile der **NB**-Gruppe sind der bei der Photolyse

gebildete Nitrosoaldehyd, der in biologischer Umgebung schädlich sein kann, und die relativ langsame Freisetzung des Substrats im Bereich von Millisekunden.

Obwohl der **NB**-Chromophor nur einen geringen Extinktionskoeffizienten oberhalb einer Wellenlänge von 300 nm aufweist, erfolgt die Photospaltung ausreichend effektiv. Der Mechanismus der Photoreaktion von **NB**-geschützten Molekülen ist sehr gut untersucht. Es handelt sich dabei um eine intramolekulare Photoredoxreaktion, die zur Freisetzung des Substrats unter Bildung von Nitrosobenzaldehyd führt.¹⁵

Die 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe (**NPE**) wird schneller als die **NB**-Gruppe abgespalten und ergibt dabei ein Nitrosoketon. Das langwellige Absorptionsmaximum kann durch Einführen von Donorsubstituenten wie z. B. Methoxy-Gruppen am aromatischen Ring variiert und somit bathochrom verschoben werden. Es existieren Varianten zum Schutz von Carbonylgruppen^{13a} (s. Abschn. 1.3.1) sowie auch Modifikationen, um die entstehende Nitrosospezies in einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion abzufangen.¹⁶

Vor kurzem wurde der Nitrodibenzofuran-Chromophor (**NDBF**) eingeführt, der vielversprechende Eigenschaften aufweist.¹⁷ Zum einen hat er im nahen UV-Bereich, der allgemein zur Photofreisetzung genutzt wird, einen deutlich größeren Extinktionskoeffizienten als der **NB**-Chromophor, zum anderen zeigt er eine sehr hohe photochemische Quantenausbeute für die Entschützung von Carbonsäuren und ist auch für die Zwei-Photonen-Aktivierung geeignet.

Eine weitere interessante photoaktivierbare Schutzgruppe stellten PFLEIDERER *et al.* mit der Nitrophenylpropyl-Gruppe (**NPP**) vor, die bei Bestrahlung eine weniger schädliche Nitrostyryl-Spezies ergibt.¹⁸

7-Nitroindolin-Reste (**NI**) sind schon seit ca. 30 Jahren als PPGs bekannt.¹⁹ Aber erst in den letzten Jahren wurde diese Schutzgruppe intensiver bearbeitet.²⁰ Nachdem **NI**-Derivate zunächst für den Schutz von Carbonsäuren eingesetzt wurden, konnte ihre Anwendung kürzlich auch auf Alkohole und Amine ausgedehnt werden.²¹

In den letzten Jahren wurde auch eine Reihe von Schutzgruppen auf der Basis des (Cumarin-4-yl)methyl (**CM**)-Chromophors entwickelt (Abb. 1-1). GIVENS *et al.* setzten aus (7-Methoxycumarin-4-yl)methyldiethylphosphat durch Bestrahlung mit Licht Diethylphosphat frei und verwendeten den Cumarin-Chromophor damit erstmals im Sinne einer PPG.²² Der Arbeitskreis um HAGEN führte u. a. die langwellig anregbaren 7-amino-substituierten **CM**-Schutzgruppen [7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]-methyl (**DMACM**)²³ und [7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl (**DEACM**)²⁴ sowie deren sehr gut wasserlösliche Variante {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl (**BCMAMC**)²⁵ ein. Die von FURUTA *et al.* vorgestellte (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-PPG (**BhCM**) zeichnet sich gleichfalls durch gute photochemische Eigenschaften aus.²⁶ Die aufgeführten **CM**-Schutzgruppen zeigen hohe Photosensitivitäten und erwiesen sich auch als sensitiv gegenüber der Zwei-Photonen-Photolyse. **CM**-Schutzgruppen lassen sich zum Schutz von Säuren,²⁷ Carbonylverbindungen²⁸ und in Form von (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-Varianten auch zum Schutz von Aminen,^{26,29} Alkoholen³⁰ und Thioalkoholen³¹ verwenden.

Die Untersuchungen zum Mechanismus der Photospaltung (7-methoxycumarin-4-yl)methyl-geschützter Säuren von SCHADE *et al.* ergaben, dass es sich dabei um eine lösungsmittelunterstützte Photoheterolyse handelt, die bevorzugt in wässrigen Medien stattfindet (Abb. 1-2).^{27a}

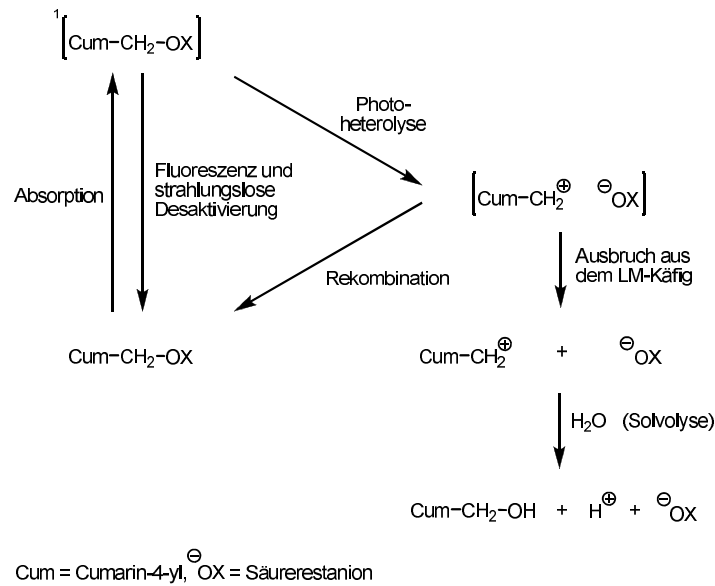


Abbildung 1-2: Photolysemechanismus der (Cumarin-4-yl)methyl-Ester

Die Vorteile der Cumarine als Chromophore von PPGs sind die hohen Extinktionen im langwelligen UV- bis sichtbaren Bereich des Lichts, die überaus schnelle Photospaltung im Nanosekundenbereich und die relativ starke Fluoreszenz der entstehenden (Cumarin-4-yl)methylalkohole, die zur Beobachtung der Photofreisetzung des Substrats genutzt werden kann. Viele dieser Eigenschaften sind stark abhängig von der Substitution am Cumarin-Gerüst und können den Anforderungen der jeweiligen Anwendung angepasst werden.

SHEEHAN *et al.* führten 1971 die Desoxybenzoinyl-Gruppe (**Desyl**) als PPG für Carbonsäuren ein.³² Den vorteilhaften hohen photochemischen Quantenausbeuten und relativ schnellen Freisetzungsraten stehen die schlechte Wasserlöslichkeit der PPG und die geringe Toleranz der PPG für Strukturmodifikationen gegenüber.

Eine andere gut untersuchte PPG ist die *p*-Hydroxyphenacyl (**pHP**)-Gruppe.³³ Sie ist ausreichend wasserlöslich, die photochemischen Quantenausbeuten sind im Allgemeinen recht hoch, sie ermöglicht eine schnelle Substratfreisetzung im Nanosekundenbereich und das Nebenprodukt der Photospaltung, *p*-Hydroxyphenylelessigsäure, ist ungiftig und weist ein hypsochrom verschobenes Absorptionsspektrum, verglichen mit dem der **pHP**-PPG, auf. Nachteilig sind die sehr kleinen Extinktionskoeffizienten von **pHP**-Derivaten oberhalb einer Wellenlänge von 320 nm.

Der (8-Brom-7-hydroxychinolin-2-yl)methyl-Rest (**BHQ**) ist ein naher Verwandter der (Cumarin-4-yl)methyl-Gruppe und wurde von DORE *et al.* zum Schutz von Carbonsäuren eingeführt.³⁴ Die Vorteile der **BHQ**-Gruppe liegen in der hohen photochemischen Quantenausbeute und der sehr geringen Fluoreszenz. Als nachteilig erweist sich allerdings der niedrige Extinktionskoeffizient von **BHQ**-geschützten Verbindungen.

1.3 Photoaktivierbare Derivate von C=O-Verbindungen

1.3.1 *o*-Nitrobenzyl-substituierte 1,3-Dioxolane

Als klassische PPGs mit breiter Anwendung kamen *o*-Nitrobenzyl-Derivate auch für den Schutz von Carbonylgruppen zum Einsatz.

Bereits 1974 zeigten HÉBERT *et al.*, dass die durch Umsetzung von *o*-Nitrophenyl-1,2-ethandiol mit Aldehyden und Ketonen darstellbaren *o*-Nitrophenyl-substituierten 1,3-Dioxolane photosensitiv sind und sich durch Bestrahlung mit Licht in die entsprechende Carbonylverbindung und α -Hydroxy-*o*-nitrosoacetophenon überführen lassen (Abb. 1-3).³⁵ 1983 wurde von dem gleichen Arbeitskreis mit *o*-Nitrophenyl-1,2-ethandiol-*caged* Testosteron erstmals auch ein *caged* Biomolekül mit Carbonylfunktion synthetisiert.³⁶

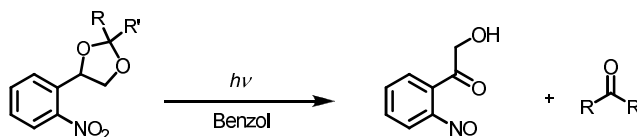


Abbildung 1-3: Photolyse von *o*-Nitrophenyl-1,2-ethandiol-geschützten Aldehyden bzw. Ketonen

In der Folgezeit wurden ausgehend von weiterentwickelten *o*-Nitrophenyl-1,2-ethandiolen photosensitive 1,3-Dioxolane mit verbesserten Eigenschaften hergestellt.^{13,37} Die wichtigsten für die Acetal- bzw. Ketalbildung benutzten 1,2-Diole sind in Abb. 1-4 aufgeführt. Durch den Einsatz der symmetrischen Bis-(*o*-nitrophenyl)ethandiole wird die Bildung von Diastereomeren bei der Umsetzung mit chiralen C=O-Verbindungen umgangen.

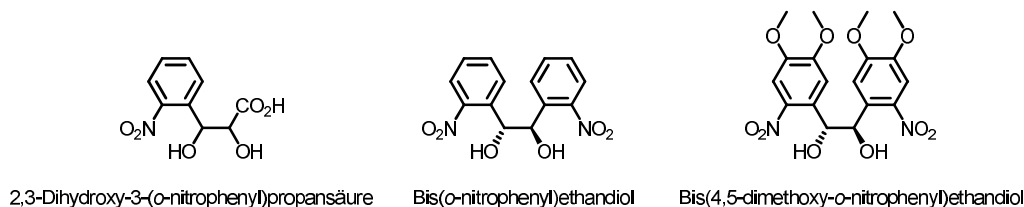


Abbildung 1-4: Strukturformeln wichtiger NB-EDs für die Schützung von C=O-Funktionen

Mit Ausnahme der von der Nitrophenyldihydroxypropansäure abgeleiteten Verbindungen handelt es sich bei den aus den aufgeführten Diolen hergestellten 1,3-Dioxolanen um hydrophobe Verbindungen und die publizierten Photospaltungen wurden ausschließlich in organischen Lösungsmitteln (z. B. Benzol) durchgeführt. Photochemische Quantenausbeuten wurden in der Regel nicht bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der unsubstituierten Nitrophenylethandiole sind bei Wellenlängen > 300 nm klein, die der dimethoxy-substituierten Verbindungen annehmbar, aber im Vergleich zu denen von **CM**-Chromophoren ebenfalls relativ klein.

1.3.2 (Cumarin-4-yl)-substituierte 1,3-Dioxolane

DORE *et al.* führten vor kurzem 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin (**Bhc-ED**) als Agenz für die Überführung von Aldehyden und Ketonen in cyclische Acetale bzw. Ketale ein (Abb. 1-5).²⁸ Die Cumarinyl-substituierten 1,3-Dioxolane – entsprechende Verbindungen wurden ausgehend von Benzaldehyd, Piperonal, Acetophenon und Cyclohexanon hergestellt – erwiesen sich wie die analogen Nitrobenzyl-Verbindungen als photolabil und ließen sich durch Bestrahlung der Verbindungen in Aldehyde und Ketone zurückführen (Abb. 1-5).

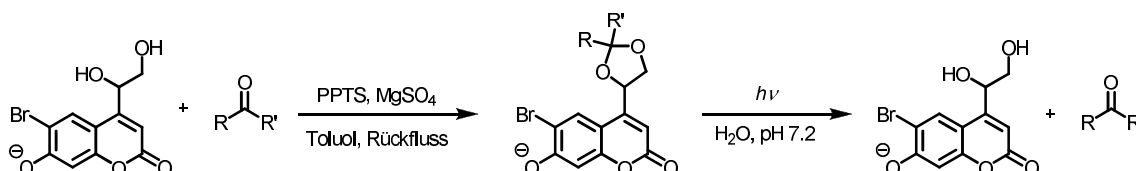


Abbildung 1-5: Synthese und Photolyse von **Bhc-ED**-geschützten Aldehyden bzw. Ketonen

Die **Bhc-ED**-geschützten Verbindungen sind in der Phenolatform (> pH 7) langwellig anregbar und hydrolysestabil. Jedoch sind die photochemischen Quantenausbeuten der Dioxolane relativ niedrig und die geringe Wasserlöslichkeit limitiert deren Anwendung unter physiologischen Bedingungen. Über den Mechanismus der Photospaltung sind keine experimentellen Untersuchungen bekannt. Es gibt aber Spekulationen, wonach die Photolyse über ionische Zwischenstufen verlaufen soll.²⁸ Zu der Geschwindigkeit der Photospaltung sind bisher keine Aussagen getroffen worden.

Vor Beginn dieser Arbeit waren die **Bhc**-substituierten 1,3-Dioxolane die einzigen literaturbekannten Phototrigger für Carbonylverbindungen mit Cumarinstruktur. Entsprechende *caged* Biomoleküle mit Carbonylfunktionen sind nicht beschrieben worden.

1.3.3 Sonstige

In der Literatur wurden in den letzten Jahren einige weitere PPGs für C=O-Funktionen beschrieben. WANG *et al.* stellten eine Reihe von Derivaten des Salicylalkohol-Chromophors, die mit Aldehyden oder Ketonen entsprechende cyclische Acetale/Ketale bilden und photosensitiv sind, dar (Abb. 1-6).³⁸

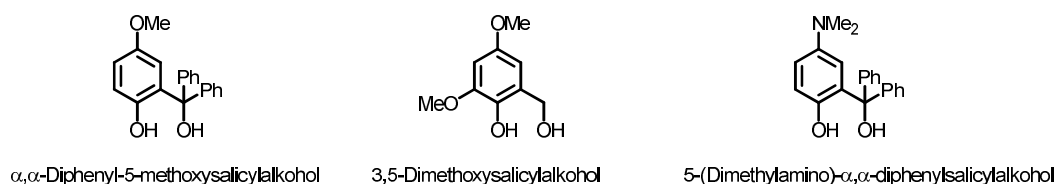


Abbildung 1-6: PPGs des Salicylalkohol-Chromophors für die Schützung von Carbonylfunktionen

Die verwendeten Dirole, α, α -Diphenyl-5-methoxysalicylalkohol, 3,5-Dimethoxysalicylalkohol und 5-(Dimethylamino)- α, α -diphenylsalicylalkohol zeigen ähnlich wie die **NB-EDs** relativ kleine Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm und sind hydrophob. Eine

Weiterentwicklung von 5-(Dimethylamino)- α,α -diphenylsalicylalkohol für den Einsatz in der photodynamischen Therapie blieb bislang anwendungslos.³⁹

Auch bei dem von Yu *et al.* entwickelten (Anthrachinon-2-yl)ethan-1,2-diol⁴⁰ und dem von POPIK *et al.* eingeführten (2,5-Dihydroxyphenyl)ethan-1,2-diol⁴¹ als Agenzien zum Schutz von Carbonylfunktionen handelt es sich um sehr hydrophobe Verbindungen und die Photospaltung der davon abgeleiteten cyclischen Acetale/Ketale konnte nur in rein organischen Medien nachgewiesen werden, was deren Anwendbarkeit stark limitiert.

Photoaktivierbare Schutzgruppen für Aldehyde und Ketone sind rar. Zudem sind die zur Verfügung stehenden Ethandiole für stark hydrophobe Biomoleküle mit Carbonylfunktion uninteressant, weil sie in der Regel deren ohnehin geringe Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen weiter drastisch reduzieren. Außerdem sind die photochemischen Eigenschaften der bisher bekannten PPGs nicht befriedigend. Die hier zitierten Schutzgruppen sind vor allem als PPGs zu betrachten und nicht als *caging*-Gruppen.

1.4 Photoaktivierbare Biomoleküle (*caged* Verbindungen)

Um die Funktion und Wirkung eines biologisch aktiven Moleküls zu studieren, ist es von großer Bedeutung, dieses exakt mit räumlicher und zeitlicher Steuerung freizusetzen. Solche orts- und zeitaufgelösten Konzentrationssprünge können mit so genannten *caged* Verbindungen erreicht werden. In diesen verliert ein Stoff durch Maskierung mit einer photoaktivierbaren Schutzgruppe (*caging* Gruppe) vorübergehend seine biologische Wirksamkeit, die aber durch die photolytische Abspaltung der Schutzgruppe zurückgewonnen werden kann (Abb. 1-7).

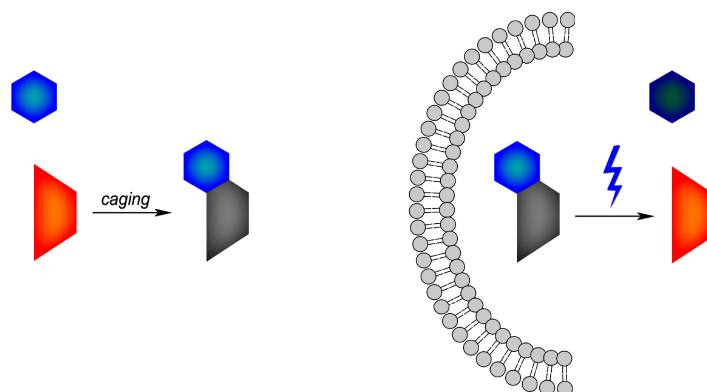


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Synthese und Photolyse einer *caged* Verbindung (rot = aktiv, grau = inaktiv)

Vorläufer biologisch aktiver Verbindungen, die auf Licht reagieren, bieten experimentelle Möglichkeiten, die sonst nur sehr schwierig zu realisieren sind. Da Licht z. B. mit Lasern in (konfokalen) Mikroskopen punktgenau eingesetzt werden kann, sind schnelle Konzentrationssprünge

der aktiven Form von Molekülen mit exakter räumlicher, zeitlicher und Dosis bezogener Steuerung möglich. Die Entwicklung derartiger Strategien reicht bis in die 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts zurück.⁴²

Das Hauptanwendungsgebiet der *caged* Verbindungen ist die biochemische und zellbiologische Forschung. Heute werden *caged* Verbindungen für viele verschiedene Zwecke verwendet. Beispielsweise seien hier die Steuerung/Regulation von Enzymaktivitäten,⁴³ die Genexpression⁴⁴ und die Erforschung von Signaltransduktionsmechanismen⁴⁵ genannt. Jüngste Entwicklungen schließen die Synthese von Biochips,^{5a,46} zeitaufgelöste Röntgenkristallographie und kinetische Studien über frühe Zustände bei der Proteinfaltung mit ein.⁴⁷ Die Zwei-Photonen-Anregung von *caged* Verbindungen ist ein neuer Trend, bei dem die Photoaktivierung des Substrats mit Hilfe hochfokussierter IR-Laserimpulse erfolgt.^{6a}

Photoaktivierbare Moleküle können durch Bestrahlung mit Licht aktiviert werden, indem die photolabile Gruppe entfernt wird. Der große Vorteil photolabiler Schutzgruppen besteht darin, dass sie ein eindeutiges Schaltverhalten ermöglichen. Wenn die photolabile Schutzgruppe richtig positioniert wird, können vollständig inaktive Moleküle erhalten werden. Bei Bestrahlung mit Licht wird dann das unmodifizierte biologisch aktive Molekül gebildet. Allerdings ist dies eine irreversible Reaktion, die stöchiometrische Mengen an Abspaltungsprodukten liefert.

An geeignete *caging* Gruppen werden die bereits in Abschn. 1.2 für Schutzgruppen genannten Ansprüche gestellt. Zusätzlich sind an die daraus resultierenden *caged* Verbindungen spezielle Anforderungen zu stellen. Idealerweise sind photoaktivierbare Moleküle ungiftig, biologisch inaktiv, im Medium der Anwendung löslich (z. B. für biologische Anwendungen im physiologischen Bereich um pH 7) und stabil gegen Hydrolyse. Die Entschützung sollte mit hoher Quantenausbeute durch effektive Absorption von Licht nicht zu kleiner Wellenlängen (> 300 nm, Reduzierung von Zellschäden) mit hohen Extinktionskoeffizienten erfolgen und nichttoxische bzw. nichtreaktive Nebenprodukte ergeben, die möglichst keine Absorption im Bereich der PPG zeigen. Zur Untersuchung lichtinduzierter kinetischer Vorgänge muss die Photoentschützung deutlich schneller ablaufen als die zu untersuchende biochemische Reaktion.

KAPLAN *et al.* leisteten 1978 mit der Synthese des 2-Nitrobenzyl- und 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-esters von Adenosin-5'-triphosphat Pionierarbeit auf dem Gebiet der *caged* Verbindungen.⁴² Heute gibt es eine Vielzahl von *caged* Verbindungen, z. B. intrazelluläre Botenstoffe, Neurotransmitter sowie diverse Pharmaka. Darunter befinden sich chemische Stoffklassen wie Nukleotide, Aminosäuren, RNA/DNA, Peptide, Proteine, ein- und zweiwertige Kationen (H^+ und Ca^{2+}) sowie kleine anorganische Moleküle (NO).^{8,48}

Die für die Herstellung von Phototriggern am häufigsten verwendeten *caging*-Gruppen sind die in Abschn. 1.2 beschriebenen photoaktivierbaren Schutzgruppen mit entsprechenden Modifikationen. *Caged* Verbindungen von Säuren, Aminen und Alkoholen wurden in der Literatur häufig beschrieben. Im Gegensatz dazu findet man mit einer Ausnahme³⁶ keine *caged* Carbonylverbindungen. Vor Beginn dieser Arbeit war, insbesondere bedingt durch einen Mangel an dafür effizienten Phototriggern, keine einzige biologische Anwendung eines Biomoleküls mit Aldehyd- bzw. Ketonfunktion bekannt (siehe Abschn. 1.3).

Vergleicht man die Eigenschaften der eingeführten *caged* Biomoleküle mit den an sie gestellten idealen Anforderungen, so ergeben sich sehr häufig schwerwiegende Defizite, die den Einsatz der Phototrigger einschränken. Viele *caged* Verbindungen zeigen eine unzureichende Effizienz der Photofreisetzung bei Wellenlängen > 350 nm (z. B. 1-(2-Nitrophenyl)alkyl-, Desyl- und Phenacyl-Verbindungen) und/oder eine zu geringe Bildungsgeschwindigkeit des Biomoleküls (z. B. 1-(2-Nitrophenyl)alkyl-Verbindungen). Oft werden auch eine inakzeptabel hohe Hydrolyseempfindlichkeit in wässrigen Pufferlösungen, eine zu geringe Wasserlöslichkeit oder eine biologische Eigenwirkung beobachtet. Hinzu kommen insbesondere bei den 2-Nitrobenzyl-Derivaten toxische Effekte oder unerwünschte Nebenreaktionen der aus der *caging*-Gruppe gebildeten Photolyseprodukte. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird es kaum eine einzige *caged* Verbindung eines Biomoleküls geben, die all die zuvor aufgezählten Ansprüche erfüllen und die gesamte Anwendungsbandbreite abdecken kann. Daher ist es sinnvoll, eine Serie von Phototriggern mit unterschiedlichen Eigenschaften zu entwickeln, aus der sich der Anwender die für seine Zwecke am besten geeignete Substanz auswählen kann.

1.5 Progesteron und Bourgeonal als potentielle Lockstoffe für menschliche Spermien

Lange Zeit glaubte man, dass Spermien von Säugetieren die Eizelle im Eileiter ohne Chemotaxis finden. Inzwischen gibt es aber verlässliche Hinweise auf Chemotaxis bei Spermien von Mensch, Kaninchen und Maus. Allerdings scheint die Suche nach der Eizelle im Eileiter für Säugetierspermien eine anspruchsvolle Aufgabe zu sein.⁴⁹ Bislang wurden das Steroid Progesteron,⁵⁰ der Duftstoff Bourgeonal⁵¹ und diverse kurzkettige Peptide⁵² als Lockstoffe diskutiert (Abb. 1-8).

In der Tat sind Säugetier-Spermien mit Duftstoffrezeptoren ausgestattet, die auch in den Riechzellen der Nase vorkommen.^{51a} Allerdings sind die biologischen Liganden der Duftstoffrezeptoren in Spermien und ihre Funktion unbekannt. Der Temperaturgradient im Eileiter von Säugetieren führt außerdem zu einem thermotaktischen Verhalten von menschlichen Spermien, d. h. sie orientieren sich an dem vorherrschenden Temperaturgradienten. Möglicherweise benötigen Säugetier-Spermien auch verschiedene Lockstoffe und einen chemischen und thermischen Gradienten, um die Eizelle zu orten.⁵²

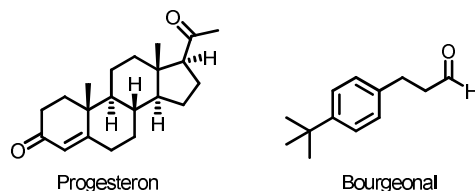


Abbildung 1-8: Strukturen von Progesteron und Bourgeonal

Steroidhormone wirken über einen sehr langsamen Signalweg, der langanhaltende Veränderungen in Zellen auslöst. Progesteron gehört zu den Steroidhormonen und entfaltet entsprechende klassische genomische Hormonwirkungen, d. h. der molekulare Wirkmechanismus erfolgt durch spezifische kernständige Rezeptoren.⁵³ In den letzten zwei Jahrzehnten gelangten jedoch schnelle, nicht-

genomische Progesteroneffekte in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses.⁵⁴ Nicht-genomische Progesteron-Wirkungen sind durch ihren schnellen Wirkungseintritt sowie durch die fehlende Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Transkription und Translation charakterisiert. Solche Effekte wurden in verschiedenen Zellen und Geweben beobachtet, z. B. in Leberzellen⁵⁵ und bestimmten Neuronen.⁵⁶ Nicht-genomische Wirkungen von Progesteron wurden auch an menschlichen Spermien nachgewiesen. Progesteron löst in menschlichen Spermien Ca^{2+} -Signale aus (Abb. 1-9).⁵⁷ Die Latenzzeit liegt im Bereich von Sekunden. Die Ca^{2+} -Konzentration steigt dabei schnell an und ist wahrscheinlich wichtig für die Befruchtung der Eizelle. Es wird vermutet, dass hierbei Progesteron als Lockstoff für Spermien dient. Damit spielt die nicht-genomische Progesteronwirkung auf Spermien vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Fertilisation.

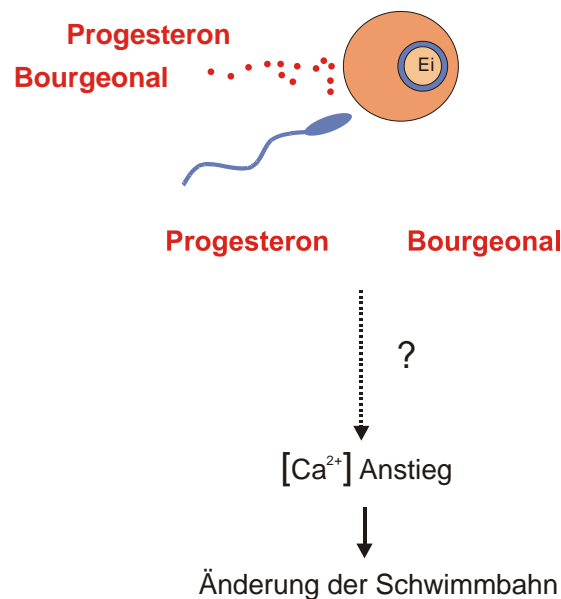


Abbildung 1-9: Chemotaxis von menschlichen Spermien

Als vor ungefähr zehn Jahren die Suche nach den chemischen Lockstoffen für Spermien bei Menschen begann, hatte die Arbeitsgruppe um EISENBACH schon einmal Progesteron als möglichen Kandidaten untersucht⁵⁸ - damals mit negativem Ergebnis. Neueste Publikationen zeigen, dass damals im falschen Konzentrationsbereich geforscht worden ist. Denn wie man heute weiß, wirkt Progesteron im mikromolaren Bereich anders als im pikomolaren Bereich.^{50a}

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass das Progesteron-Derivat Progesteron-3-O-(carboxymethyl)oxim (Progesteron-3-CMO) ebenfalls im pikomolaren Bereich wie Progesteron als Lockstoff um den gleichen Rezeptor konkurriert.⁵⁹ Man kann davon ausgehen, dass das Derivat die gleichen schnellen nicht-genomischen Effekte wie das Progesteron auslöst.

Seitdem die Progesteron-induzierten Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien bekannt sind, versucht man die Proteine in der Plasmamembran zu identifizieren, mit denen Progesteron wechselwirkt. Die Bindestellen für Progesteron in der Plasmamembran menschlicher Spermien weisen eine andere Ligandenspezifität auf als die Bindestelle der nukleären Progesteronrezeptoren. Dies ergaben Experimente zur Wirkung von mehr als 150 verschiedenen Progesteronderivaten.⁶⁰

Die Proteine, die in menschlichen Spermien und in anderen Zellen die nicht-genomische Progesteronantwort vermitteln, sind unbekannt. Es gibt jedoch Proteine, die als Kandidaten für membranständige Progesteronrezeptoren vorgeschlagen worden sind.⁶¹ Hierzu gehören zwei Familien von Membranproteinen, die PGRMC-Proteine (*progesterone receptor membrane component*) und die mPR-Proteine (*membrane progestin receptor*). Allerdings ist es bis heute nicht gelungen, eine Wechselwirkung von Progesteron mit heterolog exprimiertem PGRMC1 bzw. PGRMC2 nachzuweisen. In menschlichen Spermien wurde eine mPR-Isoform identifiziert.⁶² Sie ist hauptsächlich im *midpiece*, aber auch im postakrosomalen Kopfbereich und im Flagellum lokalisiert. Jedoch ist völlig unklar, ob die mPR-Proteine wirklich Progesteron binden und welche Funktion sie in menschlichen Spermien erfüllen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den vergangenen 20 Jahren intensiv daran gearbeitet wurde, den Signalweg der Progesteronwirkung in menschlichen Spermien zu entschlüsseln. Trotzdem ist eigentlich wenig über den Signalweg bekannt. Es fehlen vor allem systematische Untersuchungen, die die bestehenden Kontroversen klären.

Bourgeonal – chemisch 3-(4-*tert*-Butylphenyl)propanal – wird industriell als Duftstoff mit Maiglöckchenaroma eingesetzt. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass menschliche Spermien einen spezifischen Rezeptor für den Duftstoff Bourgeonal besitzen und ihre Schwimgeschwindigkeit und Bewegungsrichtung an diesem Duftstoff ausrichten können.^{51a} Die Bourgeonal-Rezeptoren kommen auch in Riechzellen vor. Die Riechrezeptoren gelten als gut untersucht und 2004 erhielten L. BUCK und R. AXEL für ihre Arbeiten über die Genfamilie der Riechrezeptoren den Nobelpreis⁶³ (Abb. 1-10).

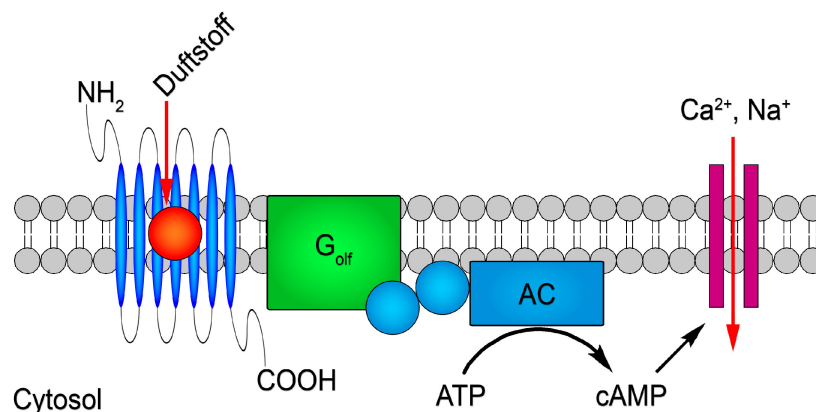


Abbildung 1-10: Aufbau eines Geruchsrezeptors (Odorant-Rezeptor, OR). Der Duftstoff bindet vermutlich an die hypervariablen Transmembransegmente des OR-Proteins und aktiviert über das assoziierte olfaktorische G-Protein (G_{olf}) die Adenylatcyclase (AC). Diese stellt aus ATP cyclisches AMP (cAMP) her, das wiederum den Einstrom von Ca²⁺ und Na⁺ durch spezifisch assoziierte Ionenkanäle stimuliert.

Schließlich wurde die Bedeutung eines olfaktorischen Rezeptors (OR) für die Chemotaxis menschlicher Spermien anhand eines auf Chromosom 17 neu identifizierten testikulären OR-Gens (hOR17-4) unter Beweis gestellt.^{51a,64} Bourgeonal ist bis jetzt der potenteste identifizierte Agonist für hOR17-4 und löst bei humanen Spermien eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration aus. Wahrscheinlich öffnen olfaktorische Rezeptoren Ionenkanäle über assoziierte G-Proteine und

cyclisches AMP.⁶⁵ Es wird aber auch der Weg durch Aktivierung einer Phospholipase C und Hydrolyse von Phosphatidylinosit zu IP₃ diskutiert.^{51b} Die zugrunde liegende Signalkette im Inneren der Spermien ist Gegenstand momentaner Untersuchungen. Der genaue Signalweg der Bourgeonalwirkung und seine Funktion in menschlichen Spermien sind bis heute nicht aufgeklärt.

Caged Progesteron- und Bourgeonal-Derivate waren bisher nicht bekannt. Ihre Einführung würde zur Aufklärung der ersten Schritte der Wechselwirkung der Signalstoffe mit den entsprechenden Rezeptoren, die im Millisekunden- bis Sekundenbereich ablaufen, einen maßgeblichen Beitrag leisten.⁶⁶ Dies ist wichtig, da denkbar ist, dass sich der Fertilisationserfolg durch lokale Applikation von Signalstoffen positiv oder negativ beeinflussen lässt. Alternative Kontrazeptiva, die ohne Eingriff in den sensiblen Hormonstoffwechsel auskommen und auch sonst keinerlei zellschädigende Eigenschaften haben, sind vorstellbar.

2 Aufgabenstellung

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung und photochemische Charakterisierung neuer langwellig photoaktivierbarer Schutzgruppen für Biomoleküle mit Carbonyl-Funktionen sowie die Untersuchung der Anwendbarkeit von entsprechenden *caged* Biomolekülen als Werkzeuge für zeit- und orts aufgelöste Untersuchungen der Mechanismen schneller zellulärer Prozesse. *Caged* Carbonylverbindungen wurden bisher nicht in biologischen Studien eingesetzt.

An die photoaktivierbaren Schutzgruppen wurden folgende Ansprüche gestellt: Die zugrunde liegende Photoreaktion sollte sauber, möglichst schnell und mit hoher photochemischer Quantenausbeute erfolgen, der Chromophor sollte einen hohen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen zwischen 350 und 400 nm aufweisen und die geschützten Verbindungen sollten in wässrigen Pufferlösungen gut löslich sein. Zusätzlich wurde eine effiziente Freisetzung des Biomoleküls auch nach Zwei-Photonen-Anregung angestrebt.

Als photoaktivierbare Schutzgruppen (PPGs) sollten (Cumarin-4-yl)-Chromophore eingesetzt werden. Wichtige Eigenschaften der Chromophore sollten durch die Einführung von Substituenten am Cumaringerüst variiert werden. Die Leistungsfähigkeit der hergestellten PPGs sollte anhand ihrer photochemischen und photophysikalischen Eigenschaften evaluiert werden. Im Ergebnis sollte daraus idealerweise eine universell einsetzbare PPG für Carbonylverbindungen resultieren.

Die Arbeit umfasst zunächst das Design und die Synthese aller erforderlichen *caging*-Reagenzien. Hierfür sollten geeignete 4-(1,2-Dihydroxyethyl)cumarin-Derivate entwickelt werden, mit denen dann die Carbonylverbindungen durch Acetalisierung/Ketalisierung in photosensitive Cumarinyl-substituierte 1,3-Dioxolane überführt werden sollten. Bei der Erarbeitung der Herstellungs- und Reinigungsverfahren für die 1,2-Diole und *caged* Carbonylverbindungen sollte nicht die Optimierung jeden einzelnen Syntheseschritts im Vordergrund stehen, sondern die Verfügbarkeit ausreichender Mengen der Substanzen für anschließende Untersuchungen, sowie deren umfangreiche analytische, photophysikalische und photochemische Charakterisierung. Im Detail gehörten dazu neben den analytischen Standardmethoden zur Strukturaufklärung die Untersuchung der Solvolysebeständigkeit und Löslichkeit der Phototrigger in wässriger Pufferlösung, die Bestimmung ihrer absorptions- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften einschließlich photochemischer Quantenausbeute und Fluoreszenzquantenausbeute sowie die Bestimmung der Geschwindigkeit der Photospaltung bzw. der Freisetzungsgeschwindigkeit der jeweiligen Biomoleküle mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenz- sowie IR-Spektroskopie.

Exemplarisch sollten die Erprobung der Syntheseschritte, Untersuchungen zur Hydrolysestabilität und zur Photochemie an geschützten strukturell einfachen Carbonylverbindungen durchgeführt werden und dann erstmalig auf die Biomoleküle Bourgeonal (Riechstoff, Chemoattraktans) und Progesteron (Hormon, Chemoattraktans) sowie dessen Derivat Progesteron-3-O-(carboxymethyl)oxim (Progesteron-3-CMO) angewendet werden. Parallel dazu sollte die Abhängigkeit der photochemischen Eigenschaften der 1,3-Dioxolane von der Struktur der eingesetzten Carbonylverbindungen (aromatischer Aldehyd, aliphatischer Aldehyd, aromatisches Keton, aliphatisches Keton) untersucht werden.

Bourgeonal spielt bei der Chemotaxis von Säugetierspermien sowie bei der Aufklärung der Mechanismen der Geruchswahrnehmung eine wichtige Rolle. Progesteron zeigt neben seiner

Wirkung als Hormon nicht-genomische neuroaktive Wirkungen, kann die Genexpression regulieren und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis von Säugetierspermien. Das Derivat Progesteron-3-CMO stellt womöglich eine Alternative zum Einsatz von Progesteron dar, da es im Hinblick auf die Chemotaxis von Säugetierspermien um dieselbe Bindungsstelle wie Progesteron konkurriert.

Schließlich sollten in der Arbeitsgruppe von Prof. U. B. KAUPP (caesar Bonn) Verhaltensexperimente mit *caged* Bourgeonal, *caged* Progesteron und *caged* Progesteron-3-CMO an menschlichen Spermien durchgeführt werden, und es sollte die Eignung der *caged* Verbindungen hinsichtlich ihrer praktischen Anwendbarkeit bei der Untersuchung der Chemotaxis von Säugetierspermien geprüft werden.

Als weitere Aufgabe ergab sich die Notwendigkeit, ein geeignetes Werkzeug zur Identifizierung der Rezeptorbindungsstelle für Progesteron an menschlichen Spermien bereitzustellen. Hierfür sollten Progesteronderivate entwickelt werden, die photoaktivierbare Crosslinking-Gruppen enthalten. Ausgehend von Progesteron-3-CMO sollten geeignete Crosslinker konzipiert und synthetisiert werden, die neben der 4-Azidosalicylsäure-Gruppierung einen fluoreszierenden Marker sowie einen Biotinrest aufweisen.

Die Studien sind besonders im Kontext fertilisationsrelevanter Kommunikationsprozesse von grundlegendem wissenschaftlichen Interesse.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Carbonylverbindungen

3.1.1 Synthesestrategien

Caged Carbonylverbindungen sollten in Form von Cumarinyl-substituierten 1,3-Dioxolanen durch Umsetzung der Carbonylverbindungen mit (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiol-Derivaten hergestellt werden (Abb. 3-1). Die Cumarinyl-1,2-ethandiole sind hierbei die Schlüsselprodukte und die Wahl der Substituenten am Cumarin-Gerüst bestimmt entscheidend die Eigenschaften der anvisierten Phototrigger.

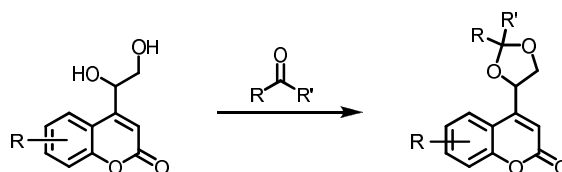


Abbildung 3-1: Synthese der Cumarinyl-substituierten 1,3-Dioxolane

Zunächst wurde der von HAGEN *et al.* entwickelte **BCMACM**-Chromophor (vgl. Abb. 1-1) als besonders aussichtsreicher Ansatzpunkt für die Entwicklung eines entsprechenden Ethandiole angesehen.^{27b} **BCMACM**-Verbindungen absorbieren langwelliges Licht mit hoher Intensität und sind gut wasserlöslich. {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}-1,2-ethandiol (**BCMAC-ED**) war bisher nicht bekannt und ein Syntheseverfahren für die Darstellung wurde entwickelt. Entgegen den Erwartungen erwiesen sich überraschenderweise aber **BCMAC-ED-caged** Carbonylverbindungen gegenüber der Photolyse als weitgehend inert, so dass auf das literaturbekannte **Bhc-ED**²⁸ (vgl. Abb. 1-5) als Synthon für die Dioxolanbildung zurückgegriffen wurde. Da die Hydroxygruppe in 7-Position in deprotonierter Form, d. h. bei pH > 7 als guter Elektronendonator fungiert, weist **Bhc-ED** ebenfalls eine hohe Extinktion im sichtbaren Bereich des Lichts auf. **Bhc-ED** eignete sich gut für die Darstellung der *caged* Carbonylverbindungen und deren photochemischen Eigenschaften erwiesen sich als zufriedenstellend. Allerdings zeigten einige der **Bhc**-substituierten Dioxolane eine unzureichende Wasserlöslichkeit. Um die Wasserlöslichkeit der Verbindungen zu erhöhen, wurde versucht, Carboxylfunktionen in die 3- bzw. 8-Position des Cumarin-Gerüsts einzuführen. Dies gelang im Fall der 8-Position mit der Verbindung **BHCC-ED**. Da sich die Carboxylfunktionen direkt am Chromophor ohne einen Linker zur Unterbrechung der π -Konjugation befand, war mit nicht vorhersagbaren zusätzlichen elektronischen Effekten im aromatischen Ring zu rechnen.

Um ein Cumarin-Derivat mit hypsochrom verschobenem Absorptionsspektrum verglichen mit **Bhc-ED** herzustellen, wurde die Hydroxyfunktion in 7-Position durch die schwächer elektronendonorfähige Carboxymethoxy-Gruppe ersetzt und es wurde [6-Brom-7-(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]-1,2-ethandiol (**BCC-ED**) synthetisiert. Gleichzeitig sollte die Wasserlöslichkeit der entsprechenden geschützten Carbonylverbindungen gegenüber den **Bhc-ED**-Derivaten erhöht sein. Entsprechende Synthesewege hierfür wurden erarbeitet. Jedoch waren die photochemischen Quantenausbeuten nicht zufriedenstellend.

Schließlich wurde mit {8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-1,2-ethandiol (**BBHC-ED**) eine neue PPG, die sowohl eine hohe Wasserlöslichkeit und hohe Extinktionskoeffizienten im Wellenlängenbereich oberhalb von 360 nm als auch eine effiziente Photolysierbarkeit vereint, entwickelt. **BBHC-ED** ist im Prinzip die in 6-Position des Cumarin-Gerüsts bromierte Variante von Calcein Blau,⁶⁷ einem fluorochromen Indikator zur chelatometrischen Bestimmung von Metallionen. Die Einführung eines Aminomethyl-Substituenten in die 8-Position des Cumarin-Gerüsts von 7-Hydroxycumarin-Derivaten bewirkt eine Absenkung des pK_s -Wertes der 7-Hydroxygruppe um 1,2 Einheiten.⁶⁸ Dieser Effekt sollte auch zum Tragen kommen, wenn man die Aminomethyl-Substitution an **Bhc-ED** vornimmt. Damit würde ein Chromophor entstehen, bei dem selbst im unteren physiologischen pH-Bereich die 7-Hydroxygruppe als Phenolat-Anion vorliegt und der demzufolge selbst bei pH 6 ausreichend große Extinktionskoeffizienten aufweist. Außerdem wurde durch die beiden Carboxylgruppen des Bis(carboxymethyl)aminomethyl-Substituenten eine deutliche Erhöhung der Wasserlöslichkeit erwartet. Das neu entwickelte **BBHC-ED** eignete sich auch hervorragend als Agenz für die Darstellung von *caged* Carbonylverbindungen. Mit den **BBHC-ED-caged** Aldehyden und Ketonen gelang es erstmals, Carbonylverbindungen mit einer relativ hohen photochemischen Quantenausbeute freizusetzen.

Bis auf **Bhc-ED** wurden alle dargestellten (Cumarin-4-yl)ethandiole erstmals zur Blockierung der Carbonylfunktion angewendet.

3.1.2 Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol

Dimethylester von 7-[[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl]-1,2-ethandiol (BCMAC-ED)

Das für die Ketalisierung/Acetalisierung der Carbonylverbindungen erforderliche Synthon (**9**) wurde nach einem 7-stufigen Syntheseweg hergestellt (Abb. 3-2).

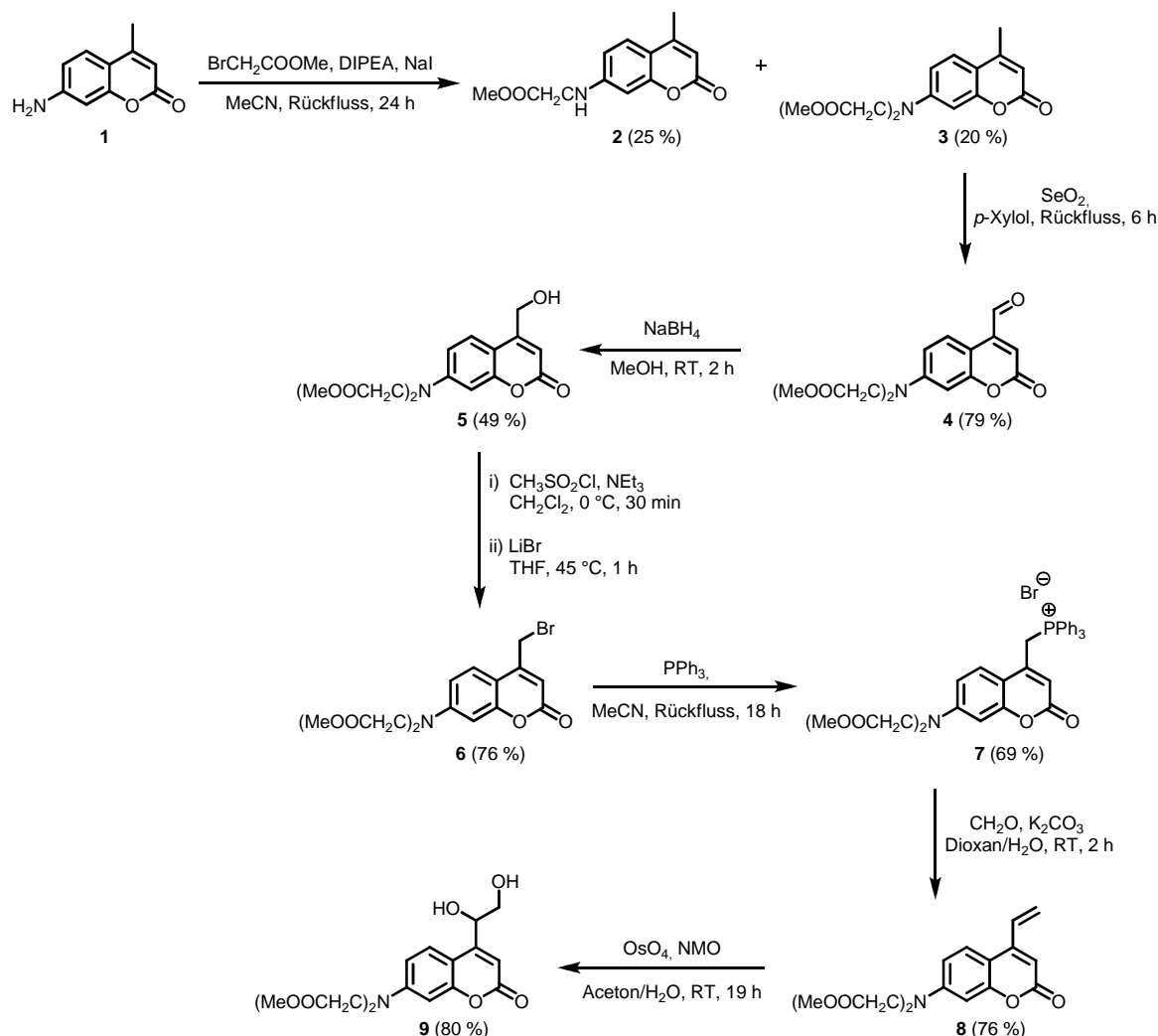


Abbildung 3-2: Synthese des Dimethylesters von **BCMAC-ED** (**9**)

Ausgangspunkt war das kommerziell erhältliche 7-Amino-4-methylcumarin (**1**), das durch Umsetzung mit Bromessigsäuremethylester in ein Gemisch aus 7-(Methoxycarbonylmethylamino)-4-methylcumarin (**2**) und 7-[[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin (**3**) überführt wurde. Das Gemisch konnte mittels Flash-Chromatographie aufgetrennt werden. Die Ausbeute an **3** war nicht befriedigend, aber Verbindung **2** konnte durch nochmalige Alkylierung weiter in **3** überführt werden. Durch Riley-Oxidation von **3** zum Aldehyd **4** und die anschließende Reduktion von **4** mit NaBH_4 wurde der entsprechende Alkohol **5** erhalten, der durch die Behandlung mit $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ und nachfolgende Umsetzung mit LiBr auf milde Weise in die 4-Brommethyl-Verbindung **6** überführt wurde. Es folgte die Reaktion zum Phosphoniumsalz **7**, der sich eine Wittig-Reaktion anschloß. Das in guter Ausbeute

erhaltene Vinylcumarin **8** wurde schließlich durch Hydroxylierung mit OsO_4 in das Diol **9** überführt. Alle Zwischenstufen wurden mit guten bis befriedigenden Ausbeuten erhalten.

6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin (Bhc-ED)

Das bereits beschriebene 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin (**15**) wurde ausgehend von 4-Bromresorcinol (**10**) nach der entsprechenden Literaturvorschrift synthetisiert.²⁸

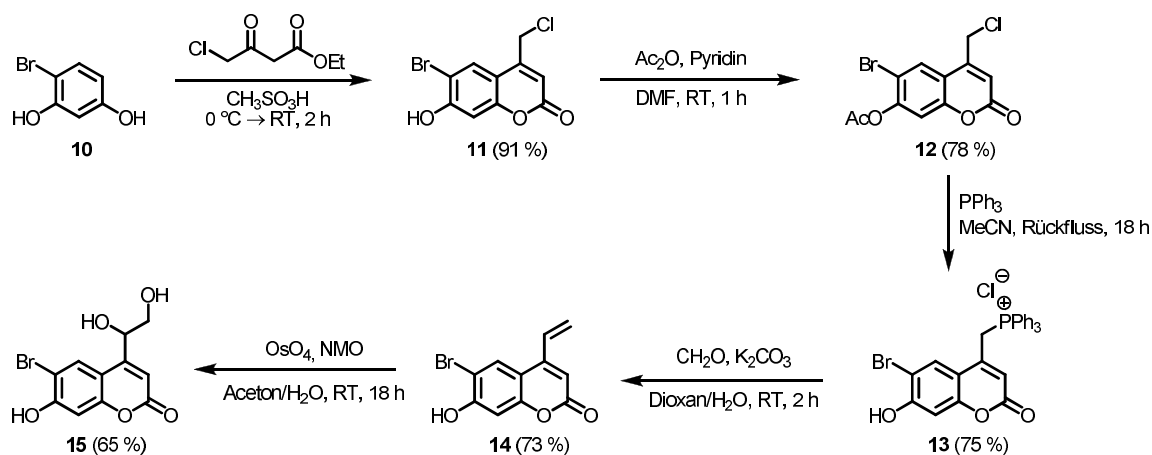


Abbildung 3-3: Synthese von **Bhc-ED (15)**

10 wurde mit 4-Chloracetessigsäureethylester zum 6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxycumarin (**11**) umgesetzt. Durch ein von mir eingeführtes Verfahren konnte **11** gegenüber der beschriebenen Syntheseprozedur in deutlich verkürzter Reaktionszeit (2 h gegenüber 6 d) bei gleichzeitiger Erhöhung der Ausbeute von 59 % auf 91 % erhalten werden. Nach Schützen der OH-Gruppe in **11** mit Essigsäureanhydrid lieferte die Umsetzung des acetylierten 4-Chlormethylcumarins **12** mit PPh_3 [7-(Acetoxymethyl)-6-bromocumarin-4-yl]methyl-triphenylphosphoniumchlorid (**13**). Es folgte die Reaktion zum 4-Vinylcumarin **14**, welches zur Zielverbindung **15** dihydroxyliert wurde (Abb. 3-3). Die erhaltenen Ausbeuten für die einzelnen Reaktionsschritte waren durchgehend gut.

Versuch zur Darstellung von 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-3-(methoxycarbonylmethyl)cumarin

Um die langwellige Extinktion der **Bhc-ED**-Gruppe zu erhalten, d. h. die Hydroxyfunktion in 7-Position unverändert zu lassen, und trotzdem die Hydrophilie des Diols zu erhöhen, wurde versucht, in 3-Position des Cumarin-Gerüsts von **Bhc-ED** eine Carboxylfunktion einzuführen.⁶⁹ Hierfür wurde nachfolgender Syntheseweg verfolgt (Abb. 3-4)

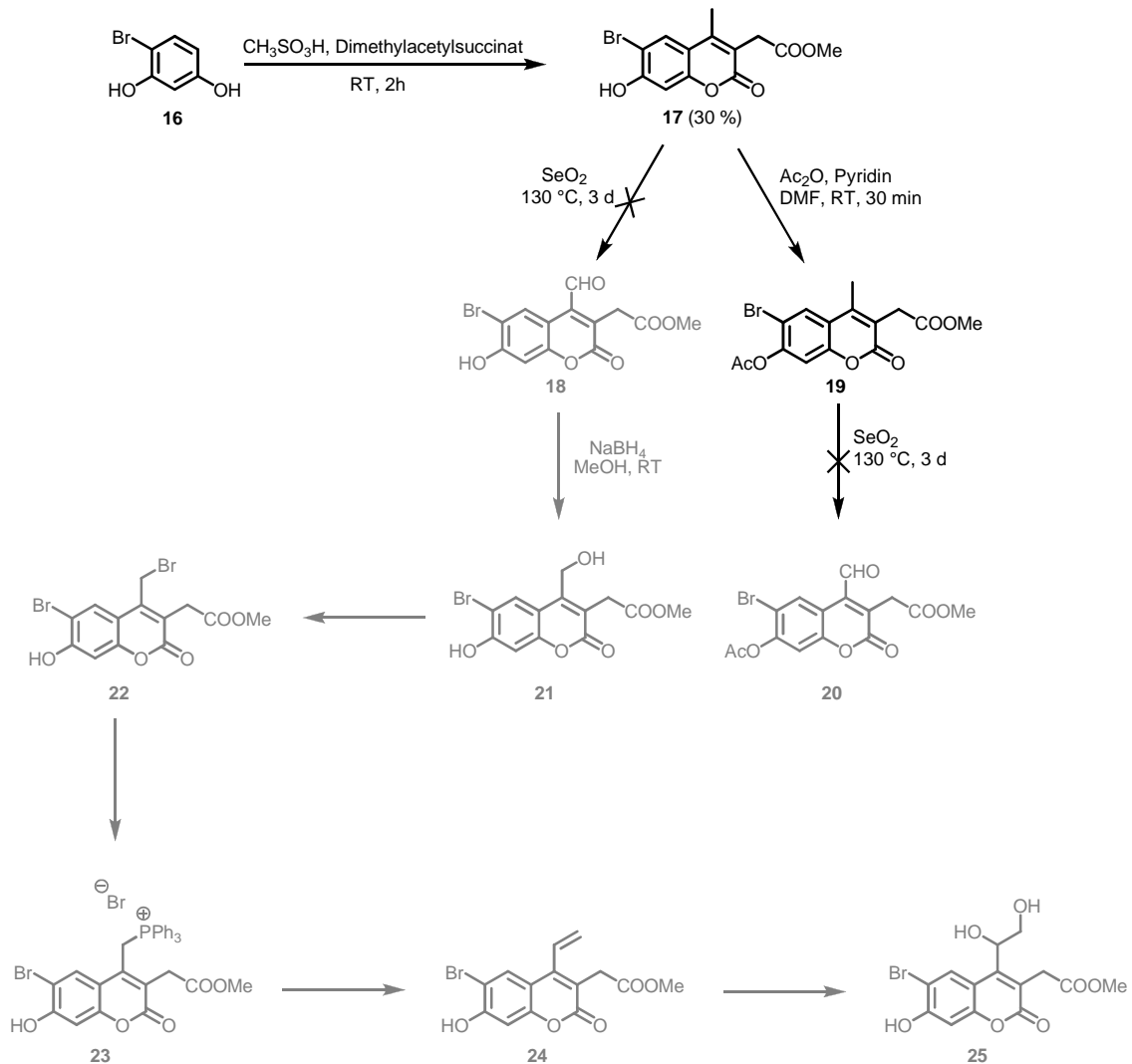


Abbildung 3-4: Syntheserversuch zur Darstellung von 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-3-(methoxycarbonylmethyl)cumarin (**25**)

Zunächst konnte das Cumarin **17** mittels Pechmann-Reaktion von **16** und Dimethylacetylsuccinat in $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ mit befriedigender Ausbeute synthetisiert werden.^{69b} Die anschließende Riley-Oxidation schlug jedoch fehl. Die CH_3 -Gruppen in **17** und dem entsprechenden O-acylierten Derivat **19** konnten nicht in Aldehydgruppen überführt werden.

Daher wurde versucht über das 4-Brommethylcumarin **27** zu dem Diol **25** zu gelangen.⁷⁰ Jedoch konnte eine gezielte Bromierung von **19** in 4-Position zu **27**, wie in Abb. 3-5 gezeigt, nicht erreicht werden. Auch weitere Umsetzungen von **19** mit KHMDS/LDA bzw. mit AIBN/NBS führten zu zahlreichen an verschiedenen Positionen bromierten Nebenprodukten. Hauptsächlich entstand dabei

ein in 8. Position am Cumarin-Gerüst bromiertes Produkt **26**. Weitere Syntheseschritte zum Diol **25** wurden nicht weiterverfolgt.

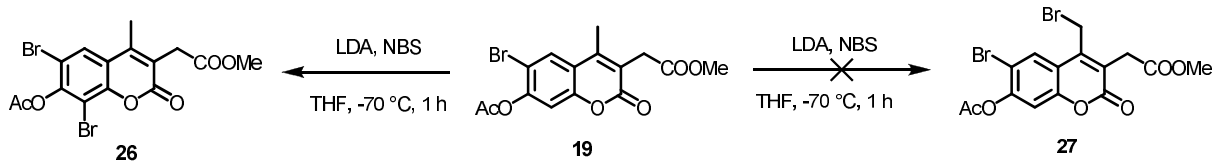


Abbildung 3-5: Versuch der Synthese von 6-Brom-7-hydroxy-8-(methoxycarbonylmethyl)-4-methylcumarin (**27**)

Methylester von 6-Brom-8-carboxy-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin (BHCC-ED)

Alternativ wurde eine Carbonsäuregruppierung in die 8-Position eingeführt. Hierfür wurde der in Abb. 3-6 aufgeführte Syntheseweg ausgewählt.

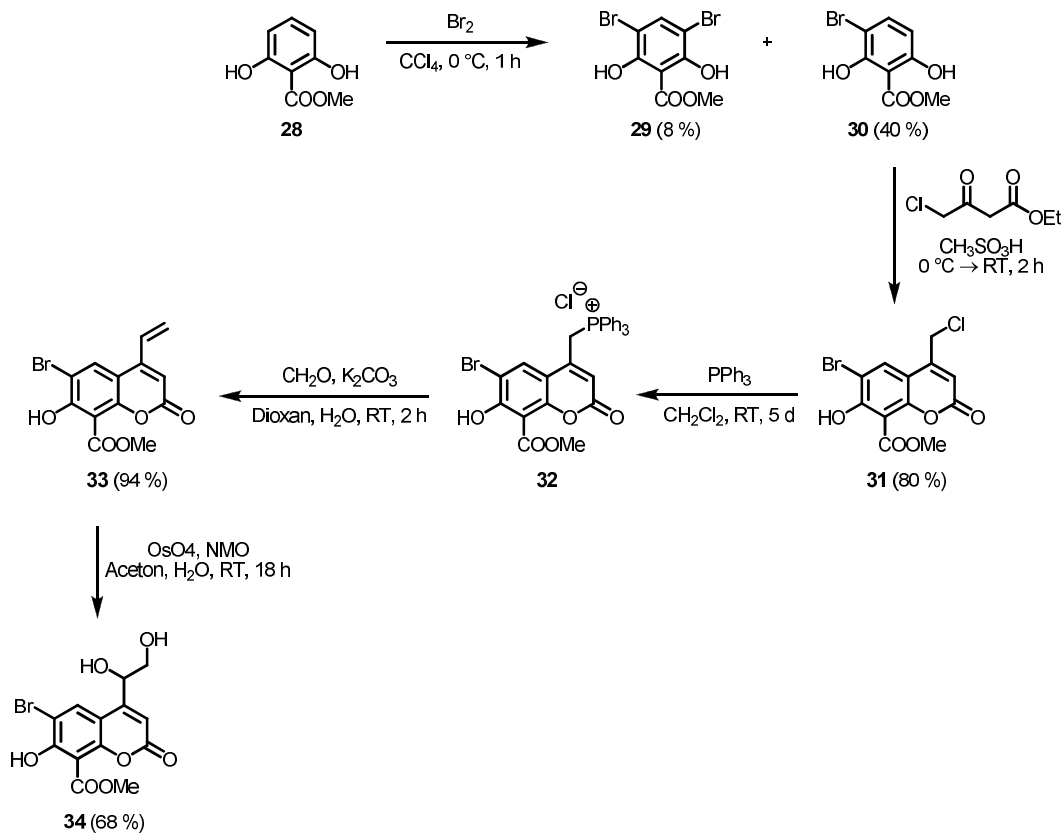


Abbildung 3-6: Synthese des Methylesters von **BHCC-ED** (**34**)

2,6-Dihydroxybenzoesäuremethylester **28** wurde in Analogie zu einem von DOYLE beschriebenen Verfahren mit Br₂ zu 3-Brom-2,6-dihydroxybenzoesäuremethylester (**30**) bromiert.⁷¹ Um das bei der Reaktionsführung entstehende doppelt bromierte Produkt **29** zu unterdrücken, war es erforderlich, die Bromierung mittels einer von mir optimierten Variante bei 0 °C durchzuführen. Hierdurch konnte die Bildung von **29** von 82 % auf 8 % reduziert werden und das einfach bromsubstituierte Produkt **30** mit 40 % Ausbeute isoliert werden. Verbindung **30** wurde anschließend in einer Pechmann-Reaktion mit 4-Chloracetessigsäureethylester in CH₃SO₃H mit 80 % Ausbeute zu 6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin (**31**) umgesetzt. Die anschließende Umsetzung mit PPh₃ zum

Phosphoniumsalz **32** unter Rückfluss erforderte 5 d Reaktionszeit. Die Wittig-Reaktion von **32** erfolgte mit dem ausgefallenen Rohprodukt und lieferte **33** mit 94 % Ausbeute. Die nachfolgende Dihydroxylierung mit OsO_4 führte schließlich mit 68 % Ausbeute zu dem Diol **34**.

Methylester von 6-Brom-7-(carboxymethoxy)-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin (BCC-ED)

In Abb. 3-7 ist ein weiterer von mir durchgeführter Syntheseweg zu einem in Position 6 bromsubstituierten-1,2-(dihydroxyethyl)cumarin **38** aufgeführt. Ausgangspunkt hierfür war eine aktuelle Publikation von FURUTA *et al.*,⁷² wonach die photochemischen Quantenausbeuten von 7-alkoxy-substituierten 6-Bromcumarinylmethylestern höher sein sollten als die entsprechenden Quantenausbeuten von 7-hydroxy-substituierten 6-Bromcumarinylmethylestern.

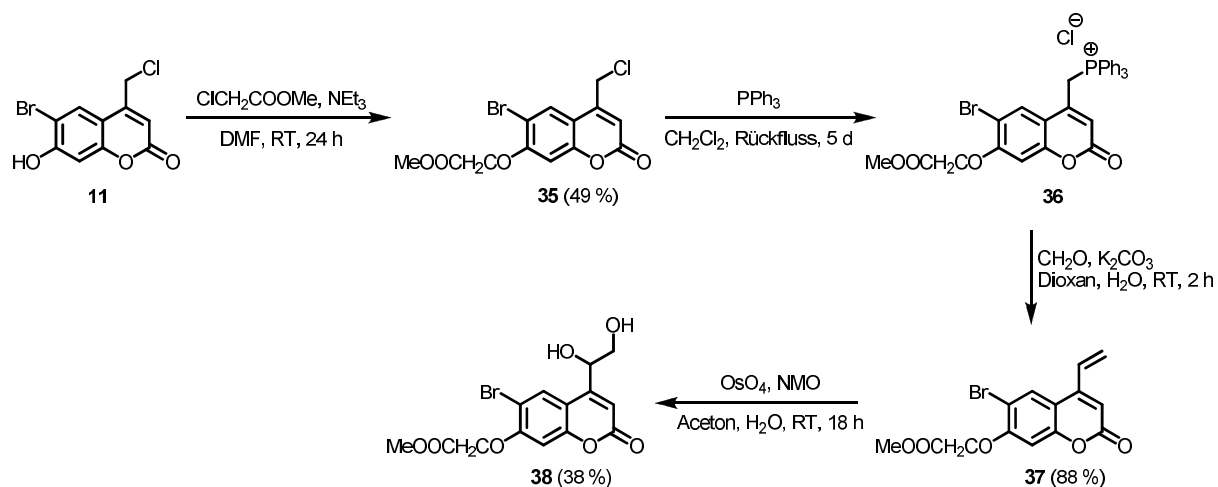


Abbildung 3-7: Synthese des Methylesters von **BCC-ED** (**38**)

Die Synthese startete mit 6-Brom-4-(chloromethyl)-7-hydroxycumarin (**11**). Bei der O-Alkylierung von **11** unter Verwendung von Bromessigsäuremethylester kam es zum partiellen Halogenaustausch und neben dem 7-(methoxycarbonylmethoxy)-substituierten Derivat **35** entstand das analoge 4-(Brommethyl)cumarin. Um Produktgemische zu vermeiden wurde daher **35** durch Umsetzung von **11** mit Chloressigsäuremethylester hergestellt. Die Ausbeute war zufriedenstellend. Verbindung **35** reagierte dann mit PPh_3 zu **36**, wobei auch hier eine verlängerte Reaktionszeit von 5 d nötig war. Nach erfolgter Wittig-Reaktion mit dem Rohprodukt von Verbindung **36** und anschließender Dihydroxylierung konnte **38** mit befriedigenden Ausbeuten erhalten werden.

Dimethylester von 8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin (BBHC-ED)

Schließlich gelang auch die Einführung eines hydrophilen Carboxymethyl-Restes in die 8-Position von **Bhc-ED**. Wie u. a. von ADAMCZYK *et al.* beschrieben, können 7-Hydroxycumarine durch Mannich-Reaktion in 8-Position aminomethyliert werden.⁶⁸ Uns gelang in Analogie zu dieser Reaktion durch Umsetzung von **Bhc-ED** (**15**) mit frisch hergestelltem Mannich-Reagenz aus Formaldehyd und Iminodiessigsäure-dimethylester-hydrochlorid die Darstellung des Synthons **39** (Abb. 3-8).⁷³

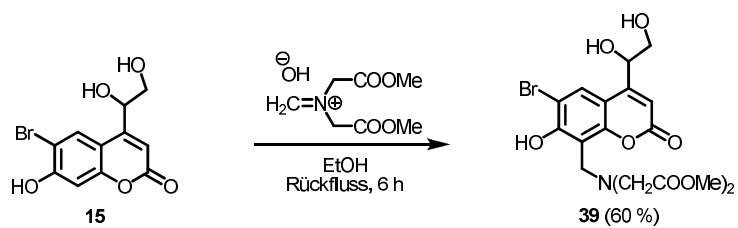


Abbildung 3-8: Synthese des Dimethylesters des **BBHC-ED**-Chromophors (**39**)

Die Mannich-Reaktion führte zwar zu einer Reihe von Nebenprodukten, so dass sich die Reinigung des Diols **39** nicht ganz einfach gestaltete, dennoch konnte das Diol **39** letztendlich in zufriedenstellender Ausbeute erhalten werden.

Damit stand ein weiteres interessantes Coumarinylethandiol als potentielles Agenz für die Überführung von Carbonylverbindungen in *caged* Derivate zur Verfügung.

Versuch zur Darstellung von 7-[Bis(carboxymethyl)amino]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-cumarin

Laut FURUTA und NOGUCHI⁷⁴ ist bei Bromierung der 6-Position im Cumarin-Gerüst neben einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums auch die photochemische Quantenausbeute für die Spaltung von Cumarinylmethylestern gegenüber nicht bromierten Derivaten erhöht, was den Schluß nahe legt, dass auch die Einführung eines 6-Bromsubstituenten in den **BCMAC**-Chromophor zur Verbesserung der photochemischen Eigenschaften führen sollte. Wir versuchten deshalb die Darstellung von dem Diol **49** nach dem in Abb. 3-9 aufgezeigten Reaktionsschema.

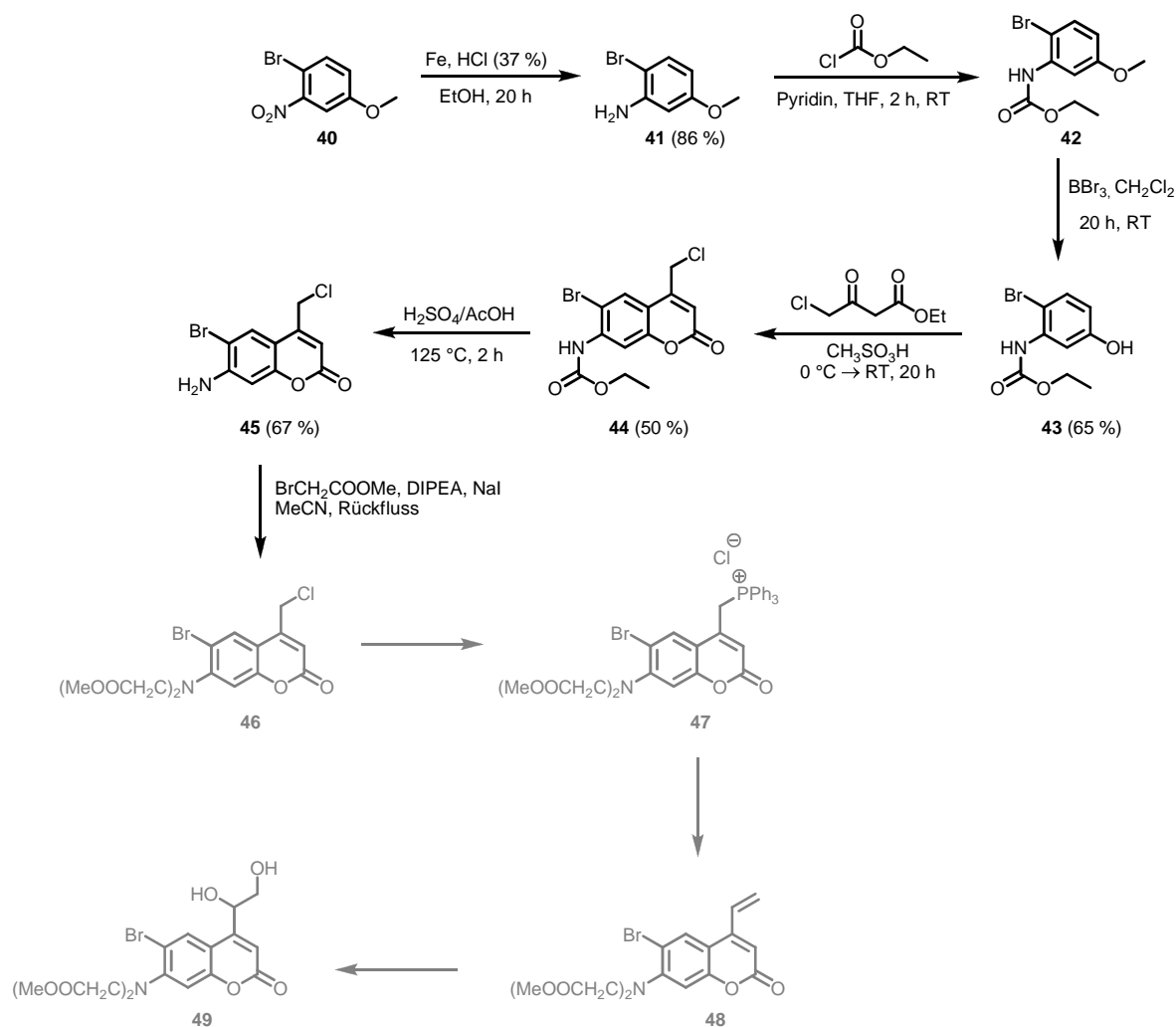


Abbildung 3-9: Syntheserversuch von 7-[Bis(carboxymethyl)amino]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-cumarin (**49**)

Wir starteten die Synthese mit der kommerziell erhältlichen Nitroverbindung **40**. Das durch Reduktion von **40** erhaltene 3-Amino-4-bromoanisol **41** erforderte für die nachfolgenden Reaktionsschritte eine Schützung der Aminofunktion, die durch Umsetzung mit Chlorameisensäureethylester erreicht werden konnte.⁷⁵ Auf die Demethylierung⁷⁶ mit BBr₃ folgte der Ringschluß zu dem Cumarinderivat **44**. Nach erfolgreicher Abspaltung der Schutzgruppe⁷⁵ gelang dann allerdings nicht die Bisalkylierung von 7-Amino-6-brom-4-(chloromethyl)cumarin **45**, so dass der Syntheseweg zum entsprechenden Diol **49** nicht weiterverfolgt wurde.

Versuche zur Darstellung von 4-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-hydroxy-6-iodcumarin

Um den Schweratomeffekt zu maximieren wurde in Analogie zu den synthetisierten 6-Brom-Cumarinen versucht, ein in Position 6 iod-substituiertes Cumarinylethandiol **56** herzustellen. Wir versuchten **56** wie in Abb. 3-10 gezeigt zu synthetisieren. Die Iodierung von **50** mit ICl verlief auch erfolgreich.⁷⁷ Allerdings gelang die Pechmann-Reaktion zum Cumarin **53** nur mit unbefriedigender Ausbeute.

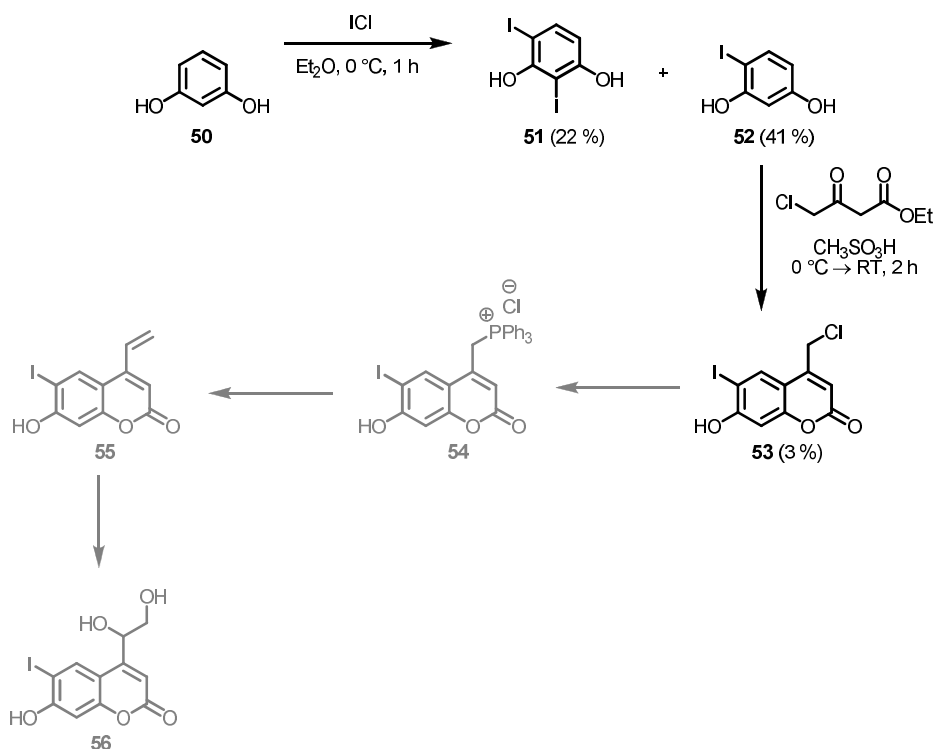


Abbildung 3-10: Syntheseversuch von 4-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-hydroxy-6-iodcumarin (**56**)

Weitere Syntheseversuche das Diol **56** über die 4-Methylverbindung **57** mittels Umsetzung von **57** mit Iodmonochlorid in Gegenwart von Cerammoniumnitrat herzustellen,⁷⁸ gelangen nicht. Es wurde lediglich das in 8-Position iodierete Derivat **58** erhalten (Abb. 3-11). Die Synthese zum Diol **56** wurde daher nicht weiterverfolgt.

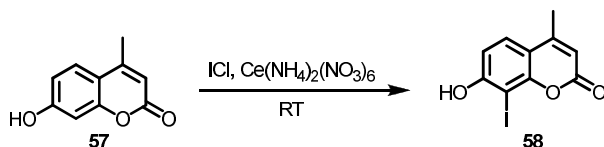


Abbildung 3-11: Synthese von 7-Hydroxy-8-iod-4-methylcumarin (**58**)

Hydrolyse der methoxycarbonylsubstituierten Ethandiole

Die dargestellten Ethandiole **9**, **15**, **34**, **38** und **39** dienen als Reagenzien für die Überführung der Carbonylverbindungen in die entsprechenden *caged* Verbindungen. Da sich nach erfolgreichem Caging bei den methoxycarbonylsubstituierten Cumarin-Chromophoren stets deren Überführung in die wasserlösliche carboxysubstituierten Derivate anschloss, entstanden nach der Photospaltung die Dirole **59** bis **62** mit freien Carbonsäureresten. Für eine Reihe von photochemischen Untersuchungen war deshalb für Vergleichszwecke die Herstellung dieser Verbindungen erforderlich. Sie erfolgte wie in Abb. 3-12 aufgeführt durch Esterspaltung unter milden Bedingungen in Gegenwart von LiOH. Die Ausbeuten für die einzelnen Hydrolyseprodukte waren zufriedenstellend.

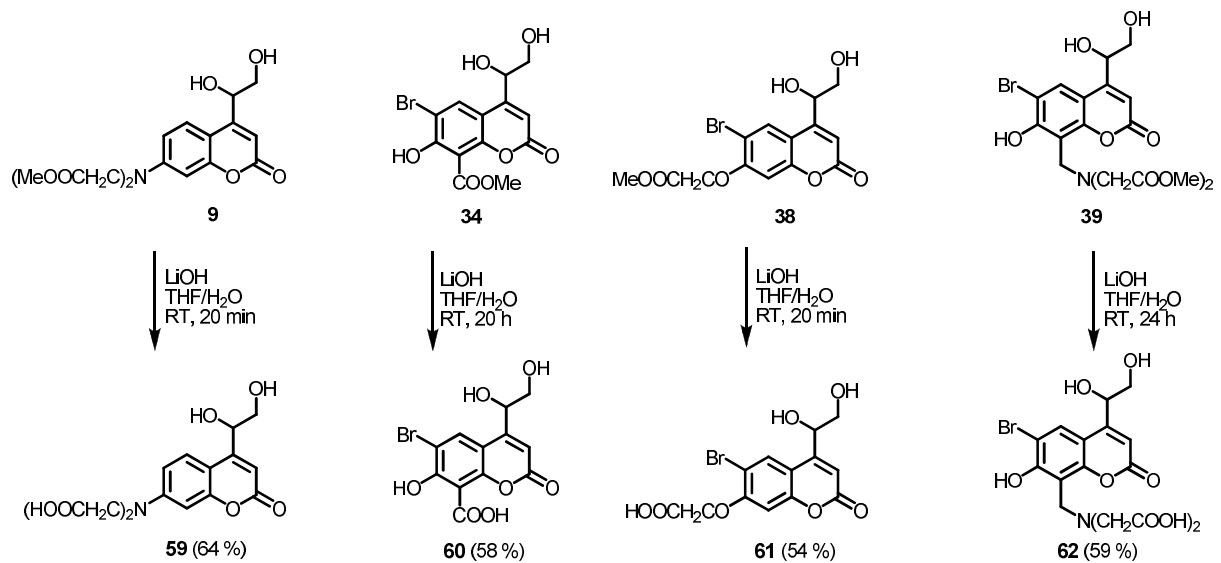


Abbildung 3-12: Synthese der 4-(1,2-Dihydroxyethyl)cumarin-Derivate **59–62**

3.1.3 Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Benzaldehyde

Die *caged* Benzaldehyde wurden wie auch alle anderen *caged* Carbonylverbindungen durch Acetalisierung/Ketalisierung der jeweiligen Carbonylverbindung mit den vorstehend beschriebenen 1,2-Diolen unter sauren Bedingungen hergestellt. Benzaldehyd diente als Modellcarbonylverbindung. Alle wichtigen Eigenschaften der verschiedenen PPGs wurden zunächst an dem entsprechenden *caged* Benzaldehyd studiert.

Die Synthese der *caged* Benzaldehyde erfolgte durch Umsetzung der entsprechenden 1,2-Ethandiole mit Benzaldehyd in Gegenwart von PPTS und MgSO_4 in Toluol in Anlehnung an ein früher beschriebenes Syntheseverfahren²⁸ (Abb. 3-13).

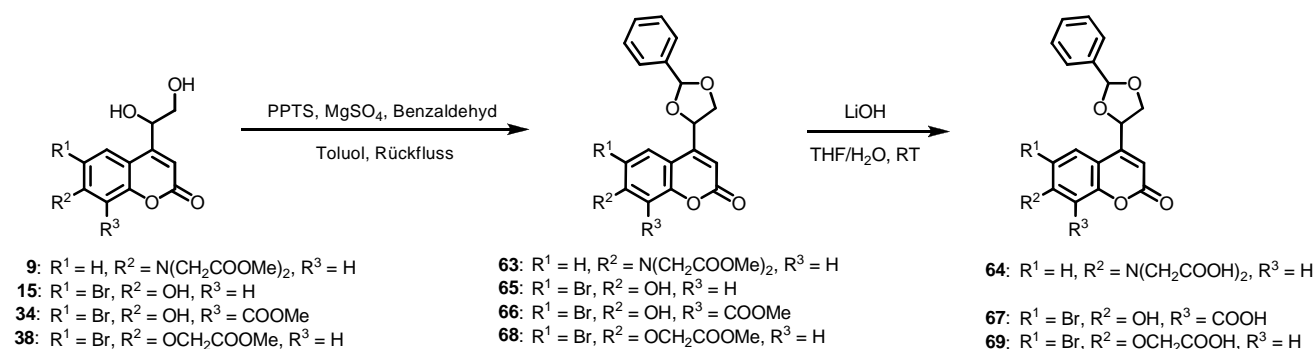
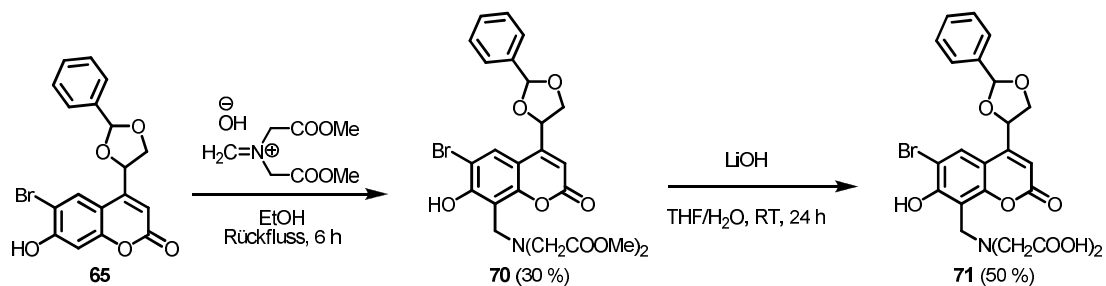


Abbildung 3-13: Synthese von **BCMAC-ED-**, **Bhc-ED-**, **BHCC-ED-** und **BCC-ED-caged** Benzaldehyd (**64**, **65**, **67** und **69**)

Die Ausbeuten der im ersten Reaktionsschritt erhaltenen cyclischen Acetale waren gut bis zufriedenstellend. Im Einzelnen konnten der Methylester von **BCMAC-ED-caged** Benzaldehyd (**63**) in 50%iger Ausbeute, **Bhc-ED-caged** Benzaldehyd (**65**) in 63%iger Ausbeute und die Methylester von **BHCC-ED-caged** Benzaldehyd (**66**) und **BCC-ED-caged** Benzaldehyd (**68**) in ca. 40%iger Ausbeute erhalten werden. Anschließend erfolgte bei den am Cumarin-Gerüst methoxycarbonylsubstituierten 1,3-Dioxolanen die Esterspaltung mittels LiOH. Die entstandenen wasserlöslichen carboxy-substituierten *caged* Benzaldehyde wurden nach Reinigung mittels präp. HPLC in guten Ausbeuten erhalten (Abb. 3-13). Die Reaktionszeit der Esterhydrolyse bei **66** war mit 18 h deutlich länger als bei den übrigen Derivaten. Es konnten **BCMAC-ED-caged** Benzaldehyd (**64**) mit 52%iger Ausbeute, **BHCC-ED-caged** Benzaldehyd (**67**) mit 48%iger Ausbeute und **BCC-ED-caged** Benzaldehyd (**69**) mit 45%iger Ausbeute erhalten werden.

Im Gegensatz zu den vorstehend aufgeführten Verbindungen gelang die Acetalisierung von **BMBHC-ED** (**39**) mit Benzaldehyd nicht. Bei analoger Reaktionsführung entstand hierbei nach kurzer Zeit ein sehr polares Nebenprodukt. Die Bildung von **BBHC-ED-caged** Benzaldehyd (**71**) konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde deshalb versucht, **71** durch Mannich-Reaktion von **Bhc-ED-caged** Benzaldehyd (**65**) herzustellen.

Abbildung 3-14: Synthese von **BBHC-ED-caged** Benzaldehyd (**71**)

Hierzu wurde das cyclische Acetal **65** in Analogie zu ADAMCZYK *et al.*⁶⁸ mit einem Mannich-Reagenz aus Formaldehyd und Iminodiessigsäure-dimethylester-hydrochlorid umgesetzt (Abb. 3-14). Tatsächlich gelang es auf diesem Weg, **65** selektiv in 8-Position zu aminomethylieren. Der gebildete Dimethylester **70** wurde anschließend mit LiOH in die Zielverbindung **71** überführt. Die nicht ganz zufriedenstellende Ausbeute von **70** ist auf die Bildung von Nebenprodukten zurückzuführen, die die Aufreinigung des Dimethylesters erschwerte.

3.1.4 Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Phenylacetaldehyd, Acetophenon und Phenylaceton

Um die Abhängigkeit der photochemischen Eigenschaften der 1,3-Dioxolane von der Struktur der eingesetzten Carbonylverbindungen zu untersuchen, wurden neben den unter Abschn. 3.1.3 *caged* Benzaldehyden (aromatische Aldehydgruppe) verschiedene einfache Carbonylverbindungen in **Bhc**- und **BBHC**-substituierte 1,3-Dioxolane überführt (Abb. 3-15). Als einfache Carbonylverbindungen dienten Phenylacetaldehyd (aliphatische Aldehydgruppe), Acetophenon (araliphatische Ketogruppe) und Phenylaceton (aliphatische Ketogruppe).

Die Synthesen erfolgten in Analogie zu den (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Benzaldehyden. Der Syntheseweg zu den **Bhc**-Derivaten wird in Abb. 3-15 gezeigt. Die Reinigung der Produkte erfolgte in allen Fällen über die präp. HPLC. Die Ausbeuten der erhaltenen **Bhc-ED-caged** Verbindungen **72–74** waren zufriedenstellend und betragen bei allen Verbindungen ca. 50 %.

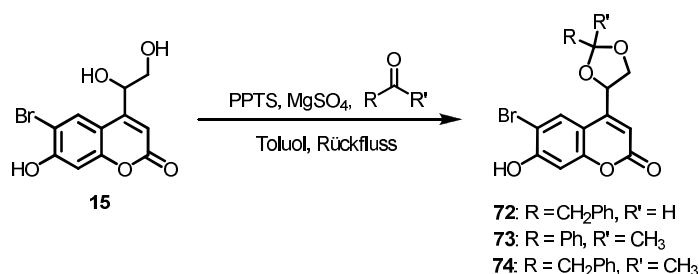


Abbildung 3-15: Synthese von **Bhc-ED-caged** Phenylacetaldehyd (**72**), Acetophenon (**73**) und Phenylaceton (**74**)

Die Acetalisierung/Ketalisierung der Carbonylverbindungen mit dem Diol **39** konnte gleichfalls nicht erreicht werden, und die Darstellung der **BBHC-ED-caged** Carbonylverbindungen **76**, **78** und **80** musste über Aminomethylierung der **Bhc**-Derivate erfolgen (Abb. 3-16).

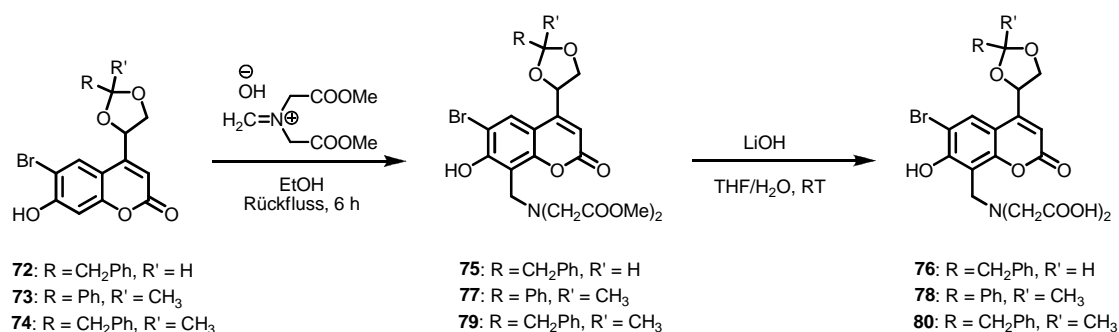


Abbildung 3-16: Synthese von **BBHC-ED-caged** Phenylacetaldehyd (**76**), Acetophenon (**78**) und Phenylaceton (**80**)

Die Ausbeuten der Methylester der **BBHC-ED-caged** Carbonylverbindungen **75**, **77** und **79** liegen im Bereich von 39 % – 46 % und sind im Vergleich zu den Ausbeuten der **Bhc-ED**-Derivate niedriger. Die Hydrolyse zu den carboxysubstituierten Derivaten gelang mit 63%iger Ausbeute für **BBHC-ED-caged**

Phenylacetaldehyd (**76**) bzw. **BBHC-ED-caged** Acetophenon (**78**) und 54%iger Ausbeute für **BBHC-ED-caged** Phenylaceton (**80**).

3.1.5 Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-*caged* Bourgeonale

Die Synthesen der Cumarinyl-1,2-diol-*caged* Bourgeonale erfolgten in Analogie zu denen der entsprechenden *caged* Benzaldehyde (Abb. 3-17).

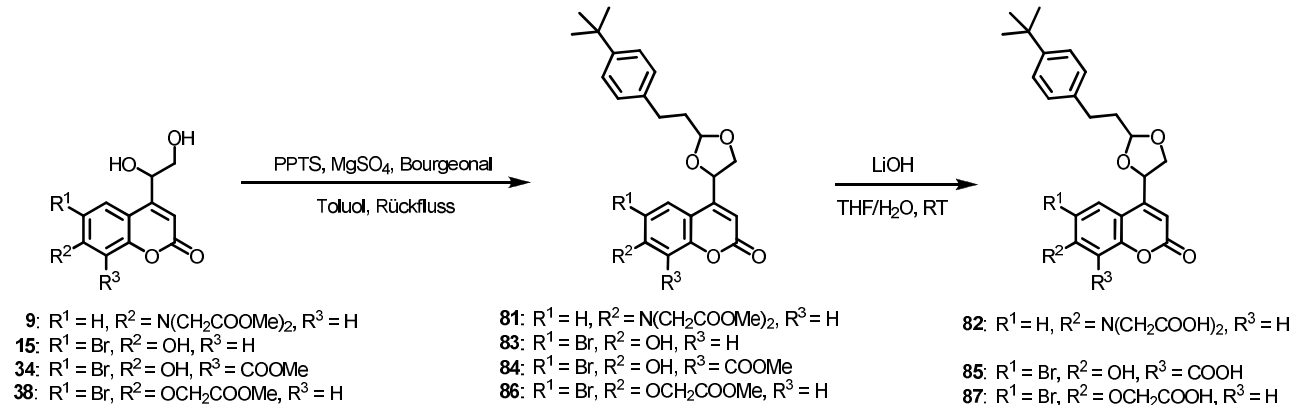


Abbildung 3-17: Synthese von **BCMAC-ED-**, **Bhc-ED-**, **BHCC-ED-** und **BCC-ED-***caged* Bourgeonal (**82**, **83**, **85** und **87**)

Alle coumarinylsubstituierten 1,3-Dioxolane wurden in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten, und die Dimethylester der *caged* Verbindungen **81**, **84** und **86** konnten mit LiOH unter milden Bedingungen erfolgreich in die wasserlöslichen carboxysubstituierten 1,3-Dioxolane überführt werden. Die Ausbeuten waren zufriedenstellend. Die Esterhydrolyse des Methylesters von **BHCC-ED-caged** Bourgeonals **84** dauerte hierbei auch deutlich länger als die der übrigen Derivate und war erst nach 18 h abgeschlossen.

BBHC-ED-caged Bourgeonal (**89**) wurde nach dem in Abb. 3-18 gezeigten Syntheseweg durch Aminomethylierung von **Bhc-ED-caged** Bourgeonal (**83**) erhalten.

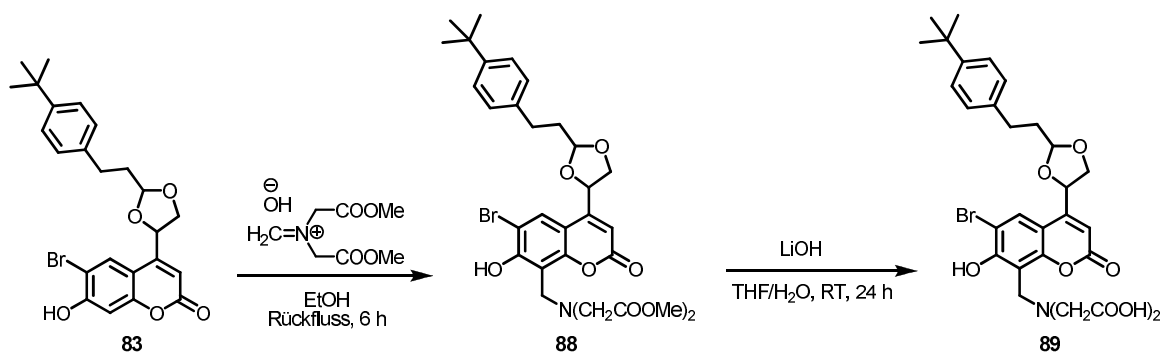


Abbildung 3-18: Synthese von **BBHC-ED-caged** Bourgeonal (**89**)

88 konnte mit 25%iger Ausbeute isoliert werden. Die anschließende Hydrolyse ergab das Zielprodukt **89** mit einer Ausbeute von 59 %.

3.1.6 Synthese der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Progesterone

Progesteron besitzt zwei Carbonylgruppen, jeweils eine in C₃-Position und eine in C₂₀-Position des Steroidgerüsts. Die Ketalisierung mit **BMAC-ED (9)** und **Bhc-ED (15)** führte zu Substanz-Gemischen aus *caged* Progesteron. Eine Ketalbildung an beiden Positionen konnte nicht beobachtet werden. Die Synthese der *caged* Progesterone **90–95** wird in Abb. 3-19 gezeigt.

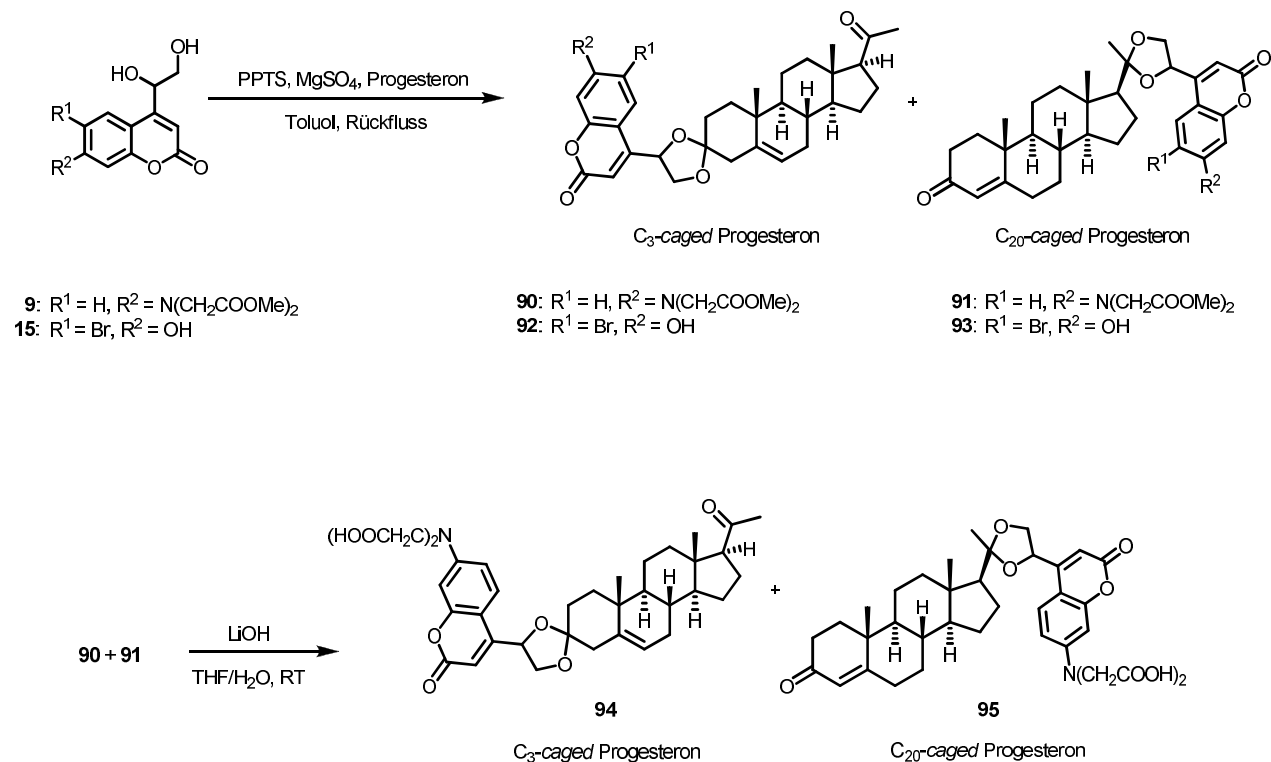


Abbildung 3-19: Synthese von **BCMAC-ED-** und **Bhc-ED-caged** Progesteronen (**90–95**)

Die Umsetzung von **BMAC-ED** und Progesteron lieferte nach 18 h Reaktionszeit und Reinigung mittels präp. HPLC ein Gemisch der Dimethylester von C₃- und C₂₀-**BCMAC-ED-caged** Progesteron (**90, 91**) mit einer Ausbeute von 38 %. Das Verhältnis von C₃-*caged* zu C₂₀-*caged* Derivat betrug 4:1. Die nachfolgende Esterhydrolyse des Gemisches mit LiOH ergab mit einer Ausbeute von 16 % ein Gemisch aus **94** und **95**. Die Trennung der beiden Verbindungen **94** und **95** wurde nicht weiterverfolgt. Bei der analogen Reaktion von **Bhc-ED** und Progesteron konnten trotz einer Reaktionszeit von 48 h nach Reinigung mittels präp. HPLC nur 30 % eines Gemisches aus C₃- und C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**92, 93**) erhalten werden. Das Verhältnis von C₃-*caged* zu C₂₀-*caged* Derivat betrug ebenfalls 4:1.

Um die Ausbeuten der cyclischen Ketale zu erhöhen, wurde der Einsatz von verschiedenen wasserentziehenden Mitteln bei der Reaktion getestet, wie z. B. NaSO₄ und Molsieb. Der Einsatz dieser Mittel brachte jedoch keine Steigerung der Ausbeuten. Die Reaktionsführung mit einer Dean-Stark-Apparatur erzielte auch keine deutlich höheren Ausbeuten. Eine Aktivierung der Carbonylverbindung oder des Diols mit TMSCl bzw. TMSOTf brachte ebenfalls keine höheren Ausbeuten zum 1,3-Dioxolan.⁷⁹

Die C₃- und C₂₀-**BBHC-ED-caged** Progesterone wurden durch die Mannich-Synthese ausgehend von dem vorstehend beschriebenen Gemisch aus C₃- und C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**92**, **93**) und anschließende Esterhydrolyse mit LiOH hergestellt (Abb. 3-20).

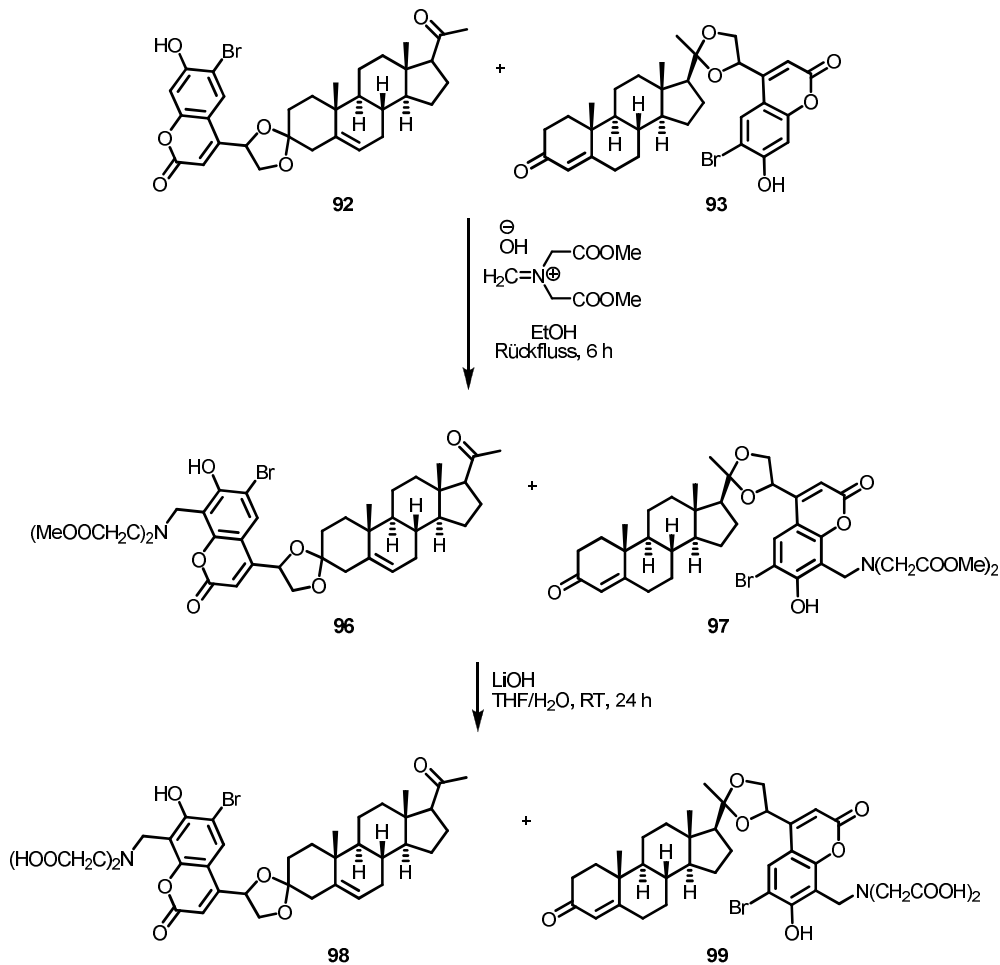


Abbildung 3-20: Synthese von **BBHC-ED-caged** Progesteronen (**98**, **99**)

Dabei betrug die Gesamtausbeute der Dimethylester des Gemisches aus C₃- und C₂₀-**BBHC-ED-caged** Progesteron (**96**, **97**) nach Reinigung durch präp. HPLC 38 %. Das Verhältnis von C₃-*caged* zu C₂₀-*caged* Isomeren war ähnlich wie bei den oben beschriebenen Derivaten. Nach anschließender Hydrolyse der Methylestergruppen mit LiOH und Reinigung durch präp. HPLC wurde ein Gemisch aus C₃- und C₂₀-**BBHC-caged** Progesteron (**98**, **99**) mit 21 % Ausbeute erhalten.

Die Umsetzung von Progesteron mit den Cumarinylethandiolen zu 1,3-Dioxolanen führte nicht nur zu den Stellungsisomeren C₃- und C₂₀-*caged* Verbindungen, sondern infolge der Einführung eines zusätzlichen Chiralitätszentrums zur Bildung von jeweils 4 Diastereomeren. Dieses wird in Abb. 3-21 am Beispiel der **Bhc-ED-caged** Progesterone (**92**, **93**) gezeigt.

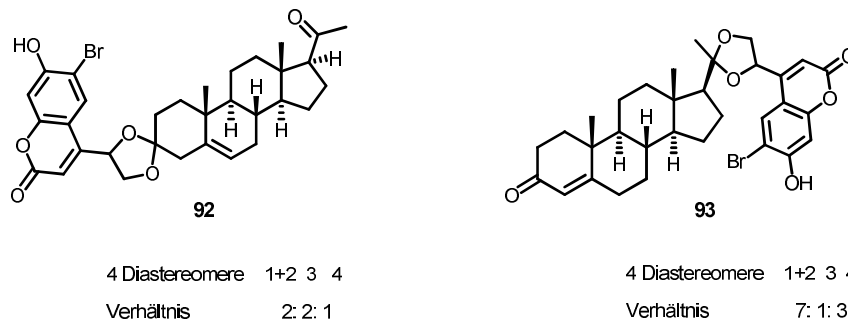


Abbildung 3-21: Diastereomere von C₃- und C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**92** und **93**)

Die Trennung der C₃- und C₂₀-substituierten Derivate sowie die Isolierung der jeweiligen Diastereomere der einzelnen Verbindungen gestalteten sich schwierig und waren wegen der geringen Ausbeuten erheblich erschwert. Im Falle der **Bhc-ED-caged** Progesterone **92** und **93** gelang letztendlich durch Flash-Chromatographie eine gute Trennung des C₃- von dem C₂₀-Derivat und erbrachte eine Ausbeute von 17 % für die C₃-Verbindung **92** und von 3 % für die C₂₀-Verbindung **93**. Die Trennung der jeweils bei beiden Verbindungen gebildeten vier Diastereomere erfolgte mittels präp. HPLC durch ein flaches Gradientengemisch. Die Reindarstellung gelang nur für die Diastereomere 3 und 4. Für die Diastereomere 1 und 2 konnte nur eine partielle Separation erreicht werden. Das Mengenverhältnis der Diastereomere zueinander für **92** und **93** ist Abb. 3-21 zu entnehmen. Die Trennung führte schließlich mit 9%iger Ausbeute zu dem C₃- (**92**) und mit 2%iger Ausbeute zu dem C₂₀-*caged* Derivat (**93**).

Die Trennung der C₃- und C₂₀-**BBhc-ED-caged** Progesterone **98** und **99** wurde durch präp. HPLC erreicht. Eine Trennung per Flash-Chromatographie wie beim **Bhc-ED**-Derivat verlief nicht zufriedenstellend. Das Verhältnis der Diastereomere für **98** und **99** war in etwa identisch mit dem von **92** und **93**. Auf die präparative Darstellung der einzelnen Diastereomere wurde in diesem Falle verzichtet.

Da die Ausbeuten der C₂₀-substituierten Progesterone über den oben skizzierten Reaktionsweg sehr niedrig waren, wurde beispielhaft für C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) ein alternativer Weg entwickelt (Abb. 3-22). Zunächst wurde Pregnenolon (**100**) mit **Bhc-ED** in Gegenwart von PPTS und MgSO₄ in Toluol in das 1,3-Dioxolan **101** überführt. Nach Reinigung wurde **101** mit 10 % Ausbeute erhalten. Nachfolgende Oppenauer-Oxidation mit Aluminiumtri-*tert*-butoxid⁸⁰ lieferte schließlich C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) mit einer Ausbeute von 30 %.

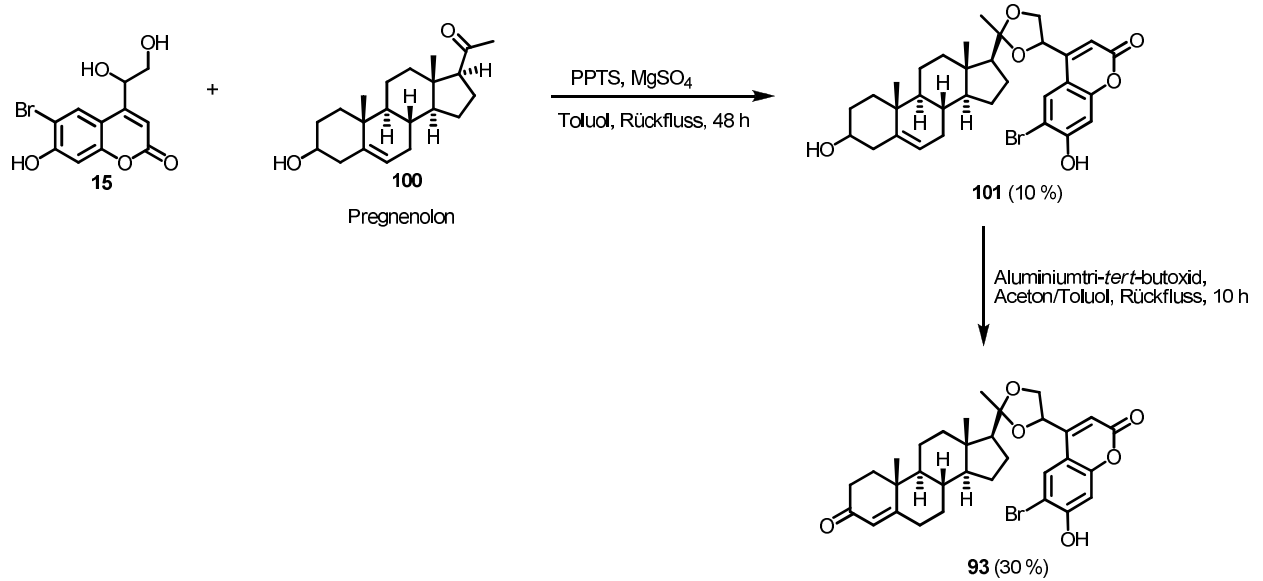


Abbildung 3-22: Alternative Synthese von C₂₀-**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**)

Beide Syntheseverfahren liefern C₂₀-caged Progesteron mit vergleichbaren Ausbeuten. Beim alternativen Syntheseweg mit *caged* Pregnenolon **101** als Vorstufe ist das C₂₀-Progesteron allerdings nur mit einem zusätzlichen Syntheseschritt erhältlich. Andererseits ermöglicht das Verfahren ein gezieltes Schützen der Carbonylfunktion in C₂₀-Position und die Aufreinigung des Endproduktes ist einfacher.

3.1.7 Synthese von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-caged Progesteron-3-CMO

Wie unter Abschn. 1.5 beschrieben zeigt Progesteron-3-CMO an menschlichen Spermien ähnliche Eigenschaften wie Progesteron und *caged* Progesteron-3-CMO könnte möglicherweise C_{20} -*caged* Progesteron ersetzen. *Caged* Progesteron-3-CMO sollte aufgrund der Nichtverfügbarkeit der C=O-Gruppe in Position 3 wesentlich leichter als C_{20} -*caged* Progesteron herzustellen sein. In Abb. 3-23 ist ein entsprechendes Syntheseverfahren für **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO (**105**) aufgeführt.

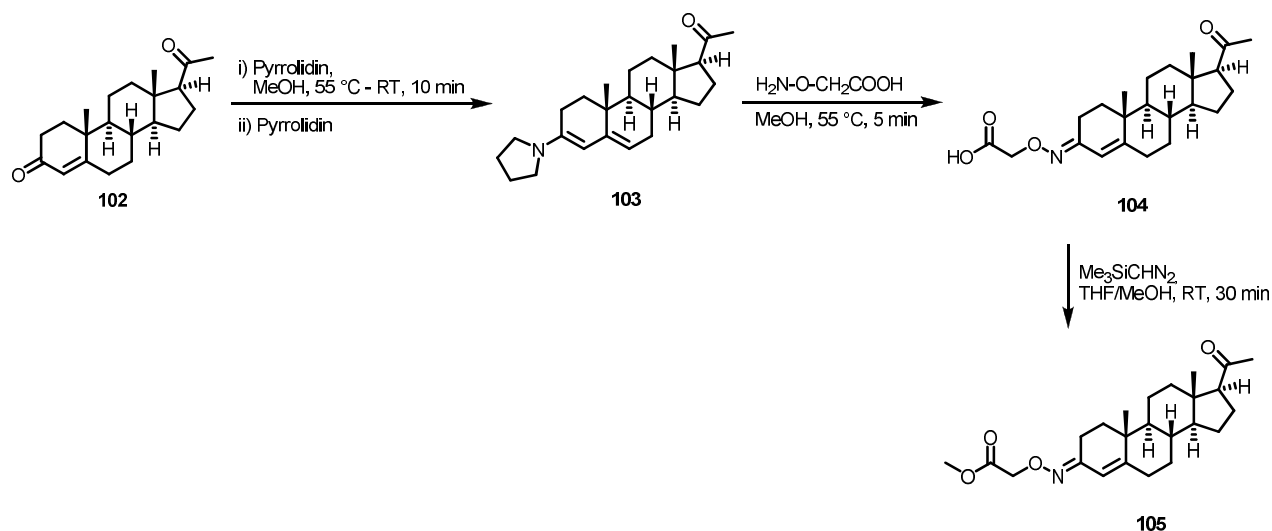


Abbildung 3-23: Synthese des Methylesters von Progesteron-3-CMO (**105**)

Zunächst wurde wie in Abb. 3-23 gezeigt der Ausgangsstoff Progesteron-3-O-(carboxymethyl)oxim (Progesteron-3-CMO) (**104**) nach einer Literaturvorschrift synthetisiert.⁸¹ Progesteron wurde durch Behandlung mit Pyrrolidin in das Enamin **103** überführt und dann weiter mit O-(Carboxymethyl)-hydroxylamin zu dem Oxim **104** umgesetzt. Die Reaktion von **104** mit Trimethylsilyldiazomethan ergab Progesteron-3-MCMO **105**, das dann weiter mit **Bhc-ED** zu dem Ketal **106** umgesetzt wurde (Abb. 3-24). Die Bildung des cyclischen Ketals **106** erfolgte nach 35 h Reaktionszeit mit einer Ausbeute von 3 %. Die Hydrolyse des Methylesters **106** mit LiOH führte mit 36 % Ausbeute zur Zielverbindung **107**. Auf eine Trennung der durch das Vorliegen der C=N-Doppelbindung bedingten Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren sowie die Diastereomerentrennung wurde verzichtet. Trotz der geringen Ausbeute bei der Ketalbildung ist die Darstellung von **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO (**107**) aufgrund deutlich weniger aufwendiger Reinigungsschritte effizienter als die Darstellung von C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**).

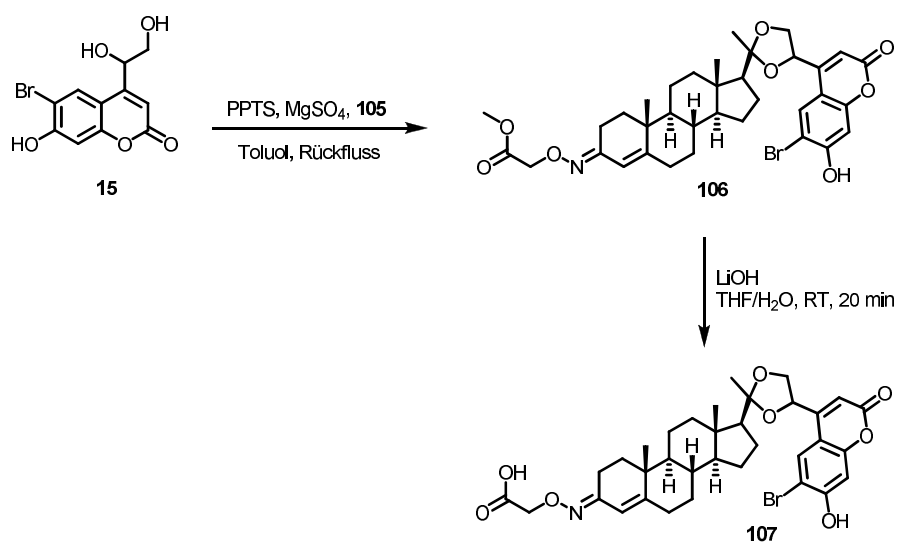


Abbildung 3-24: Synthese von **Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO (107)**

3.2 Synthese von Progesteron-Tripeptidderivaten mit Crosslinking-Eigenschaften

Crosslinker sind bi- oder multifunktionelle chemische Agenzien, die mit bestimmten funktionellen Gruppen von Makromolekülen reagieren können und dadurch eine kovalente Verknüpfung zwischen räumlich nebeneinander liegenden Teilen dieser Moleküle herstellen.⁸² Da eine räumliche Nachbarschaft die Voraussetzung für die Quervernetzbarkeit ist, lassen sich Crosslinker zur Aufklärung der Struktur von biologischen Makromolekülen einsetzen.

Hier bestand die Aufgabe darin, zur Identifizierung der Progesteron-Rezeptorbindestelle in menschlichen Spermien Progesteronderivate zu entwickeln, die eine photoaktivierbare Crosslinking-Gruppe enthalten. Gleichzeitig sollten die Progesteron-Crosslinking-Derivate gegebenenfalls eine fluoreszierende Gruppierung und/oder einen Biotinrest enthalten.

Zur Realisierung der Aufgabe wurden in Abstimmung mit der Gruppe um U. B. KAUPP funktionelle Progesteron-Tripeptidderivate entwickelt, die auf dem Grundgerüst Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-NH₂ basierten. In das Peptidgerüst wurde Progesteron-3-CMO über die freie Carboxygruppe eingeführt. Der nicht-genomische Rezeptor wurde an der Plasmamembran vermutet.⁸³ Durch die hydrophilen und unter physiologischen Bedingungen geladenen Aminosäuren des Progesteron-Tripeptidderivats konnte davon ausgegangen werden, dass ein passiver Transport bzw. eine Diffusion über die Plasmamembran in das Innere der Spermien verhindert wurde. Somit sollte sichergestellt werden, dass das Progesteron-Tripeptidderivat nur mit Proteinen in der Plasmamembran wechselwirkt. Außerdem wurden diese hydrophilen und unter physiologischen Bedingungen geladenen Aminosäuren ausgewählt, weil sie einerseits die Wasserlöslichkeit der hergestellten Progesteron-Tripeptidderivate erhöhen sollten und andererseits relativ leicht Modifizierungen an den Aminofunktionen der Lysin-Seitenketten ermöglichen.


Zunächst wurde mit 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) der NBD-Fluorophor in die Seitenketten der jeweiligen Lysine des Tripeptids eingeführt. Mit den NBD-Derivaten sollte die Progesteronbindestelle fluoreszenzoptisch lokalisiert werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute der NBD-Gruppe ist abhängig von der Polarität des umgebenden Mediums und deswegen besonders für diesen Ansatz geeignet. Sie ist in wässriger Umgebung gering, in hydrophober Umgebung – wie es für die Bindetasche von Progesteron zu erwarten wäre – weist NBD eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auf. Die Inkubation menschlicher Spermien mit dem NBD-Progesteron-Konjugat führte jedoch zur unspezifischen Einlagerung der NBD-Derivate in die Plasmamembran der Spermien. Die fluoreszenzoptische Lokalisierung der Progesteronbindestelle in Spermien war unter den Versuchsbedingungen somit nicht möglich. Diese Ergebnisse mit den NBD-Derivaten waren aber nützlich für die weitere Entwicklung der Progesteron-Tripeptidderivate. Es wurde eine höhere biologische Aktivität derjenigen Progesteron-Tripeptidderivate festgestellt, die die NBD-Gruppe in der Seitenkette des C-terminalen Lysins trugen.

Als nächstes wurden auf Basis der Ergebnisse für die NBD-Derivate Progesteron-Tripeptidderivate synthetisiert, die die photoaktivierbare 4-Azidosalicylsäure-Crosslinking-Gruppe enthielten. Die Crosslinking-Gruppe wurde unter Verwendung von *N*-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure (NHS-ASA) in die Seitenkette des C-terminalen Lysins eingeführt. Zur Aufreinigung und Detektion der

quervernetzten Proteine über Western Blot wurde zusätzlich 6-(Biotinylamino)hexansäure in die Seitenkette des N-terminalen Lysins eingeführt. Die Ergebnisse der Anwendung der Progesteron-Crosslinker sind in Abschn. 3.5 beschrieben.

Nachfolgend wird die Darstellung der einzelnen synthetisierten Verbindungen einschließlich der Zwischenprodukte kurz beschrieben. Hierbei sollte nicht die Optimierung der Syntheseschritte das Hauptziel darstellen, sondern die Verfügbarkeit ausreichender Mengen der Tripeptide für Untersuchungen der Progesteron-Rezeptor-Wechselwirkungen. Alle Progesteron-3-CMO-Konjugate zeigten aufgrund des Vorliegens der C=N-Doppelbindung *E/Z*-Isomerie und die Verbindungen wurden als *E/Z*-Gemische mit einem Isomerenverhältnis von etwa 1:1 erhalten.

Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂

Ausgehend von Fmoc-Lys(Boc)-OH wurde mittels SPPS zunächst das Harz-gebundene Tripeptid Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-NH- hergestellt (Abb. 3-25). Anschließend erfolgte am Harz die Kupplung von Progesteron-3-CMO unter gleichen Kupplungsbedingungen an das endständige Lysin. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und der Schutzgruppen dauerte 3 h, da die Pbf-Gruppe am Arginin sonst nicht effizient entfernt werden konnte. Es gelang jedoch nicht vollständig die Pbf-Gruppe am Arginin abzuspalten. Die sich anschließende Reinigung des Peptids mittels präp. HPLC führte zu einer 2.5%igen Ausbeute des Endproduktes **108**. Für die Anwendung (s. Abschn. 3.5) war diese völlig ausreichend. Eine Optimierung der Ausbeute war für alle synthetisierten Peptid-Derivate nicht notwendig.

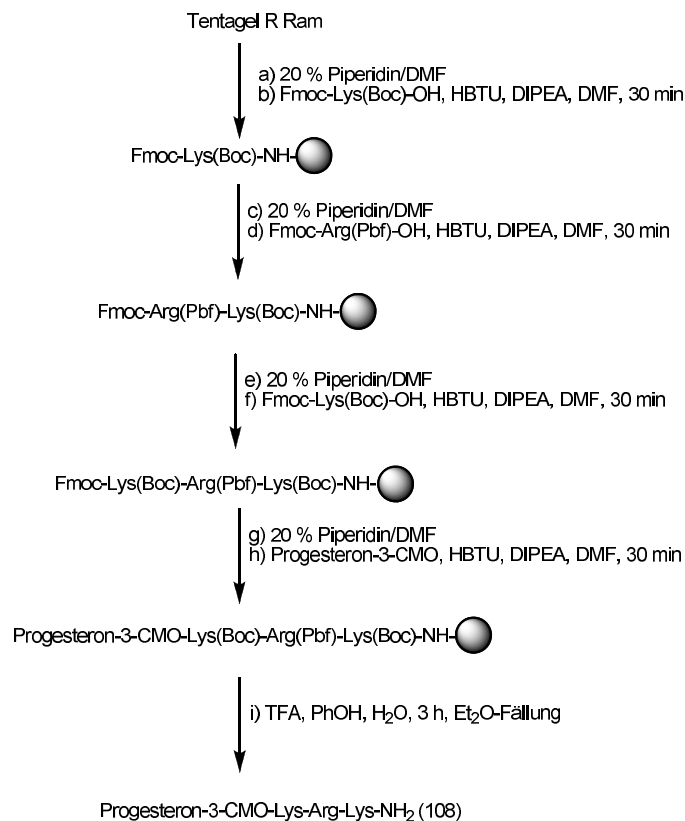


Abbildung 3-25: Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**)

Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(NBD)-Arg-Lys-NH₂ und Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys(NBD)-NH₂

Ähnlich zur obigen Peptidsynthese erfolgte als erstes die Herstellung von Progesteron-3-CMO-Lys(Dde)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-NH₂. Die Dde-Schutzgruppe am terminalen Lysin wurde unter den in Abb. 3-26 gezeigten Bedingungen (3 x 3 min 2 % Hydrazin/DMF) abgespalten, und der NBD-Rest durch Umsetzung mit NBD-Cl an die freie Seitenkette eingeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz lieferte **109** in 3.0%iger Ausbeute.

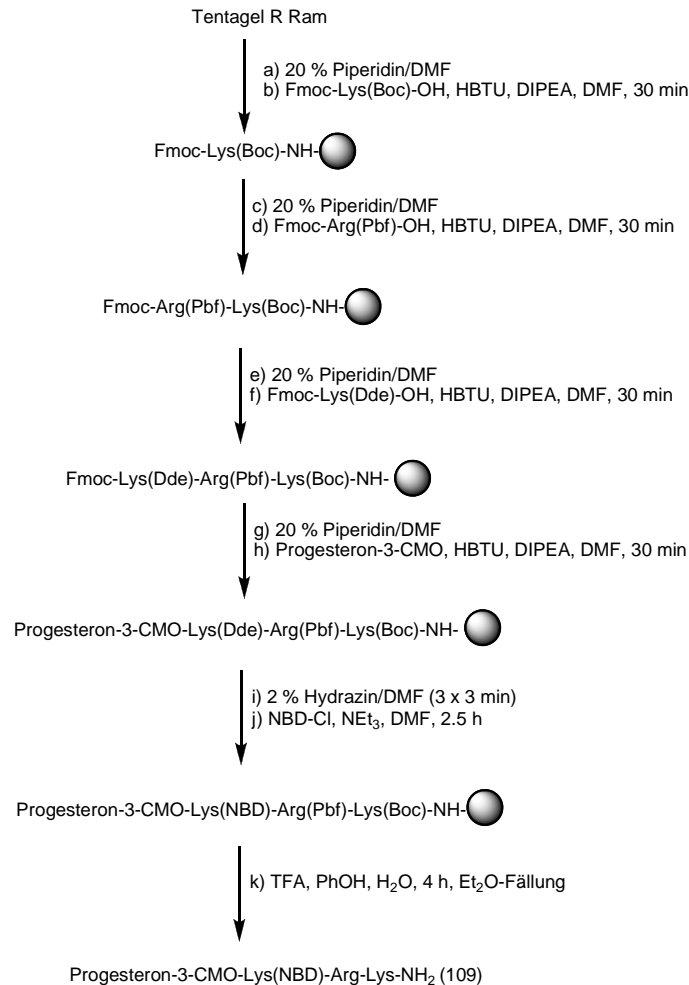


Abbildung 3-26: Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(NBD)-Arg-Lys-NH₂ (**109**)

Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys(NBD)-NH₂ (**110**) wurde analog ausgehend von Progesteron-3-CMO-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Lys(Dde)-NH-Resin hergestellt. Es wurde nach Abspaltung vom Harz mit einer Ausbeute von 3.5 % erhalten.

Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys-NH₂

Die Herstellung des potentiellen Crosslinkers Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys-NH₂ (**111**) erfolgte wie in Abb. 3-27 gezeigt. Zunächst wurde wie bereits in Abb. 3-26 aufgeführt Progesteron-

3-CMO-Lys(Dde)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-NH₂ synthetisiert. Die Dde-Schutzgruppe wurde mit Hydrazin/DMF abgespalten und die Crosslinking-Gruppierung durch Reaktion mit *N*-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure (NHS-ASA) eingeführt.

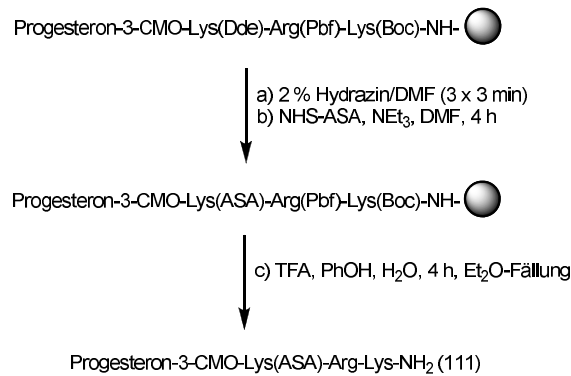


Abbildung 3-27: Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys-NH₂ (111)

Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys-6-(Biotinylamino)hexansäure)-NH₂

An Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys-NH₂ (111) wurde in die Seitenkette neben der Crosslinking-Gruppierung eine Biotinylgruppe eingeführt. Als Agenz hierfür wurde 6-(Biotinylamino)-hexansäuresuccinimidylester ausgewählt. Zunächst wurde am Harz Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-NH₂ hergestellt (vgl. Abb. 3-27) und dieses dann nach Spaltung vom Harz in Lösung mit 6-(Biotinylamino)hexansäuresuccinimidylester umgesetzt, wobei der (Biotinylamino)hexanoyl-Rest mit der freien Seitenkette des endständigen Lysins verknüpft wurde (Abb. 3-28). **112** konnte mit 4.0%iger Ausbeute erhalten werden.

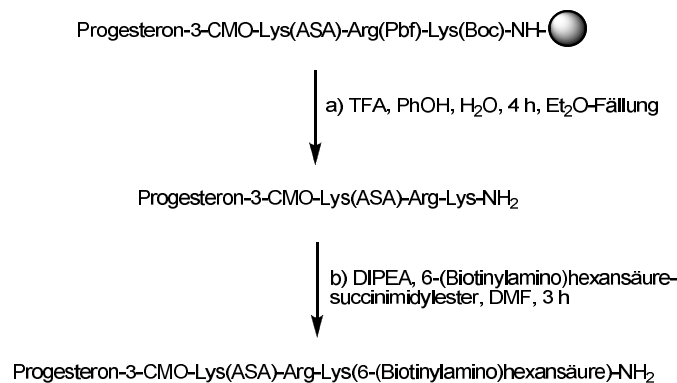


Abbildung 3-28: Synthese von Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys(6-(Biotinylamino)hexansäure)-NH₂ (112)

3.3 Eigenschaften der Phototrigger

3.3.1 Photolyse und Mechanismus der Photospaltung

Der Mechanismus der Photospaltung von cumariny-substituierten 1,3-Dioxolanen wurde bislang nicht näher untersucht. Nachdem mehr als ein Jahrzehnt lang Unklarheit über den Photolysemechanismus von Cumarinylmethylestern (**CM**-Estern) herrschte – FURUTA *et al.*⁸⁴ vermuteten 1995 bei der Photospaltung von (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl-*caged* cAMP (**MCM-caged** cAMP) einen Reaktionsmechanismus über ein Tripletttridikalpaar – untersuchten SCHADE *et al.*^{27a} den Photolysemechanismus einiger **MCM**-Ester im Detail. Um herauszufinden, an welcher Stelle die Esterbindung bei der Photolyse gespalten wird (zwischen CH₂-O oder O-X), bestrahlten sie **MCM**-diethylphosphat in einer Mischung aus Acetonitril/¹⁸O-markiertem Wasser bei einer Wellenlänge von 334 nm und untersuchten die beiden voneinander getrennten Photoprodukte massenspektroskopisch auf die Anwesenheit von Sauerstoff-18. Das ¹⁸O wurde nur im 4-(Hydroxymethyl)-7-methoxycumarin gefunden. Auf Grund dieses Ergebnisses (Spaltung der CH₂-O-Bindung) schlugen sie einen Photo-S_N1-Mechanismus für die Photolyse von **MCM**-Estern und in weiterführenden Arbeiten⁸⁵ auch für andere substituierte (Cumarin-4-yl)methyl-Ester vor (vgl. Abb. 1-2).

In Analogie zu den **CM**-Estern formulierte DORE den wahrscheinlichen Photolysemechanismus für cumariny-substituierte 1,3-Dioxolane in wässrigen Lösungen wie folgt²⁸ (Abb. 3-29):

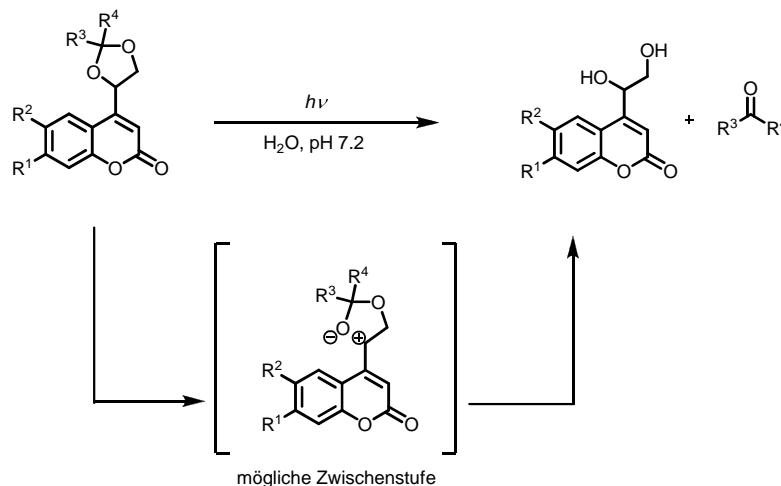


Abbildung 3-29: Vorgeschlagener Photolysemechanismus für cumariny-substituierte 1,3-Dioxolane

Es wurde angenommen, dass nach elektronischer Anregung des Cumarinchromophors aus dem S₁(0)-Zustand direkt durch heterolytische Spaltung der CH₂-O-Bindung unter Öffnung des Dioxolan-Rings ein Zwitterion gebildet wird. Das Zwitterion wird einerseits durch polare Lösungsmittelmoleküle und andererseits durch Elektronendonatorsubstituenten am (Cumarin-4-yl)methyl-Kation und/oder gute Abgangsgruppenqualität des Anions stabilisiert. Nach dem Ausbruch des Ionenpaars aus dem Lösungsmittel-Käfig, werden das Carbokation und das Anion in wässrigen Medien durch Reaktion mit H₂O abgefangen, so dass letztendlich das entsprechende Ethandiol und die Carbonylverbindung daraus resultieren. Als Konkurrenzprozess zur Ionenpaar-Trennung läuft noch die Rekombination des

Ionenpaares zum Edukt im Grundzustand ab. Des Weiteren verliert der Anregungszustand auch über Fluoreszenz- und strahlungslose Desaktivierungsprozesse.

In dieser Arbeit wurde für die untersuchten cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane der vermutete Photolysemechanismus bestätigt. Bei Bestrahlung mit Licht bei 334 nm bzw. 365 nm wurde bei allen hergestellten *caged* Verbindungen neben dem Abbau des Phototriggers die Bildung des entsprechenden 4-(1,2-Dihydroxyethyl)cumarins und die Freisetzung der jeweiligen Carbonylverbindungen durch analytische HPLC detektiert. Durch einige weitere Experimente wurde demonstriert, dass im wässrigen Medium zunächst eine Photoheterolyse mit anschließender Solvolyse stattfinden muss. Beispielsweise wurde **Bhc-ED-caged** Bourgeonal in verschiedenen zusammengesetzten Volumenanteilen von HEPES-Puffer und Acetonitril mit UV-Licht bestrahlt. Bei der Bestrahlung zeigte sich, dass die Verbindung in reinen organischen Lösungsmitteln nicht photolysierbar war. Es war kein Abbau der *caged*-Verbindung bzw. keine Bildung von Bourgeonal zu beobachten. Ein mindestens 50%iger Anteil an wässrigem Medium musste vorliegen, damit eine nachweisbare Photolyse stattfinden konnte. Auch bei einigen anderen *caged* Carbonylverbindungen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Somit ist davon auszugehen, dass der von SCHADE *et al.* entwickelte Mechanismus zur Photospaltung von **CM-Estern**^{27a} (vgl. Abb. 1.2) wie bereits von DORE vermutet auch auf die Photospaltung der *caged* Carbonylverbindungen übertragbar ist.

Der Mechanismus der Photo-S_N1-Reaktion wird ferner durch die Abhängigkeit der photochemischen Quantenausbeuten (φ_{chem}) und Fluoreszenzquantenausbeuten (φ_f) von der Lösungsmittelpolarität (mit zunehmender Polarität steigt z. B. φ_{chem}) sowie durch den Einfluss der Nucleophilie der Abgangsgruppe auf φ_{chem} und φ_f untermauert. Ferner bestätigen die durchgeführten kinetischen Untersuchungen zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Bildung des Zwitterions (vgl. Abschnitt 3.3.7) den Photo-S_N1-Mechanismus. Offen bleibt im Detail, wie die weitere Spaltung aus der gebildeten zwitterionischen Zwischenstufe abläuft.

3.3.2 Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten

Löslichkeiten: Die Löslichkeit einer *caged* Verbindung in einem physiologischen Medium wird allgemein in Form der maximal erreichbaren Konzentration – auch Sättigungskonzentration ($c_{\text{sätt}}$) – angegeben. Sie entscheidet letztendlich darüber, welche Höchstkonzentration an dem Biomolekül photolytisch freigesetzt werden kann. Die Löslichkeit einer *caged* Verbindung hängt u. a. davon ab, welche und wie viele funktionelle Gruppen das Molekül trägt. Ist das Aktivatormolekül selbst schlecht in Wasser löslich, kann die Löslichkeit des Phototriggers durch Verwendung einer hydrophilen *caging*-Gruppe erhöht werden.

Die Löslichkeiten wurden nur für eine Auswahl von relativ hydrophoben *caged* Bourgeonalen und Progesteronen in Acetonitril/HEPES-Pufferlösung bei pH 7.2 bestimmt. Die Sättigungskonzentrationen dieser Substanzen sowie einiger Ethandiole (s. Tab. 1) wurden durch analytische HPLC ermittelt, indem das System zunächst jeweils mit zwei verdünnten Lösungen (Konzentrationsbereich zwischen 12.5 und 50 μM) kalibriert und anschließend die in dem entsprechenden Kalibrierbereich verdünnte gesättigte Lösung gemessen wurde. Jede Lösung wurde dreimal injiziert, aus den drei Messwerten ein Mittelwert gebildet und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Sättigungs-

konzentration berechnet. Tabelle 1 zeigt, dass insbesondere die **Bhc-ED-caged** Biomoleküle (**83**, **92**, **93**) stark eingeschränkte Löslichkeiten aufweisen und bereits das **Bhc-ED** (**15**) den niedrigsten c_s -Wert von allen aufgeführten Diolen besitzt.

Tabelle 1: Sättigungskonzentrationen (c_s) von *caged* Carbonylverbindungen und (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiolen in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95), pH 7.2

Verbindung		c_s [μ M]	Verbindung		c_s [μ M]
82	BCMAC-ED-caged Bourgeonal	>> 100	59	BCMAC-ED	> 800
94	C₃-BCMAC-ED-caged Progesteron	>> 100	15	Bhc-ED	> 100
83	Bhc-ED-caged Bourgeonal	10	60	BHCC-ED	> 800
92	C₃-Bhc-ED-caged Progesteron	7.6	61	BCC-ED	> 800
93	C₂₀-Bhc-ED-caged Progesteron	7.7	62	BBHC-ED	> 800
85	BHCC-ED-caged Bourgeonal	> 100			
87	BCC-ED-caged Bourgeonal	> 100			
89	BBHC-ED-caged Bourgeonal	>> 100			
99	C₂₀-BBHC-ED-caged Progesteron	>> 100			

BHCC-ED-, **BCC-ED**- und **BBHC-ED-caged** Bourgeonal (**85**, **87**, **89**) sowie **C₂₀-BBHC-ED-caged** Progesteron (**99**) waren ausgesprochen gut wasserlöslich und auf eine exakte Bestimmung der c_s -Werte wurde verzichtet.

Hydrolysestabilitäten: Die Solvolyse einer *caged* Verbindung in physiologischen Medien ist, wenn hierbei das Aktivatormolekül freigesetzt wird, eine unerwünschte thermische Dunkelreaktion. Das eigentliche Ziel ist die kontrollierte Photofreisetzung. Bei den hier diskutierten *caged* Carbonylverbindungen – es handelt sich in allen Fällen um cyclische Acetale bzw. Ketale – führt eine mögliche Hydrolyse (Abb. 3-30) zu dem gleichen Ergebnis wie die Photolyse (vgl. Abschn. 3.3.1).

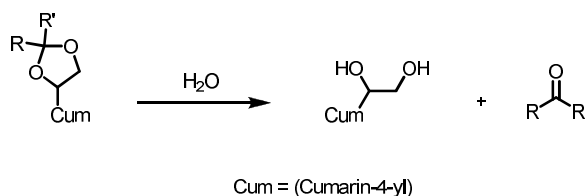


Abbildung 3-30: Hydrolyse der *caged* Carbonylverbindungen

Es ist daher unabdingbar, die Hydrolysestabilität der Phototrigger unter anwendungsorientierten Bedingungen zu testen, denn die hydrolytische Stabilität entscheidet u. a. darüber, ob eine *caged* Verbindung als solche überhaupt geeignet ist.

Die Solvolyse der gut wasserlöslichen *caged* Carbonylverbindungen wurde in wässriger HEPES-Pufferlösung (pH 7.2) und die der weniger gut löslichen Verbindungen in Acetonitril/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80, 60/40, pH 7.2) untersucht. Die Lösungen wurden 24 h bei RT im Dunkeln

aufbewahrt, wobei vorher und nachher deren Gehalt und Zusammensetzung durch HPLC analysiert wurde.

Bei allen *caged* Carbonylverbindungen wurden nach 24 h keine Abnahme der Substanzpeaks sowie keine Hydrolyseprodukte beobachtet und die Halbwertszeit betrug damit mehr als 1000 h in den verwendeten Pufferlösungen. Erfreulicherweise waren damit alle hier hergestellten Acetale bzw. Ketale ausreichend stabil und erfüllten somit diese wichtige Anforderung an *caged* Verbindungen.

3.3.3 Absorptionsspektroskopische Charakterisierung und photochemische Quantenausbeuten

Wie bereits in der Einleitung (Abschn. 1.2) erwähnt, sollen *caging*-Gruppen möglichst langwellig und effizient anregbar sein. Es werden daher Absorptionen im Bereich von 350–420 nm mit hohen Extinktionskoeffizienten und hohe photochemische Quantenausbeuten angestrebt.

UV/Vis-Absorptionseigenschaften: Die Einführung von Substituenten in chromophore Systeme führt in der Regel zur Verschiebung der Absorptionsmaxima und beeinflusst auch die Lage der Fluoreszenzbanden. Bei Cumarinchromophoren bewirken Elektronendonatoren in 6- und/oder 7-Position und Elektronenakzeptoren in 3-Position eine signifikante bathochrome Verschiebung des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs,⁸⁶ da der elektronische Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ mit einer intramolekularen Elektronenübertragung (*intramolecular charge transfer*, ICT) vom elektronenschiebenden Substituenten auf die elektronenziehende Carbonylgruppe des Lactons verknüpft ist.^{27a}

Die Absorptionsspektren der hier diskutierten als cyclische Acetale/Ketale-geschützten Carbonyl-Verbindungen weisen in neutralen Pufferlösungen zwei sehr intensive Absorptionsbanden im UV/Vis-Bereich auf, eine langwellige im Bereich von 310 nm bis 420 nm, die dem Cumarin-Chromophor zuzuordnen ist, und eine kurzwellige zwischen 210 nm und 250 nm, die überwiegend durch den Bourgeonal-, Progesteron- und Progesteron-3-CMO-Rest verursacht wird.

Die langwelligen Absorptionsbanden der bei der Photolyse entstehenden entsprechenden Ethandiole und die der geschützten Bourgeonal- bzw. Progesteron-Derivate sind sehr ähnlich (vgl. Abbildungen 3-31, 3-32, 3-34 und 3-35) und werden hier zusammen diskutiert.

Abb. 3-31 zeigt die Absorptionsspektren der 4-(Dihydroxyethyl)cumarine **59**, **15**, **60**, **61** und **62** bei pH 7.2. Die Abb. zeigt, dass **59**, **15** und **62** langwellig mit Maxima bei 380–390 nm und hohen Extinktionskoeffizienten absorbieren. Die Absorptionsmaxima von **60** und **61** sind deutlich hypsochrom verschoben.

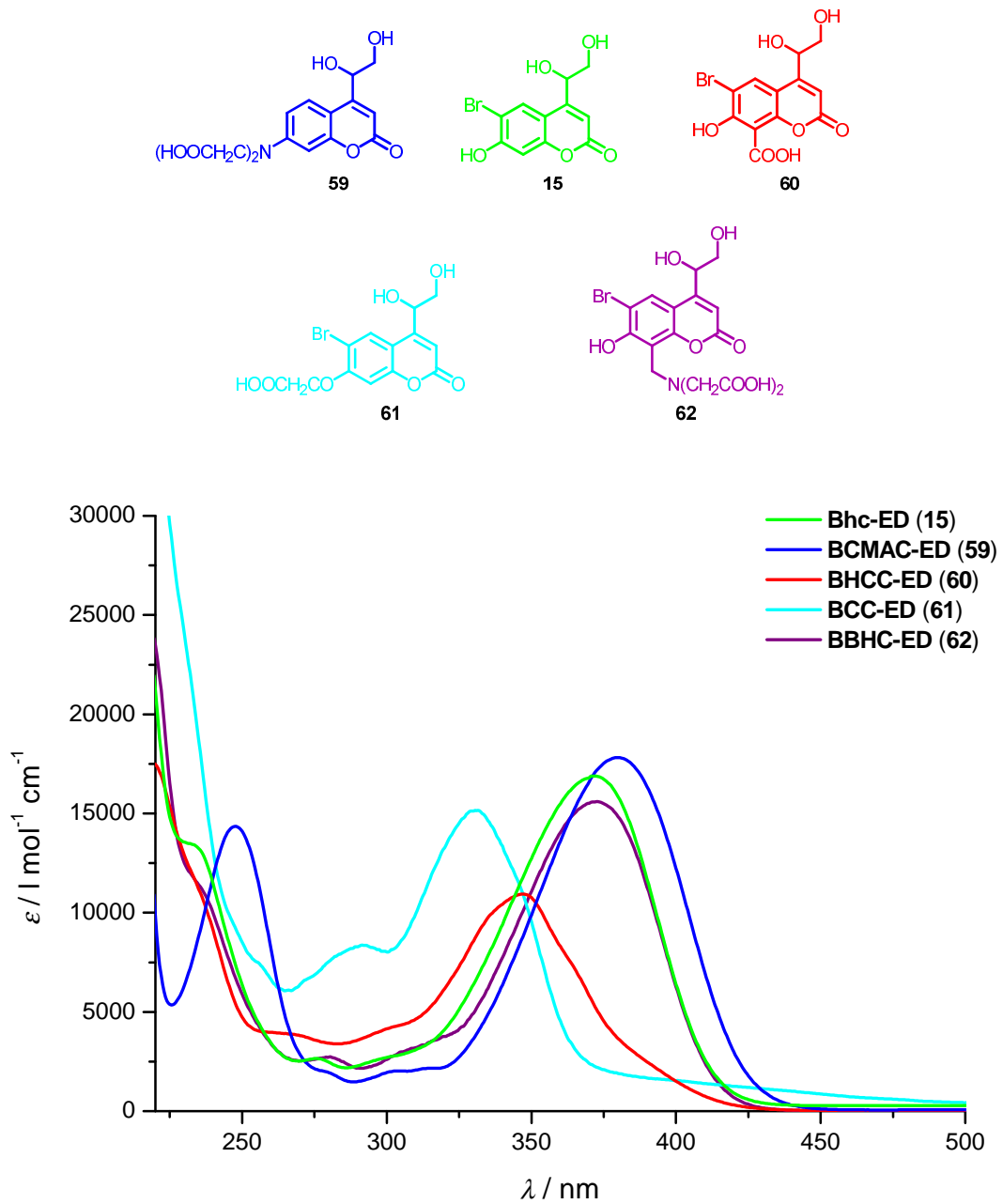


Abbildung 3-31: Absorptionsspektren der Ethandiol-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95), pH 7.2

Die vom Coumarin-Chromophor herrührende langwelligste Absorptionsbande ist ein ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang.²³ Der ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang liegt auf Grund einer Niveauinversion (verglichen mit dem unsubstituierten 4-Methylcoumarin) energetisch höher als der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang. Die ($n \rightarrow \pi^*$)-Absorptionsbande ist dementsprechend kurzwelliger als die ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Bande und wird in den meisten Fällen wegen ihrer geringeren Übergangswahrscheinlichkeit (kleiner ϵ -Wert) und der Überlagerung mit der breiten und intensiven ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Absorptionsbande verdeckt.

Im Falle der (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiol-*caged* Carbonylverbindungen (bichromophore Systeme) stellen die UV/Vis-Absorptionsspektren der Phototrigger näherungsweise eine Überlagerung (Superposition) der Spektren der beiden Einzelchromophore (Carbonylverbindung und Cumarinyl-1,2-ethandiol dar. Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, denn Cumarin und der Chromophor der jeweiligen Carbonylverbindung sind elektronisch entkoppelt. Deutlich wird dies in Abb. 3-32. Die Abb. 3-32 zeigt die Absorptionsspektren der synthetisierten *caged* Bourgeonale.

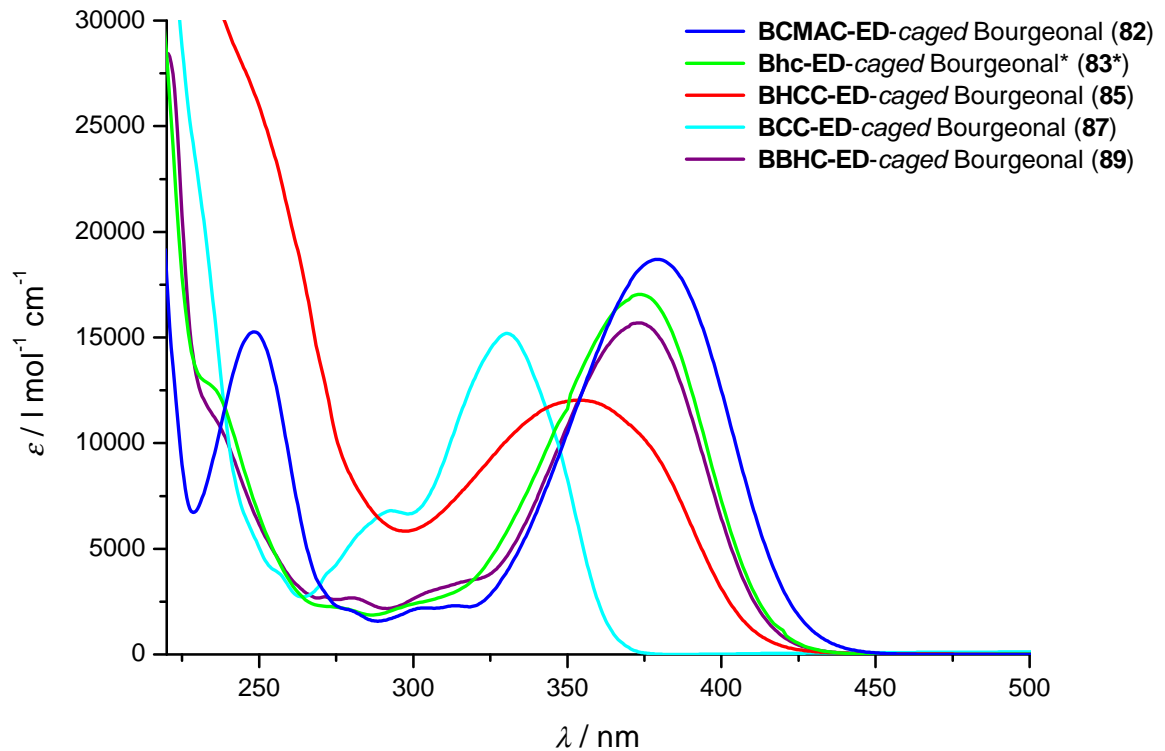


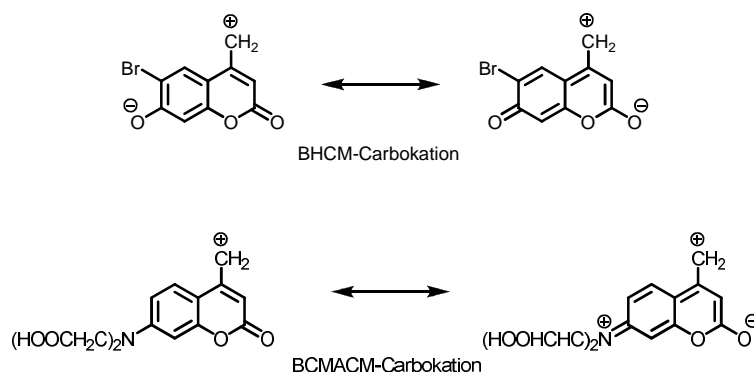
Abbildung 3-32: Absorptionsspektren der als Acetal geschützten Bourgeonal-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80*), pH 7.2

Die langwelligsten Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der *caged* Bourgeonale sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) der als Acetal geschützten Bourgeonal-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80*), pH 7.2

Verbindung	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]
82 BCMAC-ED-caged Bourgeonal	379	18700
83 Bhc-ED-caged Bourgeonal*	374	16200
85 BHCC-ED-caged Bourgeonal	354	12000
87 BCC-ED-caged Bourgeonal	330	15200
89 BBHC-ED-caged Bourgeonal	373	15700

Die langwelligsten Absorptionsmaxima der Verbindungen **82**, **83** und **89** sind wie bei den entsprechenden Ethandiolen deutlich bathochrom und hyperchrom gegenüber denen der Verbindungen **85** und **87** verschoben. Wie bereits diskutiert, bewirkt die Einführung von Elektronendonatoren in die 7-Position des Cumarin-Restes durch eine intramolekulare Ladungsübertragung im angeregten Zustand eine bathochrome Verschiebung und eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten der langwelligigen Absorptionsbande.^{27a} Bei diesem auch als push-pull-Effekt bezeichneten Phänomen fungiert die Carbonylgruppe des Lactons als Elektronenakzeptor (Abb. 3-33).

Abbildung 3-33: Intramolekulare Ladungsübertragung (ICT) am Beispiel des **BCMACM**- und **BhCM**-Chromophors

Die Verbindung **59** ist aufgrund der Elektronendonator-Stärke der Aminogruppe und die Verbindungen **15** sowie **62** sind aufgrund der phenolischen Hydroxylgruppe, die bei pH 7 in der deprotonierten Form vorliegt, zur Ausbildung des ICT-Zustands befähigt, was die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften erklärt.

Verbindung **61** ist mangels phenolischer Hydroxylgruppe nicht im gleichen Maße zur Ausbildung des ICT-Zustands befähigt. Liegt die Hydroxylfunktion, wie bei **61**, in Form einer Methoxygruppe oder protoniert vor, ist sie ein relativ schlechter Elektronendonator. Die langwelligsten Absorptionsmaxima sind zu kleineren Wellenlängen verschoben und die Extinktionskoeffizienten sind kleiner. Eine zusätzliche Substitution in der 8-Position des **Bhc**-Chromophors ohne eine entkoppelnde CH₂-Einheit, wie bei

Verbindung **60**, führt offenbar zu Wechselwirkungen mit dem π -System, welches zusätzlich elektronische Effekte bewirkt. Die Folge ist eine hypsochrome Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums.

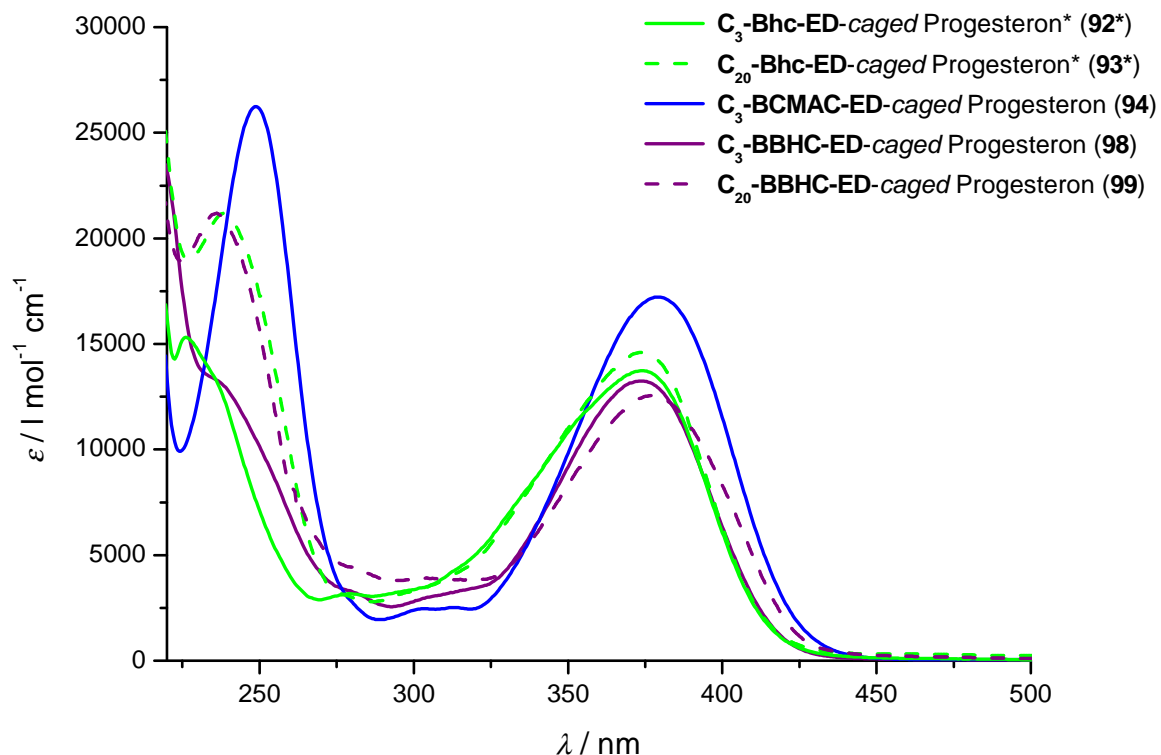


Abbildung 3-34: Absorptionsspektren der als Ketal geschützten Progesteron-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 60/40*), pH 7.2

Abb. 3-34 zeigt die Absorptionsspektren der verschiedenen von Progesteron abgeleiteten cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane. Unterschiede in den UV-Spektren sind im kurzwelligen Absorptionsbereich für die an den beiden unterschiedlichen C=O-Funktionen des Progesterons geschützten **Bhc-ED**-substituierten 1,3-Dioxolane zu erkennen. Dies ist für die Unterscheidung zwischen den in Position 3 oder 20 des Progesteron-Gerüsts strukturvariieren Verbindungen ein wichtiges Merkmal. Das in Position 20 des Progesterons geschützte **Bhc-ED**-Derivat **93** zeigt ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 239 nm mit erhöhter Intensität im Gegensatz zu dem in Position 3 geschützten Derivat **92**, welches bei 227 nm ein kurzwelliges Absorptionsmaximum bei deutlich verminderter Extinktion zeigt. Analoge Verschiebungen sind auch beim C₃- und C₂₀-**BBHC-ED**-geschützten Progesteron zu sehen. In Tabelle 3 sind die wichtigsten UV-spektroskopischen Daten aller synthetisierten Progesteron-Derivate zusammengefasst.

Tabelle 3: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) der als Ketal geschützten Progesteron-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 60/40*), pH 7.2

Verbindung		λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]
94	C ₃ - BCMAC-ED-caged Progesteron	379	17200
93	C ₂₀ - Bhc-ED-caged Progesteron*	374	14600
92	C ₃ - Bhc-ED-caged Progesteron*	374	13800
99	C ₂₀ - BBHC-ED-caged Progesteron	377	13000
98	C ₃ - BBHC-ED-caged Progesteron	374	13200
107	Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO	341	11000

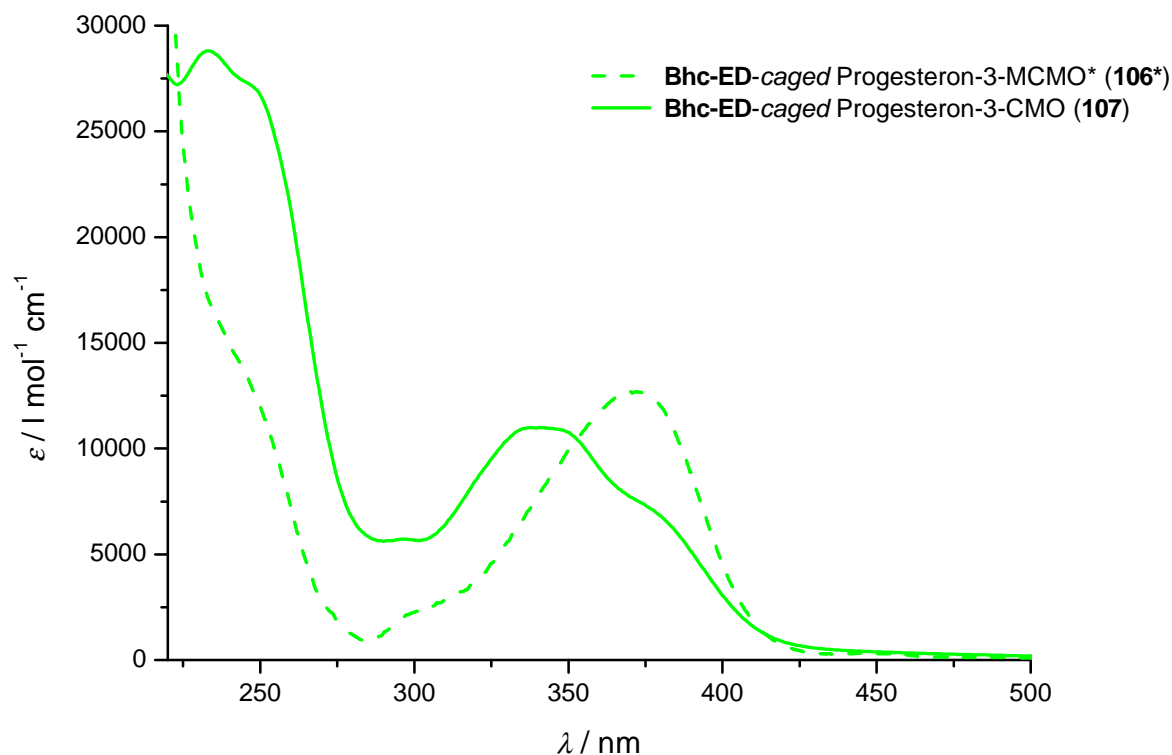


Abbildung 3-35: Absorptionsspektren von **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO-Derivaten in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 50/50*), pH 7.2

Die Absorptionsspektren von **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO und seiner als Methylester geschützten Vorstufe zeigen einen unterschiedlichen Verlauf im langwelligeren Bereich (Abb. 3-35). Bei dem **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO ist im Gegensatz zum Methylester **106** eine hypsochrome Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums zu beobachten. Dieser Effekt kommt womöglich dadurch zustande, dass bei dem Anion der Säure **107** intramolekulare Wechselwirkungen auftreten.

Photochemische Quantenausbeuten: Die Quantenausbeute (ϕ_{chem}) ist eine Effektivitätsgröße und bringt zum Ausdruck, mit welchem Wirkungsgrad die Photonen in dem betreffenden Prozess genutzt werden. Sie ist eine experimentelle Größe, die das Verhältnis der Anzahl umgesetzter Moleküle (verschwindender Moleküle n_A bzw. entstehender Moleküle n_B) zur Anzahl der absorbierten Lichtquanten definierter Energie n_Q wiedergibt.

$$\phi_A = \phi_B = -\frac{n_A}{n_Q} = \frac{n_B}{n_Q} \quad \text{Gleichung 1}$$

Aus kinetischen Experimenten erhält man die momentane (auch differentielle) Quantenausbeute (φ) als Verhältnis der Geschwindigkeiten für den Stoffumsatz und für die Lichtabsorption.

$$\varphi_A = \frac{dn_A/dt}{dn_Q/dt} = \frac{dn_A/dt}{I_{\text{abs}}} = \frac{dc_A/dt}{I_{\text{abs}}/V_R} \quad \text{Gleichung 2}$$

t = Zeit

I_{abs} = Quantenstrom

c_A = Konzentration des Stoffs A

V_R = Reaktionsvolumen

φ und ϕ stimmen überein, wenn φ auf die Zeit $t = 0$ extrapoliert wird.⁸⁷

Die differentiellen photochemischen Quantenausbeuten (φ_{chem} -Werte) der vom Cumarin abgeleiteten *caged* Verbindungen wurden nach der auf Gleichung 2 basierenden Relativmethode bestimmt, bei der man den Initialanstieg (dc/dt) der Probe mit dem eines Standards vergleicht, dessen φ_{chem} -bekannt ist.

$$\varphi_{\text{chem}}^{\text{Probe}} = \frac{(dc/dt)^{\text{Probe}}}{(dc/dt)^{\text{Standard}}} \cdot \varphi_{\text{chem}}^{\text{Standard}} \cdot \frac{(I_{\text{abs}} V_R)^{\text{Standard}}}{(I_{\text{abs}} V_R)^{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 3}$$

Werden Probe und Standard unter identischen Bedingungen (λ_{exc} und $I_0 = \text{konstant}$) monochromatisch bestrahlt und gleiche Reaktionsvolumina ($V_{R, \text{Probe}} = V_{R, \text{Standard}}$) eingesetzt, vereinfacht sich Gleichung 3 auf folgende (mit $I_{\text{abs}} = \alpha \cdot I_0$ und $\alpha = 1 - 10^{-E}$):

$$\varphi_{\text{chem}}^{\text{Probe}} = \frac{(dc/dt)^{\text{Probe}}}{(dc/dt)^{\text{Standard}}} \cdot \varphi_{\text{chem}}^{\text{Standard}} \cdot \frac{(1 - 10^{-E})^{\text{Standard}}}{(1 - 10^{-E})^{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 4}$$

E = Extinktion

Die photochemischen Quantenausbeuten φ_{chem} aller Verbindungen wurden nach der auf Gleichung 4 basierenden Relativmethode bestimmt (experimentelle Details in Abschn. 5.3). Zur Vermeidung

interner Filtereffekte durch die Photoprodukte, die häufig ein ähnliches Absorptionsspektrum wie die Ausgangsverbindung haben, wurden bei der Ermittlung der φ_{chem} -Werte maximal 10 % des Edukts photolytisch umgesetzt.

Von einigen Autoren wurde die Photoeffizienz einer Verbindung als Produkt von Extinktion (bei der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts) und photochemischer Quantenausbeute definiert und ist damit als Maß für die Empfindlichkeit gegenüber der Photolyse bei einer bestimmten Wellenlänge anzusehen. Da der Begriff Effizienz in der Physik bereits festgelegt ist, wären hier Photosensitivität bzw. Photoempfindlichkeit treffender. Die drei Bezeichnungen werden hier synonym verwendet.

Die hier diskutierten cumariny-substituierten cyclischen Acetale/Ketale sind photolabile Substanzen, bei denen C-O-Einfachbindungen nach elektronischer Anregung des Cumarin-Chromophors gespalten werden. In wässrigen Systemen wird neben der Carbonylverbindung in der Regel ein 4-(1,2-Dihydroxyethyl)cumarin-Derivat als einziges Cumarin-haltiges Photolyseprodukt gebildet (vgl. Abschn. 3.3.1).

Für die Ermittlung von φ_{chem} -Werten der **BCC-ED-caged** Verbindungen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 334 nm wurde (1*E*,3*E*)-1,4-Diphenylbuta-1,3-dien ($\varphi_{\text{chem}} = 0.11$ in *n*-Hexan) und für die der **BCMAC-ED-**, **Bhc-ED-** und **BBHC-ED-caged** Verbindungen bei 365 nm wurde [6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyl]-diethylphosphat ($\varphi_{\text{chem}} = 0.08$ in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95)) als Standard verwendet.⁸⁸ Die Konzentrationsabnahme des Eduktes wurde während der UV-Bestrahlung beim (1*E*,3*E*)-1,4-Diphenylbuta-1,3-dien durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Bei den *caged* Verbindungen sollte auch die photometrische Konzentrationsbestimmung möglich sein, unter der Voraussetzung, dass die Verbindungen hydrolysestabil sind, nur ein Cumarin-haltiges Photolyseprodukt aus der *caged* Verbindung entsteht (spektroskopisch einheitliche Reaktion) und die Absorptionsmaxima der Cumarin-Chromophore von Phototrigger und Photoprodukt oder die entsprechenden molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten sich deutlich unterscheiden. Da man hier neben der Ethandiolbildung die Entstehung anderer Cumarin-haltiger Photoprodukte bei der Photolyse der neuen cumariny-substituierten *caged* Carbonylverbindungen von vornherein nicht ausschließen konnte, wurden sämtliche Konzentrationsbestimmungen mit der analytischen HPLC durchgeführt. Die jeweils ermittelten Konzentrationen wurden über die dazugehörigen Bestrahlungszeiten aufgetragen und der Anstieg (dc/dt) wurde durch lineare Regression der Messpunkte im Initialbereich (maximal 10 % Abbau) der exponentiellen Abbaukurve der photoaktiven Verbindung erhalten. Die Extinktionen wurden aus den UV/Vis-Absorptionsspektren der unbestrahlten Lösungen ($t = 0$) bei den jeweiligen Bestrahlungswellenlängen entnommen (vgl. Abschn. 5.3 für experimentelle Details).

Die photochemischen Quantenausbeuten der untersuchten *caged* Verbindungen liegen zwischen 0.0 und 0.15. Die höchsten φ_{chem} -Werte für den Abbau weisen die **BBHC-ED**-substituierten 1,3-Dioxolane auf und übertreffen damit deutlich die der übrigen Derivate.

Wie bereits in Abschnitt 1-2 erläutert, absorbieren alle synthetisierten Cumarinchromophore das Licht im UV/Vis-Bereich relativ stark. Mit Extinktionskoeffizienten beim langwelligen Absorptionsmaximum von 11000–18700 l mol⁻¹ cm⁻¹ und den ermittelten photochemischen Quantenausbeuten ergeben sich mit einer Ausnahme ausreichend hohe Photoeffizienzen für diese Verbindungsklasse. Sie betragen

ein Vielfaches der Photoeffizienzen der bekannten PPGs für C=O-Funktionen und stellen damit unter diesen Gesichtspunkten die bislang besten Carbonyl-Schutzgruppen dar.

Nach Bestrahlung entstanden in allen Fällen die entsprechenden (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diole sowie die jeweiligen Carbonylverbindungen als Hauptprodukte. Die bei der Photolyse gebildeten (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diole **15** und **59–62** sind allerdings gegen längere Bestrahlung nicht inert. Offenbar gehen die Diole selbst eine Photoreaktion ein und werden zu hier nicht näher untersuchten Produkten umgesetzt.

In den nachfolgenden Tabellen sind die photochemischen Quantenausbeuten aller hergestellten *caged* Carbonylverbindungen zusammengestellt. Fast alle φ_{chem} -Werte für den Abbau der photolabilen als Acetal oder Ketal-geschützten Verbindungen waren zufriedenstellend. Allerdings wurde für die **BCMAC-ED-caged** Carbonylverbindungen **82** und **94** praktisch keine Photolyse beobachtet.

Tabelle 4: Extinktionskoeffizienten (λ_{max}), photochemische Quantenausbeuten (φ_{chem}), Photoeffizienz bei λ_{max} ($\varepsilon_{\text{max}}\varphi_{\text{chem}}$) und Wiederfindungsrate von einfachen Carbonylverbindungen nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm der Acetal/Ketal-geschützten Carbonyl-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95), pH 7.2

Verbindung	λ_{max} [nm]	ε_{max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	φ_{chem}	$\varepsilon_{\text{max}}\varphi_{\text{chem}}$ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	Wiederfindung Carbonylverbindung [%]
65 Bhc-ED-caged Benzaldehyd	372	18300	0.060	1098	31
71 BBHC-ED-caged Benzaldehyd	371	16100	0.140	2254	38
72 Bhc-ED-caged Phenylacetaldehyd	371	16800	0.063	1058	32
76 BBHC-ED-caged Phenylacetaldehyd	372	16400	0.104	1706	40
73 Bhc-ED-caged Acetophenon	372	17700	0.010	177	30
78 BBHC-ED-caged Acetophenon	372	16200	0.040	648	37
74 Bhc-ED-caged Phenylaceton	372	17900	0.013	233	34
80 BBHC-ED-caged Phenylaceton	373	15200	0.027	410	30

Tabelle 4 zeigt Daten der untersuchten *caged* Benzaldehyd-, Phenylacetaldehyd-, Acetophenon- und Phenylaceton-Verbindungen. Ein wesentlicher Einfluß der Struktur der eingesetzten aliphatischen bzw. aromatischen Aldehyde und Ketone jeweils untereinander auf die photochemischen Eigenschaften der entsprechenden *caged* Derivate war nicht zu beobachten. Alle *caged* Benzaldehyde/Phenylacetaldehyde einerseits bzw. *caged* Acetophenone/Phenylacetone andererseits mit demselben eingesetzten Chromophor haben in der gleichen Größenordnung liegende photochemische Quantenausbeuten. Vergleicht man die Eigenschaften der Aldehyde und Ketone miteinander, so stellt man fest, dass alle *caged* Aldehyde eine höhere photochemische Quantenausbeute aufweisen als die *caged* Ketone. Dies ist mit der besseren Abgangsgruppeneigenschaft der Aldehyde zu begründen. Hier sei aber nochmals verdeutlicht, dass der **BBHC-ED**-Chromophor deutlich bessere Photoeffizienzen für Aldehyde und Ketone aufweist als der **Bhc-ED**-Chromophor. Bei Aldehyden ist die Photoeffizienz des Mannich-substituierten

Chromophors ca. doppelt und bei Ketonen ca. dreifach höher. Die Wiederfindungsrate der Carbonylverbindungen liegt unter 50 %, was auch hier teilweise auf die schlechte Wasserlöslichkeit der durchweg sehr hydrophoben Carbonylverbindungen zurückzuführen sein dürfte.

Tabelle 5 zeigt wichtige photochemische Eigenschaften der hergestellten *caged* Bourgeonale. Auffällig ist, dass **BCMAC-ED-caged** Bourgeonal (**82**) sich als weitgehend photolytisch inert erwies. Die höchste photochemische Quantenausbeute und Photoeffizienz wies **BBHC-ED-caged** Bourgeonal (**89**) auf. Ersichtlich hat **89** eine doppelt so hohe photochemische Quantenausbeute wie **Bhc-ED-caged** Bourgeonal (**83**) und eine sechsfach bzw. zehnfach höhere Quantenausbeute als **BCC-ED-caged** Bourgeonal (**87**) bzw. **BHCC-ED-caged** Bourgeonal (**85**). Auch die Photoeffizienz der Mannich-Verbindung ist um ein Vielfaches höher als die der übrigen Verbindungen. Somit stellt **BBHC-ED** das optimale Reagenz für das *Caging* von Bourgeonal sowie wahrscheinlich auch von anderen Aldehyden dar.

Tabelle 5: Extinktionskoeffizienten (λ_{\max}), photochemische Quantenausbeuten (φ_{chem}), Photoeffizienz bei λ_{\max} ($\varepsilon_{\max}\varphi_{\text{chem}}$) und Wiederfindungsrate von Bourgeonal nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 365 nm der als Acetal geschützten Bourgeonal-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80*), pH 7.2

Verbindung	λ_{\max} [nm]	ε_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	φ_{chem}	$\varepsilon_{\max}\varphi_{\text{chem}}$ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	Wiederfindung Bourgeonal [%]
82 BCMAC-ED-caged Bourgeonal	379	18700	0.001	19	39
83 Bhc-ED-caged Bourgeonal*	374	16200	0.060	972	36
85 BHCC-ED-caged Bourgeonal	354	12000	0.013	156	46
87 BCC-ED-caged Bourgeonal	330	15200	0.024	365	40
89 BBHC-ED-caged Bourgeonal	373	15700	0.149	2339	40

Die Wiederfindungsrate von Bourgeonal nach der Bestrahlung variierte von 36 % bis 46 %. Teilweise ist die relativ geringe Wiederfindungsrate auf die schlechte Löslichkeit von Bourgeonal in wässrigen Medien zurückzuführen. Auch bei der Photolyse anderer *caged* Carbonylverbindungen wurden nur mäßige Wiederfindungsraten gefunden²⁸.

In Tabelle 6 sind die wichtigsten photochemischen Daten der hergestellten *caged* Progesteronderivate zusammengefasst. Die photochemischen Quantenausbeuten der *caged* Progesterone sind deutlich niedriger als die der entsprechenden *caged* Bourgeonale. Offenbar lassen sich aliphatisch cyclische Acetale leichter photolytisch spalten als entsprechende cyclische Ketale.

Tabelle 6: Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}), photochemische Quantenausbeuten (ϕ_{chem}), Photoeffizienz bei λ_{\max} ($\epsilon_{\max}\phi_{\text{chem}}$) und Wiederfindungsrate von Progesteron/Progesteron-3-CMO nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm von Ketal-geschützten Progesteron-Derivaten in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 60/40*), pH 7.2

	Verbindung	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	ϕ_{chem}	$\epsilon_{\max}\phi_{\text{chem}}$ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	Wiederfindung Progesteron [%]
94	C₃-BCMAC-ED-caged Progesteron	379	17200	0.000	0	n. b.
93	C₂₀-Bhc-ED-caged Progesteron*	374	14600	0.004	58	29
92	C₃-Bhc-ED-caged Progesteron*	374	13800	0.002	28	26
99	C₂₀-BBHC-ED-caged Progesteron	377	13000	0.011	143	n. b.
98	C₃-BBHC-ED-caged Progesteron	374	13200	0.016	211	n. b.
107	Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO	341	11000	0.006	66	61

C₃-BCMAC-ED-caged Progesteron (**94**) erwies sich hier ebenfalls gegenüber der Photolyse als praktisch inert. Bei den *caged* Progesteronderivaten haben die **BBHC**-Verbindungen **98** und **99** die höchsten photochemischen Quantenausbeuten aufzuweisen. **C₃**- und **C₂₀-BBHC-ED-caged** Progesteron haben eine ca. drei- bis vierfach höhere Photoeffizienz als die entsprechenden **Bhc-ED**-Derivate. Damit ist der von **BBHC-ED** abgeleitete Chromophor auch die optimale Schutzgruppe für Ketone.

Die Wiederfindungsrate von Progesteron nach Bestrahlung der *caged* Verbindungen **92** und **93** mit UV-Licht liegt bei ca. 30 %. Die relativ niedrige Wiederfindungsrate liegt wahrscheinlich wiederum an der schlechten Wasserlöslichkeit des Progesterons. Im Gegensatz dazu liegt die Wiederfindungsrate des besser wasserlöslichen Progesteron-3-CMO bei 61 %.

Betrachtet man die photochemischen Quantenausbeuten aller Cumarinyl-substituierten 1,3-Dioxolane hinsichtlich

- der Cumarinyl-Chromophore und
- der Abgangsgruppen,

kann man in beiden Fällen eine Systematik erkennen, die jeweils im Einklang mit dem vermuteten Ablauf einer Photo-S_N1-Reaktion (vgl. Abschn. 3.3.1) steht und eventuell eine Erklärung für den gravierenden Unterschied der ϕ_{chem} -Werte der **BCMAC-ED**- und **Bhc-ED-caged** Carbonylverbindungen finden.

a) Der Einfluß der Elektronendonatorstärke der Substituenten am Cumarin-Gerüst spiegelt sich bei gleich bleibendem (Bio)molekül in ϕ_{chem} wider. Mit zunehmender Elektronendonatorstärke (+M-Effekt) des/der Substituenten wird das während der Photolyse entstehende Carbeniumion, allgemein Cum-CH₂⁺, besser stabilisiert, d. h. die Bindungsheterolyse wird erleichtert.

b) Auch die Abspaltungstendenz der Abgangsgruppe wirkt sich bei identischem Cumarin-Chromophor auf ϕ_{chem} aus. So steigt ϕ_{chem} in der Reihenfolge Keton < Aldehyd.

Die photochemischen Quantenausbeuten fast aller hergestellten cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane sind zufriedenstellend. Herausragend aber ist nur die PPG vom **BBHC-ED**-Typ, die eine weitaus höhere Photoeffizienz bei entsprechend geschützten Carbonylverbindungen gegenüber den übrigen hergestellten Chromophoren aufweist. Damit stellt **BBHC-ED**, hinsichtlich der gestellten Anforderungen, d. h. einer hohen Wasserlöslichkeit, einem langwelligen Absorptionsmaximum und einer hohen photochemischen Quantenausbeute, das optimale Agens für die Schützung von C=O-Funktionen dar.

3.3.4 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung und Fluoreszenzquantenausbeuten

Fluoreszenzeigenschaften: Cumarine werden auf Grund ihrer hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften beispielsweise als optische Aufheller, als Farbstoffe für Laser und zur Fluoreszenzmarkierung einfacher organischer Substanzen bis hin zu Biomolekülen benutzt.⁸⁹ Die Aussendung von Licht (Fluoreszenz) ist neben der strahlungslosen Desaktivierung eine weitere photophysikalische Möglichkeit der Cumarine, aus elektronisch angeregten Singulettzuständen (gewöhnlich vom $S_1(0)$ - Zustand aus – KASHA-Regel) in den Singulettgrundzustand zurückzukehren. Abgesehen von der [2+2]-Cycloaddition zwischen zwei Cumarin-Molekülen (Dimerisierung) besitzen die cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane die Fähigkeit zur Photolyse nach dem bereits beschriebenen Photo- S_N1 -Mechanismus. Als Konsequenz konkurrieren die photophysikalischen (strahlungslose Desaktivierung und Fluoreszenz) und photochemischen Prozesse (Photolyse) miteinander. Eine hohe Fluoreszenzintensität wird oft auf die Starrheit des Chromophors zurückgeführt, die eine strahlungslose Desaktivierung erschwert. Zusätzlich tragen bei den Cumarinen eine Kombination von Substituenten mit Elektronendonator- und -akzeptor-Eigenschaften in konjugationsfähigen Positionen durch ICT zur Erhöhung der Fluoreszenz bei (vgl. Abb. 3-33).

Fluoreszenzquantenausbeuten: Die Fluoreszenzquantenausbeute (φ_f) einer Substanz ist als der Bruchteil von Molekülen definiert, der ein Photon nach elektronischer Anregung (aus dem $S_1(0)$ -Zustand) aussendet. Diese Angabe ist nicht identisch mit der Anzahl emittierter Photonen (die die gesamte Probe verlassen) dividiert durch die Anzahl der absorbierten Photonen. Sie können aber unter Umständen beinahe gleich sein.⁹⁰ Im Unterschied zur Effizienz, die sich stets nur auf einen Schritt bezieht, gilt die Quantenausbeute stets für einen Prozess. In diesem Sinne ist bereits die Lichtabsorption als ein Prozess anzusehen, weil der $S_1(0)$ -Zustand normalerweise erst nach Relaxation von Schwingungszuständen bzw. durch Desaktivierung höherer Singulettzustände erreicht wird. Die Lichtabsorption besitzt daher eine Quantenausbeute φ_{abs} . Sie beträgt im Allgemeinen $\varphi_{abs} = 1$, da nach dem EINSTEIN-STARK-Gesetz ein Photon bei der Lichtabsorption als Ganzes wirkt. Die Fluoreszenzquantenausbeute φ_f ergibt sich als Produkt aus der primären Quantenausbeute φ_{abs} mit der Effizienz der Fluoreszenz η_f und stellt den Zusammenhang zwischen der Kinetik der Fluoreszenz und der experimentellen differentiellen Quantenausbeute (Gleichung 2) her.^{87a}

$$\varphi_f^0 = \varphi_{abs} \cdot \eta_f^0 = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_{isc}} = k_f \cdot \tau_f^0 = \frac{\tau_f^0}{\tau_f^n} \quad \text{Gleichung 6}$$

φ_f^0 = experimentelle Fluoreszenzquantenausbeute in Abwesenheit eines Löschers

η_f^0 = Effizienz der Fluoreszenz in Abwesenheit eines Löschers

k_f = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz

k_d = Geschwindigkeitskonstante einer strahlungslosen Desaktivierung

k_{isc} = Geschwindigkeitskonstante der Interkombination

τ_f^0 = experimentelle Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit eines Löschers

τ_f^n = Fluoreszenz – Strahlungslebensdauer

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Cumarinhaltigen Verbindungen wurden mit Hilfe eines Relativverfahrens⁹¹ bestimmt (Gleichung 7), indem man die Emissionsintensität der Probe mit der eines Standards vergleicht, dessen φ_f -Wert bekannt ist. Als Standard wurde Chininsulfat in 1 N Schwefelsäure ($\varphi_f = 0.546$)^{87a} gewählt (s. Abschn. 5.3). Wenn zum einen die Brechungsindizes ($n_{\text{Probe}} = n_{\text{Standard}}$) und zum anderen die Quantenströme ($I_{\text{abs, Probe}} = I_{\text{abs, Standard}}$) bei der gleichen Wellenzahl der monochromatischen Fluoreszenzanregung von Probe und Standard identisch sind, entfallen die letzten beiden Terme in Gleichung 7.

$$\varphi_f^{\text{Probe}} = \frac{\int_0^{\infty} I_f^{\text{Probe}}(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int_0^{\infty} I_f^{\text{Standard}}(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \cdot \varphi_f^{\text{Standard}} \cdot \left(\frac{n^{\text{Probe}}}{n^{\text{Standard}}} \right)^2 \cdot \frac{I_{\text{abs}}^{\text{Standard}}}{I_{\text{abs}}^{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 7}$$

I_f = Fluoreszenzintensität

$\tilde{\nu}$ = Wellenzahl

n = Brechungsindex

I_{abs} = Quantenstrom

Die untersuchten (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiole sowie auch die cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane haben eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Fluoreszenz, die durch die Substituenten am Cumarin-Gerüst beeinflusst wird. Tabelle 7 zeigt neben den Absorptionseigenschaften die Fluoreszenzeigenschaften der (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiole. In Abb. 3-36 sind die Fluoreszenzspektren der (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiole aufgeführt.

Tabelle 7: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{max}), Extinktionskoeffizienten (ε_{max}), Fluoreszenzmaxima (λ_{fl}), Fluoreszenzquantenausbeuten (φ_f) und Stokes-Shifts der (Cumarin-4-yl)-1,2-ethandiole in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95), pH 7.2

Verbindung	λ_{max} [nm]	ε_{max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{fl} [nm]	φ_f	Stokes-Shift [nm]
59 BCMAC-ED	380	17800	485	0.191	105
15 Bhc-ED	375	16100	470	0.580	95
60 BHCC-ED	347	11000	455	0.647	108
61 BCC-ED	331	15100	465	0.010	134
62 BBHC-ED	373	15600	462	0.643	89

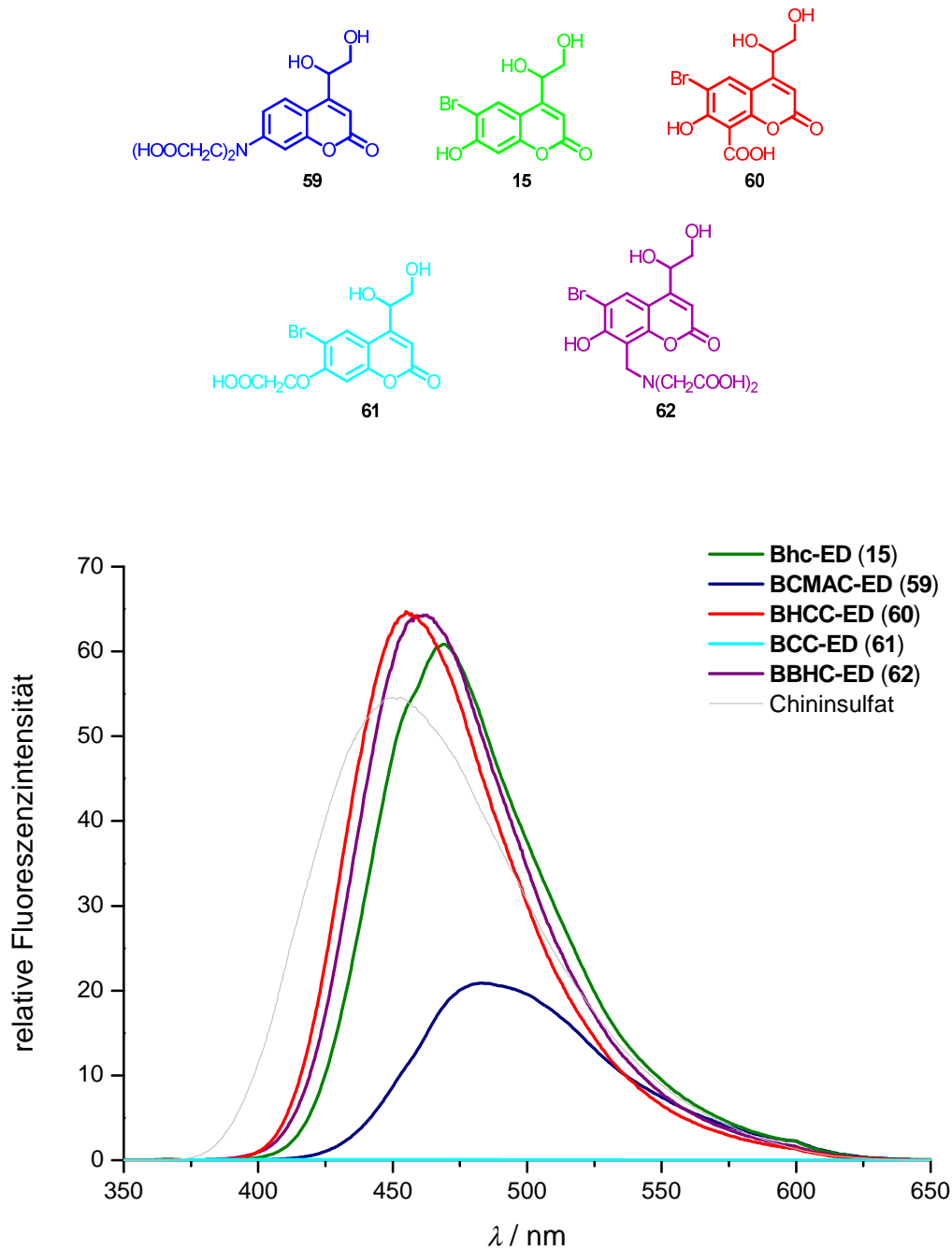


Abbildung 3-36: Normierte Fluoreszenzspektren der (Cumarin-4-yl)1,2-Ethandiole jeweils in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95) im Vergleich zu Chininsulfat in H_2SO_4

BCC-ED (61) zeigt nur eine sehr geringe Fluoreszenz, was vermutlich an den Substitutionsmuster am Cumarin-Gerüst liegt und der ϕ_f -Wert von **BCMAC-ED (59)** ist kleiner als die Werte der Fluoreszenzquantenausbeuten der (Cumarin-4-yl)1,2-ethandiole **15**, **60** und **62**. Der kleinere ϕ_f -Wert von Verbindung **59** könnte daraus resultieren, dass bei unverbrückten 7-(Dialkylamino)cumarinen (z. B. 7-[(Bis(carboxymethyl)amino)cumarin mit zunehmender Lösungsmittelpolarität ein IC-Übergang (innere Umwandlung, *internal conversion*) von einem fluoreszierenden intramolekularen Ladungsübertragungszustand (ICT-Zustand, *intramolecular charge transfer*) in einen strahlungslosen

verdrillten intramolekularen Ladungsübertragungszustand (TICT-Zustand, *twisted intramolecular charge transfer*) vorkommen kann⁹² (Abb. 3-37).

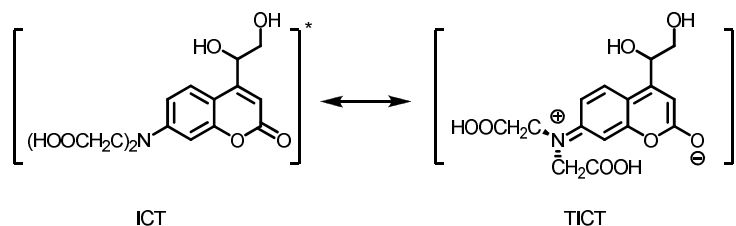


Abbildung 3-37: Resonanzstrukturen von nicht verbrückten 7-[(Bis(carboxymethyl)amino)cumarin]en im ICT- und TICT-Zustand

Der ICT-Zustand ist durch eine planare Anordnung der Bis(carboxymethyl)amino-Gruppe und der TICT-Zustand durch eine senkrecht stehende Aminogruppe gekennzeichnet. Im ersten Fall befindet sich das System in der durchkonjugierten (vom Amino-Stickstoffatom bis zum Carbonyl-Sauerstoffatom) starren ICT-Form, im zweiten in einer um ca. 90° (um die N-C-Einfachbindungsachse) verdrillten, nicht mehr konjugationsfähigen angeregten Form, in der ein Elektron vom Donator ($\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$) auf den Akzeptor (CO) übertragen wurde. Die Bildung des TICT-Zustands wird durch polare Lösungsmittel begünstigt, weil diese das entstehende Radikationenpaar stärker stabilisieren.^{87a,92b} Die Relaxation aus dem TICT-Zustand erfolgt häufig durch strahlungslose Desaktivierung. Als Resultat ist der ϕ_f -Wert der Verbindung, hier **59** kleiner.

Manchmal wird aber auch eine im Vergleich zur normalen Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand bathochrom verschobene Emissionsbande beobachtet. In diesem Fall sollte das Emissionsspektrum eine duale Fluoreszenz aufweisen. Eine zweite Fluoreszenzbande wurde aber bei **59** nicht beobachtet (Abb. 3-36).

Die Cumarinyl-substituierten 1,3-Dioxolane weisen ϕ_f -Werte auf, die näherungsweise mit denen der Diole korrelieren. Nachfolgend sind die Fluoreszenzeigenschaften der **Cumarin-ED-caged** strukturell einfachen Carbonylverbindungen (Tab. 8), Bourgeonale (Tab. 8, Abb. 3-38) und Progesterone (Tab. 8, Abb. 3-39) zusammengefasst. Allgemein gelten die schon bei den Ethandiolen diskutierten Zusammenhänge. Die C_3 - und C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesterone unterscheiden sich wie C_3 - und C_{20} -**BBHC-ED-caged** Progesterone gering in ihren ϕ_f -Werten.

Tabelle 8: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}), Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}), Fluoreszenzmaxima (λ_{fl}), Fluoreszenzquantenausbeuten (φ_f) und Stokes-Shifts der als cyclisches Acetal/Ketal geschützten Carbonyl-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95), als cyclisches Acetal geschützten Bourgeonal-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80*) und als cyclisches Ketal geschützten Progesteron- und Progesteron-3-CMO-Derivate in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 60/40°), pH 7.2

	Verbindung	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{fl} [nm]	φ_f	Stokes-Shift [nm]
65	Bhc-ED-caged Benzaldehyd	372	18300	476	0.579	104
71	BBHC-ED-caged Benzaldehyd	371	16100	470	0.357	99
72	Bhc-ED-caged Phenylacetaldehyd	371	16800	473	0.496	102
76	BBHC-ED-caged Phenylacetaldehyd	372	16400	468	0.575	96
73	Bhc-ED-caged Acetophenon	372	17700	475	0.539	103
78	BBHC-ED-caged Acetophenon	372	16200	470	0.509	98
74	Bhc-ED-caged Phenylaceton	372	17900	475	0.527	103
80	BBHC-ED-caged Phenylaceton	373	15200	470	0.512	97
82	BCMAC-ED-caged Bourgeonal	379	18700	499	0.145	120
83	Bhc-ED-caged Bourgeonal*	374	16200	473	0.570	99
85	BHCC-ED-caged Bourgeonal	354	12000	467	0.655	113
87	BCC-ED-caged Bourgeonal	330	15200	465	0.021	135
89	BBHC-ED-caged Bourgeonal	373	15700	468	0.482	95
94	C₃-BCMAC-ED-caged Progesteron	379	17200	495	0.177	116
93	C₂₀-Bhc-ED-caged Progesteron°	374	14600	473	0.380	99
92	C₃-Bhc-ED-caged Progesteron°	374	13800	474	0.520	100
99	C₂₀-BBHC-ED-caged Progesteron	377	13000	468	0.485	91
98	C₃-BBHC-ED-caged Progesteron	374	13200	468	0.524	94
107	Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO	341	11000	473	0.526	132

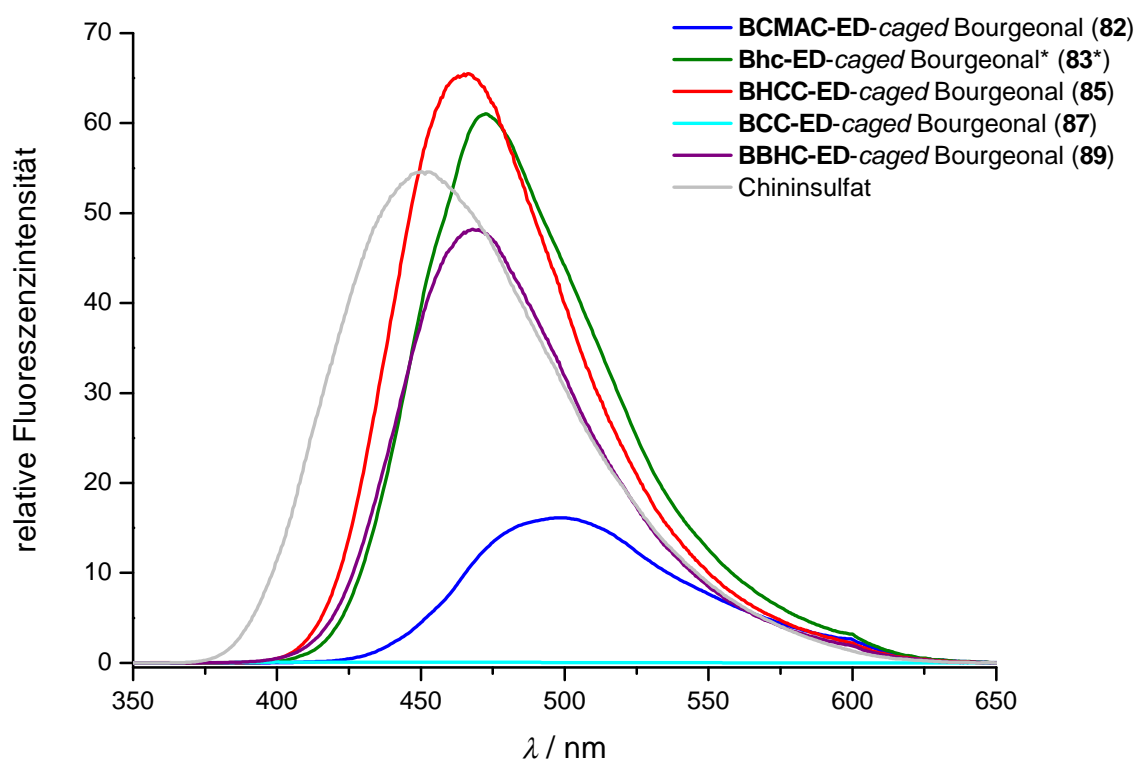


Abbildung 3-38: Normierte Fluoreszenzspektren der *caged* Bourgeonal-Derivate jeweils in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 20/80*) im Vergleich zu Chininsulfat in H₂SO₄

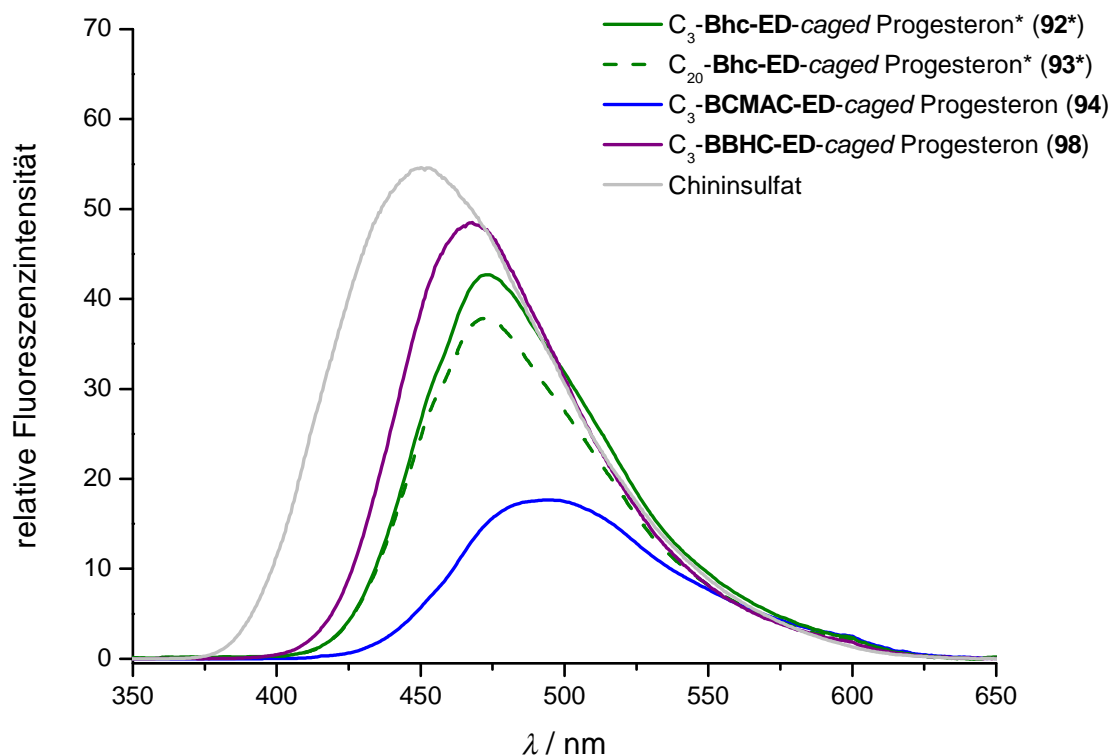


Abbildung 3-39: Normierte Fluoreszenzspektren der *caged* Progesteron-Derivate jeweils in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95, 60/40*) im Vergleich zu Chininsulfat in H₂SO₄

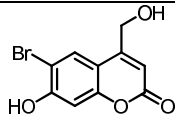
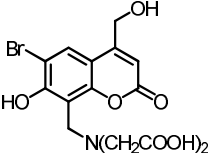
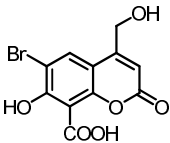
Das Maximum der Fluoreszenzemission eines Chromophors ist in der Regel langwelliger als dessen langwelligstes Absorptionsmaximum. Diesen Unterschied in der Frequenz bzw. Wellenlänge von absorbiertem und emittiertem Licht bezeichnet man als Stokes-Verschiebung bzw. Stokes-Shift. Bei den **BCC-ED**-Derivaten **61** und **87** ist neben den sehr geringen ϕ_f -Werten ein außerordentlich großer Stokes-Shift zu beobachten. Dies wird üblicherweise als Folge stark unterschiedlicher Geometrien der Minima von S₀- und S₁-Zustand diskutiert.^{87a} Aufgrund der relativ großen Stokes-Verschiebungen der untersuchten Cumarin-Derivate überlappen sich deren Absorptions- und Fluoreszenzspektren nur geringfügig.

3.3.5 pH-Abhängigkeit

Die absorptions- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften fast aller hergestellten cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane und der (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diole sind pH-abhängig, was auf die sauren (Carboxylgruppen, phenolische Hydroxygruppen) und basischen Substituenten (Dialkylaminogruppen) an den Chromophoren, die direkt deren elektronische Eigenschaften beeinflussen, zurückzuführen ist. Die photochemischen Quantenausbeuten werden ebenfalls vom pH-Wert beeinflusst. Die im basischen pH-Bereich als Phenolat-Anion vorliegende 7-Hydroxygruppe der **Bhc-ED**-Derivate stabilisiert das bei der Photolyse (vgl. Abb. 1-2) entstehende (Cumarin-4-yl)-methyl-Kation und führt dadurch zu einer Erhöhung des ϕ_{chem} -Wertes. Darüber hinaus besitzen, wie in Kapitel 3.3.3 erläutert, die Phenolat-Anionen der **Bhc-ED**-Derivate im Vergleich zu den protonierten Spezies stark bathochrom und hyperchrom verschobene langwellige Absorptionsbanden. Somit beeinflusst der pH-Wert die beiden entscheidenden Parameter für die Photoeffizienz, die photochemische Quantenausbeute und den Extinktionskoeffizienten.

Es ist davon auszugehen, dass unter physiologischen Bedingungen die Carboxyl- und tertiären Aminogruppen am Cumarin-Gerüst bei neutralem pH-Wert deprotoniert vorliegen. Nur alle (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-Derivate weisen aufgrund ihrer phenolischen Hydroxygruppe eine relativ starke pH-Abhängigkeit im relevanten pH-Bereich auf. Der Einfluss zusätzlicher Substituenten am Cumarin-Gerüst von 6-Brom-7-hydroxycumarin wurde kürzlich von N. Kotzur untersucht.^{7d} Exemplarisch wurden von 6-Brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**BhcM-OH**), 8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**BBHCM-OH**) und 6-Brom-8-carboxy-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**BHCCM-OH**) die pK_s -Werte bestimmt. Die pK_s -Werte sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Ihre Ermittlung erfolgte durch Messung der Absorptionsspektren der Verbindungen in H₂O oder MeCN/H₂O (5/95 bzw. 50/50) bei verschiedenen pH-Werten.

Tabelle 9: pK_s -Werte einiger (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-Derivate und von Verbindungen mit ähnlichen Strukturmerkmalen in ^aH₂O, ^bMeCN/H₂O (5/95) bzw. ^cMeCN/H₂O (50/50)

Verbindung	pK_s^a	pK_s^b	pK_s^c
 BhcM-OH	6.27	6.45	7.04
 BBHCM-OH	4.90 / 8.51	4.96 / 9.86	
 BHCCM-OH	8.82		
7-Hydroxy-4-methylcumarin	7.83	9.16	9.88
Methyliminodiessigsäure ⁹³	10.18		
8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (Calcein Blau) ⁶⁷	3.0 / 6.9 / 11.3		

Der pK_s -Wert von **BhcM-OH** ist, wie bereits von FURUTA *et al.*⁹⁴ berichtet, im Vergleich zu 7-Hydroxy-4-methylcumarin um 1,6 Einheiten niedriger. Dies ist der elektronenziehenden Wirkung des in 6-Position befindlichen Br-Atoms zuzuschreiben, welches das Phenolat-Anion stabilisiert. Der gleiche Effekt ist bei den verwandten Verbindungen Phenol und *o*-Bromphenol (pK_s 9.95 bzw. 8.42) zu beobachten.⁹⁵ Dagegen liegt der pK_s -Wert der phenolischen Hydroxygruppe von **BHCCM-OH** um eine Einheit über dem von 7-Hydroxy-4-methylcumarin. Offenbar ist die in diesem Molekül in 8-Position befindliche Carboxylfunktion dafür verantwortlich.

Die Verbindung **BBHCM-OH** zeigte im Vergleich zu **BhcM-OH** eine weitere Verringerung des pK_s -Wertes, verursacht durch das benachbarte tertiäre Amin, welches eine Wasserstoffbrückenbindung zur phenolischen Hydroxyfunktion ausbilden kann. ADAMCZYK *et al.*⁶⁸ stellten ebenfalls nach Einführung eines Aminomethyl-Substituenten in die 8-Position von 7-Hydroxy-4-methylcumarin eine Absenkung des pK_s -Wertes um 0.9 Einheiten fest. Beim Übergang von **BhcM-OH** zu **BBHCM-OH** beträgt die Verringerung des pK_s -Wertes 1.3 Einheiten. Demzufolge liegen bei einem pH-Wert von 6.0 noch 90 % des **BBHCM**-Chromophors als Phenolat-Anionen vor und erlauben sogar am unteren Ende des physiologischen Bereichs eine nahezu unverändert hohe Absorption bei 370 nm und damit eine effektive Photospaltung. Dies ist ein wichtiger Vorteil der hier neu entwickelten **BBHCM**-PPG. Von der in der Literatur beschriebenen **BhcM**-PPG sind, bedingt durch ihren höheren pK_s -Wert, lediglich 50 % der Spezies bei pH 6.0 deprotoniert.

3.3.6 Zwei-Photonen-Photolyse

C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) wurde auch auf Eignung zur Zwei-Photonen-Photolyse geprüft. Zwei-Photonen-Uncaging bedeutet, dass die Absorption von einem UV-Photon durch die gleichzeitige Absorption von zwei Infrarot (IR)-Photonen ersetzt werden kann. Diese Art der Photolyse zeichnet sich u. a. durch die höhere Eindringtiefe der benutzten Strahlung (IR) in Materie sowie die lokal noch mehr begrenzte Photofreisetzung des Biomoleküls aus der *caged* Verbindung, nämlich nur im Fokus des IR-Lichts, aus. Die Zwei-Photonen-Photolyse ermöglicht auch die Freisetzung von Biomolekülen aus *caged* Verbindungen in Gewebeschnitten. Die Freisetzung von Benzaldehyd aus **Bhc-ED-caged** Benzaldehyd (**65**) durch Zwei-Photonen-Photolyse wurde bereits beschrieben.²⁸ Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir nun erstmalig nachweisen, dass auch das C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) (Diastereomerenmischung) zur Zwei-Photonen-Photolyse nach simultaner Absorption von zwei IR-Lichtquanten befähigt ist. Diese Experimente wurden gemeinsam mit B. WIESNER (FMP) durchgeführt. Hierfür wurde die *caged* Verbindung **93** (jeweils 20 μ M) in HEPES/Acetonitril an dem Zwei-Photonen-Mikroskop mit einem Titan-Saphir-Laser bestrahlt ($\lambda = 755$ nm). Die Photofreisetzung von Progesteron aus **93** wurde in bestimmten Zeitabständen mittels HPLC bestimmt. *N*-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl-L-glutamat (**BhcM-Glu**) diente hierbei als Standard und wurde unter gleichen Bedingungen an dem Zwei-Photonen-Mikroskop mit dem Titan-Saphir-Laser photolysiert. Der Abbau von **BhcM-Glu** war um den Faktor 5 schneller als der von C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron. **Bhc-Glu** hat eine Zwei-Photonen *uncaging action cross section* von ungefähr $\sigma_u = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1}$, dies entspricht 1 GM.²⁶ Der Wert für C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron beträgt demnach ca. $\sigma_u = 0.2$ GM, was bedeutet, dass Progesteron aus der *caged* Verbindung auch durch Bestrahlung mit IR-Lichtquanten mit ausreichender Empfindlichkeit freigesetzt werden kann.

3.3.7 Photokinetische Untersuchungen

Die Kinetik der Photolyse von (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diol-*caged* Carbonylverbindungen ist bisher nicht untersucht worden. Mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenz- und IR-Spektroskopie wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals Untersuchungen zur Geschwindigkeit der Photolyse und der Biomolekül-Freisetzung in Zusammenarbeit mit Prof. R. Schmidt (Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main) bzw. Prof. A. Barth (Universität Stockholm) durchgeführt.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Die Kinetik der Photolyse von (Cumarin-4-yl)methyl-Estern, insbesondere die Bildungsgeschwindigkeit der Photoprodukte, wurde bereits an einigen **CM-caged** cyclischen Nukleotiden^{23,27a,96} bzw. **CM-caged** Protonen^{88,97} durch zeitaufgelöste Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Untersuchungen der Bildungsgeschwindigkeit der Photoprodukte bei cumariny-substituierten *caged* Carbonylverbindungen waren bislang nicht bekannt.

In Analogie zu den Messungen der **CM-caged** Nukleotide bzw. **CM-caged** Protonen⁹⁷ wurden in dieser Arbeit die wichtigsten Vertreter der synthetisierten (Cumarin-4-yl)methyl-substituierten 1,3-Dioxolane gleichfalls mit der zeitaufgelösten Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die

Anregung der Ethandiole und *caged* Carbonylverbindungen erfolgte durch einen Stickstofflaser ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$), dessen Intensität durch Einsetzen von Graufiltern in den Strahlengang variiert wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde mit Hilfe einer Silicium-Avalanche-Diode detektiert und über einen Speicher-Oszillographen ausgegeben. Nach Einzelimpulsanregung (0.5 ns Impulsbreite) der Phototrigger und Detektion ihrer Fluoreszenzabklingkurven wurde dabei jeweils die Bildung eines neuen fluoreszierenden cumarinhaltigen Photolyseproduktes noch während des Anregungsimpulses, d. h. innerhalb weniger Nanosekunden, beobachtet. Aufgrund des angenommenen Photo-S_N1-Mechanismus sollte es sich dabei um die durch die Primäerspaltung gebildeten Zwitterionen handeln, die damit innerhalb von Nanosekunden freigesetzt worden sind. Die folgende Tabelle 10 zeigt die bestimmten Fluoreszenzlebensdauern und ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die primäre Photospaltung einiger *caged* Carbonylverbindungen.

Tabelle 10: Fluoreszenzlebensdauern (τ_{OH}) und Geschwindigkeitskonstanten (k_1) einiger *caged* Carbonylverbindungen

	Verbindung	τ_{OH} [ns]	k_1 [s ⁻¹]
59	BCMAC-ED	1.73	
82	BCMAC-ED-<i>caged</i> Bourgeonal	1.73	$(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^8$
15	Bhc-ED	4.32	
83	Bhc-ED-<i>caged</i> Bourgeonal	4.32	
92	C₃-Bhc-ED-<i>caged</i> Progesteron	4.57	
93	C₂₀-Bhc-ED-<i>caged</i> Progesteron	4.57	$(1.2 \pm 0.5) \cdot 10^8$

Zeitaufgelöste IR-Messungen

Da bei der Photolyse der *caged* Carbonylverbindungen aus Dioxolanen Aldehyde bzw. Ketone, d. h. Verbindungen mit C=O-Funktionen gebildet werden, sollte durch Messung der Zeit für das Auftreten der C=O-Bande mittels IR-Spektroskopie die Freisetzungsgeschwindigkeit der Biomoleküle bestimmt werden können. Auf entsprechende zeitaufgelöste IR-Untersuchungen ist die Arbeitsgruppe von Prof. A. Barth (Stockholm) spezialisiert und die *caged* Verbindungen **65**, **71** und **83** wurden dort untersucht. Die zeitaufgelösten IR-Untersuchungen erwiesen sich jedoch als sehr komplex und es liegen gegenwärtig keine verlässlichen Ergebnisse vor.

3.4 Anwendungen von *caged* Progesteron- und Bourgeonal-Derivaten

Um die Funktionalität der neu entwickelten *caged* Progesterone, *caged* Bourgeonale und des *caged* Progesteron-3-CMO unter physiologischen Bedingungen zu prüfen, wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. U. B. KAUPP die Photofreisetzung von Progesteron aus **92**, **93**, Bourgeonal aus **83**, **89** und Progesteron-3-CMO aus **107** an menschlichen Spermien getestet.

Anwendung von *caged* Progesteron-Derivaten

Zunächst wurden mit den **Bhc-ED-caged** Progesteron-Derivaten **92** und **93** die Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Auslösung von Ca^{2+} -Signalen untersucht um abzuklären, ob die Blockierung des Carbonylsauerstoff in C_3 - oder C_{20} -Position für die nicht-genomische Progesteronwirkung auf menschliche Spermien entscheidend ist. Durch diese Experimente sollte bestimmt werden, an welcher Position die Blockierung eine möglichst vollständige biologische Inaktivität hervorruft. Es stellte sich heraus, dass das C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) eine deutlich niedrigere biologische Restaktivität besitzt als das C_3 -Derivat **92** (Abb. 3-40 a), 3-40 b)). Das C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron ist 500–1000-fach weniger potent als Progesteron und damit sehr gut als *caged* Verbindung geeignet.⁹⁸

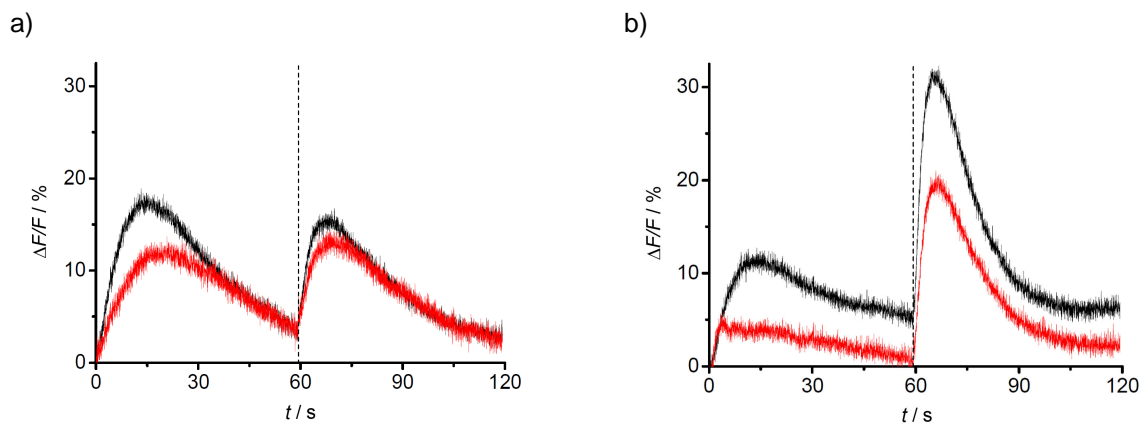


Abbildung 3-40: Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien nach Stimulation von C_3 - und C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron mit Licht der Wellenlänge 295–395 nm in der *Stopped-Flow*-Apparatur: 5 μM (schwarz), und 2.5 μM (rot). Zeitpunkt der Mischung $t = 0$ s. Die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F$) bezieht sich auf die gemittelte Fluoreszenzintensität der ersten 50 ms. a) C_3 -*caged* Progesteron (**92**), b) C_{20} -*caged* Progesteron (**93**). Zum Zeitpunkt $t = 60$ s erfolgte der UV-Blitz.

Die Untersuchungen zur Chemotaxis an menschlichen Spermien erfolgten mit dem C_{20} -Derivat. Die Spermien wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikator Fluo-4 geladen um die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Photofreisetzung von Progesteron aus C_{20} -*caged* Progesteron aufzeichnen zu können. Es ergab sich ein schneller und dosisabhängiger Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.⁹⁸

Die folgende Abb. 3-41 zeigt Ca^{2+} -Messungen bei Freisetzung von Progesteron aus C_{20} -caged Progesteron **93**.

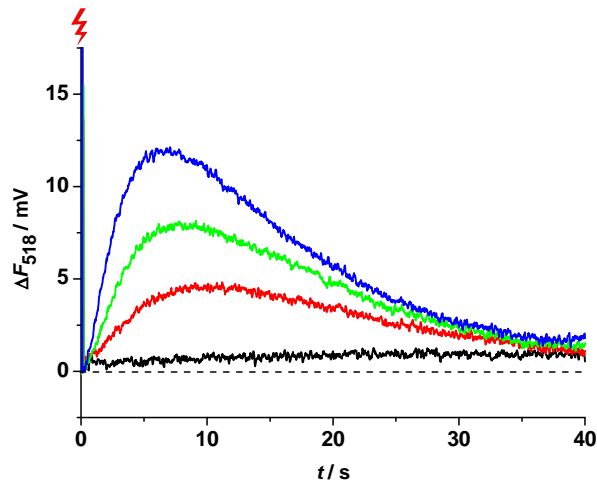


Abbildung 3-41: Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien nach photolytischer Freisetzung von Progesteron aus *caged* Progesteron in einer *Stopped-Flow*-Apparatur. In der Küvette wurden dann UV-Blitze mit einer Intensität von 100 % (blau), 50 % (grün) bzw. 25 % (rot) appliziert und so unterschiedliche Progesteronmengen freigesetzt (schwarz = kein UV-Blitz).

Zudem führt der $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg zu einer Schwimmbahnänderung der menschlichen Spermien ähnlich der wie sie auch bei Seeigelspermien zu beobachten ist (Abb. 3-42). Die gezeigte Trajektorie ist charakteristisch für Spermien und durch die Experimente unter Einsatz von C_{20} -caged Progesteron gelang es erstmals auch bei menschlichen Spermien die Bewegungslaufbahn zu zeigen.⁹⁸

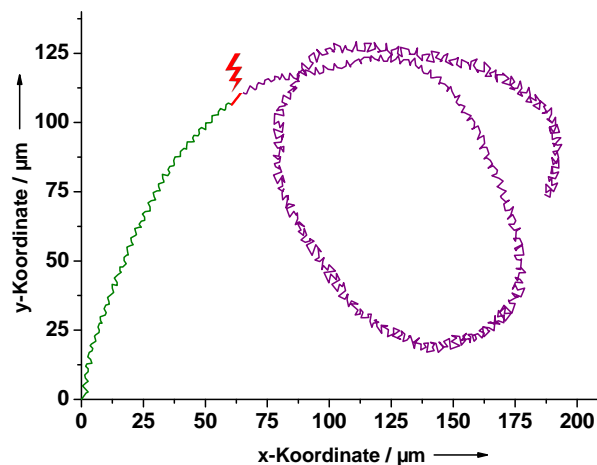


Abbildung 3-42: Die Trajektorie des einzelnen Spermiums vor (grün) und nach (violett) nach dem UV-Blitz (rot)

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass C_{20} -**Bhc-ED-caged**-Progesteron (**93**) biologisch inaktiv sowie hydrolysestabil ist und zu einer schnellen und hohen Progesteron-Freisetzung nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 295–395 nm führt. Die Anwendbarkeit konnte in Experimenten mit menschlichen Spermien gezeigt werden. Dabei konnten ein $[Ca^{2+}]$ -Anstieg und eine Änderung der Schwimmbahn der Spermien bei Freisetzung von Progesteron aus **93** festgestellt werden. Mit *caged* Progesteron steht erstmalig ein Werkzeug für Studien zum Mechanismus schneller Progesteronwirkungen an menschlichen Spermien zur Verfügung. *Caged* Progesteron stellt auch gleichzeitig ein wichtiges neues Werkzeug für die Untersuchungen anderer schneller nicht-genomischer Prozesse dar.

Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO (**107**) zeigt nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 295–395 nm analog wie Progesteron eine schnelle konzentrationsabhängige Ca^{2+} -Freisetzung in menschlichen Spermien (Abb. 3-43).

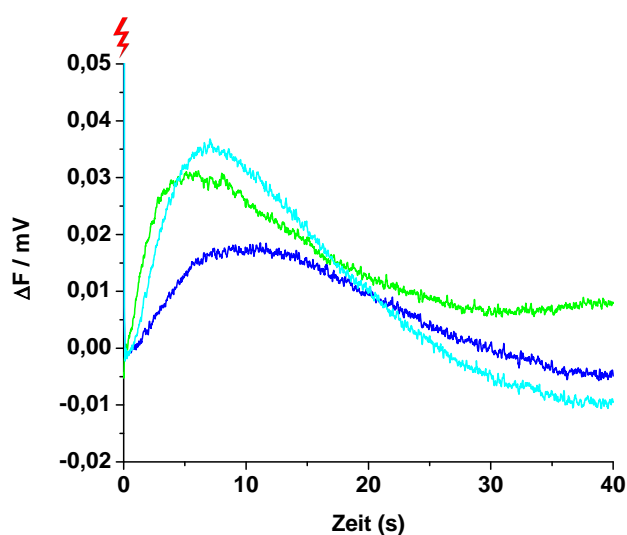


Abbildung 3-43: Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien nach Stimulation von **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO (**107**) mit Licht der Wellenlänge 295–395 nm in der *Stopped-Flow*-Apparatur: 10 nM Progesteron (grün), 5 μ M (**107**) (blau), 10 μ M (**107**) (türkis).

Da Progesteron-3-CMO ca. 70 % der Aktivität des Progesterons besitzt und um die gleiche Rezeptorbindungsstelle wie Progesteron konkurriert, ist das Derivat als geeignete Alternative zum Progesteron zu betrachten.⁵⁹ Zudem hat das Progesteron-3-CMO nur eine Carbonyl-Funktion an C_{20} , so dass der Syntheseweg zum C_{20} -*caged* Progesteron-Derivat hierdurch deutlich weniger aufwendig ist. Eine gegenüber C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron erhöhte Wasserlöslichkeit liefert die Carboxyl-Gruppe an dem Carboxymethyloxim-Rest an Position 3. Damit ist C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO (**107**) hinsichtlich Wasserlöslichkeit und Darstellbarkeit als eine optimierte Variante des C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesterons (**93**) anzusehen.

Anwendung von *caged* Bourgeonal-Derivaten

Die *caged* Bourgeonal-Derivate **BCMAC-ED-*caged* Bourgeonal (82)**, **Bhc-ED-*caged* Bourgeonal (83)** **BBHC-ED-*caged* Bourgeonal (89)** wurden ebenfalls auf ihre Anwendbarkeit im Hinblick auf die Chemotaxis der menschlichen Spermien in der Gruppe von Prof. U. B. KAUPP untersucht.

Alle Derivate erwiesen sich als biologisch völlig inaktiv und setzten bei Bestrahlung mit UV-Licht Bourgeonal frei. Damit sind die Verbindungen prinzipiell als *caged* Verbindungen geeignet. Die Derivate **82** und **89** haben eine hohe Wasserlöslichkeit und waren in der Anwendung für die Experimente besser geeignet als das wenig in HEPES-Puffer lösliche **Bhc-ED-*caged* Bourgeonal (83)**.

Allerdings konnte bisher keine eindeutige Aussage im Hinblick auf die Eigenschaft von Bourgeonal als Chemoattraktans getroffen werden. Offenbar sind für die Bourgeonaleffekte in menschlichen Spermien gegenüber Progesteron wesentlich höhere Bourgeonalkonzentrationen erforderlich und wahrscheinlich war die freigesetzte Konzentration an Bourgeonal nicht ausreichend, um Ca^{2+} -Signale und eine Chemotaxis von Bourgeonal an menschlichen Spermien hervorzurufen.

In der Literatur ist Bourgeonal als Lockstoff für menschliche Spermien beschrieben worden.⁶⁵ Jedoch fehlt bislang ein direkter Beweis. Weitere Untersuchungen zum Einsatz von *caged* Bourgeonal auch an Riechzellen sind geplant. Hierbei soll u. a. durch die Verwendung von stärkeren Lichtquellen ein höherer Konzentrationsprung erreicht werden.

3.5 Werkzeuge zur Untersuchung von Progesteron-Rezeptor Wechselwirkungen

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu nicht-genomischen Wirkungen von Progesteron an menschlichen Spermien aus Abschn. 3.4 ergab sich die Notwendigkeit, zur Identifizierung der Rezeptorbindungsstelle, Progesteronderivate mit Crosslinker-Eigenschaften zu entwickeln.

Als Grundgerüst wurde neben Progesteron das Tripeptid Lys-Arg-Lys-NH₂ gewählt, das durch die hydrophilen und unter physiologischen Bedingungen geladenen Aminosäuren die nötige Wasserlöslichkeit gewährleisten und die passive Transmembrandiffusion verhindern sollte. Außerdem boten die Aminogruppen der Seitenketten die Möglichkeit, weitere funktionelle Gruppen einzufügen. Als Progesteron-Derivat kam das Progesteron-3-CMO zum Einsatz, da es an der Carboxy-Gruppe leicht modifizierbar ist und neuere Experimente gezeigt haben, dass es im Hinblick auf die Chemotaxis von Säugetierspermien um die gleiche Bindungsstelle wie Progesteron konkurriert.⁵⁹ Abb. 3-44 zeigt die Struktur von dem synthetisierten Prog-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**).

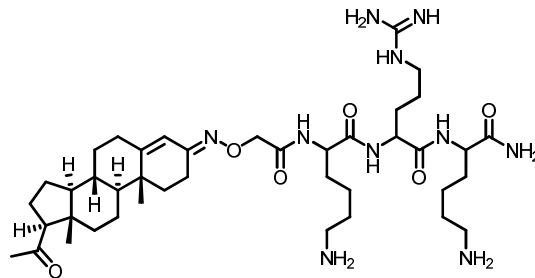


Abbildung 3-44: *E/Z* Prog-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**)

Um die Progesteronbindungsstelle an menschlichen Spermien direkt fluoreszenzoptisch lokalisieren zu können, wurde das Progesteron-Tripeptid **108** zusätzlich mit einer fluoreszierenden Nitrobenzoxadiazol-Gruppe (NBD) jeweils an einen der beiden Lysinreste derivatisiert. Die Inkubation der menschlichen Spermien mit Progesteron-3-CMO-Lys(NBD)-Arg-Lys-NH₂ (**109**) bzw. Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys(NBD)-NH₂ (**110**) (s. Struktur im Abschn. 5.5) führte jedoch zur Einlagerung der NBD-Derivate in die Plasmamembran der Spermien. Eine Lokalisation der Progesteronbindungsstelle war auf diesem Weg nicht möglich. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass das Derivat **109** eine höhere biologische Aktivität als das Derivat **110** hatte. Auf Basis der für die NBD-Derivate erhaltenen Ergebnisse wurde schließlich das in Abb. 3-45 gezeigte Progesteron-Derivat **112** synthetisiert, um als Werkzeug für die Identifizierung der Progesteron-Bindungsstelle eingesetzt zu werden.

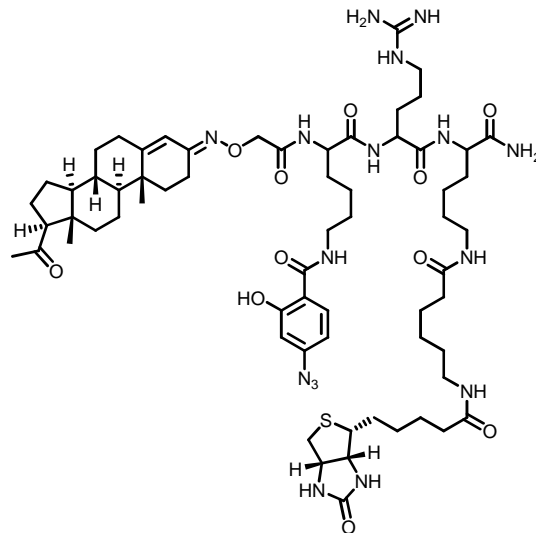


Abbildung 3-45: *E/Z* Progesteron-3-CMO-Lys(ASA)-Arg-Lys(6-(Biotinylamino)hexansäure)-NH₂ (**112**)

Ausgehend von Prog-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**) wurde eine 4-Azidosalicyl-Gruppe (ASA) an das N-terminale Lysin und an das C-terminale Lysin eine Biotinyl-Gruppe gekoppelt. Dem hydrophoben Charakter des Progesteron- und Biotinyl-Rests stehen die hydrophilen Amidgruppen und das freie Arginin gegenüber. Die Hydrophilie von Verbindung **112** war dennoch ausreichend für physiologische Experimente. Durch Bestrahlung mit UV-Licht spaltet sich aus der ASA-Gruppe molekularer Stickstoff ab. Dadurch entsteht eine radikalische Verbindung, die das Molekül kovalent an unmittelbar benachbarte Moleküle (Proteine, aber auch Phospholipide) bindet. Die mit dem Progesteron-Crosslinker modifizierten biotinylierten Proteine konnten über eine Avidin-Säule aufgereinigt werden. Der anschließend durchgeführte Westernblot erlaubte eine Detektion dieser Proteinfraction mittels HRP-gekoppelten Avidins.

Die nachfolgenden Anwendungen erfolgten in der Gruppe von Prof. U. B. KAUPP und wurden von N. Goodwin durchgeführt.⁵⁹ Zunächst wurde das synthetisierte Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**) auf seine biologische Aktivität auf menschliche Spermien getestet. Gemessen wurde die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration. Als Ca²⁺-Indikator wurde hierbei Fluo-4 eingesetzt. Das Progesteron-Tripeptid löste Ca²⁺-Signale wie in Abb. 3-46 gezeigt in menschlichen Spermien aus, d. h. es bindet an den Progesteronrezeptor. Im Vergleich zum Progesteron-3-CMO war die Potenz dieses Derivats allerdings geringer. Dennoch erwies sich die Verbindung als potentes Zellmembran impermeables Progesteron-substituiertes Derivat.

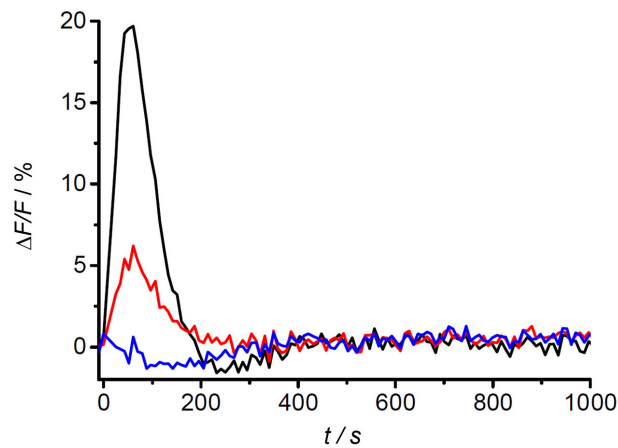


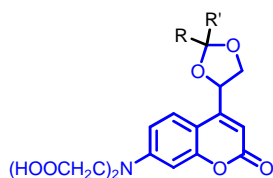
Abbildung 3-46: Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys- NH_2 im *Platereader*: 10 μM (schwarz), 1 μM (rot) und 100 nM (blau). Die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F$) bezieht sich auf die gemittelte Fluoreszenzintensität vor der Stimulation. Zeitpunkt der Injektion $t = 0$ s.

Die Crosslinking-Untersuchungen mit dem Peptid **112** zeigten jedoch, dass nicht die Proteine der Progesteron-Bindestelle, sondern die Proteine mit dem Crosslinker reagierten, die besonders stark exprimiert wurden. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen Rezeptorproteinen und dem Progesteron-Crosslinker konnte nicht beobachtet werden. Für weitere Untersuchungen zur Progesteron-Bindungsstelle sind zurzeit optimierte Progesteron-Crosslinker-Derivate in der Entwicklung.

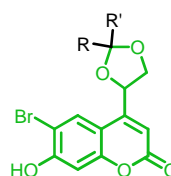
4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neue langwellig anregbare photoaktivierbare Schutzgruppen für Carbonylfunktionen eingeführt und Herstellungsverfahren für entsprechende Synthesebausteine entwickelt. Die geschützten Carbonylverbindungen (*caged* Verbindungen) wurden umfassend photophysikalisch und photochemisch charakterisiert sowie in der Praxis getestet. Die Zielsetzung bestand, neben einer möglichst quantitativen Freisetzung der C=O-Funktionen bei der Photospaltung, zunächst im Design von Schutzgruppen mit möglichst langwelligsten Absorptionsmaxima, hohen Photoeffizienzen sowie einer guten Wasserlöslichkeit.

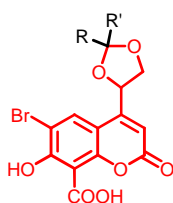
Es wurden überwiegend neue (Cumarin-4-yl)-Derivate synthetisiert und erstmals zum Schutz von Carbonyl-Funktionen erprobt. Die Phototrigger wurden durch Überführung der Aldehyde und Ketone mittels (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diole in cyclische Acetale bzw. Ketale erhalten. Im Vordergrund stand dabei die Verfügbarkeit ausreichender Mengen der Substanzen für anschließende Untersuchungen und nicht die Optimierung jeden einzelnen Syntheseschritts. Die Erprobung der Syntheseschritte erfolgte an strukturell einfachen Carbonylverbindungen und wurde anschließend auf die Synthese von *caged* Verbindungen der Biomoleküle Bourgeonal (Riechstoff, Chemoattraktans) und Progesteron (Hormon, Chemoattraktans) sowie das Derivat Progesteron-3-O-(carboxymethyl)-oxim (Progesteron-3-CMO) übertragen. Das Progesteronmolekül enthält sowohl in 3- als auch in 20-Position eine Carbonylgruppe. Bei der Synthese erhält man ein Gemisch aus beiden Stellungsisomeren. Die Auftrennung und Separation der Stellungsisomeren sowie der jeweils gebildeten Diastereomeren erfolgte durch Flash-Chromatographie und präp. RP-HPLC. Die Zuordnung und Strukturaufklärung erfolgte durch ^1H -, ^{13}C - und 2D-NMR.



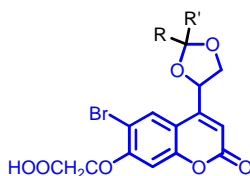
BCMAC-ED-*caged* Carbonylverbindungen
4-{7-[Bis(carboxymethyl)amino]-
cumarin-4-yl]-1,3-dioxolane



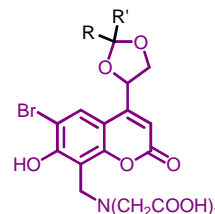
Bhc-ED-*caged* Carbonylverbindungen
4-(6-Brom-7-hydroxy-
cumarin-4-yl)-1,3-dioxolane



BHCC-ED-*caged* Carbonylverbindungen
4-[6-Brom-8-carboxy-7-hydroxycumarin-4-
yl]-1,3-dioxolane



BCC-ED-*caged* Carbonylverbindungen
4-[6-Brom-7-(carboxymethoxy)-
cumarin-4-yl]-1,3-dioxolane



BBHC-ED-*caged* Carbonylverbindungen
4-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-
7-hydroxycumarin-4-yl}-1,3-dioxolane

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten **BCMAC-ED**-, **Bhc-ED**-, **BHCC-ED**- und **BCC-ED-*caged* Carbonylverbindungen** wiesen geringe bis zufriedenstellende photochemische Quantenausbeuten auf. Eine deutliche Erhöhung der photochemischen Quantenausbeute konnte durch Einführung einer Bis(carboxymethyl)aminomethyl-Gruppierung in die 8-Position von dem

6-Brom-7-hydroxycumarin-Chromophor erreicht werden. Das auf Basis dieses Chromophors erstmals eingeführte *caging*-Reagenz **BBHC-ED (62)** erwies sich als optimal für die Schützung von Carbonyl-Funktionen. Für **BBHC-ED-caged** Aldehyde und Ketone wurden relativ hohe photochemische Quantenausbeuten und befriedigende Wiederfindungsraten der Carbonylverbindungen bei gleichzeitig hoher Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen ermittelt.

Die Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen war auch bei den anderen hergestellten *caged* Verbindungen in der Regel für die photochemischen, photophysikalischen und biologischen Studien ausreichend. Auch die Hydrolysestabilität, eine Voraussetzung für die gezielte Freisetzung des Biomoleküls ausschließlich durch Bestrahlung mit Licht, war in allen Fällen gegeben.

Die cumarinyli-substituierten 1,3-Dioxolane fluoreszieren. Ihre Fluoreszenzquantenausbeuten liegen in Abhängigkeit von der Struktur zwischen 0.19 und 0.65 und korrelieren damit mit denen der entsprechenden (Cumarin-4-yl)ethandiole.

Die absorptions- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften sowie die photochemischen Quantenausbeuten der am Cumarin-Chromophor in 7-Position hydroxy-substituierten als cyclisches Acetal oder Ketal-geschützten Carbonylverbindungen sind pH-abhängig. So besitzen die **Bhc-**, **BHCC-** und **BBHC-**substituierten 1,3-Dioxolane die erwünschten bathochrom und hyperchrom verschobenen langwelligen Absorptionsbanden nur bei Vorliegen in der Phenolat-Struktur. Die **BBHC-ED-caged** Verbindungen liegen bei einem pH-Wert von 6.0 noch zu 90 % als Phenolat-Anion vor und haben sogar am unteren Ende des physiologischen pH-Bereichs eine nahezu unverändert hohe Absorption bei 370 nm und damit eine hohe Photosensivität. Dies ist ein wichtiger Vorteil des in dieser Arbeit neu entwickelten **BBHC-ED**-Chromophors. Im Vergleich dazu sind von der bereits beschriebenen **Bhc-ED**-Gruppe abgeleitete *caged* Verbindungen, bedingt durch ihren höheren pK_s -Wert, lediglich 50 % der Spezies bei pH 6.0 deprotoniert.

In dieser Arbeit konnte auch demonstriert werden, dass C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) sensitiv gegenüber der Zwei-Photonen-Photolyse ist. Dies erhöht die Anwendungsbreite der *caged* Verbindung und ermöglicht auch das Arbeiten mit Gewebeschnitten.

Die Geschwindigkeitskonstante für die primäre Photospaltung im ersten Schritt der Photoheterolyse von C_{20} -**Bhc-ED-caged** Progesteron (**93**) wurde durch energieabhängige zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Der erhaltene Wert von $(1.2 \pm 0.5) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ zeigt, dass der erste Schritt der Photospaltung in wenigen Nanosekunden stattfindet. Die schnelle Spaltung stützt den vorgeschlagenen Mechanismus über eine zwitterionische Zwischenstufe. Zum zweiten Schritt der Photoheterolyse, der Freisetzung des Biomoleküls, sind Untersuchungen mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie bei einem Kooperationspartner begonnen worden, konnten aber noch nicht abgeschlossen werden.

Schließlich wurden Phototrigger von Bourgeonal, Progesteron und Progesteron-3-CMO in Untersuchungen zur Chemotaxis menschlicher Spermien bei Kooperationspartnern erfolgreich eingesetzt. Die Photofreisetzung von Progesteron aus **Bhc-ED-caged** Progesteronen (**92**, **93**) und Progesteron-3-CMO aus **Bhc-ED-caged** Progesteron-3-CMO (**107**) löste einen $[Ca^{2+}]$ -Anstieg aus. Messungen zur Photofreisetzung von Bourgeonal aus **82**, **83** und **89** setzten zwar das Biomolekül Bourgeonal frei, eindeutige Aussagen zur Ca^{2+} -Freisetzung und hinsichtlich der Chemotaxis waren jedoch nicht möglich. Dennoch kann festgestellt werden, daß sich die (Cumarin-4-yl)-substituierten

1,3-Dioxolane als exzellente Werkzeuge für die orts- und zeitaufgelöste Untersuchung schneller biologischer Prozesse erwiesen haben. Insbesondere die C_{20} -*caged* Progesterone bieten sich auch für die Untersuchung weiterer nicht-genomischer Progesteronwirkungen, z. B. an Neuronen an.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines geeigneten Werkzeugs zur Aufklärung der Struktur des Proteins, das die nicht-genomische Progesteronantwort in menschlichen Spermien vermittelt. Dafür wurde das Tripeptid Lys-Arg-Lys-NH₂, welches eine hohe Wasserlöslichkeit besitzt, an Progesteron-3-CMO gekoppelt. Zusätzlich wurden an die Seitenketten der Lysine der Crosslinker 4-Azidosalicylsäure sowie ein Biotinyl-Rest oder der Fluoreszenzmarker NBD eingeführt. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Rezeptorprotein und dem Progesteron-Crosslinker-Konstrukt konnte bisher aber nicht nachgewiesen werden. Jedoch erwies sich das zellmembranimpermeable Progesteron-Tripeptid Progesteron-3-CMO-Lys-Arg-Lys-NH₂ (**108**) als interessantes Agens für weitere Untersuchungen am Progesteron-Rezeptor.

Als Ausblick kann das neu entwickelte **BBHC-ED** (**62**) zur Schützung von anderen Carbonylverbindungen verwendet werden und dürfte sich als universelle photoaktivierbare Carbonylschutzgruppe etablieren. Die Untersuchungen zur Anwendbarkeit von C_{20} -**BBHC-ED**-*caged* Progesteron (**99**) bei der Chemotaxis in menschlichen Spermien werden gegenwärtig durchgeführt. Zur Lokalisierung der Bindungsstelle des Progesterons am Rezeptorprotein sind weitere optimierte, spezifisch bindende Progesteron-Crosslinker-Derivate zu entwickeln.

5 Experimenteller Teil

5.1 Physikalische Meßgeräte

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern *Bruker DPX 300* bzw. *Bruker DPX 600* gemessen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, wobei die Kalibrierung auf d_6 -DMSO (^1H : 2.50, ^{13}C : 39.5) bzw. d_4 -MeOH (^1H : 3.31, ^{13}C : 49.0) erfolgte. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale fand gegebenenfalls über zweidimensionale homo- und heteronukleare Spektren (H-H-COSY, TOCSY, HMQC und HMBC) statt – die Numerierung orientiert sich an der Nomenklatur der einzelnen Verbindungen. Alle Signale von Diastereomerenmischungen sind mit ^a gekennzeichnet. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben.

Massenspektroskopie (MS)

Die Massenspektren wurden mit einer LC-MS-Kopplung von einer *Acquity UPLC (Waters)* mit einer ESI-TOF-Einheit *LCT Premier (Waters - Micromass Technologies)* aufgenommen. Die Trennung erfolgte dabei auf einer *Ascentis Express C18* Säule (2.7 μm , 30 mm x 2.1 mm, *Supelco*) bei einer Flussrate von 0.2 ml min⁻¹ mit linearen Gradienten und den Eluenten A H₂O und B MeCN (jeweils mit 0.05 % TFA). Hochauflösende Massenspektren (HRMS) wurden auf einem *Agilent 6210 ESI-TOF (Agilent Technologies)* gemessen. Die Analyse der Proben erfolgte durch Elution mit einem Gemisch von H₂O/MeOH (1/1), versetzt mit 0.1 % HCOOH. Es wurde mit etwa 1 μM Lösungen gearbeitet. Alle Werte sind in atomaren Masseneinheiten m/z angegeben.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit dem FTIR Gerät *Spectrum Spotlight 200 FTIR Microscope system with imaging* von *Perkin Elmer* aufgenommen.

UV-VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung der UV-Spektren erfolgte an einem *Jasco V-630*. Die Fluoreszenzspektren wurden auf einem *Jasco FP-6500* aufgenommen.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem *SMP3* der Firma *Bibby Sterilin Ltd.* bzw. *APA II* der Firma *Schorpp Gerätetechnik* ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

5.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die analytische DC wurde an Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ auf Glasplatten der Firma *Merck* durchgeführt. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 365 nm verwendet.

Säulenchromatographie (SC)

Präparative SC wurde in Normalglassäulen an Kieselgel (Porendurchmesser 60 Å, Partikelgröße 30–60 µm) der Firma *J. T. Baker* als Flash-Chromatographie mit N₂-Überdruck durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungsmittel ist in Volumenanteilen angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die analytische HPLC wurde eine *Hewlett-Packard HP 1100* Anlage, ausgestattet mit einem DAD und einem Fluoreszenzdetektor in Kombination mit einer *EC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 ec* Säule (100 Å, 5 µm, 250 mm x 4 mm, *Macherey-Nagel*) bei RT und einer Flußrate von 1 ml min⁻¹ eingesetzt. Alternativ wurde die analytische HPLC an einem *Shimadzu LC-20* System (Degaser *DGU-20A3*, Autosampler *SIL-20A*, Controller *CBM-20A*), ausgestattet mit einem DAD-UV-Detektor (*SPD-M20A*) und einem Fluoreszenzdetektor (*RF-10AXL*) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden auf einer *EC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 ec* Säule (100 Å, 5 µm, 250 mm x 4 mm, *Macherey-Nagel*) bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ und 40 °C Säulentemperatur durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl, die Probenkonzentration etwa 1 mg ml⁻¹.

Für die präp. HPLC kam ein *Shimadzu LC-8A* System (Controller *SCL-10A*) mit einem UV-Detektor (*SPD-M20A*) zur Anwendung. Die Trennungen wurden auf einer *VP 250/21 Nucleodur 100-5 C18 ec* Säule (100 Å, 5 µm, 250 mm x 21 mm, *Macherey-Nagel*) bei RT und einer Flussrate von 10 ml min⁻¹ durchgeführt.

Es wurde mit linearen Gradienten und den Eluenten A₁ H₂O mit 0.1 % TFA bzw. A₂ H₂O und B MeCN gearbeitet.

5.3 Arbeitsweise, Lösungsmittel und Chemikalien

Synthese

Die Ausgangsverbindungen und Lösungsmittel für die Synthese wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *Lancaster*, *J. T. Baker* bzw. *Riedel-de Haën* bezogen. Für die HPLC wurden MeCN (HPLC grade) von *J. T. Baker* und gereinigtes H₂O (*Milli-Q-Plus* von *Millipore*) verwendet.

Organische Extrakte wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 40 °C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer entfernt. Eventuell verbliebene Lösungsmittelreste wurden im Hochvakuum ($p \leq 10^{-3}$ mbar) entfernt. Substanzen in wässrigen Lösungen, insbesondere nach der präp. HPLC, wurden mit einer *Alpha 1-2* Anlage der Firma *Christ* gefriergetrocknet. Reaktionen mit feuchtigkeits- oder luftempfindlichen Verbindungen wurden in ausgeheizten Glasapparaturen unter Schutzgas (N₂) durchgeführt. Die Trocknung und Aufbewahrung wasserfreier Lösungsmittel erfolgte über Molekularsieb (*Fluka UOP Typ 3A*, Porendurchmesser 3 Å). Alle

synthetischen und analytischen Arbeiten wurden unter Gelblight und in braun gefärbten Glasgefäßen durchgeführt. Der HEPES-Puffer enthielt 10 mM HEPES, 120 mM KCl und wurde mit 2 M KOH-Lösung auf pH 7.2 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend filtriert und autoklaviert.

Peptidsynthese

Die für die SPPS^{2a,99} benötigten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden von *GLS China*, das Harz von *RAPP Polymere* bezogen.

Für die manuelle Synthese wurde von 250 mg Tentagel R RAM Harz (0.2 mmol g^{-1}) ausgegangen. Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit 10 ml 20 % Piperidin/DMF (5 min und 10 min). Die Dde-Abspaltung erfolgte mit 2 % Hydrazin/DMF (3 x 5 ml, je 3 min). Für die Kettenverlängerung wurden nacheinander 4 Äq Fmoc-geschützter Aminosäure, 4 Äq HBTU, 10 ml DMF and 4 Äq DIPEA zum Harz gegeben und die Mischung 30 min bei RT geschüttelt. Zwischen den Schritten wurde das Harz mit DMF (3 x 10 ml, je 1 min) gewaschen. Die Abspaltung vom Harz geschah durch Schütteln mit einer Mischung von 5 ml TFA, 0.2 ml H₂O und 50 mg Phenol innerhalb von 2 h. Anschließend wurde die Lösung filtriert und zu kaltem Et₂O gegeben. Die resultierende Suspension wurde 5 min bei 5000 min^{-1} zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. RP-HPLC.

Photochemische Quantenausbeute

Für alle photochemischen und photophysikalischen Experimente wurden UV- bzw. Fluoreszenz-Quarzküvetten mit einer Weglänge von 1 cm verwendet. Die Photolyse der geschützten Verbindungen in Lösung [$50 \mu\text{M}$ in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95)] wurde mit einer Hochdruck-Quecksilber-Gasentladungslampe (*HBO 500, Oriol*) ausgelöst. Die Lichtintensität wurde bei Bedarf mit einem 10 %-Transmissionsfilter *100FN46-50* begrenzt und einem Metallinterferenzfilter *334FS10-50* bzw. *365FS10-50* monochromatisiert (alle Filter von *Oriel*). Während der Bestrahlung wurden die Lösungen innerhalb der Küvetten mit einem kleinen Magnetrührer homogenisiert. Alternativ wurde Borosilikatglas ($\lambda_c = 325 \text{ nm}$) verwendet (Abb. 5-1).

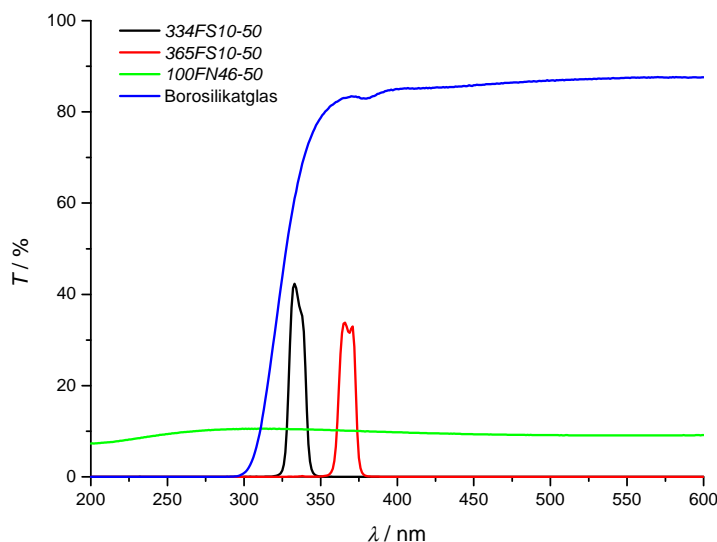


Abbildung 5-1: Transmissionsspektren der verwendeten Filter

Für die kinetischen Untersuchungen wurden die bestrahlten Lösungen mittels HPLC analysiert. Die photochemischen Quantenausbeuten Φ_{chem} wurden durch Vergleich mit *E,E*-1,4-Diphenylbuta-1,3-dien ($\varphi_{\text{chem}} = 0.11$ in *n*-Hexan) bzw. [(6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyl]diethylphosphat als Referenzsubstanzen [$\varphi_{\text{chem}} = 0.08$ in MeCN/HEPES (5/95)]⁸⁸ unter Anwendung von Gleichung 4 in Kapitel 3.3.3 ermittelt. Dabei wurden gleiche Reaktionsvolumina V_R von Probe und Standard bestrahlt.

Zwei-Photonen-Photolyse

Die Zwei-Photonen-Photolyse erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (*LSM 510 META NLO, Carl Zeiss Jena GmbH*), welches mit einem Titan-Saphir-Laser (Cameleon-Dioden-gepumpter Laser, *Coherent*, $\lambda_{\text{exc}} = 755$ nm) ausgestattet war.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Emissionsspektren der Lösungen der cumariny-substituierten Derivate und der bei der Photolyse entstandenen Cumarinylethandiole [10 μM in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95)] wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: Anregungsspaltbreite 3 nm, Emissionsspaltbreite 3 nm, Aufnahmegeschwindigkeit 200 nm min^{-1} , Empfindlichkeit gering bzw. mittel, Auflösung 1.0. Die Korrekturfunktion $Q(\lambda)$, ermittelt durch Quotientenbildung nach Normierung von gemessenem und korrigiertem¹⁰⁰ Emissionsspektrum von Chininhemisulfat in 1 N H_2SO_4 , ist in Abb. 5-2 dargestellt.

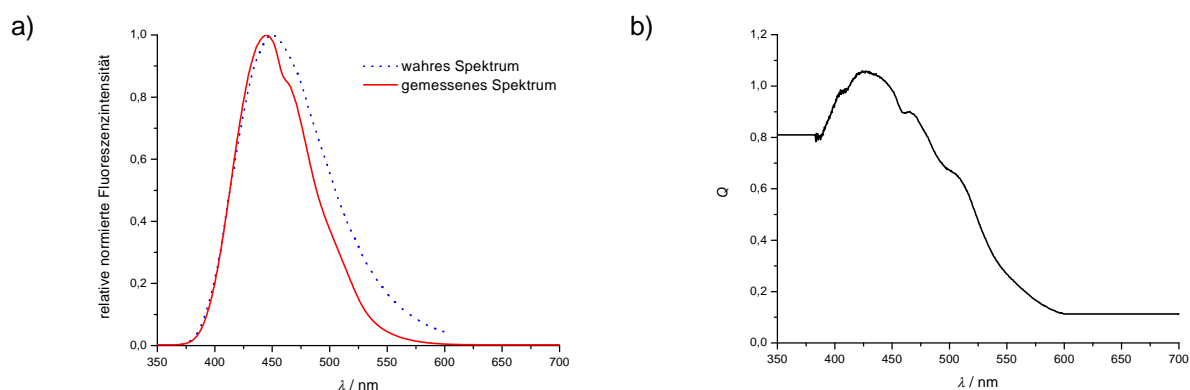


Abbildung 5-2: a) Wahres und gemessenes Emissionsspektrum von Chininhemisulfat-monohydrat in 1 N H_2SO_4 (normiert), b) Korrekturfunktion $Q(\lambda)$ für das verwendete Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenzquantenausbeuten φ_f wurden bei RT durch Vergleich korrigierter Spektren mit Chininhemisulfat-monohydrat (Chinin x 0,5 H_2SO_4 x H_2O) als Referenzsubstanz ($\varphi_f = 0.546$ in 1 N H_2SO_4) nach der relativen Methode bestimmt.¹⁰¹ Bei der Anregungswellenlänge waren die Absorptionen der Lösungen, des Standards und der untersuchten Substanz identisch. Die Brechungsindizes n der Lösungen wurden gemessen und berücksichtigt.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanstiegs- und -abklingkurven wurden im rechten Winkel zum Anregungslicht registriert.¹⁰² Als Anregungsenergiequelle diente ein *MSC 1600* Stickstofflaser von *LTB* ($\lambda_{\text{exc}} = 337$ nm, 0.5 ns Impulsbreite, 0.7 mJ maximale Impulsenergie), dessen Intensität durch Einbau diverser Transmissionsfilter in den Strahlengang abgeschwächt wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde durch eine Sammellinse gebündelt, passierte einen geeigneten Interferenzfilter (**BCMAC**- und **Bhc**-Chromophor: $\lambda_{\text{em}} = 488$ nm) und wurde von einer verstärkten AD 110 Silicium-Avalanche-Diode von *Opto-Electronics* (600 ps Anstiegszeit) detektiert. Alle Signale wurden digitalisiert und in einen *Tektronix TDS 620A* Speicheroszillographen eingespeist.

Zur Bestimmung der Apparatefunktion $AF(t)$ wurde eine MgO-Schicht im 45°-Winkel mit 20 Laserimpulsen bestrahlt und das gemittelte reflektierte Signal aufgezeichnet. $AF(t)$ beinhaltet die Verzerrung eines instantan abklingenden Signals, verursacht durch das endliche Laserimpulsprofil und die Ansprechzeit des Detektorsystems. Die Fluoreszenzsignale der entsprechenden Cumarin-1,2-ethandiole wurden ebenfalls über 20 Laserimpulse gemittelt, während die cumariny-substituierten 1,3-Dioxolane nur mit jeweils einem Laserimpuls angeregt wurden. Die Fluoreszenzlebensdauern (τ_f) der Cumarin-1,2-ethandiole wurden aus ihren Fluoreszenzabklingkurven durch nichtlineare Kurvenanpassung (Faltung von $AF(t)$ mit monoexponentieller Zerfallskinetik) ermittelt. Die erreichte Zeitauflösung betrug ca. 200 ps.

Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten

Die Löslichkeit der hydrophoben *caged* Verbindungen wurde in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95) mit Hilfe der analytischen HPLC untersucht. In einigen Fällen wurde die Sättigungskonzentration ($c_{\text{sätt}}$) bestimmt.

Frisch angesetzte 1 mM Suspensionen der *caged* Verbindungen in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95) wurden zunächst 10 min mit Ultraschall behandelt. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde ein Teil der klaren Lösung abgenommen und verdünnt. Durch Vergleich der ermittelten Peakflächen mit denen bekannter Konzentrationen der entsprechenden Verbindungen mittels analytischer HPLC wurde die Löslichkeit berechnet.

Für die Untersuchung der Hydrolysestabilität wurden die Lösungen vor und nach 24-stündiger Aufbewahrung bei RT im Dunkeln durch HPLC analysiert. Bei allen untersuchten *caged* Verbindungen betrug die Abnahme der Peakfläche unter 1 %, was einer Halbwertszeit von mehr 1000 h entspricht.

5.4 *Arbeitsvorschriften für Ausgangsstoffe und caged Verbindungen*

5.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Methode A: Cumarinsynthese mittels Pechmann-Reaktion

Eine Suspension aus 1 Äq des entsprechenden Resorcinols und 1.5 Äq 4-Chloracetessigsäureethylester in Methansulfonsäure wurde 2 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde anschließend auf Eiswasser gegeben und 1 h nachgerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit 60 ml kaltem H₂O gewaschen und getrocknet.

Methode B: Synthese der Phosphoniumsalze

Das entsprechende 4-(Halogenmethyl)cumarin wurde unter N₂-Atmosphäre mit 2 Äq PPh₃ in MeCN für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene Niederschlag wurde dann abgesaugt, mit 80 ml MeCN nachgewaschen und getrocknet.

Methode C: Wittig-Reaktion zu 4-Vinylcumarinen

1 Äq des Phosphoniumsalzes wurde unter Rühren mit Dioxan, H₂O und einer 36.5%igen Formaldehydlösung versetzt. Es bildete sich sofort eine klare Lösung, in die nach 15 min Rühren bei RT 0.5 Äq K₂CO₃ gegeben wurden. Es wurde 2 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und die Lösung dreimal mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt.

Methode D: Dihydroxylierung

1 Äq des 4-Vinylcumarins wurde in Aceton gelöst und dann mit H₂O versetzt. Anschließend wurde 1 Äq NMO Monohydrat hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde mit 0.1 Äq einer 4%igen OsO₄-Lösung versetzt. Es wurde 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.2 Äq Na₂SO₃ abgebrochen und es wurde 1 h nachgerührt. Anschließend wurde Aceton entfernt und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, eingeeengt und per Flash-SC gereinigt.

Methode E: Acetal- bzw. Ketalbildung

1 Äq des (Cumarin-4-yl)ethan-1,2-diols wurde in 15 ml Toluol gelöst und mit 1 Äq PPTS und 600 mg MgSO₄ unter N₂-Spülung versetzt. Anschließend wurden 3 Äq des Aldehyds bzw. des Ketons hinzugefügt. Es wurde 18 h unter Rückfluss erhitzt, MgSO₄ abfiltriert, das Filtrat eingeeengt und der Rückstand mittels präp. HPLC gereinigt.

Methode F: Spaltung der Methylester-Gruppierung

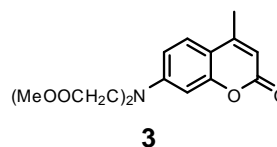
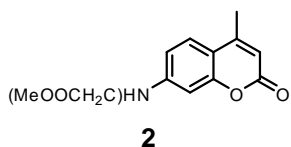
Die Methylester wurden in THF/H₂O (2/1) gelöst. Es wurden 1 Äq bzw. 2 Äq LiOH x H₂O hinzugefügt und für 20 min bei RT gerührt. THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels präp. HPLC gereinigt.

Methode G: Synthese des Mannich-Reagenz' und der BBHC-ED-Derivate

4 mmol Paraformaldehyd und 4 mmol KOH wurden in 10 ml EtOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 4 mmol Iminodiessigsäure-dimethylester-hydrochlorid gegeben und für 1 h bei RT gerührt. Zu diesem frisch hergestellten Mannich-Reagenz wurde anschließend die jeweilige *caged* Verbindung hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 7 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen und Einengen erfolgte die Reinigung mittels präp. HPLC.

5.4.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin und 7-(methoxycarbonylmethylamino)-4-methylcumarin



Zu einer Suspension von 15.0 g (85.6 mmol) 7-Amino-4-methylcumarin in 250 ml MeCN wurden 44.3 g (343 mmol) DIPEA und 12.8 g (85.6 mmol) NaI unter N₂-Atmosphäre hinzugefügt. Dabei bildete sich eine klare Lösung. Nach der Zugabe von 78.6 g (514 mmol) Bromessigsäuremethylester entstand ein farbloser Niederschlag. Der Ansatz wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, das LM am Rotationsverdampfer und überschüssiger Bromessigsäuremethylester am HV entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc/ges. NaCl-Lösung (1/1) aufgenommen und zweimal mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 6/1–1/1) gereinigt. Es wurden 6.20 g (25.0 mmol, 30 %) **2** und 5.50 g (17.0 mmol, 20 %) **3** als hellgelbe Feststoffe isoliert.

2

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.34 (s, 3 H, CH₃), 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.35 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 6.03 (s, 1 H, Cum H-3), 6.51 (d, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-8), 6.63 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.4, 1 H, Cum H-6), 7.53 (d, ³J = 8.9, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 17.9 (CH₃), 51.9 (OCH₃), 52.4 (N(CH₂)₂), 98.3 (Cum C-8), 109.1 (Cum C-6), 109.2 (Cum C-3), 110.1 (Cum C-4a), 126.1 (Cum C-5), 151.0 (Cum C-7), 153.4 (Cum C-4), 154.9 (Cum C-8a), 160.5 (Cum C-2), 170.3 (COOMe).

HRMS 320.1138 ([M+H]⁺), ber. 320.1134

Schmelzpunkt > 65 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.56 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/3)

t_R (HPLC) 12.39 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

3

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.32 (s, 3 H, CH₃), 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 4.05 (d, ³J = 6.0, 2 H, NHCH₂), 5.95 (s, 1 H, Cum H-3), 6.42 (d, ⁴J = 2.0, 1 H, Cum H-8), 6.65 (dd, ³J = 8.8, ⁴J = 2.2, 1 H, Cum H-6), 6.96 (t, ³J = 6.0, 1 H, NH), 7.46 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5).

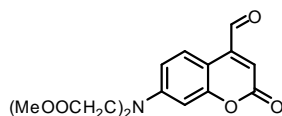
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 18.0 (CH₃), 44.0 (NHCH₂), 51.8 (OCH₃), 97.0 (Cum C-8), 108.1 (Cum C-3), 109.5 (Cum C-4a), 110.3 (Cum C-6), 126.0 (Cum C-5), 151.9 (Cum C-7), 153.7 (Cum C-4), 155.4 (Cum C-8a), 160.6 (Cum C-2), 171.0 (COOMe).

HRMS 248.0927 ([M+H]⁺), ber. 248.0923

Schmelzpunkt > 138 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.62 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/3)

t_R (HPLC) 12.00 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-formylcumarin**4**

5.53 g (17.3 mmol) **2** wurden in 150 ml trockenem *p*-Xylol in der Wärme gelöst. Zu der Lösung wurden 3.84 g (34.6 mmol) gepulvertes SeO₂ gegeben und es wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde zum Entfernen des schwarzen Selens heiß filtriert und der Rückstand noch zweimal mit je 20 ml heißem *p*-Xylol gewaschen. Die tiefbraune Lösung wurde auf etwa 50 ml eingeeengt und über Nacht bei RT zur Kristallisation stehengelassen. Das Produkt wurde abgesaugt und mit wenig *p*-Xylol gewaschen. Aus der Mutterlauge konnte nach Einengen weiteres Produkt isoliert werden. Insgesamt wurden 4.50 g (13.5 mmol, 79 %) **4** als orangefarbener Feststoff isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.37 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 6.62 (d, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-8), 6.72 (dd, ³J = 8.8, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-6), 6.78 (s, 1 H, Cum H-3), 8.23 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5), 10.09 (s, 1 H, CHO).

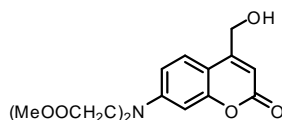
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 51.9 (OCH₃), 52.2 (N(CH₂)₂), 98.6 (Cum C-8), 105.2 (Cum C-4a), 109.9 (Cum C-6), 118.3 (Cum C-3), 126.5 (Cum C-5), 143.7 (Cum C-4), 151.3 (Cum C-7), 156.1 (Cum C-8a), 160.8 (Cum C-2), 170.1 (COOMe), 193.9 (CHO).

HRMS 356.0760 ([M+Na]⁺), ber. 356.0746

Schmelzpunkt > 115 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.80 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) 13.15 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin**5**

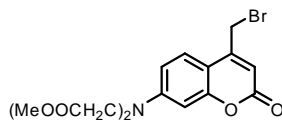
Zu einer Suspension von 4.50 g (13.5 mmol) **4** in 100 ml MeOH wurden 0.51 g (13.5 mmol) NaBH₄ gegeben. Die entstandene Lösung wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend mit 50 ml H₂O versetzt, mit 1 M HCl-Lösung auf pH 5 eingestellt und dreimal mit je 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 40 ml ges. NaCl-Lösung extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 4/1–1/3) gereinigt. Es resultierten 2.21 g (6.56 mmol, 49 %) **4** als hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.34 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 4.68 (s, 2 H, CH₂OH), 5.26 (bs, 1 H, OH), 6.16 (s, 1 H, Cum H-3), 6.53 (d, ⁴J = 1.8, 1 H, Cum H-8), 6.60 (dd, ³J = 8.6, ⁴J = 1.8, 1 H, Cum H-6), 7.47 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 51.9 (OCH₃), 52.3 (N(CH₂)₂), 59.0 (CH₂OH), 98.4 (Cum C-8), 105.2 (Cum C-3), 107.6 (Cum C-4a), 109.1 (Cum C-6), 125.0 (Cum C-5), 150.8 (Cum C-7), 154.9 (Cum C-8a), 156.7 (Cum C-4), 160.8 (Cum C-2), 170.3 (COOMe).

HRMS	336.1081 ($[M+H]^+$), ber. 336.1083
Schmelzpunkt	> 144 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1/2)
t_R (HPLC)	10.47 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-(bromomethyl)cumarin

**6**

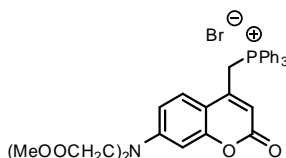
1.13 g (9.88 mmol, 1.5 Äq) Methansulfonylchlorid wurden zu einer eisgekühlten Lösung von **5** (2.21 g, 6.56 mmol) und NEt₃ (1.33 g, 13.2 mmol) in 40 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 0 °C gerührt, dann mit 5%iger wässriger NaHCO₃-Lösung extrahiert und die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Nach Einengen von CH₂Cl₂ wurde der gebildete {7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methylsulfonsäuremethylester ohne weitere Aufreinigung in 35 ml wasserfreiem THF mit 2.29 g (26.3 mmol) LiBr zu **6** umgesetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, dreimal mit ges. NaCl-Lösung (je 30 ml) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde bis auf etwa 10 ml eingeeengt, bis zur Trübung mit *n*-Hexan versetzt und über Nacht bei 6 °C zur Kristallisation stehengelassen. Das Produkt wurde abgesaugt. Insgesamt wurden 1.98 g (4.97 mmol, 76 %) **6** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.37 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 4.79 (s, 2 H, CH₂Br), 6.36 (s, 1 H, Cum H-3), 6.56 (d, ⁴J = 2.1, 1 H, Cum H-8), 6.70 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-6), 7.47 (d, ³J = 8.9, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 28.1 (CH₂Br), 51.9 (OCH₃), 52.3 (N(CH₂)₂), 98.5 (Cum C-8), 107.4 (Cum C-4a), 109.3 (Cum C-6), 110.2 (Cum C-3), 126.1 (Cum C-5), 151.3 (Cum C-7), 151.4 (Cum C-4), 155.5 (Cum C-8a), 160.4 (Cum C-2), 170.2 (C=O).

HRMS	420.0080 ($[M+Na]^+$), ber. 420.0059
Schmelzpunkt	> 194 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.46 (<i>n</i> -Hexan/THF = 1/1)
t_R (HPLC)	14.28 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

{7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl-triphenylphosphoniumbromid

**7**

1.98 g (4.97 mmol) **6** wurden mit 2.61 g (9.88 mmol) PPh₃ nach Methode **B** zum Phosphoniumsalz **7** umgesetzt. Die Reaktion wurde in 20 ml wasserfreiem Toluol durchgeführt. Es wurden 2.20 g (3.42 mmol, 69 %) **7** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.31 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 5.29 (d, ²J = 16.7, 2 H, CH₂PPh₃), 5.78 (d, ⁴J = 3.8, 1 H, Cum H-3), 6.19 (dd, ³J = 9.1, ⁴J = 2.0, 1 H, Cum H-6), 6.49 (d, ⁴J = 2.0, 1 H, Cum H-8), 7.18 (d, ³J = 9.1, 1 H, Cum H-5), 7.68–7.74 (m, 6 H, *o*-Ph), 7.78–7.92 (m, 9 H, *m*-Ph, *p*-Ph).

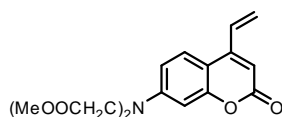
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 24.4 (d, ¹J = 51.1, C_HCH₂PPh₃), 51.9 (OCH₃), 52.3 (N(CH₂)₂), 98.4 (Cum C-8), 108.60, 108.64 (Cum C-4a, Cum C-6), 113.0 (d, ³J = 7.3, Cum C-3), 117.1 (d, ¹J = 87.8, *i*-Ph), 126.4 (Cum C-5), 130.2 (d, ²J = 12.7, *o*-Ph), 134.1 (d, ³J = 10.2, *m*-Ph), 135.3 (d, ⁴J = 2.7, *p*-Ph), 144.1 (d, ²J = 7.9, Cum C-4), 151.3 (Cum C-7), 154.9 (Cum C-8a), 159.2 (d, ⁴J = 3.0, Cum C-2), 170.0 (COOMe).

HRMS 580.1907 (M⁺), ber. 580.1889

Schmelzpunkt > 191 °C (Zers.)

t_R (HPLC) 11.89 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-vinylcumarin



8

2.20 g (3.42 mmol) **7** wurden mit 40 ml einer 36.5%igen Formaldehydlösung in 150 ml Dioxan/20 ml H₂O nach Methode **C** zu dem 4-Vinylcumarin-Derivat **8** umgesetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurden 236 mg (1.71 mmol) K₂CO₃ zugegeben. Die Reinigung mittels Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1–2/1) lieferte 1.86 g (2.59 mmol, 76 %) **8** als gelben Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.36 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 5.79 (d, ³J = 11.5, 1 H, H(*E*)), 6.14 (d, ³J = 17.2, 1 H, H(*Z*)), 6.28 (s, 1 H, Cum H-3), 6.56 (d, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-8), 6.64 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.3, 1 H, Cum H-6), 7.14 (dd, ³J = 17.3, ³J = 11.2, 1 H, CHCH₂), 7.68 (d, ³J = 8.9, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 51.9 (OCH₃), 52.3 (N(CH₂)₂), 98.7 (Cum C-8), 104.8 (Cum C-3), 108.4 (Cum C-4a), 109.3 (Cum C-6), 123.6 (CHCH₂), 125.8 (Cum C-5), 130.1 (CHCH₂), 151.0 (Cum C-4), 151.2 (Cum C-7), 155.3 (Cum C-8a), 160.8 (Cum C-2), 170.3 (COOMe).

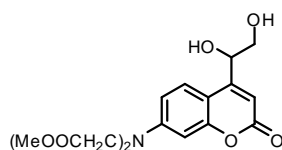
HRMS 332.1139 ([M+H]⁺), ber. 332.1134

Schmelzpunkt > 150 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.56 (*n*-Hexan/THF = 1/1), 0.55 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/3)

t_R (HPLC) 13.03 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin (BMCMAc-ED)



9

1.86 g (2.59 mmol) **8** wurden mit 165 µl (0.26 mmol) einer 4%igen OsO₄-Lösung und 0.35 g (2.59 mmol) NMO in 30 ml Aceton/5 ml H₂O nach Methode **D** zum Diol umgesetzt. Die Reaktion

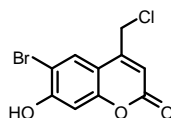
wurde durch Zugabe von 0.39 g (3.11 mmol) Na_2SO_3 gestoppt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1–1/3) wurden 0.76 g (2.08 mmol, 80 %) **9** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.46–3.64 (m, 2 H, $\text{CHH}'\text{OH}$), 3.67 (s, 6 H, OCH_3), 4.35 (s, 4 H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 4.58 (bs, 1 H, CHOH), 4.88–4.95 (m, 2 H, CHOH , $\text{CHH}'\text{OH}$), 6.16 (s, 1 H, Cum H-3), 6.53 (d, $^4J = 2.3$, 1 H, Cum H-8), 6.62 (dd, $^3J = 9.0$, $^4J = 2.3$, 1 H, Cum H-6), 7.63 (d, $^3J = 8.7$, 1 H, Cum H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 51.9 (OCH_3), 52.3 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 65.8 ($\text{CHH}'\text{OH}$), 70.0 (CHOH), 98.5 (Cum C-8), 107.1 (Cum C-3), 108.1 (Cum C-4a), 109.0 (Cum C-6), 125.8 (Cum C-5), 150.7 (Cum C-7), 155.2 (Cum C-8a), 157.3 (Cum C-4), 160.8 (Cum C-2), 170.3 (COOMe).

HRMS	358.0912 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), ber. 358.0903
Schmelzpunkt	> 161 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.10 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1/3)
t_R (HPLC)	9.37 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

6-Brom-4-(chlormethyl)-7-hydroxycumarin²⁸



11

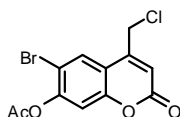
10.0 g 4-Bromresorcinol (52.9 mmol) wurden mit 10.8 ml (79.4 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester in 80 ml Methansulfonsäure nach Methode **A** zum Cumarin umgesetzt. Es wurden 13.8 g (47.9 mmol, 91 %) **11** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 4.98 (s, 2 H, CH_2), 6.46 (s, 1 H, Cum H-3), 6.91 (s, 1 H, Cum H-8), 7.98 (s, 1 H, Cum H-5), 11.52 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 42.2 (CH_2), 103.3 (Cum C-8), 106.2 (Cum C-6), 110.7 (Cum C-4a), 112.1 (Cum C-3), 129.0 (Cum C-5), 150.2 (Cum C-4), 154.1, 157.5 (Cum C-7, Cum C-8a), 159.7 (Cum C-2).

HRMS	288.9261 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 288.9267
Schmelzpunkt	159 °C, kein Schmelzpunkt in der Literatur angegeben
R_f (DC)	0.47 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc (1 % AcOH) = 1/1)
t_R (HPLC)	14.08 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

7-(Acetoxy)-6-brom-4-(chlormethyl)cumarin²⁸



12

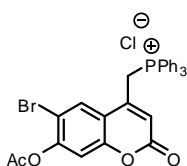
13.0 g (45.2 mmol) **11** wurden in 30 ml DMF gelöst. Es wurden zunächst 4.8 ml (0.06 mmol) Pyridin und anschließend 10.7 ml (11.5 g, 112.9 mmol) Essigsäureanhydrid zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Es wurde 45 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am HV entfernt und der Rückstand per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 4/1–2/1) gereinigt. Es resultierten 11.6 g (35.2 mmol, 78 %) **12** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 2.27 (s, 3 H, CH₃), 5.07 (s, 2 H, CH₂), 6.73 (s, 1 H, Cum H-3), 7.55 (s, 1 H, Cum H-8), 8.19 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (151 MHz, d₆-DMSO): 20.6 (CH₃), 41.1 (CH₂), 111.3 (Cum C-6), 112.9 (Cum C-8), 116.0 (Cum C-3), 116.8 (Cum C-4a), 129.1 (Cum C-5), 149.4 (Cum C-4), 150.1, 153.1 (Cum C-7, Cum C-8a), 159.0 (Cum C-2), 168.0 (COCH₃).

Schmelzpunkt > 167 °C (Zers.)
R_f (DC) 0.70 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)
t_R (HPLC) 15.88 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

[7-(Acetoxy)-6-bromcumarin-4-yl]methyl-triphenylphosphoniumchlorid²⁸



13

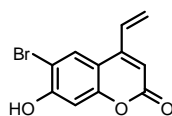
11.0 g (33.3 mmol) **12** wurden mit 17.5 g (66.6 mmol) PPh₃ in 500 ml MeCN nach Methode **B** zum Phosphoniumsalz umgesetzt. Es wurden 14.8 g (24.9 mmol, 75 %) **13** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.33 (s, 3 H, CH₃), 5.61 (d, ²J = 17.0, 2 H, CH₂PPh₃), 6.35 (d, ⁴J = 4.3, 1 H, Cum H-3), 7.40 (s, 1 H, Cum H-8), 7.70–7.73 (m, 7 H, Cum H-5, *o*-Ph), 7.84–7.95 (m, 9 H, *m*-Ph, *p*-Ph).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 20.5 (CH₃), 24.4 (d, ¹J = 49.1, CH₂PPh₃), 110.8 (Cum C-6), 112.4 (Cum C-8), 116.9 (d, ¹J = 86.5, *i*-Ph), 117.7 (d, ³J = 3.3, Cum C-4a), 120.1 (d, ³J = 8.2, Cum C-3), 129.5 (Cum C-5), 130.10 (d, ²J = 12.8, *o*-Ph), 134.1 (d, ³J = 10.9, *m*-Ph), 135.4 (*p*-Ph), 142.7 (d, ²J = 8.7, Cum C-4), 150.0, 152.6 (Cum C-7, Cum C-8a), 159.0 (d, ⁴J = 3.2, Cum C-2), 167.7 (COCH₃).

Schmelzpunkt > 197 °C (Zers.)
t_R (HPLC) 15.99 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-7-hydroxy-4-vinylcumarin²⁸



14

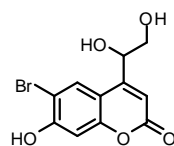
Das Phosphoniumsalz **13** (14.0 g, 23.6 mmol) wurde mit 130 ml einer 36.5%igen Formaldehydlösung in 500 ml Dioxan/100 ml H₂O nach Methode **C** zur Vinylverbindung umgesetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurden 1.63 g (11.8 mmol) K₂CO₃ zugegeben. Der Rückstand wurde per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1–3/1) gereinigt. Es resultierten 4.60 g (17.2 mmol, 73 %) **14** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 5.74 (d, ³J = 11.3, 1 H, H(*E*)), 6.16 (d, ³J = 17.6, 1 H, H(*Z*)), 6.42 (s, 1 H, Cum H-3), 6.90 (s, 1 H, Cum H-8), 7.21 (dd, ³J = 17.7, ³J = 11.6, 1 H, CHCH₂), 8.04 (s, 1 H, Cum H-5), 11.45 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 103.3 (Cum C-8), 106.2 (Cum C-6), 107.1 (Cum C-3), 111.7 (Cum C-4a), 124.2 (CHCH_2), 128.8 (Cum C-5), 129.9 (CHCH_2), 149.7 (Cum C-4), 154.0, 157.4 (Cum C-7, Cum C-8a), 160.1 (Cum C-2).

Schmelzpunkt 185–190 °C
 R_f (DC) 0.41 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)
 t_R (HPLC) 14.20 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin²⁸



15

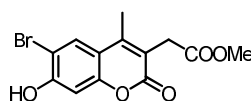
4.00 g (15.0 mmol) **14** wurden mit 955 μl (1.50 mmol) einer 4%igen OsO_4 -Lösung und 2.03 g (15.0 mmol) NMO in 60 ml Aceton/10 ml H_2O nach Methode **D** zum Diol umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.27 g (18.0 mmol) Na_2SO_3 abgebrochen. Die Reinigung per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 4/1–1/2) lieferte 2.98 g (9.76 mmol, 65 %) **15** als farblosen Farbstoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.34–3.60 (m, 2 H, $\text{CHH}'\text{OH}$), 4.90–4.92 (m, 2 H, CHOH , $\text{CHH}'\text{OH}$), 5.72–5.73 (m, 1 H, CHOH), 6.28 (s, 1 H, Cum H-3), 6.89 (s, 1 H, Cum H-8), 8.04 (s, 1 H, Cum H-5), 11.41 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 65.7 ($\text{CHH}'\text{OH}$), 70.1 (CHOH), 103.2 (Cum C-8), 105.9 (Cum C-6), 109.4 (Cum C-3), 111.5 (Cum C-4a), 128.8 (Cum C-5), 154.0 (Cum C-7/8a), 156.6 (Cum C-4), 157.0 (Cum C-7/8a), 160.1 (Cum C-2).

Schmelzpunkt > 196 °C (Zers.)
 R_f (DC) 0.10 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)
 t_R (HPLC) 8.53 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

6-Brom-7-hydroxy-3-(methoxycarbonylmethyl)-4-methylcumarin



17

10.00 g (52.0 mmol) Bromresorcinol wurden mit 12.65 ml (78.0 mmol) Dimethylacetylsuccinat in 80 ml Methansulfonsäure nach Methode **A** zum Cumarin **17** umgesetzt. Die Reinigung per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 7/1–1/4) lieferte 5.10 g (15.6 mmol, 30 %) **17** als farblosen Feststoff.

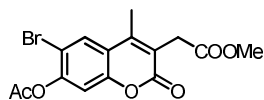
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 2.36 (s, 3 H, CH_3), 3.62 (s, 3 H, COOCH_3), 3.65 (s, 2 H, CH_2), 6.89 (s, 1 H, Cum H-8), 7.95 (s, 1 H, Cum H-5), 11.37 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 15.1 (CH_3), 32.4 (CH_2), 51.8 (COOCH_3), 102.8 (Cum C-8), 106.2 (Cum C-6), 113.6 (Cum C-4a), 116.1 (Cum C-3), 129.4 (Cum C-5), 148.9 (Cum C-4), 152.2 (Cum C-7/8a), 156.8 (Cum C-7/8a), 160.5 (Cum C-2), 170.5 (COOCH_3).

Schmelzpunkt > 123 °C (Zers.)
 R_f (DC) 0.51 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 12.65 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-(Acetoxy)-6-Brom-3-(methoxycarbonylmethyl)-4-methylcumarin



19

5.00 g (15.3 mmol) **17** wurden in 20 ml DMF gelöst. Es wurden zunächst 2.0 ml (0.02 mmol) Pyridin und anschließend 2.89 ml (30.6 mmol) Essigsäureanhydrid zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Es wurde für 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am HV entfernt und der Rückstand per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 8/1–1/1) gereinigt. Es resultierten 3.50 g (9.49 mmol, 62 %) **19** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.25 (s, 3 H, OCH₃), 2.41 (s, 3 H, CH₃), 3.60 (s, 3 H, COOCH₃), 3.69 (s, 2 H, CH₂), 6.81 (s, 1 H, Cum H-8), 7.95 (s, 1 H, Cum H-5).

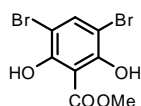
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 15.1 (CH₃), 20.8 (OCH₃), 32.4 (CH₂), 51.8 (COOCH₃), 102.8 (Cum C-8), 106.2 (Cum C-6), 113.6 (Cum C-4a), 116.1 (Cum C-3), 129.4 (Cum C-5), 148.9 (Cum C-4), 152.2 (Cum C-7/8a), 156.8 (Cum C-7/8a), 160.5 (Cum C-2), 170.5 (COOCH₃).

Schmelzpunkt > 130 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.26 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) 14.29 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

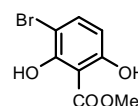
3,5-Dibrom-2,6-dihydroxybenzoesäuremethylester¹⁰³ dihydroxybenzoesäuremethylester¹⁰⁴



29

und

3-Brom-2,6-



30

20.0 g (0.12 mol) 2,6-Dihydroxybenzoesäuremethylester wurden in 250 ml CCl₄ gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Zugabe von 9.15 ml (0.18 mol) Brom erfolgte tropfenweise unter Kühlung. Nach beendeter Zugabe wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 10/1–6/1) gereinigt. Es resultierten 3.0 g **29** (9.20 mmol, 8 %) und 12.0 g (48.6 mmol, 40 %) **30** als farblose Feststoffe.

29

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.90 (s, 3 H, CH₃), 7.89 (s, 1 H, H-4), 10.43 (bs, 2 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 53.1 (CH₃), 101.1 (C-3 und C-5), 108.1 (C-1), 138.3 (C-4), 153.7 (C-2 und C-6), 167.4 (COOMe).

HRMS 322.8543 ([M-H]⁻), ber. 322.8560

Schmelzpunkt > 109 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.32 (*n*-Hexan/EtOAc = 5/1)

t_R (HPLC) 17.91 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

30

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.85 (s, 3 H, CH₃), 6.41 (d, 1 H, ³J = 8.8, H-4), 7.46 (d, 1 H, ³J = 9.0, H-3), 10.32 (bs, 2 H, OH).

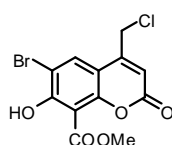
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 52.5 (CH₃), 99.4 (C-3), 107.6 (C-1), 109.2 (C-5), 136.0 (C-4), 154.2 (C-2/6), 158.0 (C-2/6), 168.9 (COOMe).

HRMS 268.9421 ([M+Na]⁺), ber. 268.9425

Schmelzpunkt > 95 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.21 (*n*-Hexan/EtOAc = 5/1)

t_R (HPLC) 15.82 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-4-(chloromethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin**31**

5.0 g (20.2 mmol) **30** wurden mit 4.12 ml (30.3 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester in 60 ml Methansulfonsäure nach Methode **A** zum Cumarin umgesetzt. Der Ansatz wurde 24 h bei RT gerührt. Es wurden 5.6 g (16.1 mmol, 80 %) **31** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.90 (s, 3 H, CH₃), 5.02 (s, CH₂), 6.55 (s, 1 H, Cum H-3), 8.14 (s, 1 H, Cum H-5), 11.42 (bs, 1 H, OH).

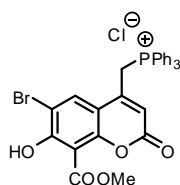
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 41.2 (CH₂), 53.0 (OCH₃), 107.6 (Cum C-6), 111.0 (Cum C-4), 112.2 (Cum C-8), 112.8 (Cum C-3), 130.4 (Cum C-5), 150.0 (Cum C-4a), 151.0, 154.6 (Cum C-7, Cum C-8a), 158.7 (Cum C-2), 163.9 (COOMe).

HRMS 368.9141 ([M+Na]⁺), ber. 368.9154

Schmelzpunkt > 113 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.64 (*n*-Hexan/EtOAc (1 % AcOH) = 2/1)

t_R (HPLC) 16.27 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

[6-Brom-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin-4-yl]-methyl-triphenylphosphoniumchlorid**32**

3.00 g (8.63 mmol) **31** wurden mit 4.53 g (17.3 mmol) PPh₃ in 150 ml CH₂Cl₂ in N₂-Atmosphäre 5 d unter Rückfluss erhitzt. Das LM wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand ohne weitere Reinigung zur Vinylverbindung **32** umgesetzt.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.86 (s, 3 H, CH₃), 5.38 (d, ²J = 17.0, 2 H, CH₂PPh₃), 6.07 (d, ⁴J = 3.6, 1 H, Cum H-3), 7.63 (s, 1 H, Cum H-5), 7.72–7.76 (m, 6 H, *o*-Ph), 7.83–7.90 (m, 9 H, *m*-Ph, *p*-Ph).

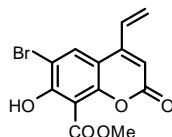
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 24.6 (d, $^1J = 53.7$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{PPh}_3$), 52.9 (OCH₃), 107.2 (Cum C-6), 110.7 (Cum C-8), 112.0 (d, $^3J = 3.7$, Cum C-4a), 116.8 (d, $^3J = 8.4$, Cum C-3), 116.9 (d, $^1J = 86.0$, *i*-Ph), 130.1 (d, $^2J = 12.8$, *o*-Ph), 130.8 (Cum C-5), 134.1 (d, $^3J = 10.4$, *m*-Ph), 135.4 (*p*-Ph), 143.0 (d, $^2J = 8.4$, Cum C-4), 150.6, 154.6 (Cum C-7, Cum C-8a), 157.7 (d, $^4J = 3.2$, Cum C-2), 163.8 ($\underline{\text{C}}\text{OOMe}$).

HRMS 573.0504 (M^+), ber. 573.0461

Schmelzpunkt > 181 °C (Zers.)

t_{R} (HPLC) 12.84 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)-4-vinylcumarin



33

2.00 g (3.28 mmol) des Phosphoniumsalzes **32** wurden mit 50 ml einer 36.5%igen Formaldehydlösung in 200 ml Dioxan/30 ml H₂O nach Methode **C** in das Vinylderivat **33** überführt. Nach 15 min Rühren bei RT wurden 226 mg (1.64 mmol) K₂CO₃ zugegeben. Vor dem Entfernen des Dioxans am Rotationsverdampfer wurde der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7 eingestellt. Der Rückstand wurde per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1–2/1) gereinigt. Es resultierten 1.00 g (3.08 mmol, 94 %) **33** als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.90 (s, 3 H, CH₃), 5.76 (d, $^3J = 11.1$, 1 H, H(*E*)), 6.19 (d, $^3J = 17.1$, 1 H, H(*Z*)), 6.51 (s, 1 H, Cum H-3), 7.24 (dd, $^3J = 17.1$, $^3J = 11.1$, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$), 8.39 (s, 1 H, Cum H-5), 11.34 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 52.9 (CH₃), 107.67, 107.68 (Cum C-3, Cum C-6), 111.3 (Cum C-8), 111.9 (Cum C-4a), 124.6 ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$), 129.7 ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$), 130.1 (Cum C-5), 149.6 (Cum C-4), 150.9, 154.4 (Cum C-7, Cum C-8a), 159.2 (Cum C-2), 164.1 ($\underline{\text{C}}\text{OOMe}$).

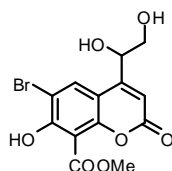
HRMS 346.9524 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), ber. 346.9531

Schmelzpunkt > 136 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.40 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_{R} (HPLC) 16.00 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin



34

1.00 g (3.08 mmol) **33** wurden mit 196 μl (0.308 mmol) einer 4%igen OsO₄-Lösung und 0.42 g (3.08 mmol) NMO in 25 ml DMF/3 ml H₂O nach Methode **D** zum Diol **34** umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.47 g (3.70 mmol) Na₂SO₃ abgebrochen. Die Reinigung per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 5/1–1/2) lieferte 750 mg (2.09 mmol, 68 %) **34** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.55–3.63 (m, 2 H, CHH'OH), 3.90 (s, 3 H, CH₃), 4.91–4.95 (m, 2 H, CHOH, CHH'OH), 5.72 (bs, 1 H, CHOH), 6.35 (s, 1 H, Cum H-3), 8.20 (s, 1 H, Cum H-5), 11.29 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 52.9 (CH₃), 65.6 (CHH'OH), 70.0 (CHOH), 107.3 (Cum C-6), 110.1 (Cum C-3), 111.2 (Cum C-8), 111.9 (Cum C-4a), 130.5 (Cum C-5), 150.7, 153.8 (Cum C-7, Cum C-8a), 156.5 (Cum C-4), 159.1 (Cum C-2), 164.1 (COOMe).

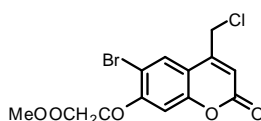
HRMS 380.9595 ([M+Na]⁺), ber. 380.9586

Schmelzpunkt > 144 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.18 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 10.27 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-4-(chloromethyl)-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin



35

Zu einer Lösung von 20.0 g (69.1 mmol) **11** in 100 ml DMF wurden 9.63 ml (69.1 mmol) NEt₃ hinzugefügt. Nach der Zugabe von 9.08 ml (103.6 mmol) Chloressigsäuremethylester wurde der Ansatz 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 7/1–1/1) gereinigt. Es wurden 12.2 g (33.7 mmol, 49 %) **35** als farbloser Feststoff isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.72 (s, 3 H, CH₃), 5.03 (s, 2 H, CH₂Cl), 5.09 (s, 2 H, OCH₂), 6.57 (s, 1 H, Cum H-3), 7.25 (s, 1 H, Cum H-8), 8.09 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 41.2 (CH₂Cl), 52.1 (CH₃), 65.7 (OCH₂), 102.1 (Cum C-8), 106.8 (Cum C-6), 112.1 (Cum C-4a), 113.3 (Cum C-3), 129.0 (Cum C-5), 149.9 (Cum C-4), 154.1 (Cum C-8a), 156.6 (Cum C-7), 159.5 (Cum C-2), 168.2 (COOMe).

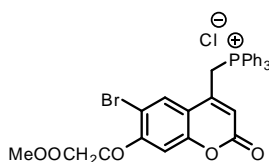
HRMS 382.9312 ([M+Na]⁺), ber. 382.9298

Schmelzpunkt > 148 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.59 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 15.90 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

[6-Brom-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin-4-yl]methyl-triphenylphosphoniumchlorid



36

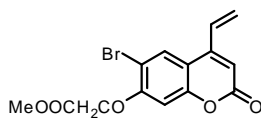
3.00 g (8.30 mmol) **35** wurden mit 4.35 g (16.6 mmol) PPh₃ in 150 ml CH₂Cl₂ in N₂-Atmosphäre 6 d unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die im Rückstand befindliche Verbindung **30** ohne weitere Reinigung zu der Vinylverbindung **36** umgesetzt.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.72 (s, 3 H, CH₃), 5.03 (s, 2 H, OCH₂), 5.44 (d, ²J = 16.8, 2 H, CH₂PPh₃), 6.10 (d, ⁴J = 4.1, 1 H, Cum H-3), 7.13 (s, 1 H, Cum H-8), 7.58 (s, 1 H, Cum H-5), 7.71–7.76 (m, 6 H, o-Ph), 7.83–7.93 (m, 9 H, m-Ph, p-Ph).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 24.4 (d, ¹J = 50.2, CH₂PPh₃), 52.0 (CH₃), 65.6 (OCH₂), 101.6 (Cum C-8), 106.5 (Cum C-6), 113.2 (d, ³J = 2.7, Cum C-4a), 116.9 (d, ¹J = 86.6, i-Ph), 117.2 (d, ³J = 8.7, Cum C-3), 129.4 (Cum C-5), 130.1 (d, ²J = 13.1, o-Ph), 134.1 (d, ³J = 10.8, m-Ph), 135.4 (p-Ph), 143.1 (d, ²J = 8.9, Cum C-4), 153.7 (Cum C-8a), 156.6 (Cum C-7), 158.4 (d, ⁴J = 3.0, Cum C-2), 163.0 (COOMe).

HRMS 587.0642 (M⁺), ber. 587.0617
Schmelzpunkt 178 °C
t_R (HPLC) 13.53 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-7-(methoxycarbonylmethoxy)-4-vinylcumarin



37

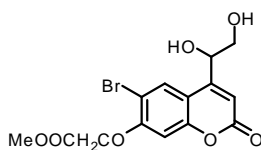
2.00 g (3.21 mmol) **36** wurden mit 40 ml einer 36.5%igen Formaldehydlösung in 130 ml Dioxan/25 ml H₂O nach Methode **C** zum Alken umgesetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurden 221 mg (1.61 mmol) K₂CO₃ zugegeben. Der pH-Wert wurde vor dem Entfernen des Dioxans am Rotationsverdampfer mit 1 N HCl auf 7 eingestellt. Der Rückstand wurde per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1–4/1) gereinigt. Es resultierten 0.95 g (2.80 mmol, 88 %) **37** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.70 (s, 3 H, CH₃), 5.03 (s, 2 H, OCH₂), 5.79 (d, ³J = 11.2, 1 H, H(*E*)), 6.13 (d, ³J = 17.3, 1 H, H(*Z*)), 6.21 (s, 1 H, Cum H-3), 7.12 (s, 1 H, Cum H-8), 7.18 (dd, ³J = 17.3, ³J = 11.2, 1 H, CHCH₂), 7.63 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 51.8 (CH₃), 65.3 (OCH₂), 102.0 (Cum C-8), 106.5 (Cum C-6), 112.2 (Cum C-4a), 113.6 (Cum C-3), 125.3 (CHCH₂), 129.1 (CHCH₂), 129.4 (Cum C-5), 148.9 (Cum C-4), 154.3 (Cum C-8a), 156.9 (Cum C-7), 159.5 (Cum C-2), 169.2 (COOMe).

HRMS 360.9678 ([M+Na]⁺), ber. 360.9688
Schmelzpunkt > 148 °C (Zers.)
R_f (DC) 0.60 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/3)
t_R (HPLC) 15.63 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin



38

0.95 g (2.80 mmol) **37** wurden mit 178 µl (0.28 mmol) einer 4%igen OsO₄-Lösung und 0.38 g (2.80 mmol) NMO in 25 ml Aceton/3 ml H₂O nach Methode **D** zum Diol umgesetzt. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 0.42 g (3.36 mmol) Na₂SO₃ abgebrochen. Die Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 7/1–2/1) lieferte 0.40 g (1.07 mmol, 38 %) **38** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.57–3.68 (m, 2 H, CHH'OH), 3.72 (s, 3 H, CH₃), 4.88–4.96 (m, 2 H, CHOH, CHH'OH), 5.08 (s, 2 H, OCH₂), 5.75–5.77 (m, 1 H, CHOH), 6.37 (s, 1 H, Cum H-3), 6.37 (s, 1 H, Cum H-8), 7.20 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 52.0 (CH₃), 65.56, 65.59 (CHH'OH und OCH₂), 70.1 (CHOH), 101.9 (Cum C-8), 106.5 (Cum C-6), 110.6 (Cum C-3), 112.9 (Cum C-4a), 129.1 (Cum C-5), 154.0 (Cum C-8a), 156.1 (Cum C-7), 156.4 (Cum C-4), 159.9 (Cum C-2), 168.2 (COOMe).

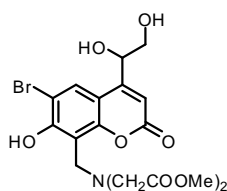
HRMS 394.9742 ([M+Na]⁺), ber. 394.9742

Schmelzpunkt > 128 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.24 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 10.25 min (50–95 % B in A₁, 0–20 min)

8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin



39

301 mg (1.00 mmol) **15** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 286 mg (0.60 mmol, 60 %) **39** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.50–3.55, 3.58–3.60 (m, 2 H, CHH'-OH), 3.62 (s, 4 H, NCH₂COOMe), 3.66 (s, 6 H, OCH₃), 4.18 (s, 2 H, CH₂NCH₂), 4.91 (m, 1 H, CHOH), 6.30 (s, 1 H, Cum H-3), 8.03 (s, 1 H, Cum H-5), 11.65 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 47.8 (CH₂NCH₂), 51.8 (OCH₃), 53.6 (CH₂COOMe), 65.6 (CHH'OH), 70.0 (CHOH), 105.9 (Cum C-6), 109.3 (Cum C-3), 110.3 (Cum C-8), 111.4 (Cum C-4a), 127.9 (Cum C-5), 151.8, 156.6 (Cum C-7, Cum C-8a), 156.8 (Cum C-4), 159.8 (Cum C-2), 171.1 (COOMe).

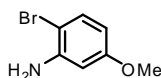
HRMS 496.0232 ([M+Na]⁺), ber. 496.0219

Schmelzpunkt 145 °C

R_f (DC) 0.21 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 11.70 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

3-Amino-4-bromanisol¹⁰⁵



41

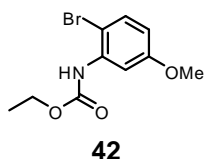
Eine Lösung von 2.0 g (8.62 mmol) 4-Brom-3-nitroanisol in 25 ml EtOH wurde mit 3 ml 35%iger HCl und danach mit 1.4 g (25.9 mmol) Eisenpulver versetzt. Es wurde 6 h unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde zentrifugiert und dekantiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 9/1– 2/1) gereinigt. Es resultierten 1.5 g (7.42 mmol, 86 %) **41** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.66 (s, 3 H, CH₃), 4.92 (bs, 2 H, NH₂), 6.11 (dd, ³J = 8.8, ⁴J = 2.9, 1 H, H-6), 6.39 (d, ⁴J = 2.9, 1 H, H-2), 7.19 (d, ³J = 8.8, 1 H, H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 54.9 (CH₃), 98.7 (C-4), 100.4 (C-2), 103.9 (C-6), 132.4 (C-5), 146.5 (C-3), 159.6 (C-1).

HRMS	201.9864 ([M+H] ⁺), ber. 201.9868
Schmelzpunkt	128 °C
R_f (DC)	0.53 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 4/1)
t_R (HPLC)	13.17 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

4-Brom-3-(ethoxycarbonylamino)anisol¹⁰⁶



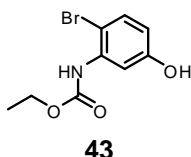
2.0 g (9.89 mmol) **41** wurden in 60 ml THF unter N₂-Spülung gelöst. Anschließend wurden 1.19 ml (14.8 mmol) Pyridin hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf 3 °C gekühlt und es wurden 0.94 ml (9.89 mmol) Chlorameisensäureethylester langsam hinzugegropft, so dass die Temperatur nicht über 10 °C anstieg. Es wurde für 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 50 ml H₂O versetzt. Es wurde dreimal mit je 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die im Rückstand befindliche Verbindung **42** wurde ohne weitere Reinigung zu der Verbindung **43** umgesetzt.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.23 (t, ³J = 7.1, 3 H, CH₂CH₃), 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 4.11 (q, ³J = 7.1, 2 H, CH₂CH₃), 6.72 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.9, 1 H, H-6), 7.17 (d, ⁴J = 2.8, 1 H, H-2), 7.50 (d, ³J = 8.8, 1 H, H-2), 8.75 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 14.5 (CH₂CH₃), 55.5 (OCH₃), 60.6 (OCH₂CH₃), 108.2 (C-4), 111.8 (C-2), 112.4 (C-6), 132.8 (C-5), 137.1 (C-3), 153.9 (COOEt), 158.9 (C-1).

HRMS	295.9907 ([M+Na] ⁺), ber. 295.9898
Schmelzpunkt	89 °C
R_f (DC)	0.38 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 4/1)
t_R (HPLC)	15.84 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

4-Brom-3-(ethoxycarbonylamino)phenol



67.7 ml (67.7 mmol) einer 1 M BBr₃-Lösung in CH₂Cl₂ wurden bei -78 °C vorgelegt. Eine Lösung von 1.30 g (4.74 mmol) **42** in 20 ml CH₂Cl₂ wurde unter N₂-Spülung langsam zugetropft. Es wurde 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde auf Eiswasser gegeben und dreimal mit je 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die Reinigung mittels Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 6/1–1/1) lieferte 0.8 g (3.08 mmol, 65 %) **43** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.23 (t, ³J = 7.1, 3 H, CH₂CH₃), 4.10 (q, ³J = 7.1, 2 H, CH₂CH₃), 6.53 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.9, 1 H, H-6), 7.04 (d, ⁴J = 2.8, 1 H, H-2), 7.36 (d, ³J = 8.9, 1 H, H-5), 8.60 (s, 1 H, NH), 9.73 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 14.5 (CH₂CH₃), 60.5 (CH₂CH₃), 106.0 (C-4), 112.9 (C-2), 113.9 (C-6), 132.7 (C-5), 136.8 (C-3), 153.8 (COOEt), 157.1 (C-1).

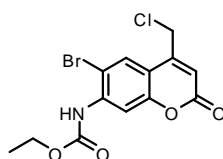
HRMS 281.9746 ([M+Na]⁺), ber. 281.9742

Schmelzpunkt 95 °C

R_f (DC) 0.33 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) 13.13 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

6-Brom-4-(chlormethyl)-7-(ethoxycarbonylamino)cumarin



44

500 mg (1.92 mmol) **43** wurden mit 0.39 ml (2.88 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester in 5.0 ml Methansulfonsäure nach Methode **A** umgesetzt. Die Reaktion wurde in 70%iger H₂SO₄ durchgeführt. Es wurde 20 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 350 mg (0.97 mmol, 50 %) **44** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.23 (t, ³J = 7.2, 3 H, CH₂CH₃), 4.18 (q, ³J = 7.2, 2 H, CH₂CH₃), 5.04 (s, 2 H, CH₂Cl), 6.64 (s, 1 H, Cum H-3), 7.75 (s, 1 H, Cum H-8), 8.10 (s, 1 H, Cum H-5), 9.12 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 14.4 (OCH₂CH₃), 41.0 (CH₂-Cl), 61.2 (OCH₂CH₃), 111.2 (Cum C-6), 111.6 (Cum C-8), 114.7, 114.8 (Cum C-4a, Cum C-3), 128.8 (Cum C-5), 139.6 (Cum C-7), 149.5 (Cum C-4), 152.8 (Cum C-8a), 153.5 (COOEt), 159.3 (Cum C-2).

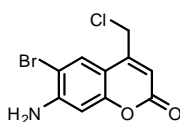
HRMS 381.9462 ([M+Na]⁺), ber. 381.9458

Schmelzpunkt 196 °C

R_f (DC) 0.52 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) 15.73 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-Amino-6-brom-4-(chlormethyl)cumarin



45

350 mg (0.97 mmol) **44** wurden in 2 ml konz. H₂SO₄ und 2 ml AcOH aufgenommen. Der Ansatz wurde 2 h bei 125 °C gerührt und dann auf Eiswasser gegeben. Der pH-Wert wurde auf 9 eingestellt, der Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 180 mg (0.63 mmol, 67 %) **45** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 4.93 (s, 2 H, CH₂Cl), 6.28 (s, 1 H, Cum H-3), 6.33 (bs, 2 H, NH₂), 6.69 (s, 1 H, Cum H-8), 7.84 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 41.2 (CH₂Cl), 100.1 (Cum C-8), 103.7 (Cum C-6), 107.7 (Cum C-4a), 109.5 (Cum C-3), 128.7 (Cum C-5), 149.6, 150.4 (Cum C-7, Cum C-8a), 154.5 (Cum C-4), 160.0 (Cum C-2).

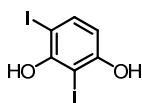
HRMS 286.9320 ([M+Na]⁺), ber. 286.9349

Schmelzpunkt 178 °C

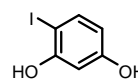
R_f (DC) 0.40 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) 13.72 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

1,3-Dihydroxy-2,4-diiodbenzol¹⁰⁷ und 1,3-Dihydroxy-4-iodbenzol¹⁰⁸



51



52

250 mg (2.27 mmol) Resorcinol wurden in Et₂O aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Die Zugabe von 85.3 µl (1.70 mmol) ICl erfolgte tropfenweise unter Kühlung. Nach beendeter Zugabe wurde das LM im Vakuum entfernt und mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) gereinigt. Es resultierten 180 mg (0.50 mmol, 22 %) **51** und 217 mg (0.92 mmol, 41 %) **52** als farblose Feststoffe.

51

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 6.29 (d, 3J = 8.5, 1 H, H-6), 7.45 (d, 3J = 8.5, 1 H, H-5), 9.15, 10.40 (s, 2 H, OH-1, OH-3).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 72.9 (C-4), 78.2 (C-2), 109.3 (C-6), 138.0 (C-5), 156.1 (C-3), 158.4 (C-1).

HRMS 360.8214 ([M-H]⁻), ber. 360.8222

Schmelzpunkt 80 °C

R_f (DC) 0.28 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 13.52 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

52

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 6.08 (dd, ⁴J = 2.4, ³J = 8.7, 1 H, H-6), 6.39 (d, ⁴J = 2.4, 1 H, H-2), 7.35 (d, ³J = 8.6, 1 H, H-5), 9.44, 10.04 (s, 2 H, OH-1, OH-3).

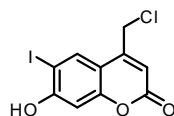
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 71.0 (C-4), 102.7 (C-2), 109.2 (C-6), 138.5 (C-5), 157.2 (C-3), 158.8 (C-1).

HRMS 234.9249 ([M-H]⁻), ber. 234.9256

Schmelzpunkt 67–71 °C

R_f (DC) 0.21 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 11.64 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-(Chlormethyl)-7-hydroxy-6-iodcumarin**53**

217 mg (0.92 mmol) **52** wurden mit 0.19 ml (1.38 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester in 5 ml Methansulfonsäure nach Methode **A** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 8.0 mg (0.02 mmol, 3 %) **53** als farblosen Feststoff.

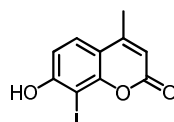
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 4.99 (s, 2 H, CH₂Cl), 6.44 (s, 1 H, Cum, H-3), 6.85 (s, 1 H, Cum, H-8), 8.14 (s, 1 H, Cum, H-5), 11.55 (s, 1 H, OH).

HRMS 358.8955 ([M+Na]⁺), ber. 358.8948

Schmelzpunkt 129 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.27 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 14.68 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-Methyl-7-hydroxy-8-iodcumarin**58**

250 mg (1.42 mmol) **57** wurden mit 71.2 µl (1.42 mmol) ICl in Gegenwart von 5.58 mg (0.01 mmol) Cerammoniumnitrat umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 60.0 mg (0.20 mmol, 14 %) **58** als farblosen Feststoff.

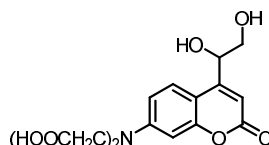
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.37 (s, 3 H, CH₃), 5.46 (s, 1 H, OH), 6.38 (s, 1 H, Cum, H-3), 6.77 (dd, ³J = 8.9, 1 H, Cum H-6), 7.82 (d, ³J = 8.9, 1 H, Cum H-5). 5.46 (s, 1 H, OH)

HRMS 324.9331 ([M+Na]⁺), ber. 324.9338

Schmelzpunkt 155 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.23 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) 12.22 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

7-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin**59**

50 mg (0.14 mmol) **9** wurden nach Methode **F** mit 11.7 mg (0.28 mmol) LiOH x H₂O in 6 ml THF/3 ml H₂O umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 30 mg (0.09 mmol, 64 %) **59** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.45–3.53, 3.58–3.64 (m, 2 H, CHH'OH), 4.22 (s, 4 H, N(CH₂)₂), 4.87–4.94 (m, 2 H, CHOH, CHH'OH), 6.15 (s, 1 H, Cum C-3), 6.45 (s, 1 H, Cum H-8), 6.58 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-6), 7.64 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5).

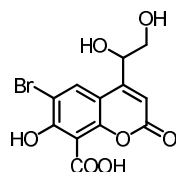
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 53.2 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 65.8 ($\text{CHH}'\text{OH}$), 70.4 (CHOH), 98.7 (Cum C-8), 106.8 (Cum C-3), 108.9 (Cum C-4a), 109.4 (Cum C-6), 126.1 (Cum C-5), 150.9 (Cum C-7), 155.2 (Cum C-8a), 157.4 (Cum C-4), 161.2 (Cum C-2), 171.8 (COOH).

HRMS 338.0881 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 338.0876

Schmelzpunkt 196 °C

t_{R} (HPLC) 6.20 min, 6.44 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

6-Brom-8-carboxy-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin



60

50 mg (0.14 mmol) **34** wurden nach Methode **F** mit 5.9 mg (0.14 mmol) $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ in 6 ml THF/3 ml H_2O umgesetzt. Es wurde 20 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5 % B in A_1 , 0–60 min) lieferte 28 mg (0.08 mmol, 58 %) **60** als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.58–3.66 (m, 2 H, $\text{CHH}'\text{OH}$), 4.88–4.96 (m, 2 H, CHOH , $\text{CHH}'\text{OH}$), 5.70 (bs, 1 H, CHOH), 6.33 (s, 1 H, Cum H-3), 8.02 (s, 1 H, Cum H-5), 11.68 (bs, 1 H, OH).

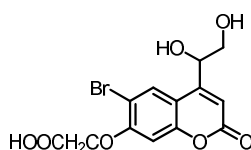
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 66.4 ($\text{CHH}'\text{OH}$), 71.1 (CHOH), 107.1 (Cum C-6), 111.3 (Cum C-3), 111.5 (Cum C-8), 112.2 (Cum C-4a), 130.6 (Cum C-5), 151.1, 153.7 (Cum C-7, Cum C-8a), 156.8 (Cum C-4), 158.8 (Cum C-2), 166.3 (COOH).

HRMS 342.9455 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), ber. 342.9453

Schmelzpunkt > 225 °C (Zers.)

t_{R} (HPLC) 5.98 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

6-Brom-7-(carboxymethoxy)-4-(1,2-dihydroxyethyl)cumarin



61

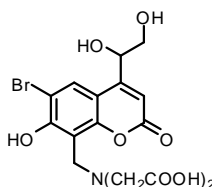
50 mg (0.13 mmol) **38** wurden nach Methode **F** mit 5.5 mg (0.13 mmol) $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ in 6 ml THF/3 ml H_2O umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5 % B in A_1 , 0–60 min) lieferte 25 mg (0.07 mmol, 54 %) **61** als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.47–3.58 (m, 2 H, $\text{CHH}'\text{OH}$), 4.92–4.98 (m, 2 H, CHOH , $\text{CHH}'\text{OH}$), 5.12 (s, 2 H, OCH_2), 5.70–5.76 (m, 1 H, CHOH), 6.40 (s, 1 H, Cum H-3), 6.44 (s, 1 H, Cum H-8), 7.22 (s, 1 H, Cum H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 65.58, 65.62 ($\text{CHH}'\text{OH}$, OCH_2), 71.0 (CHOH), 100.3 (Cum C-8), 106.0 (Cum C-6), 110.8 (Cum C-3), 113.1 (Cum C-4a), 129.5 (Cum C-5), 154.3 (Cum C-8a), 156.5 (Cum C-7), 157.0 (Cum C-4), 159.7 (Cum C-2), 168.6 (COOH).

HRMS	356.9615 ([M-H] ⁻), ber. 356.9610
Schmelzpunkt	> 138 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.29 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1/1)
t_R (HPLC)	6.55 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin

**62**

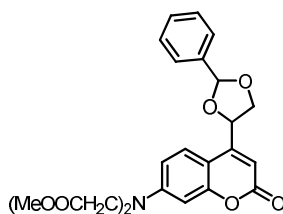
45 mg (95 μmol) **39** wurden nach Methode **F** mit 8.0 mg (190 μmol) LiOH x H₂O in 6 ml THF/3 ml H₂O umgesetzt. Es wurde für 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 25 mg (56 μmol, 59 %) **62** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.28 (s, 4 H, CH₂COOH), 3.44–3.52, 3.56–3.64 (m, 2 H, CHH'OH), 4.06 (s, 2 H, CH₂NCH₂), 4.84 (m, 1 H, CHOH), 6.06 (s, 1 H, Cum H-3), 7.88 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 47.1 (CH₂NCH₂), 55.7 (CH₂COOH), 66.0 (CHH'OH), 70.3 (CHOH), 105.6 (Cum C-6), 105.8 (Cum C-3), 109.7 (Cum C-8), 115.3 (Cum C-4a), 127.1 (Cum C-5), 153.3 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 157.4 (Cum C-4), 157.8 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 160.6 (Cum C-2), 171.0 (COOH).

HRMS	446.0076 ([M+H] ⁺), ber. 446.0087
Schmelzpunkt	> 200 °C (Zers.)
t_R (HPLC)	8.26 min (5–50 % B in A ₁ , 0–20 min)

4-{7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}-2-phenyl-1,3-dioxolan (BMCMAC-ED-caged Benzaldehyd)

**63**

200 mg (0.55 mmol) **9** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 167 μl (1.65 mmol) Benzaldehyd, 138 mg (0.55 mmol) PPTS und 800 mg MgSO₄ zum Acetal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 127 mg (0.28 mmol, 50 %, Diastereomerenmischung) **63** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.65 (s, 6 H, OCH₃), 3.77–3.80, 4.06–4.10 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.37 (s, 4 H, (NCH₂)₂), 4.56–4.61, 4.78–4.83 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.77–5.83 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.99/6.16 (s, 1 H, CHPh)^a, 6.16/6.17 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.58/6.60 (s, 1 H, Cum H-8)^a, 6.62/6.63 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-6)^a, 7.43/7.44 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5)^a, 7.58–7.63 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.71–7.80 (m, 2 H, *o*-Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 51.7 (OCH₃), 52.3 ((NCH₂)₂), 69.6/70.1 (CH $\overline{\text{C}}$ HH'-dioxolan)^a, 72.7 (C $\overline{\text{H}}$ CHHH'-dioxolan), 99.0 (Cum C-8), 103.7 (C $\overline{\text{H}}$ -Ph), 105.0 (Cum C-3), 107.0/107.2 (Cum C-4a)^a, 109.3/109.4 (Cum C-6)^a, 125.5/125.8 (Cum C-5)^a, 126.8 (σ -CH), 128.9/129.1, 129.4/129.7 (3 C, *m*-CH, *p*-CH)^a, 136.5/137.6 (*i*-C)^a, 151.4 (Cum C-7), 154.9/155.1 (Cum C-8a)^a, 155.5/155.6 (Cum C-4)^a, 160.5/160.6 (Cum C-2)^a, 170.3 (C $\overline{\text{O}}$ OMe).

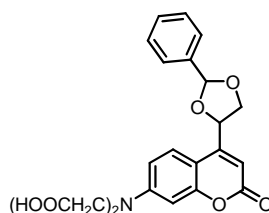
HRMS 476.1325 ([M+Na]⁺), ber. 476.1321

Schmelzpunkt > 128 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.34 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **63a, 63b:** 17.82 min, **63c, 63d:** 17.98 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}-2-phenyl-1,3-dioxolan (BCMAC-ED-caged Benzaldehyhd)



64

100 mg (0.22 mmol) **63** wurden nach Methode **F** mit 18.5 mg (0.44 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (5–50 % B in A₂, 0–60 min). Es resultierten 46.8 mg (0.11 mmol, 52 %, Diastereomergemisch) **64** als farbloser Feststoff.

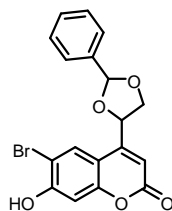
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.76–3.80, 4.06–4.10 (m, 1 H, CHCH $\overline{\text{H}}$ '-dioxolan), 4.35 (s, 4 H, (NCH₂)₂), 4.57–4.60, 4.78–4.83 (m, 1 H, CHCH $\overline{\text{H}}$ '-dioxolan), 5.76–5.83 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.99/6.14 (s, 1 H, CHPh)^a, 6.16/6.17 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.58/6.61 (s, 1 H, Cum H-8)^a, 6.62/6.63 (d, $^3J = 8.8$, 1 H, Cum H-6)^a, 7.44/7.45 (d, $^3J = 8.8$, 1 H, Cum H-5)^a, 7.55–7.62 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.68–7.77 (m, 2 H, σ -Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 52.1 ((NCH₂)₂), 69.6/70.1 (CH $\overline{\text{C}}$ HH'-dioxolan)^a, 72.7 (C $\overline{\text{H}}$ CHHH'-dioxolan), 99.6 (Cum C-8), 103.5 (C $\overline{\text{H}}$ -Ph), 105.7 (Cum C-3), 107.0/107.1 (Cum C-4a)^a, 109.3/109.4 (Cum C-6)^a, 125.5/125.7 (Cum C-5)^a, 126.9 (σ -CH), 128.9/129.2, 129.4/129.7 (3 C, *m*-CH, *p*-CH)^a, 136.5/137.7 (*i*-C)^a, 151.6 (Cum C-7), 154.9/155.0 (Cum C-8a)^a, 155.5/155.7 (Cum C-4)^a, 162.5/162.6 (Cum C-2)^a, 177.3 (COOH).

HRMS 423.0948 ([M-H]⁺), ber. 423.0954

Schmelzpunkt > 168 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **65a, 65b:** 14.79 min, **65c, 65d:** 14.93 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-2-phenyl-1,3-dioxolan²⁸ (Bhc-ED-caged Benzaldehyd)**65**

200 mg (0.66 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 200 μ l (1.98 mmol) Benzaldehyd, 166 mg (0.66 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 zum Acetal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A_1 , 0–60 min) lieferte 163 mg (0.42 mmol, 63 %, Diastereomerenmischung) **65** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.74–3.77, 4.01–4.06 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.53–4.59, 4.77–4.82 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.62–5.71 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.96/6.12 (s, 1 H, CHPh)^a, 6.22/6.43 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.92/6.93 (s, 1 H, Cum H-8)^a, 7.44–7.48 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.55–7.58 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.91 (s, 1 H, Cum H-5), 11.50 (s, 1 H, OH).

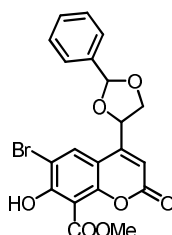
¹³C-NMR (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 69.9/70.2 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.9 (CHCHH'-dioxolan), 103.8 (Cum C-8), 103.9 (CH-Ph), 106.3/106.4 (Cum C-6)^a, 107.1/107.9 (Cum C-3)^a, 110.5/110.6 (Cum C-4a)^a, 126.7 (*o*-CH), 128.3 (Cum C-5), 128.4/128.5, 129.4/129.6 (3 C, *m*-CH, *p*-CH)^a, 136.3/137.4 (*i*-C)^a, 153.7/153.9 (Cum C-4)^a, 154.06/154.10, 157.4/ 157.5 (Cum C-7, Cum C-8a)^a, 159.7/159.9 (Cum C-2)^a.

HRMS 410.9838 ([M+Na]⁺), ber. 410.9844

Schmelzpunkt > 119 °C (Zers.), Lit.²⁸ 106–180 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **65a, 65b**: 16.36 min, **65c, 65d**: 16.54 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

4-[6-Brom-8-(methoxycarbonyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]-2-phenyl-1,3-dioxolan (BHMCC-ED-caged Benzaldehyd)**66**

100.0 mg (0.28 mmol) **34** wurden nach Methode **E** in 20 ml Toluol mit 84.9 μ l (0.84 mmol) Benzaldehyd, 70.4 mg (0.28 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 zum Acetal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A_1 , 0–60 min) lieferte 49.2 mg (0.11 mmol, 40 %, Diastereomerenmischung) **66** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.90 (s, 3 H, OCH₃), 3.99–4.16, 4.35–4.39 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.76–4.90, 5.38–5.45 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 6.24 (s, 1 H, Cum H-3), 7.39–7.46 (m, 3 H, *m*-CH, *p*-CH), 7.56–7.59 (m, 2 H, *o*-CH), 7.68 (s, 1 H, Cum H-5), 11.51 (s, 1 H, OH).

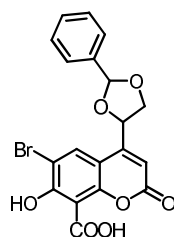
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 52.6 (OCH₃), 68.7/69.9 (CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan)^a, 74.8/75.6 (CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan)^a, 100.7 (Cum C-3), 116.4 (Cum C-8), 119.9 (Cum C-4a), 120.8 (Cum C-6), 125.1/125.4 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 127.6 (Cum C-5), 127.9/ 128.0 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 136.1/136.3 (*i*-C)^a, 154.9 (Cum C-4), 156.7/157.5/ 158.4/158.9 (Cum C-8a und Cum C-7)^a, 159.7 (Cum C-2), 171.3/171.5 ($\underline{\text{C}}\text{OOMe}$)^a.

HRMS 468.9902 ([M+Na]⁺), ber. 468.9899

Schmelzpunkt > 159 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **66a-66d**: 17.28 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-[6-Brom-8-carboxy-7-hydroxycumarin-4-yl]-2-phenyl-1,3-dioxolan (BHCC-ED-caged Benzaldehyd)



67

30.0 mg (0.07 mmol) **66** wurden nach Methode **F** mit 2.81 mg (0.07 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 18 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–50 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 14.6 mg (0.03 mmol, 48 %, Diastereomerenmischung) **67** als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 3.91–4.11, 4.35–4.41 (m, 1 H, CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan), 4.68–4.88, 5.37–5.46 (m, 1 H, CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan), 6.25 (s, 1 H, Cum H-3), 7.40–7.50 (m, 3 H, *m*-CH, *p*-CH), 7.49–7.58 (m, 2 H, *o*-CH), 7.63 (s, 1 H, Cum H-5).

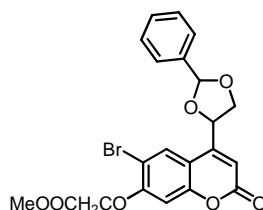
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 68.5/69.7 (CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan)^a, 74.9/75.7 (CH $\underline{\text{C}}\text{HH}'$ -dioxolan)^a, 101.4 (Cum C-3), 116.2 (Cum C-8), 118.2 (Cum C-4a), 120.2 (Cum C-6), 125.6/125.7 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 127.9 (Cum C-5), 128.2/128.6 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 136.2/136.4 (*i*-C)^a, 155.1 (Cum C-4), 157.7/158.1/ 159.3/158.8 (Cum C-8a und Cum C-7)^a, 160.2 (Cum C-2), 171.8/171.9 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$)^a.

HRMS 430.9759 ([M-H]⁻), ber. 430.9766

Schmelzpunkt > 174 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **67a-67d**: 14.49 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-[6-Brom-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin-4-yl]-2-phenyl-1,3-dioxolan (BMCC-ED-caged Benzaldehyd)



68

50.0 mg (0.13 mmol) **38** wurden nach Methode **E** in 20 ml Toluol mit 39.4 μ l (0.39 mmol) Benzaldehyd, 32.7 mg (0.13 mmol) PPTS und 600 MgSO₄ umgesetzt. Die präp. HPLC (50–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 24.0 mg (0.05 mmol, 40 %, Diastereomeregemisch) **68** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.53–3.66 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.81–3.98/4.33–4.45/4.71–4.79 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan)^a, 5.11 (s, 2 H, CH₂COOMe), 5.46–5.52 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.38/6.41 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.31 (s, 1 H, Cum H-8), 7.42–7.56 (m, 3 H, *m*-CH, *p*-CH), 7.59–7.63 (m, 2 H, *o*-CH), 7.93/7.96 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 52.5 (OCH₃), 65.8 (CH₂COOMe), 69.2/69.4 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.8 (CHCHH'-dioxolan), 102.8 (Cum C-8), 106.8 (Cum C-6), 108.3 (Cum C-3), 113.6 (Cum C-4a), 125.8/125.9, 128.2/128.9 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 129.1 (Cum C-5), 136.5/136.9 (*i*-C)^a, 154.8 (Cum C-4), 155.1 (Cum C-8), 156.2 (Cum C-7), 159.1 (Cum C-2), 168.9 (COOMe).

HRMS 483.0060 ([M+Na]⁺), ber. 483.0055

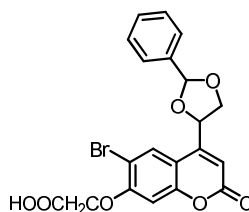
Schmelzpunkt > 128 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.43 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **68a-68d**: 18.01 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-[6-Brom-7-(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]-2-phenyl-1,3-dioxolan
Benzaldehyd

(BCC-ED-caged)



69

30.0 mg (0.07 mmol) **68** wurden nach Methode **F** mit 2.9 mg (0.07 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 30 min bei RT gerührt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (5–50 % B in A₂, 0–60 min). Es wurden 12.0 mg (0.03 mmol, 45 %, Diastereomeregemisch) **69** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.53–3.66 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.81–3.98/4.33–4.45/4.71–4.79 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan)^a, 5.11 (s, 2 H, CH₂COOMe), 5.46–5.52 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.38/6.41 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.31 (s, 1 H, Cum H-8), 7.42–7.56 (m, 3 H, *m*-CH, *p*-CH), 7.59–7.63 (m, 2 H, *o*-CH), 7.93/7.96 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

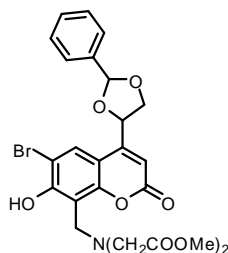
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 66.2 (CH₂COOMe), 70.2/70.5 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.2 (CHCHH'-dioxolan), 101.1 (Cum C-8), 107.9 (Cum C-6), 108.0 (Cum C-3), 113.06 (Cum C-4a), 125.1/125.5 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 129.1 (Cum C-5), 129.2/129.4 (*m*-CH, *p*-CH)^a, 136.9/137.1 (*i*-C)^a, 154.7 (Cum C-4), 155.3 (Cum C-8), 157.2 (Cum C-7), 160.8 (Cum C-2), 170.9 (COOH).

HRMS 444.9928 ([M-H]⁻), ber. 444.9923

Schmelzpunkt > 169 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **69a-69d**: 15.77 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-phenyl-1,3-dioxolan (BMBHC-ED-caged Benzaldehyd)



70

98.9 mg (0.25 mmol) **65** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 42.5 mg (75.6 μmol, 30 %, Diastereomeregemisch) **70** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.63 (s, 4 H, N(CH₂COOCH₃)₂), 3.66 (s, 6 H, (COOCH₃)₂), 3.73–3.78, 4.02–4.08 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.18/4.19 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOCH₃)₂)^a, 4.56/4.79 (t, *J* = 8.0, 1 H, CHCHH'-dioxolan)^a, 5.64–5.73 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.96/6.12 (s, 1 H, CHPh)^a, 6.23/6.22/6.46 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.44–7.49 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.55–7.60 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.90 (s, 1 H, Cum H-5), 11.77 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 47.9 (CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 51.8 ((COOCH₃)₂), 53.6 (N(CH₂COOCH₃)₂), 70.0/70.2 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.9/73.0 (CHCHH'-dioxolan)^a, 103.8/103.9 (CH-Ph)^a, 106.29/106.33 (Cum C-6)^a, 107.0/107.4 (Cum C-3)^a, 110.4, 110.5 (Cum C-4a, Cum C-8), 126.7 (*o*-CH), 127.3/127.8 (Cum C-5)^a, 128.3/128.5, 129.4/129.7 (3 C, *m*-CH, *p*-CH)^a, 136.3/137.4 (*i*-C)^a, 152.0 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 154.2/154.3 (Cum C-4)^a, 157.1/157.2 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 159.5 (Cum C-2), 171.2 (COOCH₃).

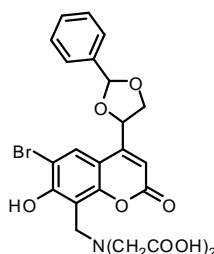
HRMS 584.0522 ([M+Na]⁺), ber. 584.0532

Schmelzpunkt > 120 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.35 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **70a, 70b**: 18.20 min, **70c, 70d**: 18.32 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-phenyl-1,3-dioxolan (BBHC-ED-caged Benzaldehyd)



71

42.5 mg (75.6 μmol) **70** wurden nach Methode **F** mit 6.3 mg (151 μmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 20.0 mg (37.4 μmol, 50 %, Diastereomeregemisch) **71** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 3.52 (s, 4 H, (CH₂COOH)₂), 3.74–3.79, 4.02–4.06 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.21/4.22 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOH)₂)^a, 4.56/4.79 (t, ³J = 8.0, 1 H, CHCHH'-dioxolan)^a, 5.64–5.72 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.96/6.12 (s, 1 H, CH-Ph)^a, 6.22/6.44 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.44–7.48 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.55–7.57 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.89 (s, 1 H, Cum H-5), 12.67 (bs, 1 H, OH).

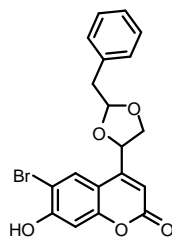
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 48.0 (CH₂N(CH₂COOH)₂), 53.5 ((CH₂COOH)₂), 70.0/70.2 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.9/73.0 (CHCHH'-dioxolan)^a, 103.8/103.9 (CH-Ph)^a, 106.3/106.9 (Cum C-6)^a, 106.9/107.7 (Cum C-3)^a, 110.2, (Cum C-4a), 110.30/110.34 (Cum C-8)^a, 126.7 (*o*-CH), 127.1 (Cum C-5), 128.3/128.5, 129.4/129.7 (3 C, *m*-CH, *p*-CH)^a, 136.3/137.4 (*i*-C)^a, 151.99/152.02 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 154.1/154.2 (Cum C-4)^a, 157.4/157.5 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 159.4/159.5 (Cum C-2)^a, 172.2 (COOH).

HRMS 575.9921 ([M-3H+2Na]⁺), ber. 575.9888

Schmelzpunkt > 130 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **71a, 71b:** 14.37 min, **71c, 71d:** 14.59 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

2-Benzyl-4-(6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-1,3-dioxolan (Bhc-ED-caged Phenylacetaldehyd)



72

200 mg (0.66 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 221 µl (1.98 mmol) Phenylacetaldehyd, 166 mg (0.66 mmol) PPTS und 800 mg MgSO₄ zum Acetal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–20 min) lieferte 134 mg (0.33 mmol, 50 %, Diastereomergemisch) **72** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.95–3.11 (m, 2 H, CH₂-Ph), 3.56–3.64, 3.79–3.88 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.33–4.38, 4.66–4.74 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.12–5.22, 5.31–5.37 (m, 1 H, CHCH₂Ph), 5.40–5.55 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.20/6.23 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.91 (s, 1 H, Cum H-8), 7.19–7.33 (m, 5 H, Ph), 7.82 (s, 1 H, Cum H-5), 11.45 (s, 1 H, OH).

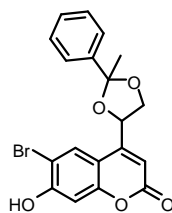
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 39.4 (CHCH₂Ph), 69.5/69.7 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.3 (CHCHH'-dioxolan), 103.3 (Cum C-8), 104.95/104.99 (CHCH₂Ph)^a, 106.2/106.3 (Cum C-6)^a, 106.8/107.7 (Cum C-3)^a, 110.5/110.6 (Cum C-4a)^a, 126.5, 126.6 (Ph), 128.3 (Cum C-5), 128.4, 129.6, 129.7 (Ph), 135.7/135.9 (*i*-C)^a, 153.9/153.95, 154.00/154.1, 157.3/157.4 (Cum C-4, Cum C-7, Cum C-8a)^a, 159.7/159.8 (Cum C-2)^a.

HRMS 424.9993 ([M+Na]⁺), ber. 425.0001

Schmelzpunkt > 105 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **72a, 72b:** 16.36 min, **72c, 72d:** 16.54 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-2-methyl-2-phenyl-1,3-dioxolan²⁸
Acetophenon)
(Bhc-ED-caged**73**

200 mg (0.66 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 231 μ l Acetophenon (1.98 mmol), 166 mg (0.66 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 zum Ketal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A_1 , 0–60 min) lieferte 105 mg (0.26 mmol, 40 %, Diastereomergemisch) **73** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) **73a/73b**: 1.75 (s, 3 H, CH_3), 3.84–3.89, 4.20–4.25 (m, 2 H, CHCHH' -dioxolan), 5.35–5.41 (m, 1 H, CHCH_2 -dioxolan), 6.38 (s, 1 H, Cum H-3), 6.91 (s, 1 H, Cum H-8), 7.37–7.51 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.50–7.53 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.88 (s, 1 H, Cum H-5), 11.46 (s, 1 H, OH).

73c/73d: 1.70 (s, 3 H, CH_3), 3.66–3.71, 4.73–4.78 (m, 2 H, CHCHH' -dioxolan), 5.62–5.72 (m, 1 H, CHCH_2 -dioxolan), 6.04 (s, 1 H, Cum H-3), 6.88 (s, 1 H, Cum H-8), 7.35–7.44 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.53–7.58 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.92 (s, 1 H, Cum H-5), 11.47 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d_6 -DMSO) **73a/b**: 27.4 (CH_3), 68.9 (CHCHH' -dioxolan), 72.7 (CHCHH' -dioxolan), 103.3 (Cum C-8), 106.3 (Cum C-6), 107.9 (Cum C-3), 110.0 ($\underline{\text{C}}$ -Ph), 110.5 (Cum C-4a), 125.1 (*o*-CH), 128.1 (*m*-CH oder *p*-CH), 128.4 (Cum C-5), 128.5 (*m*-CH oder *p*-CH) 142.3 (*i*-C), 154.06, 154.08 (Cum C-4, Cum C-8a), 157.3 (Cum C-7), 159.8 (Cum C-2).

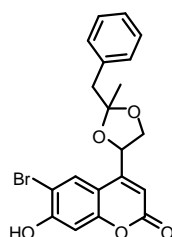
73c/d: 27.0 (CH_3), 69.4 (CHCHH' -dioxolan), 73.3 (CHCHH' -dioxolan), 103.3 (Cum C-8), 106.3 (Cum C-6), 107.6 (Cum C-3), 109.9 ($\underline{\text{C}}$ -Ph), 110.6 (Cum C-4a), 124.7 (*o*-CH), 128.1 (*m*-CH oder *p*-CH), 128.3 (Cum C-5), 128.4 (*m*-CH oder *p*-CH), 142.7 (*i*-C), 153.3 (Cum C-4), 153.9 (Cum C-8a), 157.4 (Cum C-7), 159.7 (Cum C-2).

HRMS **73a, 73b**: 424.9994 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), **73c, 73d**: 424.9992 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), ber. 425.0001

Schmelzpunkt > 146 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.23 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **73a, 73b**: 15.32 min, **73c, 73d**: 15.54 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min)

2-Benzyl-4-(6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-2-methyl-1,3-dioxolan
Phenylacetone)
(Bhc-ED-caged**74**

200 mg (0.66 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 263 μ l (1.98 mmol) Phenylacetone, 166 mg (0.66 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 zum Ketal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp.

HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 128 mg (0.31 mmol, 47 %, Diastereomerengemisch) **74** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.36 (s, 3 H, CH₃), 3.07 (s, 2 H, CH₂Ph), 3.52–3.60, 4.52–4.58 (m, 2 H, CHCHH'-dioxolan), 5.45–5.55 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.13 (s, 1 H, Cum H-3), 6.89 (s, 1 H, Cum H-8), 7.19–7.31 (m, 5 H, Ph), 7.89 (s, 1 H, Cum H-5), 11.46 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 23.2 (CH₃), 44.6 (CH₂Ph), 68.9 (CHCHH'-dioxolan), 72.1 (CHCHH'-dioxolan), 103.3 (Cum C-8), 106.3 (Cum C-6), 107.2 (Cum C-3), 110.4 (CH₂Ph), 110.7 (Cum C-4a), 126.5, 127.8 (Ph), 128.4 (Cum C-5), 130.4 (Ph), 135.7/136.3 (*i*-C)^a, 153.3 (Cum C-4), 153.9, 157.3 (Cum C-7, Cum C-8a) 159.7 (Cum C-2).

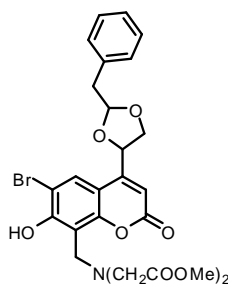
HRMS 439.0150 ([M+Na]⁺), ber. 439.0157

Schmelzpunkt > 100 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.25 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **74a, 74b**: 17.43 min, **74c, 74d**: 17.59 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

2-Benzyl-4-{8-[bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-1,3-dioxolan (BMBHC-ED-caged Phenylacetaldehyd)



75

134 mg (0.33 mmol) **72** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 73.0 mg (0.13 mmol, 39 %, Diastereomerengemisch) **75** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.94–3.14 (m, 2 H, CH₂Ph), 3.37–3.55, 3.77–3.87 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.62 (s, 4 H, (CH₂COOCH₃)₂), 3.65/3.66 (s, 6 H, (CH₂COOCH₃)₂)^a, 4.17 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 4.31–4.39, 4.65–4.73 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.18–5.24, 5.30–5.36 (m, 1 H, CHCH₂Ph), 5.43–5.54 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.20/6.25 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.20–7.36 (m, 5 H, Ph), 7.80/7.84 (s, 1 H, Cum H-5)^a, 10.45 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 39.3 (CHCH₂Ph), 47.8 (CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 51.8 ((CH₂COOCH₃)₂), 53.6 ((CH₂COOCH₃)₂), 69.5/69.7 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.3 (CHCHH'-dioxolan), 105.0 (CHCH₂Ph), 106.2/106.3 (Cum C-6)^a, 107.6 (Cum C-3), 110.38/110.40, 110.5 (Cum C-4a, Cum C-8)^a, 126.5, 126.6 (Ph), 127.1 (Cum C-5), 128.2, 129.65, 129.72 (Ph), 135.7/136.0 (*i*-C)^a, 151.9/152.0 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 154.28/154.28 (Cum C-4)^a, 157.0/157.1 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 159.3/159.4 (Cum C-2)^a, 171.1/171.2 (COOCH₃)^a.

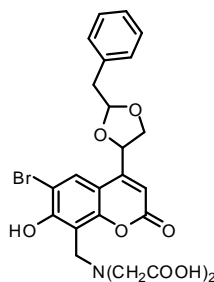
HRMS 576.0864 ([M+H]⁺), ber. 576.0869

Schmelzpunkt > 108 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.30 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **75a, 75b**: 18.56 min, **75c, 75d**: 18.72 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

2-Benzyl-4-{8-[bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-1,3-dioxolan (BBHC-ED-caged Phenylacetaldehyd)



76

73.0 mg (0.13 mmol) **75** wurden nach Methode **F** mit 10.9 mg (0.26 mmol) LiOH x H₂O in 6 ml THF/3 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 45.0 mg (82.1 μmol, 63 %, Diastereomergemisch) **76** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.95–3.12 (m, 2 H, CH₂Ph), 3.50 (s, 4 H, (CH₂COOH)₂), 3.55–3.64, 3.78–3.86 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.19 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOH)₂), 4.32–4.40, 4.64–4.72 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.18–5.23, 5.29–5.36 (m, 1 H, CHCH₂Ph), 5.43–5.54 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.20/6.24 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.21–7.35 (m, 5 H, Ph), 7.79 (s, 1 H, Cum H-5).

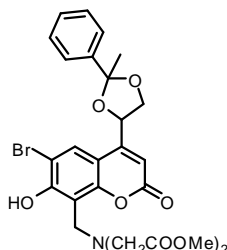
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 39.3 (CHCH₂Ph), 47.0 (CH₂N(CH₂COOH)₂), 53.5 ((CH₂COOH)₂), 69.5/69.7 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.4 (CHCHH'-dioxolan), 105.0 (CHCH₂Ph), 106.2/106.3 (Cum C-6)^a, 106.6 (Cum C-3), 110.2, 110.3 (Cum C-4a, Cum C-8), 126.5, 126.6 (Ph), 127.1 (Cum C-5), 128.2, 129.66, 129.73 (Ph), 135.7/136.0 (*i*-C)^a, 151.9/152.0 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 154.4 (Cum C-4), 157.4/157.5 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 159.4/159.5 (Cum C-2)^a, 172.17/171.20 (COOH)^a.

HRMS 570.0389 ([M+Na]⁺), ber. 570.0376

Schmelzpunkt > 120 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **76a, 76b:** 14.96 min, **76c, 76d:** 15.24 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-2-methyl-2-phenyl-1,3-dioxolan (BMBHC-ED-caged Acetophenon)



77

105 mg (0.26 mmol) **73** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 63.0 mg (0.11 mmol, 42 %, Diastereomergemisch) **77** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.71/1.75 (s, 3 H, CCH₃)^a, 3.63 (s, 4 H, (CH₂COOCH₃)₂), 3.66 (s, 6 H, (CH₂COOCH₃)₂), 3.68–3.73, 3.78–3.91 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.12–4.27 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.19 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 5.36–5.43 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.40/6.43 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.33–7.47 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.49–7.56 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.89/7.90 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 27.5 (CCH₃), 47.8 (CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 51.8 ((COOCH₃)₂), 53.6 ((CH₂COOCH₃)₂), 68.9 (CHCHH'-dioxolan), 72.7 (CHCHH'-dioxolan), 106.3 (Cum C-6), 107.6/107.8 (Cum C-3)^a, 110.0 (C-Ph), 110.4, 110.5 (Cum C-4a, Cum C-8), 124.7/125.1 (*o*-CH)^a, 127.4 (Cum C-5), 128.2, 128.4 (3 C, *m*-CH, *p*-CH), 142.3 (*i*-C), 152.0, (Cum C-7 oder Cum C-8a), 154.5 (Cum C-4), 157.0 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 159.5/159.6 (Cum C-2)^a, 172.2 (COOCH₃).

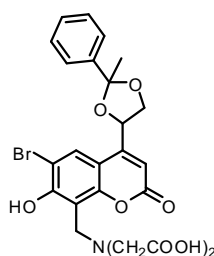
HRMS 576.0871 ([M+H]⁺), ber. 576.0869

Schmelzpunkt > 132 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.37 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **77a**: 19.06 min, **77b**: 19.19, **77c**: 19.39, **77d**: 19.58 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-2-methyl-2-phenyl-1,3-dioxolan (BBHC-ED-caged Acetophenon)



78

63.0 mg (0.11 mmol) **77** wurden nach Methode **F** mit 9.2 mg (0.22 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 38.0 mg (69.3 μmol, 63 %, Diastereomeregemisch) **78** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.70/1.75 (s, 3 H, CCH₃)^a, 3.51 (s, 4 H, (CH₂COOH)₂), 3.83–3.91 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.13–4.27 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.19 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOH)₂), 5.35–5.44 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.39 (s, 1 H, Cum H-3), 7.31–7.47 (m, 3 H, *m*-Ph, *p*-Ph), 7.49–7.58 (m, 2 H, *o*-Ph), 7.86/7.90 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

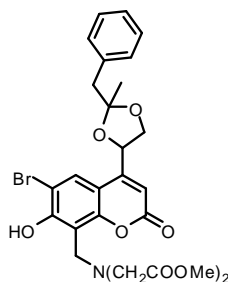
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 27.0/27.5 (CCH₃)^a, 48.0 (CH₂N(CH₂COOH)₂), 53.5 ((CH₂COOH)₂), 68.9 (CHCHH'-dioxolan), 72.7 (CHCHH'-dioxolan), 106.3 (Cum C-6), 107.7 (Cum C-3), 110.0 (C-Ph), 110.25, 110.28 (Cum C-4a, Cum C-8), 124.7/125.2 (*o*-CH)^a, 127.3 (Cum C-5), 128.2, 128.3, 128.4 (3 C, *m*-CH, *p*-CH), 142.4/142.7 (*i*-C)^a, 152.0 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 154.5 (Cum C-4), 157.4 (Cum C-7 oder Cum C-8a), 159.5 (Cum C-2), 172.2 (COOH).

HRMS 570.0392 ([M+Na]⁺), ber. 570.0376

Schmelzpunkt > 124 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **78a**, **78b**: 15.21 min, **78c**, **78d**: 15.49 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

2-Benzyl-4-{8-[bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-methyl-1,3-dioxolan (BMBHC-ED-caged Phenylacetone)



79

128 mg (0.31 mmol) **74** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 85.0 mg (0.14 mmol, 46 %, Diastereomeregemisch) **79** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.36 (s, 3 H, CCH₃), 3.03/3.07 (s, 2 H, CH₂Ph)^a, 3.48–3.58, 3.72–3.80 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.61 (s, 4 H, (CH₂COOCH₃)₂), 3.66 (s, 6 H, (CH₂COOCH₃)₂), 4.16/4.17 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOCH₃)₂)^a, 4.51–4.60, 4.65–4.72 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.48–5.60 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.12/6.25 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.20–7.33 (m, 5 H, Ph), 7.89/7.91 (s, 1 H, Cum H-5)^a, 10.45 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 23.3/23.4 (CCH₃)^a, 43.1/44.6 (CH₂Ph)^a, 47.8 (CH₂N(CH₂COOCH₃)₂), 51.8 ((CH₂COOCH₃)₂), 53.6 ((CH₂COOCH₃)₂), 68.9 (CHCHH'-dioxolan), 72.2/72.5 (CHCHH'-dioxolan)^a, 106.2 (Cum C-6), 107.5/107.6 (Cum C-3)^a, 110.3/110.6 (Cum C-4a)^a, 111.0/111.1 (CCH₂-Ph)^a, 126.4/126.5, 127.2 (Ph)^a, 127.8 (Cum C-5), 127.9/128.0, 130.3/130.4 (Ph)^a, 136.4/136.8 (*i*-C)^a, 152.4/152.5 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 154.1/154.2 (Cum C-4)^a, 157.0/157.1 (Cum C-7 oder Cum C-8a)^a, 159.5/159.6 (Cum C-2)^a, 171.2 (COOCH₃).

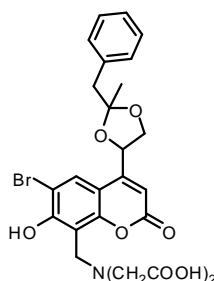
HRMS 612.0857 ([M+Na]⁺), ber. 612.0845

Schmelzpunkt > 106 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.36 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **79a, 79b:** 19.35 min, **79c, 79d:** 19.49 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

2-Benzyl-4-{8-[bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-methyl-1,3-dioxolan (BBHC-ED-caged Phenylacetone)



80

85.0 mg (0.14 mmol) **79** wurden nach Methode **F** mit 11.7 mg (0.28 mmol) LiOH x H₂O in 6 ml THF/3 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 42.5 mg (75.6 μmol, 54 %, Diastereomeregemisch) **80** als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.35 (s, 3 H, CCH₃), 3.03/3.07 (s, 2 H, CH₂Ph)^a, 3.50 (s, 4 H, N(CH₂COOH)₂), 3.73–3.81, 3.87–3.91 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.19 (s, 2 H, CH₂N(CH₂COOH)₂), 4.50–4.58, 4.64–4.71 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.43–5.61 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.12/6.25 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.21–7.32 (m, 5 H, Ph), 7.85/7.86 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

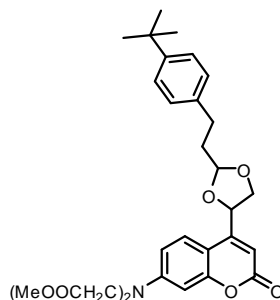
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 23.2/23.5 (CCH₃)^a, 43.1/44.7 (CH₂-Ph)^a, 47.0 (CH₂N(CH₂COOH)₂), 53.5 (N(CH₂COOH)₂), 68.9 (CHCHH'-dioxolan), 72.2/72.6 (CHCHH'-dioxolan)^a, 106.2 (Cum C-6), 106.8 (Cum C-3), 110.3/110.4, 110.6, 111.0 (Cum C-4a, Cum C-8, CCH₂-Ph)^a, 126.5 (Ph), 127.1 (Cum C-5), 127.8/128.0, 130.3/130.5 (Ph)^a, 136.3/136.8 (*i*-C)^a, 151.8, 154.3, 157.4 (Cum C-7, Cum C-8a, Cum C-4), 159.5 (Cum C-2), 172.2 (COOH).

HRMS 560.0597 ([M-H]⁻), ber. 560.0556

Schmelzpunkt > 128 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **80a, 80b**: 15.45 min, **80c, 80d**: 15.66 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BMCMAC-ED-caged Bourgeonal)



81

80 mg (0.22 mmol) **9** wurden nach Methode **E** in 15 ml Toluol gelöst und mit 134 µl (0.66 mmol) Bourgeonal, 55.3 mg (0.22 mmol) PPTS und 600 mg MgSO₄ zum Acetal **81** umgesetzt. Es wurde 10 h unter Rückfluss erhitzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (50–95 % B in A₂, 0–60 min). Es wurden 73.0 mg (0.13 mmol, 62 %, Diastereomeregemisch) **81** als farbloser Feststoff erhalten.

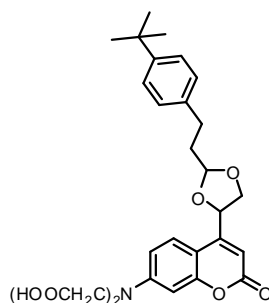
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 1.26 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.93–2.10 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2.64–2.80 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 3.50–3.58, 3.72–3.81 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.67 (s, 6 H, OCH₃), 4.35 (s, 4 H, (NCH₂)₂), 4.38–4.48, 4.68–4.77 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.04–5.12 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 5.35–5.48 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.16/6.17 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.57 (bs, 1 H, Cum H-8), 6.62 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-6), 7.17 (d, ³J = 8.0, 2 H, *m*-CH), 7.31 (d, ³J = 8.0, 2 H, *o*-CH), 7.43 (d, ³J = 8.8, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 29.1/29.3 (CHCH₂CH₂)^a, 31.2 (CCH₃), 34.06 (CCH₃), 34.8/34.9 (CHCH₂CH₂)^a, 51.9 (OCH₃), 52.3 ((NCH₂)₂), 69.7/70.2 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.6 (CHCHH'-dioxolan), 98.6 (Cum C-8), 104.2/104.4 (Bourg-CHCH₂CH₂)^a, 105.3 (Cum C-3), 107.1/107.3 (Cum C-4a)^a, 109.3 (Cum C-6), 125.1 (*m*-CH), 125.3/125.5 (Cum C-5)^a, 127.9 (*o*-CH), 138.0/138.1 (*i*-C)^a, 148.2 (*p*-C), 151.1 (Cum C-7), 154.8/154.9 (Cum C-8a)^a, 155.2/155.4 (Cum C-4)^a, 160.5 (Cum C-2), 170.2 (COOMe).

HRMS 538.2461 ([M+H]⁺), ber. 538.2441

Schmelzpunkt	> 68 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.41 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2/1)
t_R (HPLC)	81a-81d: 20.35 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min, 95 % B in A ₁ , 20–25 min)

4-{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BCMAC-ED-caged Bourgeonal)

**82**

50.0 mg (0.10 mmol) **81** wurden nach Methode **F** mit 8.4 mg (0.20 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (5–50 % B in A₂, 0–60 min). Es resultierten 22.0 mg (40.0 µmol, 40 %, Diastereomergemisch) **82** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, d₄-MeOH): 1.33 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.98–2.17 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2.78–2.84 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 3.55–3.67, 3.78–3.87 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 3.99 (s, 4 H, (NCH₂)₂), 4.40–4.51, 4.76–4.85 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.13–5.18 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 5.39–5.50 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.17/6.21 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.46 (bs, 1 H, Cum H-8), 6.62 (d, ³J = 9.3 Hz, 1 H, Cum H-6), 7.20 (d, ³J = 8.1, 2 H, *m*-CH), 7.37 (d, ³J = 8.1, 2 H, *o*-CH), 7.41 (d, ³J = 9.3, 1 H, Cum H-5).

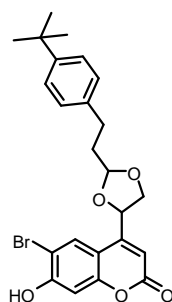
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₄-MeOH): 30.8 (CHCH₂CH₂), 31.9 (CCH₃), 35.2 (CCH₃), 36.5 (CHCH₂CH₂), 58.1 ((NCH₂)₂), 71.6 (CHCHH'-dioxolan), 74.5 (CHCHH'-dioxolan), 99.3 (Cum C-8), 104.7 (Cum C-3), 106.0 (CHCH₂CH₂), 107.5 (Cum C-4a), 111.1 (Cum C-6), 125.6 (Cum C-5), 126.4 (*m*-CH), 129.2 (*o*-CH), 139.6 (*i*-C), 149.9 (*p*-C), 154.2 (Cum C-7), 157.2 (Cum C-8a), 157.6 (Cum C-4) 164.2 (Cum C-2), 177.1 (COOH).

HRMS 508.1975 ([M-H]⁻), ber. 508.1971

Schmelzpunkt > 132 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **82a-82d:** 17.76 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (Bhc-ED-caged Bourgeonal)

**83**

200 mg (0.66 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 401 μ l (1.98 mmol) Bourgeonal, 165 mg (0.66 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 zum Acetal umgesetzt. Der Ansatz wurde 10 h unter Rückfluss erhitzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (30–95 % B in A_2 , 0–60 min). Es wurden 245 mg (0.52 mmol, 78 %, Diastereomerenmischung) **83** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.94–2.09 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 2.67–2.77 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 3.53–3.61, 3.80–3.87 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 4.32–4.45, 4.69–4.78 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 5.00–5.07, 5.12–5.16 (m, 1 H, CHCH_2CH_2), 5.43–5.53 (m, 1 H, CHCH_2 -dioxolan), 6.27/6.29 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 6.88 (s, 1 H, Cum H-8), 7.17 (d, $^3J = 8.0$, 2 H, *m*-CH), 7.31 (d, $^3J = 8.0$, 2 H, *o*-CH), 7.82/7.84 (s, 1 H, Cum H-5)^a, 11.48 (s, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, d_6 -DMSO): 29.1/29.3 (CHCH_2CH_2)^a, 31.2 (CCH_3), 34.0 (CCH_3), 34.7/34.8 (CHCH_2CH_2)^a, 69.5/70.0 (CHCHH' -dioxolan)^a, 72.35/72.41 (CHCHH' -dioxolan)^a, 103.3 (Cum C-8), 104.1/104.2 (CHCH_2CH_2)^a, 106.3 (Cum C-6), 107.8 (Cum C-3), 110.5 (Cum C-4a), 125.1 (*m*-CH), 127.9 (*o*-CH), 128.4 (Cum C-5), 138.0 (*i*-C), 148.2 (*p*-C), 154.0 (Cum C-4), 157.35, 157.39 (Cum C-7, Cum C-8a), 159.8 (Cum C-2).

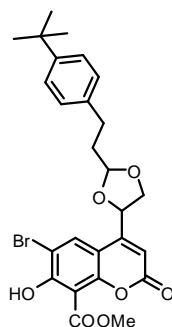
HRMS 473.0972 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 473.0964

Schmelzpunkt > 122 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.36 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **83a, 83b**: 20.47 min, **83c, 83d**: 20.57 min (5–95 % B in A_1 , 0–20 min, 95 % B in A_1 , 20–25 min)

4-[6-Brom-7-hydroxy-8-(methoxycarbonyl)cumarin-4-yl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BHMCC-ED-caged Bourgeonal)



84

150.0 mg (0.42 mmol) **34** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 254 μ l (1.25 mmol) Bourgeonal, 106 mg (0.42 mmol) PPTS und 800 mg MgSO_4 umgesetzt. Es wurde 7 h unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde mittels präp. HPLC gereinigt (80–95 % B in A_2 , 0–60 min). Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol, 23 %, Diastereomerenmischung) **84** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.91–2.10 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 2.65–2.78 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 3.53–3.63 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 4.30–4.41, 4.65–4.76 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 4.98–5.07, 5.09–5.15 (m, 1 H, CHCH_2CH_2), 5.42–5.52 (m, 1 H, CHCH_2 -dioxolan), 6.24 (s, 1 H, Cum H-3), 7.18 (d, $^3J = 7.9$, 2 H, *m*- CH_2), 7.31 (d, $^3J = 7.9$, 2 H, *o*-CH), 7.90/7.92 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 29.3 (CHCH_2CH_2), 31.2 (CCH_3), 34.1 (CCH_3), 34.7 (CHCH_2CH_2), 52.7 (OCH_3), 69.5 (CHCHH' -dioxolan), 72.4 (CHCHH' -dioxolan), 104.3 (CHCH_2CH_2), 106.8 (Cum C-3), 108.9 (Cum C-8), 109.3 (Cum C-4a), 111.3 (Cum C-6), 125.1 (m -CH), 127.9 (o -CH), 129.1 (Cum C-5), 138.0 (i -C), 148.1 (p -C), 151.2 (Cum C-8a), 154.1 (Cum C-4), 156.2 (Cum C-7), 159.2 (Cum C-2), 164.4 (COOMe).

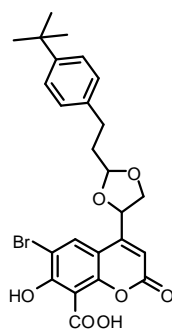
HRMS 553.0853 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), ber. 553.0838

Schmelzpunkt > 112 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.44 (n -Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **84a-84d**: 17.13 min (50–95 % B in A_1 , 0–20 min)

4-[6-Brom-8-carboxy-7-hydroxycumarin-4-yl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BHCC-ED-caged Bourgeonal)



85

50.0 mg (0.09 mmol) **84** wurden nach Methode **F** mit 3.8 mg (0.09 mmol) $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ in 5 ml THF/2.5 ml H_2O umgesetzt. Es wurde 18 h bei RT gerührt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte mittels präp. HPLC (5–50 % B in A_2 , 0–60 min). Es wurden 20.0 mg (0.04 mmol, 43 %, Diastereomeregemisch) **85** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.83–2.06 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 2.59–2.76 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 3.65–3.88, 4.30–4.37 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 4.76–4.82, 5.32–5.38 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 4.91–4.95, 4.97–5.04 (m, 1 H, CHCH_2CH_2), 6.17 (s, 1 H, Cum H-3), 7.12–7.20 (m, 2 H, m -CH), 7.26–7.33 (m, 2 H, o -CH), 7.60 (s, 1 H, Cum H-5).

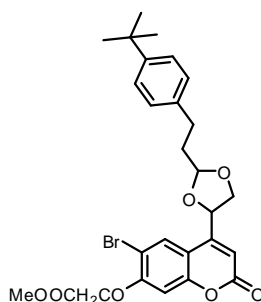
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 29.4 (CHCH_2CH_2), 31.2 (CCH_3), 34.1 (CCH_3), 34.9 (CHCH_2CH_2), 68.9/69.9 (CHCHH' -dioxolan)^a, 72.8/76.9 (CHCHH' -dioxolan)^a, 100.0 (Cum C-3) 104.0 (CHCH_2CH_2), 115.4 (Cum C-8), 119.4 (Cum C-4a), 120.7 (Cum C-6), 125.1/125.2 (m -CH)^a, 127.1 (Cum C-5), 127.9/128.0 (o -CH)^a, 138.1/138.3 (i -C)^a, 148.1/148.2 (p -C)^a, 154.7 (Cum C-4), 155.7/157.7/ 158.1/158.5 (Cum C-8a und Cum C-7)^a, 160.7 (Cum C-2), 168.9/169.0 (COOH)^a.

HRMS 515.0713 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), ber. 515.0705

Schmelzpunkt > 153 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **85a-85d**: 14.25 min (50–95 % B in A_1 , 0–20 min)

**4-[6-Brom-7-(methoxycarbonylmethoxy)cumarin-4-yl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan
(BMCC-ED-caged Bourgeonal)**

**86**

50.0 mg (0.13 mmol) **38** wurden nach Methode **E** in 20 ml Toluol mit 79.1 μ l (0.39 mmol) Bourgeonal, 32.7 mg (0.13 mmol) PPTS und 600 mg MgSO_4 umgesetzt. Es wurde 22 h unter Rückfluss erhitzt. Die präp. HPLC (50–95 % B in A_2 , 0–60 min) lieferte 47.1 mg (0.09 mmol, 66 %, Diastereomeregemisch) **86** als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.27 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.92–2.13 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 2.65–2.81 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 3.55–3.65 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan), 3.72 (s, 3 H, OCH_3), 3.81–3.92/4.32–4.45/4.69–4.79 (m, 1 H, CHCHH' -dioxolan)^a, 5.00–5.07 (m, 1 H, CHCH_2CH_2), 5.09 (s, 2 H, CH_2COOMe), 5.45–5.56 (m, 1 H, CHCH_2 -dioxolan), 6.36/6.37 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.18 (d, $^3J = 7.90$ Hz, 2 H, *m*-CH), 7.24 (s, 1 H, Cum H-8), 7.31 (d, $^3J = 7.90$, 2 H, *o*-CH), 7.93/7.95 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, d_6 -DMSO): 29.3 (CHCH_2CH_2), 31.2 (CCH_3), 34.0 (CCH_3), 34.6 (CHCH_2CH_2), 52.0 (OCH_3), 65.6 (CH_2COOMe), 69.4/69.9 (CHCHH' -dioxolan)^a, 72.4 (CHCHH' -dioxolan), 102.1 (Cum C-8), 104.3 (CHCH_2CH_2), 106.9 (Cum C-6), 109.0 (Cum C-3), 112.0 (Cum C-4a), 125.1 (*m*-CH), 127.9 (*o*-CH), 128.3 (Cum C-5), 138.0 (*i*-C), 148.2 (*p*-C), 153.8 (Cum C-4), 154.1 (Cum C-8), 156.5 (Cum C-7), 159.3 (Cum C-2), 168.2 (COOMe).

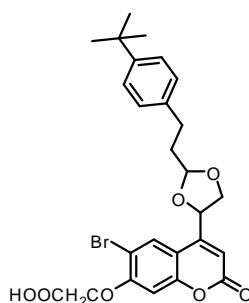
HRMS 545.1171 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 545.1175

Schmelzpunkt > 136 °C (Zers.)

R_f (DC) 0.58 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **86a-86d**: 21.13 min (50–95 % B in A_1 , 0–20 min, 95 % B in A_1 , 20–25 min)

4-[6-Brom-7-(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BCC-ED-caged Bourgeonal)

**87**

40.0 mg (0.07 mmol) **86** wurden nach Methode **F** mit 2.9 mg (0.07 mmol) $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ in 5 ml THF/2.5 ml H_2O umgesetzt. Es wurde 30 min bei RT gerührt. Der Rückstand wurde mittels präp.

HPLC gereinigt (5–50 % B in A₂, 0–60 min). Es wurden 18.5 mg (0.04 mmol, 50 %, Diastereomeren-gemisch) **87** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.27 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.96–2.11 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2.68–2.79 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 3.80–3.88 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.35–4.42 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.49 (s, 2 H, CH₂COOH), 5.01–5.07, 5.11–5.16 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 5.44–5.53 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.30 (s, 1 H, Cum H-3), 6.86 (s, 1 H, Cum H-8), 7.18 (d, ³J = 8.5, 2 H, *m*-CH), 7.31 (d, ³J = 8.5, 2 H, *o*-CH), 7.86/7.87 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

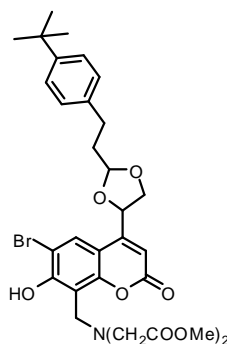
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 29.3 (CH-CH₂-CH₂), 31.2 (CCH₃), 34.0 (CCH₃), 34.6 (CHCH₂CH₂), 68.4 (CH₂COOH), 69.5 (CHCHH'-dioxolan), 72.4 (CHCHH'-dioxolan), 101.9 (Cum C-8), 104.3 (CHCH₂CH₂), 107.1 (Cum C-6), 108.1 (Cum C-3), 110.8 (Cum C-4a), 125.1 (*m*-CH), 127.8 (Cum C-5), 127.9 (*o*-CH), 138.0 (*i*-C), 148.2 (*p*-C), 153.9 (Cum C-4), 154.0 (Cum C-8), 158.0 (Cum C-7), 159.3 (Cum C-2), 168.3 (COOH).

HRMS 553.0834 ([M+Na]⁺), ber. 553.0838

Schmelzpunkt > 154 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **87a-87d**: 19.94 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4-{8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-(4-tert-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BMBHC-ED-caged Bourgeonal)



88

200 mg (0.42 mmol) **83** wurden nach Methode **G** umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 68 mg (0.11 mmol, 25 %, Diastereomere ngemisch) **88** als farblosen Feststoff.

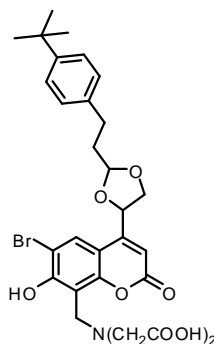
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.26 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.93–2.11 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2.65–2.79 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 3.62 (s, 4 H, NCH₂COOMe), 3.66 (s, 6 H, OCH₃), 3.79–3.87 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.18 (s, 2 H, CH₂NCH₂COOMe), 4.33–4.43, 4.67–4.77 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.04–5.13 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 5.44–5.54 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 6.29/6.30 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.18 (d, ³J = 7.95, 2 H, *m*-CH), 7.31 (d, ³J = 7.95, 2 H, *o*-CH), 7.81/7.82 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 29.1/29.3 (CHCH₂CH₂)^a, 31.2 (CCH₃), 34.0 (CCH₃), 34.7/34.8 (CHCH₂CH₂)^a, 47.8 (CH₂NCH₂COOMe), 51.8 (OCH₃), 53.6 (CH₂COOMe), 69.5 (CHCHH'-dioxolan), 72.4 (CHCHH'-dioxolan), 104.2 (CHCH₂CH₂), 106.2 (Cum C-6), 106.6 (Cum C-4a), 107.7 (Cum C-3), 110.4 (Cum C-8), 125.1 (*m*-CH), 127.2 (Cum C-5), 127.9 (*o*-CH), 138.0/138.1 (*i*-C)^a, 148.2 (*p*-C), 152.0 (Cum C-8a), 154.4/154.5 (Cum C-4)^a, 157.1 (Cum C-7), 159.3 (Cum C-2), 171.4 (COOMe).

HRMS 668.1471 ([M+Na]⁺), ber. 668.1471

Schmelzpunkt	> 120 °C (Zers.)
R_f (DC)	0.35 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1/1)
t_R (HPLC)	88a-88d: 21.67 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min, 95 % B in A ₁ , 20–25 min)
	88a-88d: 17.13 min (50–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

4-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BBHC-ED-caged Bourgeonal)

**89**

68.0 mg (0.11 mmol) **88** wurden nach Methode **F** mit 9.2 (0.22 mmol) LiOH x H₂O in 6 ml THF/3 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (5–50 % B in A₂, 0–60 min) wurden 40.0 mg (64.7 μmol, 59 %, Diastereomerengemisch) **89** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.27 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.91–2.08 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 2.65–2.77 (m, 2 H, CHCH₂CH₂), 3.14 (s, 4 H, NCH₂COOH), 3.51–3.60, 3.73–3.82 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.03 (s, 2 H, CH₂NCH₂COOH), 4.29–4.39, 4.60–4.70 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.02–5.09 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 5.33–5.44 (m, 1 H, CH-CH₂-dioxolan), 5.87/5.88 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 7.18 (d, ³J = 8.1, 2 H, *m*-CH), 7.31 (d, ³J = 8.1, 2 H, *o*-CH), 7.56/7.59 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

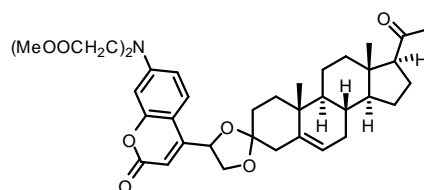
¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 29.1/29.3 (CHCH₂CH₂)^a, 31.2 (CCH₃), 34.0 (CCH₃), 34.7/34.9 (CHCH₂CH₂)^a, 48.4 (CH₂NCH₂COOH), 57.1 (CH₂NCH₂COOH), 69.8/70.4 (CHCHH'-dioxolan)^a, 72.6/72.7 (CHCHH'-dioxolan)^a, 99.0 (Cum C-3), 102.5 (Cum C-4a), 103.9, 104.0 (CHCH₂CH₂, Cum C-8), 125.1 (*m*-CH), 126.4 (Cum C-5), 127.9 (*o*-CH), 138.0/138.1 (*i*-C)^a, 148.1 (*p*-C), 154.5/154.6 (Cum C-8a)^a, 155.0 (Cum C-4), 155.2 (Cum C-7), 160.8/160.9 (Cum C-2)^a, 169.2 (COOH).

HRMS 616.1178 ([M-H]⁻), ber. 616.1182

Schmelzpunkt > 142 °C (Zers.)

t_R (HPLC) **89a, 89b:** 11.10 min, **89c, 89d:** 11.14 min (50–95 % B in A₁, 0–20 min)

4'-{7-[Bis(methoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}-spiro[5-pregnen-20-on-3,2'-[1,3]dioxolan] (C₃-BMCMAC-ED-caged Progesteron)

**90**

95.4 mg (0.26 mmol) **9** wurden nach Methode **E** in 20 ml Toluol gelöst und mit 246 mg (0.78 mmol) Progesteron, 65.3 mg (0.26 mmol) PPTS und 600 mg MgSO₄ mit zum Ketal umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte ein Gemisch von 65.1 mg (0.10 mmol, 38 %, Diastereomeregemisch) aus **90** und **91** als farblose Feststoffe.

90

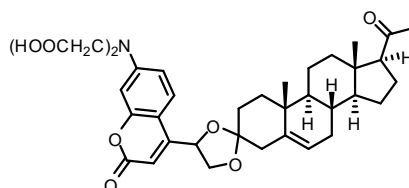
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 0.57 (s, 3 H, H-18), 0.88–1.08 (m, 1 H, H-9), 1.10 (s, 3 H, H-19), 1.14–1.19 (m, 2 H, H-16, H-14), 1.30–1.33 (m, 1 H, H-2), 1.35–1.40 (m, 2 H, H-1, H-11) 1.44–1.50 (m, 1 H, H-8), 1.53–1.57 (m, 1 H, H-12), 1.59–1.62 (m, 3 H, H'-2, H'-16, H-15), 1.65–1.69 (m, 1 H, H'-15), 1.70–1.73 (m, 1 H, H'-11), 1.75–1.79 (m, 1 H, H-7), 1.80–1.83 (m, 1 H, H'-1), 2.00–2.05 (m, 1 H, H'-12), 2.06–2.08 (m, 2 H, H'-7, H'-16), 2.10 (s, 3 H, H-21), 2.15–2.29 (m, 2 H, H-4), 2.45–2.58 (m, 1 H, H-17), 3.50–3.60 (m, 1H, CHH'-dioxolan), 3.71 (s, 6 H, OCH₃), 4.56–4.66 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.20–5.40 (m, 1 H, H-6), 5.20–5.39 (m, 1 H, CH-dioxolan), 6.00–6.05 (m, 1 H, Cum H-3), 6.35 (s, 1 H, Cum H-8), 6.43–6.56 (m, 1 H, Cum H-6), 7.28–7.39 (m, 1 H, Cum H-5).

HRMS 684.3161 ([M+Na]⁺), ber. 684.3149

R_f (DC) 0.31 (*n*-Hexan/EtOAc = 2/1)

t_R (HPLC) **90a**: 21.59 min, **90b**: 21.81 min, **90c**: 22.39 min, **90d**: 22.79 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min, 95 % B in A₁, 20–25 min)

4'-(7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl)-spiro[5-pregnen-20-on-3,2'-[1,3]dioxolan]
(C₃-BCMAC-ED-caged Progesteron)

**94**

65.1 mg (0.10 mmol) **90** und **91** wurden nach Methode **F** mit 8.4 mg (0.20 mmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde für 1 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–50 % B in A₂, 0–60 min) lieferte ein Gemisch von 10.1 mg (0.02 mmol, 16 %, Diastereomeregemisch) aus **94** und **95** als farblose Feststoffe.

94

¹H-NMR (600 MHz, d₄-MeOH): 0.55 (s, 3 H, H-18), 0.85–0.99 (m, 1 H, H-9), 1.01 (s, 3 H, H-19), 1.12–1.23 (m, 2 H, H-16, H-14), 1.28–1.30 (m, 1 H, H-2), 1.33–1.38 (m, 2 H, H-1, H-11) 1.42–1.47 (m, 1 H, H-8), 1.47–1.50 (m, 1 H, H-12), 1.55–1.57 (m, 3 H, H'-2, H'-16, H-15), 1.60–1.63 (m, 1 H, H'-15), 1.63–1.65 (m, 1 H, H'-11), 1.69–1.74 (m, 1 H, H-7), 1.74–1.82 (m, 1 H, H'-1), 2.01–2.03 (m, 1 H, H'-12), 2.03–2.05 (m, 2 H, H'-7, H'-16), 2.07 (s, 3 H, H-21), 2.19–2.33 (m, 2 H, H-4), 2.58–2.60 (m, 1 H, H-17), 3.55–3.66 (m, 1H, CHH'-dioxolan), 4.50–4.66 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.23–5.44 (m, 1 H, H-6), 5.23–5.47 (m, 1 H, CH-dioxolan), 5.95–6.06 (m, 1 H, Cum H-3), 6.21 (s, 1 H, Cum H-8), 6.34–6.43 (m, 1 H, Cum H-6), 7.30–7.40 (m, 1 H, Cum H-5).

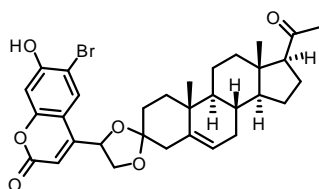
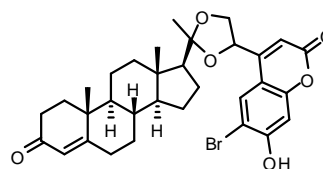
94

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₄-MeOH): 12.7 (C-18), 18.4 (C-19), 20.6/20.7 (C-11)^a, 22.2 (C-16), 24.0 (C-15), 30.7 (C-7), 30.9 (C-21), 31.2/31.4 (C-9)^a, 32.9 (C-2), 36.1 (C-1), 36.9/37.0 (C-10)^a, 37.7 (C-12), 43.3 (C-13), 49.1 (C-9), 55.8 (C-14), 59.4 (N-CH₂), 62.3 (C-17), 68.7/68.8 (CH-dioxolan)^a, 72.3/72.4 (CH₂-dioxolan)^a, 97.3 (Cum C-8), 101.8 (Cum C-3), 104.9 (Cum C-4a), 109.4 (Cum C-6), 110.3 (C-3), 121.6 (C-6), 122.0 (C-4), 124.0 (Cum C-5), 139.5 (C-5), 152.3 (Cum C-4), 152.4 (Cum C-7), 155.2 (Cum C-8a), 161.0 (Cum C-2), 171.2 (COOH), 208.4 (C-20).

HRMS 632.2848 ([M-H]⁻), ber. 632.2860

t_R (HPLC) **94a**: 18.96 min, **94b**: 19.23 min, **94c**: 19.54 min, **94d**: 19.73 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[5-pregnen-20-on-3,2'-[1,3]dioxolan] (C₃-Bhc-ED-caged Progesteron) und 4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[4-pregnen-3-on-20,2'-[1,3]dioxolan] (C₂₀-Bhc-ED-caged Progesteron)

**92****93**

150 mg (0.50 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 20 ml Toluol mit 472 mg (1.50 mmol) Progesteron, 126 mg (0.50 mmol) PPTS und 800 mg MgSO₄ zum Ketal umgesetzt. Der Ansatz wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (50–95 % B in A₂, 0–60 min). Die Trennung von **92** und **93** erfolgte per Flash-SC (*n*-Hexan/EtOAc = 6/1–2/1). Es resultierten 52.0 mg (87.0 μmol, 17 %) **92** und 8.0 mg (13.4 μmol, 3 %) **93**. Die Trennung der jeweiligen Diastereomere erfolgte mittels präp. HPLC (50–95 % B in A₂, 0–60 min). Es wurden 25.0 mg (41.8 μmol, 9 %) **92** und 5.0 mg (8.37 μmol, 2 %) **93** (in Form eines Diastereomerengemisches) als farblose Feststoffe erhalten.

4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[4-pregnen-3-on-20,2'-[1,3]dioxolan] (C₂₀-Bhc-ED-caged Progesteron)

Aluminiumtri-*tert*-butoxid (13.0 mg, 0.05 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre zu einer Lösung von **101** (20 mg, 0.03 mmol) in wasserfreiem Toluol (10 ml) und wasserfreiem Aceton (3 ml) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels präp. HPLC gereinigt (50–95 % B in 60 min; eluent A, H₂O; eluent B, CH₃CN). **93** konnte als Diastereomerenmisch isoliert werden (5 mg, 30 %).

92

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 0.55 (s, 3 H, H-18), 0.75–0.95 (m, 1 H, H-2), 1.01 (s, 3 H, H-19), 0.98–1.08 (m, 1 H, H-9), 1.10–1.25 (m, 2 H, H-15, H-14), 1.30–1.50 (m, 4 H, H-11, H-1, H-12, H-8), 1.52–1.66 (m, 4 H, H'-11, H-16, H-7, H'-15), 1.69–1.78 (m, 1 H, H'-2), 1.83–1.92 (m, 1 H, H'-1), 1.94–2.11 (m, 6 H, H'-7, H'-12, H'-16, H-21), 2.35–2.63 (m, 3 H, H-4, H-17), 3.58–3.76 (m, 1H, CHH'-dioxolan), 4.48–4.62 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.24–5.34 (m, 1 H, H-6), 5.40–5.55 (m, 1 H, CH-dioxolan), 6.16–6.29 (m, 1 H, Cum H-3), 6.86 (s, 1 H, Cum H-8), 7.82–7.91 (m, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 12.9/13.0 (C-18)^a, 18.6 (C-19), 20.1/20.5/20.6 (C-11)^a, 22.2 (C-16), 23.8/24.0 (C-15)^a, 31.2/31.4/31.5/31.8 (C-7, C-21)^a, 32.4 (C-2), 34.5 (C-8), 35.8/35.9 (C-1)^a, 36.0/36.1/36.2/36.3 (C-10)^a, 37.9 (C-12), 40.2 (C-4), 43.3/43.4 (C-13)^a, 49.1/49.2 (C-9)^a, 56.0 (C-14), 62.6 (C-17), 68.5/68.3 (CH-dioxolan)^a, 72.1/72.3/72.6 (CH₂-dioxolan)^a, 103.3 (Cum C-8), 106.4 (Cum C-3 und Cum C-6), 107.0/107.1 (C-3)^a, 110.4/110.5/110.7 (Cum C-4a)^a, 121.7 (C-6), 128.3 (Cum C-5), 139.3/139.6 (C-5)^a, 154.0 (Cum C-8a), 154.2 (Cum C-4), 157.5 (Cum C-7), 159.9 (Cum C-2), 208.5/211.7 (C-20)^a.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ / cm⁻¹ 1723 (C=O, C₂₀), 1704 (C=O, Cum)

HRMS 597.1867 ([M+H]⁺), ber. 597.1852

R_f (DC) 0.66 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **92a:** 18.03 min, **92b:** 18.17 min, **92c:** 18.48 min, **92d:** 18.98 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

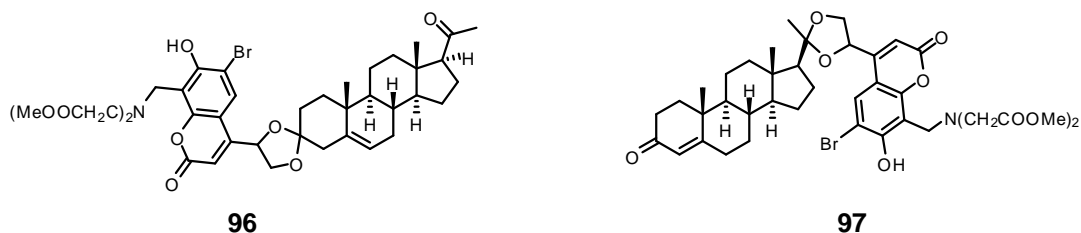
93

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 0.83 (s, 3 H, H-18), 0.87–0.94 (m, 1 H, H-9), 0.96–1.02 (m, 1 H, H-7), 1.03–1.10 (m, 1 H, H-14), 1.15 (s, 3 H, H-19), 1.19–1.29 (m, 2 H, H-16, H-12), 1.38 (s, 3 H, H-21), 1.40–1.46 (m, 1 H, H-11), 1.48–1.53 (m, 1 H, H'-11), 1.55–1.69 (m, 3 H, H-8, H-1, H'-16), 1.70–1.84 (m, 2 H, H-15, H'-7), 1.85–1.93 (m, 2 H, H-17, H'-15), 1.95–2.00 (m, 1 H, H'-1), 2.05–2.12 (m, 1 H, H'-12), 2.13–2.20 (m, 1 H, H-2), 2.22–2.29 (m, 1 H, H-6), 2.35–2.65 (m, 2 H, H'-2, H'-6), 3.56–3.69 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 4.46–4.79 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.22–5.42 (m, 1 H, CH-dioxolan), 5.48–5.67 (m, 1 H, H-4), 6.26 (s, 1 H, Cum H-3), 6.85 (s, 1 H, Cum H-8), 7.93 (s, 1 H, Cum H-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 12.9/13.1 (C-18)^a, 16.9 (C-19), 20.4 (C-11), 22.7 (C-15), 23.3/23.5 (C-16)^a, 24.9 (C-21), 31.6 (C-7), 32.0 (C-6), 33.6 (C-2), 34.5 (C-8), 35.1 (C-1), 36.1 (C-10), 38.2 (C-12), 41.5 (C-13), 53.1/53.2 (C-9)^a, 55.2 (C-14), 57.3/57.3 (C-17)^a, 67.6/69.4/70.0 (CH-dioxolan)^a, 72.5/74.2 (CH₂-dioxolan)^a, 103.2 (Cum C-8), 106.5/106.7/106.8 (Cum C-3 und Cum C-6)^a, 110.6 (Cum C-4a), 113.0 (C-20), 123.2 (C-4), 128.2 (Cum C-5), 153.9 (Cum C-8a), 154.5 (Cum C-4), 157.6 (Cum C-7), 160.0 (Cum C-2), 171.0 (C-5), 198.0 (C-3).

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ / cm^{-1}	1645 (C=O, C ₃), 1722 (C=O, Cum)
HRMS	597.1862 ([M+H] ⁺), ber. 597.1852
R _f (DC)	0.47 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1/1)
t _R (HPLC)	93a : 19.71 min, 93b : 19.89 min, 93c : 20.33 min, 93d : 20.83 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min, 95 % B in A ₁ , 20–25 min)

4'-{8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-spiro[5-pregnen-20-on-3,2'-[1,3]dioxolan] (C₃-BMBHC-ED-caged Progesteron) und 4'-{8-[Bis(methoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-spiro[4-pregnen-3-on-20,2'-[1,3]dioxolan] (C₂₀-BMBHC-ED-caged Progesteron)



200 mg (0.34 mmol) eines Gemisches der Verbindungen **92** und **93** wurden nach Methode **G** in 10 ml EtOH umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 99.3 mg (0.13 mmol, 38 %) eines Gemisches der beiden Verbindungen **96** und **97** als farblosen Feststoff.

97

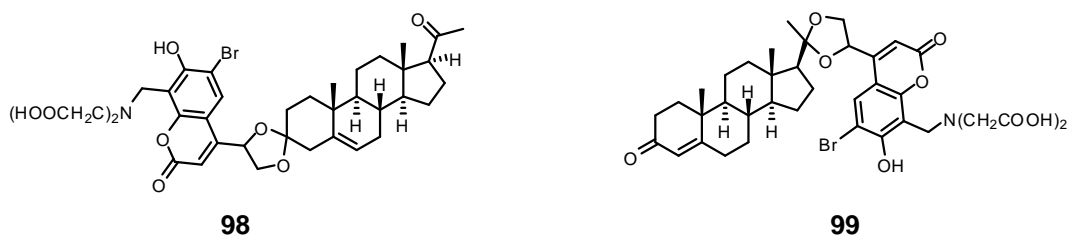
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 0.85 (s, 3 H, H-18), 0.88–1.06 (m, 3 H), 1.16 (s, 3 H, H-19), 1.17–1.33 (m, 2 H), 1.36 (s, 3 H, H-21), 1.43–2.70 (m, 15 H), 3.62 (s, 4 H, NCH₂COOMe), 3.65 (s, 6 H, NCH₂COOCH₃), 3.83–3.87 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.26 (s, 2 H, CH₂NCH₂COOMe), 4.43–4.52, 4.54–4.68 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.50–5.59 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.63–5.66 (m, 1 H, H-4), 5.93–6.09 (m, 1 H, Cum H-3)^a, 7.63–7.70 (m, 1 H, Cum H-5)^a.

HRMS 770.2531 ([M+H]⁺), ber. 770.2540

R_f (DC) 0.71 **96** (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1); 0.64 **97** (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **96a**₁: 13.87 min, **96a**₂: 14.33 min, **96a**₃: 14.70 min, **96a**₄: 14.78 min; **97b**₁: 15.79 min, **97b**₂: 16.23 min, **97b**₃: 16.71 min, **97b**₄: 17.33 min (50–95 % B in A₁, 0–20 min)

4'-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-spiro[5-pregnen-20-on-3,2'-[1,3]dioxolan] (C₃-BBHC-ED-caged Progesteron) und 4'-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}-spiro[4-pregnen-3-on-20,2'-[1,3]dioxolan] (C₂₀-BBHC-ED-caged Progesteron)



40.0 mg (51.9 μmol) des Gemisches aus **96** und **97** wurden nach Methode **F** mit 4.4 mg (104 μmol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Es wurde 24 h bei RT gerührt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (5–80 % B in A₂, 0–60 min) wurden 8.00 mg (10.8 μmol , 21 %) eines Gemisches der Verbindungen **98** und **99** als farbloser Feststoff erhalten.

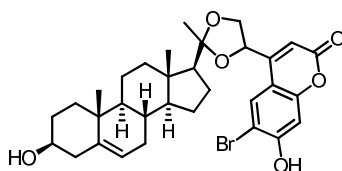
99

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): 0.87 (s, 3 H, H-18), 0.90–1.06 (m, 3 H), 1.17 (s, 3 H, H-19), 1.19–1.33 (m, 2 H), 1.38 (s, 3 H, H-21), 1.40–2.78 (m, 15 H), 3.16 (s, 4 H, NCH₂COOH), 3.81–3.90 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 4.10 (s, 2 H, CH₂NCH₂COOH), 4.40–4.52, 4.54–4.72 (m, 1 H, CHCHH'-dioxolan), 5.51–5.58 (m, 1 H, CHCH₂-dioxolan), 5.58–5.65 (m, 1 H, H-4), 5.90–6.03 (m, 1 H, Cum H-3)^a, 7.67–7.78 (m, 1 H, Cum H-5)^a.

HRMS 764.2045 ([M+Na]⁺), ber. 764.2046

t_R (HPLC) **98a₁–98a₄**: 13.90–14.07 min; **99b₁–99b₄**: 14.79–14.98 min, (50–95 % B in A₁, 0–20 min)

4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[5-pregnen-3 β -ol-20,2'-[1,3]dioxolan] (Bhc-ED-caged Pregnenolon)

**101**

50.0 mg (0.17 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 15 ml Toluol mit 161 mg (0.51 mmol) Pregnenolon, 42.7 mg (0.17 mmol) PPTS und 600 mg MgSO₄ zum Ketal umgesetzt. Es wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Der Rückstand wurde mittels präp. HPLC gereinigt (60–95 % B in A₂, 0–60 min). Es wurden 10.0 mg (0.02 mmol, 10 %, Diastereomerengemisch) **101** als farbloser Feststoff erhalten.

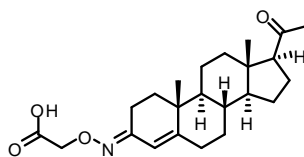
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 0.78 (s, 3 H, H-18), 0.94 (s, 3 H, H-19), 0.96–1.06 (m, 2 H, H-1, H-9), 1.09–1.17 (m, 1 H, H-14, H-11), 1.18–1.26 (m, 1 H, H-12), 1.31–1.35 (m, 1 H, H-2), 1.37 (s, 3 H, H-21), 1.39–1.46 (m, 2 H, H-16, H-8), 1.48–1.56 (m, 2 H, H-15, H-7), 1.59–1.69 (m, 2 H, H'-11, H'-2), 1.70–1.80 (m, 2 H, H'-1), 1.84–2.03 (m, 3 H, H-17, H'-7, H'-16, H'-15), 2.04–2.11 (m, 2 H, H'-12, H-4), 2.12–2.17 (m, 1 H, H'-4), 3.22–3.29 (m, 1 H, H-3), 3.60–3.66 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 4.17–4.24 (m, 1 H, CH₂-dioxolan), 4.72–4.77 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.27–5.31 (m, 1 H, H-6), 6.30 (s, 1 H, Cum H-3), 6.90 (s, 1 H, Cum H-8), 7.97 (s, 1 H, Cum H-5), 11.50 (bs, 1 H, OH).

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ / cm⁻¹ 1723 (C=O, Cum)

HRMS 599.1996 ([M+H]⁺), ber. 599.2008

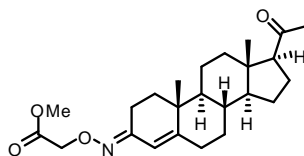
R_f (DC) 0.42 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **101a**: 12.37 min, **101b**: 12.98 min, **101c**: 13.80 min, **101d**: 14.85 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min)

Progesteron-3-O-(carboxymethyl)oxim (Progesteron-3-CMO)⁸¹**104**

943 mg (3 mmol) Progesteron wurden in 15 ml MeOH unter N₂-Spülung gelöst. Der Ansatz wurde auf 55 °C erhitzt und 493 µl (6 mmol) Pyrrolidin wurden zugegeben. Weitere Zugabe von 493 µl (6 mmol) Pyrrolidin erfolgte nach 10 min Rühren bei RT. Anschließend wurden 328 mg (3 mmol) O-(Carboxymethyl)hydroxylamin hinzugefügt. Der Ansatz wurde 5 min auf 55 °C erhitzt. MeOH wurde danach am Vakuum entfernt und der Rückstand in 40 ml H₂O aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit konz. HCl auf 2 eingestellt. Dann wurde 3 x mit je 50 ml EtOAc extrahiert und die resultierende organische Phase wurde 3 x mit je 50 ml 4%iger NaOH-Lösung extrahiert. Die alkalische wässrige Lösung wurde auf 5 °C gekühlt und mit konz. HCl auf pH 2 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde in 60 ml EtOAc aufgenommen und 3 x mit je 40 ml H₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es wurden 844 mg (2.18 mmol, 73 %, cis-trans-Isomerengemisch) **104** als farbloser Feststoff erhalten.

HRMS	410.1313 ([M+Na] ⁺), ber. 410.1307
Schmelzpunkt	169–170 °C
R _f (DC)	0.36 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3/1)
t _R (HPLC)	104a : 10.23 min, 104b : 10.94 min (50–95 % B in A ₁ , 0–20 min)

Progesteron-3-O-(methoxycarbonylmethyl)oxim¹⁰⁹ (Progesteron-3-MCMO)**105**

1.0 g (2.58 mmol) Progesteron-3-CMO wurden unter N₂-Atmosphäre in 100 ml MeOH gelöst. Anschließend wurden 1.29 ml (5.16 mmol) Trimethylsilyldiazomethan hinzuge tropft und es wurde 1 h bei RT gerührt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A₁, 0–60 min) lieferte 613 mg (1.53 mmol, 59 %) **105** als farblosen Feststoff.

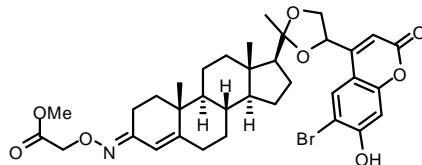
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 0.56 (s, 3 H, H-18), 0.80–0.96 (m, 2 H, steroid), 1.02 (s, 2 H, steroid), 1.06 (s, 1 H, steroid), 1.11–1.18 (m, 1 H, steroid), 1.25–1.30 (m, 1 H, steroid), 1.34–1.49 (m, 3 H, steroid), 1.50–1.64 (m, 2 H, steroid), 1.67–1.78 (m, 1 H, steroid), 1.80–1.92 (m, 1 H, steroid), 1.95–2.03 (m, 2 H, steroid), 2.06 (s, 3 H, H-21), 2.11–2.37 (m, 3 H, steroid), 2.52–2.60 (m, 1 H, H-17), 3.65 (s, 3 H OCH₃), 4.59 (s, 2 H, NOCH₂COOMe), 5.68 (s, 1 H, H-4).

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 13.0 (C-18), 17.3, 19.1, 20.9, 22.2, 24.0, 31.2, 32.2, 34.1, 35.6, 37.5, 38.0, 43.4, 51.5 (OCH₃), 53.0, 62.5 (C-17), 69.9 (NOCH₂COOMe), 116.4 (C-4), 153.4, 156.1, 156.5, 159.8, 170.3, 208.5 (C20).

HRMS	424.2460 ([M+Na] ⁺), ber. 424.2464
Schmelzpunkt	122 °C

R_f (DC)	0.36 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3/1)
t_R (HPLC)	21.19 min, 21.78 min (5–95 % B in A ₁ , 0–20 min, 95 % B in A ₁ , 20–25 min)

4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[4-pregnen-3-on-3-O-(methoxycarbonylmethyl)oxim-20,2'-[1,3]dioxolan] (Bhc-ED-caged Progesteron-3-MCMO)



106

150 mg (0.50 mmol) **15** wurden nach Methode **E** in 30 ml Toluol mit 602 mg (1.50 mmol) Progesteron-3-MCMO, 126 mg (0.50 mmol) PPTS zum Ketal umgesetzt. Es wurde 35 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (70–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 10.3 mg (15.0 μ mol, 3 %) **106** als farblosen Feststoff.

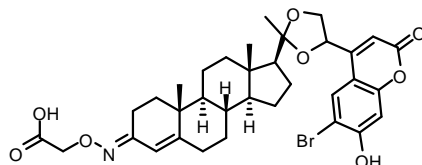
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 0.82–0.85 (m, 3 H, H-18), 0.89–0.91 (m, 1 H, steroid), 1.02–1.05 (m, 3 H, H-19/H-21), 1.12–1.18 (m, 2 H, steroid), 1.22–1.27 (m, 2 H, steroid), 1.38 (s, 3 H, H-19/H-21), 1.43–1.44 (m, 1 H, steroid), 1.46–1.52 (m, 1 H, steroid), 1.61–1.67 (m, 1 H, steroid), 1.71–1.80 (m, 5 H, steroid), 1.84–1.89 (m, 2 H, steroid), 1.96–2.11 (m, 2 H, steroid), 2.18–2.21 (m, 1 H, steroid), 2.24–2.39 (m, 2 H, steroid), 3.52–3.61/4.61–4.64 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 4.59 (s, 2 H, NOCH₂COOCH₃), 5.26–5.31/5.36–5.40 (m, 1 H, CHH'-dioxolan)^a, 5.48–5.53 (m, 1 H, CH-dioxolan), 5.68 (s, 1 H, steroid), 6.23–6.29 (m, 1 H, Cum H-3)^a, 6.85–6.92 (m, 1 H, Cum H-8)^a, 7.88–7.96 (m, 1 H, Cum H-5)^a, 11.49 (bs, 1 H, OH).

HRMS 706.1988 ([M+Na]⁺), ber. 706.1991

R_f (DC) 0.53 (*n*-Hexan/EtOAc = 1/1)

t_R (HPLC) **106a**: 20.34 min, **106b**: 20.92 min, **106c**: 21.50 min, **106d**: 21.83 min (60–95 % B in A₁, 0–20 min, 95 % B in A₁, 20–25 min)

4'-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)-spiro[4-pregnen-3-on-3-O-(carboxymethyl)oxim-20,2'-[1,3]dioxolan] (Bhc-ED-caged Progesteron-3-CMO)



107

10.3 mg (15.1 μ mol) **106** wurden nach Methode **F** mit 0.63 mg (15.1 μ mol) LiOH x H₂O in 5 ml THF/2.5 ml H₂O umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A₂, 0–60 min) lieferte 3.6 mg (5.4 μ mol, 36 %) **107** als farblosen Feststoff.

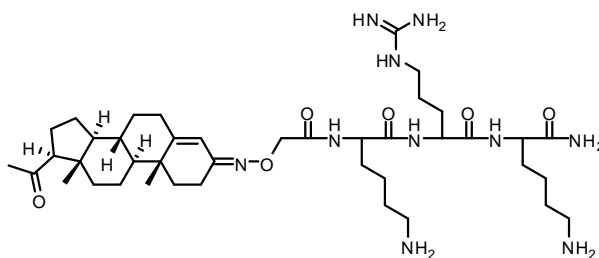
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 0.80 (s, 3 H, H-18), 0.83–0.86 (m, 1 H, steroid), 0.96–1.03 (m, 3 H, H-19/H-21), 1.12–1.26 (m, 3 H, steroid), 1.30–1.33 (m, 1 H, steroid), 1.35–1.38 (m, 3 H, H-19/H-21), 1.43–1.50 (m, 2 H, steroid), 1.59–1.65 (m, 1 H, steroid), 1.67–1.81 (m, 4 H, steroid), 1.84–1.92 (m, 3 H, steroid), 1.95–2.01 (m, 1 H, steroid), 2.03–2.19 (m, 2 H, steroid), 2.22–2.33 (m, 2 H, steroid), 2.82–2.93/3.55–3.62 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 4.18–4.24 (m, 2 H, NOCH₂COOH), 4.48–4.55, 4.64–4.68 (m, 1 H, CHH'-dioxolan), 5.11–5.17/5.21–5.28 (m, 1 H, CH-dioxolan)^a, 5.39–5.48 (m, 1 H, steroid), 5.59–5.62/5.63–5.66 (s, 1 H, Cum H-3)^a, 5.74–5.78/5.79–5.83 (s, 1 H, Cum H-8)^a, 7.51–7.55/7.57–7.62 (s, 1 H, Cum H-5)^a.

HRMS 668.1866 ([M-H]⁻), ber. 668.1859

t_R (HPLC) **107a**: 21.16 min, **107b**: 21.23 min, **107c**: 21.45 min, **107d**: 21.64 min (5–95 % B in A₁, 0–20 min, 95 % B in A₁, 20–25 min)

5.5 Peptidsynthesen

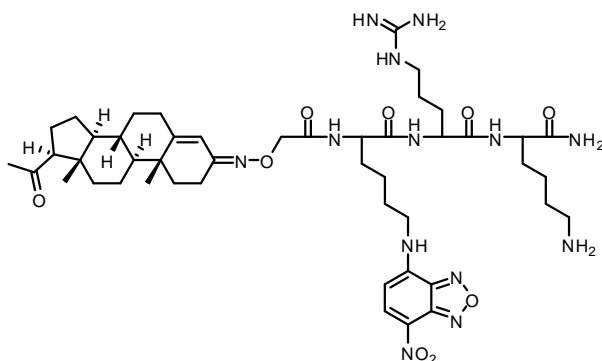
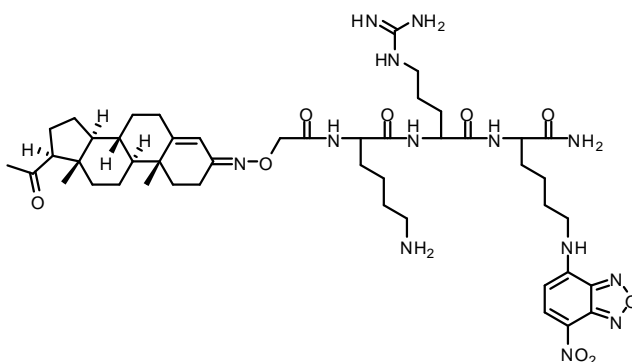
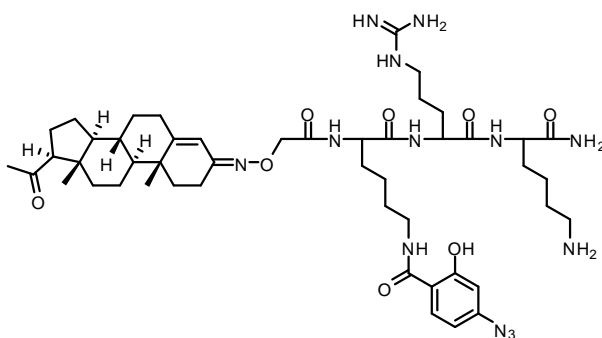
(Progesteron-3-CMO)-Lys-Arg-Lys-NH₂



108

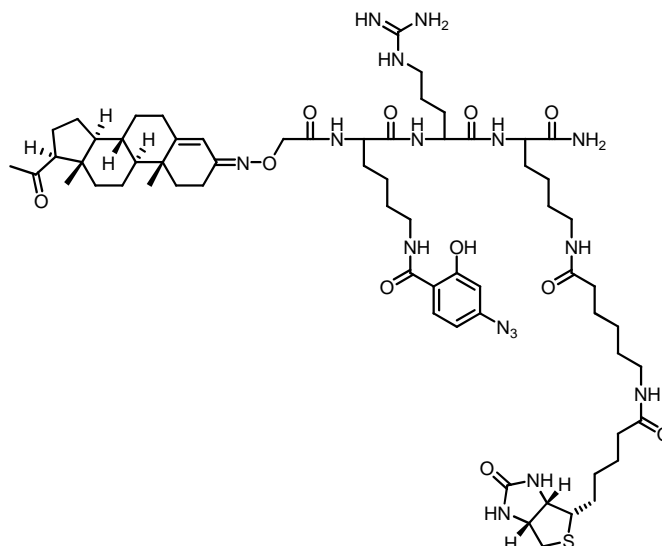
MS 799.5567 ([M+H]⁺), ber. 799.5558

t_R (LCMS) 2.23 min, 2.26 min (5–95 % B in A, 0–6 min)

(Progesteron-3-CMO)-Lys(NBD)-Arg-Lys-NH₂**109****MS** 962.5572 ([M+H]⁺), ber. 962.5576**t_R (LCMS)** 3.06 min, 3.11 min (5–95 % B in A, 0–6 min)**(Progesteron-3-CMO)-Lys-Arg-Lys(NBD)-NH₂****110****MS** 962.5598 ([M+H]⁺), ber. 962.5576**t_R (LCMS)** 2.81 min, 2.85 min (5–95 % B in A, 0–6 min)**(Progesteron-3-CMO)-Lys(ASA)-Arg-Lys-NH₂****111**

MS	960.5789 ($[M+H]^+$), ber. 960.5783
t_R (LCMS)	3.10 min, 3.15 min (5–95 % B in A, 0–6 min)

(Progesteron-3-CMO)-Lys(ASA)-Arg-Lys(6-(Biotinylamino)hexansäure)-NH₂



112

MS	1299.7370 ($[M+H]^+$), ber. 1299.7400
t_R (LCMS)	3.31 min, 3.37 min (5–95 % B in A, 0–6 min)

6 Literaturverzeichnis

- [1] (a) K. Jarowicki, P. Kocienski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 2109–2135; (b) P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's protective groups in organic synthesis*; 4. Aufl.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, **2006**.
- [2] (a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154; (b) M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2056–2083; (c) M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192–2219.
- [3] (a) V. N. R. Pillai, *Synthesis (Stuttg)* **1980**, 1–26; (b) N. Hoffmann, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1052–1103.
- [4] Kyriacos C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1636–1638.
- [5] (a) A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4707–4712; (b) A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4785–4791; (c) J. M. Alonso, A. Reichel, J. Piehler, A. del Campo, *Langmuir* **2008**, *24*, 448–457.
- [6] (a) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458; (b) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; (c) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.
- [7] (a) C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346; (b) C. G. Bochet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2071–2073; (c) C. G. Bochet, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2140–2142; (d) N. Kotzur, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, **2009**.
- [8] J. E. Corrie, T. Furuta, R. Givens, A. L. Yousef, M. Goeldner, *Photoremovable Protecting Groups used for the caging of Biomolecules in Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and caged Biomolecules*; Hrsg.: M. Goeldner, R. S. Givens; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**, 1–94.
- [9] J. A. Barltrop, P. J. Plant, Schofiel.P, *Chem. Commun.* **1966**, 822–823.
- [10] Patchorn.A, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333–6335.
- [11] (a) D. Leipert, P. Heiduschka, J. Mack, H. J. Egelhaaf, D. Oelkrug, G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2338–2340; (b) D. Leipert, P. Heiduschka, J. Mack, H. J. Egelhaaf, D. Oelkrug, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2471–2474; (c) A. Specht, M. Goeldner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2008–2012; (d) A. Specht, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2042–2046.
- [12] C. Y. Chang, B. Niblack, B. Walker, H. Bayley, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 391–400.
- [13] (a) A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1138–1141; (b) S. Kantevari, C. V. Narasimahji, H. B. Mereyala, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5849–5854.
- [14] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**, 125–142.
- [15] (a) Y. V. Il'ichev, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10159–10170; (b) Y. V. Il'ichev, M. A. Schworer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–4595; (c) M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schworer, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 33–42.
- [16] M. C. Pirrung, Y. R. Lee, K. Park, J. B. Springer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5042–5047.

- [17] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [18] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [19] (a) B. Amit, D. A. Benefraim, A. Patchornik, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1976**, 57–63; (b) S. Pass, B. Amit, A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7674–7675.
- [20] (a) C. Helgen, C. G. Bochet, *Synlett* **2001**, 1968–1970; (b) J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 960–969; (c) F. Afroz, A. D. Barone, P. A. Bury, C. A. Chen, A. Cuppoletti, R. G. Kuimelis, H. D. Li, G. H. McGall, *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1936–1939; (d) G. Papageorgiou, D. Ogden, J. E. T. Corrie, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7228–7233.
- [21] A. Hassner, D. Yagudayev, T. K. Pradhan, A. Nudelman, B. Amit, *Synlett* **2007**, 2405–2409.
- [22] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [23] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [24] (a) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1046–1048; (b) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1077–1080.
- [25] (a) V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geissler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887–7891; (b) V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8099–8104.
- [26] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [27] (a) B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117; (b) V. Hagen, B. Dekowski, N. Kotzur, R. Lechler, B. Wiesner, B. Briand, M. Beyermann, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1621–1627.
- [28] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.
- [29] R. O. Schoenleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, 501–504.
- [30] A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867–4870.
- [31] J. H. Wosnick, M. S. Shoichet, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 55–60.
- [32] (a) J. C. Sheehan, R. M. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5277–5281; (b) J. C. Sheehan, R. M. Wilson, A. W. Oxford, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1971**, 123–126.
- [33] (a) J. C. Sheehan, K. Umezawa, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3771–3774; (b) R. S. Givens, C. H. Park, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6259–6262.
- [34] (a) O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422; (b) Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267–4276; (c) M. J. Davis, C. H. Kragor, K. G. Reddie, H. C. Wilson, Y. Zhu, T. M. Dore, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721–1729.
- [35] J. Hebert, D. Gravel, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 187–189.
- [36] D. Gravel, J. Hebert, D. Thoraval, *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 400–410.

- [37] M. J. Aurell, C. Boix, M. L. Ceita, C. Llopis, A. Tortajada, R. Mestres, *J. Chem. Res. Synop.* **1995**, 452–453.
- [38] (a) P. F. Wang, H. Y. Hu, Y. Wang, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1533–1535; (b) P. F. Wang, H. Y. Hu, Y. Wang, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2831–2833; (c) P. F. Wang, Y. Wang, H. Y. Hu, C. Spencer, X. Liang, L. R. Pan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6152–6157.
- [39] P. F. Wang, M. Mondal, Y. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2055–2058.
- [40] J. Y. Yu, W. J. Tang, H. B. Wang, Q. H. Song, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2007**, *185*, 101–105.
- [41] A. P. Kostikov, N. Malashikhina, V. V. Popik, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1802–1804.
- [42] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [43] C. Zscherp, A. Barth, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1875–1883.
- [44] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777–8778.
- [45] T. Strunker, I. Weyand, W. Bonigk, Q. Van, A. Loogen, J. E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, U. B. Kaupp, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1149–1154.
- [46] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900.
- [47] G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 486–493.
- [48] S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784.
- [49] U. B. Kaupp, N. D. Kashikar, I. Weyand, *Annu. Rev. Physiol.* **2008**, *70*, 93–117.
- [50] (a) M. E. Teves, F. Barbano, H. A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska, L. C. Giojalas, *Fertil. Steril.* **2006**, *86*, 745–749; (b) S. Publicover, C. V. Harper, C. Barratt, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 235–242.
- [51] (a) M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J. A. Riffell, C. H. Wetzel, R. K. Zimmer, H. Hatt, *Science* **2003**, *299*, 2054–2058; (b) S. Bartram, W. Boland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4729–4731; (c) S. Bartram, W. Boland, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4877–4879.
- [52] M. Eisenbach, L. C. Giojalas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 276–285.
- [53] A. Aranda, A. Pascual, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1269–1304.
- [54] E. Falkenstein, H. C. Tillmann, M. Christ, M. Feuring, M. Wehling, *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 513–555.
- [55] A. Sanchezbueno, M. J. Sancho, P. H. Cobbold, *Biochem. J* **1991**, *280*, 273–276.
- [56] A. Samadi, C. G. Carlson, A. Gueorguiev, R. J. Cenedella, *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* **2002**, *444*, 700–709.
- [57] (a) P. Thomas, S. Meizel, *Biochem. J* **1989**, *264*, 539–546; (b) P. F. Blackmore, S. J. Beebe, D. R. Danforth, N. Alexander, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1376–1380.
- [58] B. S. Jaiswal, I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, M. Eisenbach, *Biol. Reprod.* **1999**, *60*, 1314–1319.
- [59] N. Goodwin, Dissertation, Universität zu Köln, **2010**.
- [60] P. F. Blackmore, J. F. Fisher, C. H. Spilman, J. E. Bleasdale, *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 727–739.
- [61] (a) C. Meyer, R. Schmid, P. C. Scriba, M. Wehling, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 726–731; (b) E. Falkenstein, C. Meyer, C. Eisen, P. C. Scriba, M. Wehling, *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.* **1996**, 229, 86–89; (c) Y. Zhu, J. Bond, P. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 2237–2242.
- [62] P. Thomas, C. Tubbs, V. F. Garry, *Steroids* **2009**, 74, 614–621.
- [63] (a) R. Axel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6110–6127; (b) R. Axel, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6264–6282.
- [64] M. Spehr, H. Hatt, *Drug News Perspect.* **2004**, 17, 165–171.
- [65] M. Spehr, K. Schwane, J. A. Riffell, J. Barbour, R. K. Zimmer, E. M. Nauhaus, H. Hatt, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 40194–40203.
- [66] A. Gakamsky, L. Armon, M. Eisenbach, *Hum. Reprod.* **2009**, 24, 1152–1163.
- [67] G. M. Huitink, D. P. Poe, H. Diehl, *Talanta* **1974**, 21, 1221–1229.
- [68] M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege, T. V. S. Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1985–1988.
- [69] (a) D. Ferroud, J. Collard, M. Klich, C. Dupuis-Hamelin, P. Mauvais, P. Lassaigne, A. Bonnefoy, B. Musicki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2881–2886; (b) I. V. Nagorichna, I. P. Dubovik, M. M. Garazd, V. P. Khilya, *Chem. Nat. Compd.* **2003**, 39, 253–261.
- [70] X. Li, N. Jain, R. K. Russell, R. Ma, S. Branum, J. Y. Xu, Z. Sui, *Org. Process Res. Dev.* **2006**, 10, 354–360.
- [71] F. P. Doyle, H. R. J. Waddington, J. C. Hanson, J. H. C. Nayler, G. R. Thomas, *J. Chem. Soc.* **1963**, 497–506.
- [72] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyo, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4717–4720.
- [73] V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2790–2797.
- [74] T. Furuta, K. Noguchi, *Trends Analyt. Chem.* **2004**, 23, 511–519.
- [75] B. Curten, P. H. M. Kullmann, M. E. Bier, K. Kandler, B. F. Schmidt, *Photochem. Photobiol.* **2005**, 81, 641–648.
- [76] J. F. W. McOmie, M. L. Watts, D. E. West, *Tetrahedron* **1968**, 24, 2289–2292.
- [77] S. S. Lele, S. Sethna, *J. Org. Chem.* **1958**, 23, 1731–1734.
- [78] B. Das, M. Krishnaiah, K. Venkateswarlu, V. S. Reddy, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1665–1665.
- [79] P. Wessig, K. Mollnitz, C. Eiserbeck, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4859–4872.
- [80] E. Breitmaier, G. Jung, *Organische Chemie*; Thieme, Stuttgart **2005**.
- [81] A. H. Janoski, F. C. Shulman, G. E. Wright, *Steroids* **1974**, 23, 49–64.
- [82] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 483–514.
- [83] (a) P. F. Blackmore, J. Neulen, F. Lattanzio, S. J. Beebe, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 18655–18659; (b) S. Meizel, K. O. Turner, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1991**, 77, R1–R5.
- [84] T. Furuta, H. Torigai, M. Sugimoto, M. Iwamura, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3953–3956.
- [85] (a) R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 5000–5004; (b) R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 5768–5774.
- [86] A. Barth, J. E. T. Corrie, *Biophys. J.* **2002**, 83, 2864–2871.

- [87] (a) H. G. O. Becker, *Einführung in die Photochemie*; Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, **1991**; (b) D. Geißler, Y. N. Antonenko, R. Schmidt, S. Keller, O. O. Krylova, B. Wiesner, J. Bendig, P. Pohl, V. Hagen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1219–1223.
- [88] D. Geissler, Y. N. Antonenko, R. Schmidt, S. Keller, O. O. Krylova, B. Wiesner, J. Bendig, P. Pohl, V. Hagen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1195–1198.
- [89] H. Khalfan, R. Abuknesha, M. Randweaver, R. G. Price, D. Robinson, *Histochem. J.* **1986**, *18*, 497–499.
- [90] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991–999.
- [91] (a) J. Bendig, D. Kreysig, R. Schoneich, *Zeitschr. f. Chem.* **1979**, *19*, 151–152; (b) W. Rettig, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 969–986.
- [92] (a) G. Jones, W. R. Jackson, C. Choi, W. R. Bergmark, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 294–300; (b) W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 971–988.
- [93] J. Bjerrum, G. Schwarzenbach, L. Sillen, *The Chemical Society: London* **1958**.
- [94] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119–1128.
- [95] F. C. Nachod, J. J. Zuckerman, *Determination of organic structures by physical methods*; Academic Press: New York-London, **1971**.
- [96] (a) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, B. Wiesner, B. Schade, S. Helm, D. Lorenz, U. B. Kaupp, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1999**, *53*, 91–102; (b) R. O. Schonleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97–101; (c) V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434–442.
- [97] D. Geißler, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, **2006**.
- [98] F. Kilic, N. D. Kashikar, R. Schmidt, L. Alvarez, L. Dai, I. Weyand, B. Wiesner, N. Goodwin, V. Hagen, U. B. Kaupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9463–9463.
- [99] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748–5749.
- [100] W. H. Melhuish, *Appl. Opt.* **1975**, *14*, 26–27.
- [101] D. F. Eaton, *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107–1114.
- [102] (a) C. Grewer, H. D. Brauer, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 5001–5006; (b) R. P. Herbrich, R. Schmidt, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2000**, *133*, 149–158.
- [103] H. Gybaeck, Patent WO 2006/121390 A2, **2006**.
- [104] L. Gang, Patent US 2002/0072516 A1, **2002**.
- [105] D. E. Rudisill, J. K. Stille, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5856–5866.
- [106] B. C. G. Söderberg, J. A. Shriver, S. H. Cooper, T. L. Shrou, E. Scott Helton, L. R. Austin, H. H. Odens, B. R. Hearn, P. C. Jones, T. N. Kouadio, T. H. Ngi, R. Baswell, H. John Caprara, M. D. Meritt, T. T. Mai, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8775–8791.
- [107] F. L. Weigl, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2044–2045.
- [108] I. Thomsen, K. B. G. Torssell, *Acta Chem. Scand.* **1991**, *45*, 539–542.
- [109] M. Adamczyk, Y. Y. Chen, J. R. Fishpaugh, J. C. Gebler, *J. Chromatogr. A* **1993**, *657*, 345–348.

7 Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2006 bis Oktober 2009 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin angefertigt und von Herrn Prof. Dr. J. Rademann und Herrn Dr. V. Hagen betreut.

Kooperationen mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und bereits publizierte Teilergebnisse der Dissertation sind in der Arbeit aufgeführt.

Ich versichere, daß ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient. Ich erkläre hiermit die Kenntnis der dem angestrebten Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung vom 01.09.2005.

Berlin, im August 2010

Funda Kilic