

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR-WIRKUNGS-  
BEZIEHUNG AN G1, DEM ERSTEN SELEKTIVEN  
GPR30 AGONISTEN

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  
SANDRA ALSCHER  
aus Berlin

Februar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2008 bis Februar 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am: 07.06.2012

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. Ronald Gust,**

dem ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung herzlich danken möchte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolber für die Abbildungen der form- und pharmakophorbasierten Überlagerung.

Großer Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Analytikabteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Spektren. Frau Dr. Adelheid Hagenbach aus der Arbeitsgruppe von Prof. Abram danke ich für die Anfertigung der Kristallstrukturaufnahmen.

Ich danke meinen Kollegen für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während des gesamten Zeitraums. Besonders möchte ich mich bei Frau vom Bauer für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank den technischen Angestellten Maxi Wenzel und Silke Bergemann für die Unterstützung bei zellulären Fragen, sowie Thomas Rudolf nicht nur für seine Hilfestellung bei chemischen Fragen, sondern auch ganz besonders für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, mit viel guter Laune.

Ich danke meinen Freunden für ihre Treue und Unterstützung, insbesondere Michal Andrä und Karol Nowosinski für ihre Hilfsbereitschaft bei chemischen Fragen und Marc Bonin für seine Hilfestellung bei allen Computerfragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Partner Boris Vollrath bedanken, die mir mit ihrer liebevollen Unterstützung immer Halt geben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater Prof. Dr. Günter Scherowsky für das Korrekturlesen und vor allem für seine unendliche Geduld.



Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Theoretische Grundlagen	1
1.1.1	Estrogene und ihre Rezeptoren	1
1.1.1.1	Transkriptionsaktivierung	1
1.1.1.2	G-Protein-gekoppelter Rezeptor: GPR30	2
1.1.1.2.1	Verteilung des GPR30 im Körper	4
1.1.1.2.2	Lokalisation des GPR30 in der Zelle	4
1.1.1.2.3	Physiologische Funktion des GPR30	5
1.1.1.2.4	Rolle des GPR30 bei der Tumorentstehung	6
1.1.1.2.5	Bekannte Verbindungen als Liganden des GPR30	7
1.1.1.2.6	Die ersten selektiven nichtsteroidalen GPR30 Liganden: G1 und G15	9
1.1.2	Die Diels-Alder-Reaktion	10
1.1.2.1	Einfluss von Substituenten	12
1.1.2.2	Regioselektivität	12
1.1.2.3	Stereoselektivität	13
1.1.2.3.1	cis-Prinzip	13
1.1.2.3.2	Aldersche endo-Regel	13
1.1.2.4	Lösungsmittel und Katalysatoreffekte	14
1.2	Problemstellung	15
<b>2</b>	<b>Synthetischer Teil</b>	<b>19</b>
2.1	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen	19
2.1.1	Variation der einzelnen Molekülbausteine	19
2.1.1.1	Variation der Aldehydkomponente	19
2.1.1.2	Variation der Dienophil- und der Aldehydkomponente	21
2.1.1.3	Variation der Aminkomponente	22
2.1.2	Verbindungen in Anlehnung an Estron	26
2.1.3	Verbindungen in Anlehnung an Estradiol	27
2.1.3.1	Variation der funktionellen Gruppen	28

2.1.4	Dimere Verbindung .....	29
2.2	Synthese der Tetrahydrochinolingrundstruktur .....	30
2.2.1	Synthese mit Trifluoressigsäure als Katalysator .....	30
2.2.2	Synthese mit Scandiumtrifluormethansulfonat als Katalysator ..	31
2.2.3	Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid.....	31
2.2.4	Reduktion von Nitrogruppen am aromatischen Ring mittels Zinnchlorid .....	32
2.2.5	Acetylierung an Stickstoff und Sauerstoff.....	33
2.3	Synthese der von Estron und Estradiol abgeleiteten Verbindungen.....	33
2.3.1	Synthese der chloresubstituierten 4-Methoxybenzaldehyde .....	34
2.3.2	Synthese des 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyds .....	34
2.3.3	Etherspaltung mit Bortribromid .....	35
2.3.4	Etherspaltung mit $\text{AlCl}_3$ und Ethanthiol.....	35
<b>3</b>	<b>Strukturuntersuchungen .....</b>	<b>37</b>
3.1	Strukturanalyse der Tetrahydrocyclopentachinolin-Derivate am Beispiel von G1 .....	37
3.2	Strukturanalyse der Hexahydropyranochinolin-Derivate.....	41
3.2.1	Konfigurationszuordnung der Diastereomere.....	41
3.3	Strukturanalyse mittels Hochtemperatur-NMR .....	48
3.4	Dem Estron und Estradiol angepasste Verbindungen .....	51
3.4.1	Strukturklärung von 1-(4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b- tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon.....	54
3.4.2	Endo- und exo-Formen .....	57
3.4.2.1	Endo-exo-Isomerisierung bei Etherspaltung.....	58
3.4.2.2	Endo-exo-Gemische .....	59
<b>4</b>	<b>Pharmakologische Untersuchungen .....</b>	<b>63</b>
4.1	Zytotoxizitätsuntersuchungen .....	63
4.1.1	Verwendete Zelllinien .....	63
4.1.2	Das verwendete Testsystem .....	63
4.1.3	Testergebnisse .....	65
4.1.3.1	Einfluss der Aldehydkomponente .....	65

4.1.3.2	Einfluss der Dienophil- und der Aldehydkomponente .....	68
4.1.3.3	Einfluss der Aminkomponente.....	70
4.1.3.4	Zytotoxizität der Verbindungen in Anlehnung an Estron .....	76
4.1.3.5	Zytotoxizität der Verbindungen in Anlehnung an Estradiol....	78
4.1.3.6	Einfluss der Amin- und Aldehydkomponente .....	80
4.1.3.7	Zytotoxizität der dimeren Verbindung.....	81
4.2	Estrogenitätsuntersuchungen .....	82
4.2.1	Das verwendete Testsystem.....	82
4.2.2	Testergebnisse.....	83
4.2.2.1	Verbindungen in Anlehnung an Estron.....	84
4.2.2.2	Verbindungen in Anlehnung an Estradiol .....	85
4.2.2.3	Verbindungen mit Variation der Aldehyd- und Aminkomponente .....	87
4.2.2.4	Verbindungen mit selektiver Zytotoxizität an MCF-7 Zellen ..	88
4.2.2.5	Antiestrogenität.....	88
<b>5</b>	<b>Fluoreszenzuntersuchungen.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>93</b>
6.1	Endo-exo Selektivität.....	93
6.2	Regioselektivität des Angriffs von Cyclopentadien an das Azadien .....	96
6.3	Zytotoxizität.....	97
6.4	Verbindungen in Anlehnung an Estron und Estradiol .....	99
6.4.1	Untersuchungen der Zytotoxizität und Estrogenität .....	100
6.5	Ausblick .....	102
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>107</b>
9.1	Synthetischer und analytischer Teil.....	107
9.1.1	Allgemeine Angaben.....	107
9.1.2	Synthesevorschriften und analytische Daten .....	108

9.1.2.1	Variation der Aldehydkomponente.....	108
9.1.2.1.1	Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Tetrahydrocyclopentachinolinderivate .....	108
9.1.2.1.2	Allgemeine Vorschrift zur Synthese mit Scandium(III)trifluormethansulfonat (Scandiumtriflat).....	108
9.1.2.2	Variation der Ring- und Aldehydkomponente .....	115
9.1.2.2.1	Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Hexahydropyrano- chinolinderivate .....	115
9.1.2.3	Variation der Aminkomponente .....	118
9.1.2.3.1	Allgemeine Vorschrift zur Reduktion mit $\text{LiAlH}_4$ .....	120
9.1.2.3.2	Allgemeine Vorschrift zur Acetylierung .....	134
9.1.2.4	Von Estron abgeleitete Strukturen .....	135
9.1.2.4.1	Allgemeine Vorschrift zur Synthese der chloresubstituierten Benzaldehydvorstufen .....	135
9.1.2.4.2	Allgemeine Vorschrift zur Synthese der fluoresubstituierten Benzaldehydvorstufen .....	136
9.1.2.4.3	Vorschrift zur Etherspaltung mit $\text{AlCl}_3$ und Ethanthiol .....	142
9.1.2.5	Von Estradiol abgeleitete Strukturen .....	144
9.1.2.5.1	Vorschrift zur Reduktion von Nitrogruppen mit $\text{SnCl}_2$ .....	153
9.1.2.5.2	Allgemeine Vorschrift zur Etherspaltung mit Bortribromid ...	154
9.1.2.6	Dimere Verbindung .....	155
9.2	Biochemischer und pharmakologischer Teil .....	156
9.2.1	Verwendete Geräte .....	156
9.2.2	Verbrauchsmaterialien .....	157
9.2.3	Reagenzien und Lösungen .....	157
9.2.4	Biologisches Material .....	159
9.2.5	Allgemeine Kultivierungsbedingungen .....	159
9.2.5.1	Zellkulturmedium .....	159
9.2.5.2	Passagieren und Mediumwechsel .....	159
9.2.5.3	Zellzahlbestimmung .....	160
9.2.6	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	160
9.2.6.1	Aussaat der Zellen.....	160

---

9.2.6.2	Substanzzugabe .....	160
9.2.6.3	Abstoppen des Zelltests .....	161
9.2.6.4	Färben und Auswertung des Zelltests .....	161
9.2.6.5	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte .....	162
9.2.7	Luciferase-Assay zur Bestimmung der Estrogenität und Antiöstrogenität .....	162
9.2.7.1	Kultivierung und Aussaat der Zellen .....	162
9.2.7.2	Transfektion .....	162
9.2.7.3	Substanzzugabe .....	163
9.2.7.4	Abstoppen des Zelltests .....	165
9.2.7.5	Auswertung .....	165
9.3	Fluoreszenzspektroskopie .....	165
9.3.1	Gerät .....	165
9.3.2	Aufnahme der Fluoreszenzspektren .....	165
<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>167</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>175</b>
11.1	Poster .....	175



## Abkürzungsverzeichnis

COSY	Correlatetd Spectroscopy (zweidimensionale NMR-Spektroskopie)
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF Rezeptor
ER $\alpha/\beta$	Estrogenrezeptor $\alpha$ und $-\beta$
ERE	Estrogene responsive element
GPR30	G-Protein gekoppelter Rezeptor 30
HB-EGF	heparinbound EGF
IA	intrinsische Aktivität
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metallproteinasen
NOE	Nuclear Overhauser Effect
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
Schmb.	Schmelzbereich
Schmp.	Schmelzpunkt
Sc(OTf) <sub>3</sub>	Scandium(III)triflat/Scandium(III)trifluormethansulfonat
TFA	Trifluoressigsäure



# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretische Grundlagen

### 1.1.1 Estrogene und ihre Rezeptoren

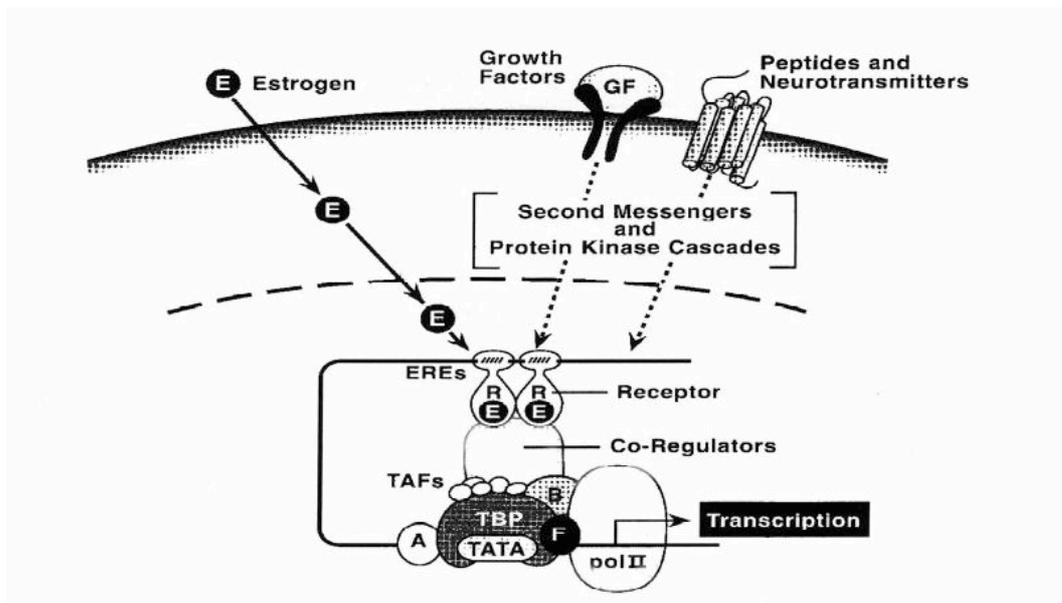
Estrogene spielen eine fundamentale Rolle in vielen verschiedenen physiologischen Abläufen des menschlichen Körpers. Sie besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung von Wachstum und Differenzierung in verschiedenen Zellgeweben. Insbesondere wirken Estrogene auf die weiblichen und männlichen Fortpflanzungsorgane, die Brustdrüsen, das Skelett und das kardiovaskuläre System. Andererseits haben sie auch wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs.

Die Wirkungen von steroidalen und nichtsteroidalen Hormonen werden über spezifische Rezeptoren vermittelt. Seit den 60er Jahren ist bekannt, dass 17 $\beta$ -Estradiol (E2) seine Wirkung über einen intrazellulären Estrogenrezeptor, später als Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) bezeichnet, entfaltet (Jensen and DeSombre 1973). Die Kristallstruktur der ligandenbindenden Domäne dieses Rezeptors wurde 1997 beschrieben (Brzozowski, Pike et al. 1997). 1996 wurde mit ER $\beta$  ein zweiter intrazellulärer Rezeptor gefunden (Kuiper, Carlsson et al. 1997). ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zu den nukleären Hormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren fungieren. Sie vermitteln genomische Wirkungen innerhalb von Stunden bis Tagen.

#### 1.1.1.1 Transkriptionsaktivierung

In Abwesenheit eines Liganden liegen die Estrogenrezeptoren (ERs) an Hitzeschockproteine (z.B. HSP90) gebunden vor (Joab, Radanyi et al. 1984), (Renoir, Buchou et al. 1986), (Sanchez, Meshinchi et al. 1987). Kommt es zur Bindung eines Liganden, dissoziiert der Komplex aus Rezeptor und HSP90. Zusätzlich werden Phosphorylierungsprozesse ausgelöst (Le Goff, Montano et al. 1994), (Denton, Koszewski et al. 1992). Durch eine nun mögliche Konformationsänderung können die ERs dimerisieren. Es werden sowohl Homo- (ER $\alpha$ /ER $\alpha$  oder ER $\beta$ /ER $\beta$ ) als auch Heterodimere (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) gebildet (Cowley, Hoare et al.

1997), (Pettersson, Grandien et al. 1997). Diese Dimere binden an sogenannte "estrogen responsive elements" (EREs) der DNA und führen so zur Transkriptionsaktivierung, s. **Abb. 1**. Unterstützt wird dieser Prozess durch Koregulatoren und Transkriptionsfaktoren, wobei letztere an die sog. TATA-Box (25-30 Basenpaare vom Startpunkt entfernt) binden und damit den Präinitiationskomplex bilden (Lee and Hahn 1995). Dieser Komplex sorgt nun für das Ablesen der DNA mittels RNA-Polymerase II.

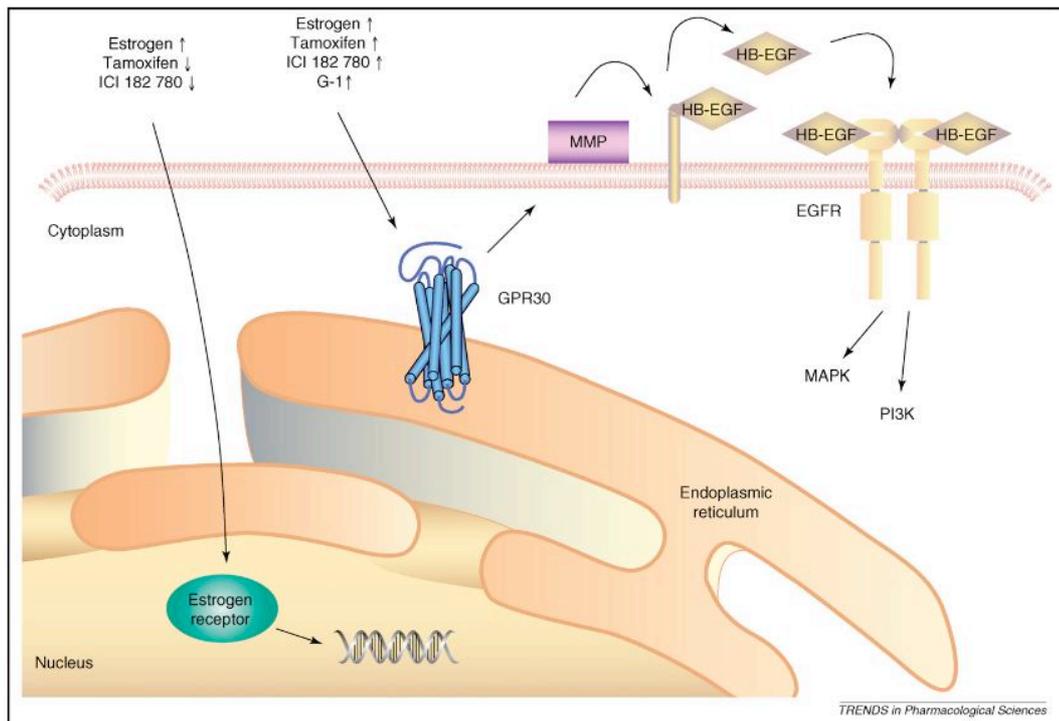


**Abb. 1:** Modell der Transkriptionsaktivierung (Katzenellenbogen, Montano et al. 1997), (Tsai and O'Malley 1994), E: Estrogen, R: Rezeptor, ERE: "estrogen responsive element", GF: "growth factor", TBP: TATA-bindendes Protein, TAFs: TBP-assoziierte Faktoren, pol II: Polymerase II

### 1.1.1.2 G-Protein-gekoppelter Rezeptor: GPR30

In den 90er Jahren wurde entdeckt, dass Steroide ihre Wirkung auch auf einem wesentlich schnelleren, nichtgenomischen Weg, ausüben können. Es wurde ein weiterer Estrogenrezeptor identifiziert, der im Vergleich zu den klassischen ERs eine vollkommen andere Struktur aufweist: der **GPR30**. Er gehört in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die durch eine siebenfach transmembrane Helix charakterisiert sind und hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert werden. Bei der Signalübertragung an GPCRs kommt es zu einer Konformationsänderung der Guaninnukleotide. Dies hat eine Aktivierung von

Effektorproteinen wie Kinasen, Phospholipasen und Adenylatcyclasen zur Folge. Die Aktivierung des GPR30 löst Signale aus, die second messenger (intrazelluläre Botenstoffe) stimulieren und die Freisetzung von EGF-verwandten Substanzen fördern, die ihrerseits den EGF-Rezeptor aktivieren (Filardo, Quinn et al. 2000), (Filardo 2002), (Ho and Liao 2002).



**Abb. 2:** Übersicht der Estrogen vermittelten Signalübertragung an GPR30 (Prossnitz, Sklar et al. 2008); MMP: Matrix-Metallproteinasen, HB-EGF: heparin-bound Epidermal growth factor, EGFR: Epidermal growth factor Rezeptor, MAPK: mitogen-aktivierte Proteinkinase, PI3K: Phosphoinositol-3-kinase; ↑: agonistische Aktivität, ↓: antagonistische Aktivität. Die aufgeführten Liganden Tamoxifen, ICI 182 780 und G1 werden in den Kapiteln 1.1.1.2.5 und 1.1.1.2.6 beschrieben.

Durch Bindung eines Liganden an den GPR30 werden unter anderem an der Zelloberfläche befindliche Matrix-Metallproteinasen (MMP) aktiviert, die eine Reaktionskaskade unter Freisetzung von HB-EGFs (heparin-bound epidermal growth factors) auslösen, s. **Abb. 2**. Binden letztere an den EGFR (EGF-Rezeptor) kommt es zur Aktivierung von MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase), PI3K (Phosphoinositol-3-kinase) und zur Freisetzung von Calcium (Filardo, Quinn et al. 2000), (Revankar, Cimino et al. 2005).

#### **1.1.1.2.1 Verteilung des GPR30 im Körper**

Der GPR30 ist im menschlichen Körper weit verbreitet. Er wurde nicht nur in gesunden Geweben, wie z.B. Gehirn, Lunge, Leber, Herz, Pankreas, Placenta, Blutgefäßen und Knochen gefunden, sondern auch in Endometrium-, Ovarial- und Brustkrebs (Owman, Blay et al. 1996), (O'Dowd, Nguyen et al. 1998), (Haas, Meyer et al. 2007), (Heino, Chagin et al. 2008), (Carmeci, Thompson et al. 1997), (Smith, Leslie et al. 2007).

#### **1.1.1.2.2 Lokalisation des GPR30 in der Zelle**

Die Lokalisation des GPR30 in der Zelle wird noch kontrovers diskutiert. Forschungsergebnisse von Funakoshi und Filardo belegen, dass GPR30 in der Plasmamembran von menschlichen Brustkrebszellen exprimiert wird (Funakoshi, Yanai et al. 2006), (Filardo, Quinn et al. 2007). In der Arbeitsgruppe um Funakoshi wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der die Membranständigkeit des GPR30 belegt. Filardo et al. konnten mit Hilfe von E2, welches an bovines Serumalbumin (BSA) gebunden war und somit membranimpermeabel ist, zeigen, dass GPR30 membranständig ist. Vergleichbare Ergebnisse erzielte D. Malek in ihrer Dissertation (2006), die an der FU-Berlin in den Arbeitskreisen von Prof. Gust und Prof. Kleuser durchgeführt wurde. Sie konnte durch Experimente mit membranimpermeablen BSA-E2 und Pertussistoxin (PTX) beweisen, dass E2 seine inhibitorische Wirkung auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade über den G-Proteingekoppelten Rezeptor GPR30 auslöst und damit eine schnelle Estrogenantwort an der Zellmembran initiiert (Malek 2006). Im Gegensatz dazu stellen Prossnitz et al. die vollständige Membranimpermeabilität von BSA-E2 in Frage, da mangels Stabilität dieses Komplexes auch nicht kovalent gebundenes E2 vorliegt, das an intrazelluläre Rezeptoren zu binden vermag (Prossnitz, Sklar et al. 2008). Sie konnten hingegen mittels neutraler und geladener E2-Derivate zeigen, dass die Aktivierung von GPR30 mit der Zellmembranpermeabilität dieser Liganden korreliert (Revankar, Mitchell et al. 2007). Auch mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten 17 $\alpha$ -substituierten Estrogenderivaten konnte gezeigt werden, dass sich funktionsfähiger GPR30 intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum befindet (Revankar, Cimino et al. 2005).

### 1.1.1.2.3 Physiologische Funktion des GPR30

Die Kenntnisse über die physiologischen Funktionen des GPR30 sind noch sehr unvollständig. Der GPR30 ist, wie schon erwähnt, im Körper weit verbreitet. Er wurde sowohl im peripheren, als auch im zentralen Nervensystem lokalisiert, sowie in Zellen des Immunsystems, in den Fortpflanzungsorganen, im Gastrointestinaltrakt und im kardiovaskulären System (Olde and Leeb-Lundberg 2009).

In den letzten Jahren wurde die Rolle des GPR30 in vivo an den verschiedenen Organsystemen, insbesondere bei Nagetieren, vielfältig untersucht. Die Experimente lieferten z.T. unterschiedliche Ergebnisse, die sich teilweise widersprechen.

Im Hinblick auf das Nervensystem konnten Xu et al. zeigen, dass eine Stimulierung des GPR30 die Aktivität des Serotonin-Rezeptors dämpft, was zu einer verminderten Oxytocin Antwort führt. Die Autoren vermuten daher eine Beteiligung des GPR30 bei bestimmten Befindlichkeitsstörungen, wie Depressionen oder Angstzuständen (Xu, Qin et al. 2009). In einer anderen Studie konnten Kuhn et al. zeigen, dass GPR30 eine Rolle bei der Estrogen-vermittelten peripheren Induktion der mechanischen Hyperalgesie spielt (Kuhn, Dina et al. 2008).

Eine wichtige Rolle spielt GPR30 im kardiovaskulären System. Seine Aktivierung führt zu einer akuten Vasodilatation und somit zu einer Blutdrucksenkung (Haas, Bhattacharya et al. 2009). Darüber hinaus beobachteten die Autoren, dass das Fehlen des GPR30 zu einer abdominalen Adipositas führt, was wiederum seinen Einfluss auf den Metabolismus bestätigt. Windahl et al. hingegen vermuten, dass GPR30 nicht direkt in den Fettmetabolismus involviert ist. Sie konnten mit Hilfe eines Mäusestammes, dem GPR30 fehlt, zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Mäusen und dem Wildtyp im Hinblick auf das Körperfett besteht (Windahl, Andersson et al. 2009).

Martensson et al. beschreiben, dass der Mangel an GPR30 zu einer verminderten Glucosetoleranz und zu einer verringerten Insulinfreisetzung führt. Sie konnten damit zeigen, dass GPR30 einen bedeutenden Einfluss auf verschiedene metabolische Vorgänge hat (Martensson, Salehi et al. 2009).

Im Fortpflanzungsapparat hingegen spielt er nur eine untergeordnete Rolle. Hier ist vor allem der ER $\alpha$  von großer Bedeutung (Prossnitz and Barton 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel der beiden Rezeptorsysteme handelt und noch intensive Forschung erforderlich ist, um die physiologische Funktion des GPR30 vollständig aufzuklären. Insbesondere ist hierfür die Entwicklung von selektiven GPR30 Agonisten bzw. Antagonisten von Bedeutung.

#### **1.1.1.2.4 Rolle des GPR30 bei der Tumorentstehung**

GPR30 wird, wie schon erwähnt, in verschiedenen Tumorzellen exprimiert. Er wurde u.a. in MCF-7- und SKBr3-Brustkrebszellen (Carmeci, Thompson et al. 1997; Thomas, Pang et al. 2005), den Hec1A- und Hec50-Endometriumkarzinomzellen (Revankar, Cimino et al. 2005; Vivacqua, Bonofiglio et al. 2006) und BG-1 Ovarialkarzinomzellen (Albanito, Madeo et al. 2007) gefunden. Eine Überexpression von GPR30 wurde von einigen Forschergruppen mit Proliferation, Tumorgröße von >2 cm und dem Auftreten von Metastasen in Zusammenhang gebracht (Filardo, Graeber et al. 2006). Kanda et al. berichten über eine GPR30 vermittelte Apoptosehemmung aufgrund einer Bcl-2 Expression und über eine Stimulierung des Zellwachstums, gefördert durch eine vermehrte Bildung von Cyclin D (Kanda and Watanabe 2003; Kanda and Watanabe 2004). Weiterhin konnten sie zeigen, dass GPR30 die vermehrte Bildung des Protoonkogens c-fos vermittelt (Kanda and Watanabe 2003).

Interessant ist, dass GPR30 in verschiedenen Tumorzellen unterschiedliche Effekte auslöst. Während er das Wachstum der ER $\alpha$  positiven MCF-7 Brustkrebszellen hemmt (Ariazi, Brailoiu et al. 2010), fördert er das der ER-negativen SKBr3-Zellen, sowie der Schilddrüsen-, Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen (Pandey, Lappano et al. 2009), (Vivacqua, Bonofiglio et al. 2006), (Albanito, Madeo et al. 2007).

Auch die Migration von Krebszellen wird offenbar von GPR30 beeinflusst. Bologna et al. konnten zeigen, dass die Migration von MCF-7- und auch von SKBr3-Zellen GPR30-vermittelt gehemmt wird (Bologna, Revankar et al. 2006). D. Malek zeigte ebenfalls in ihrer Arbeit, dass die TGF- $\beta$ -induzierte Migration von MCF-7-Zellen

über GPR30-vermittelte Signalwege gehemmt wird (Malek 2006). Pandey et al. hingegen belegen, dass die GPR30-vermittelte Migration in SKBr3-Zellen durch die Bildung von CTGF (connective tissue growth factor) induziert wird (Pandey, Lappano et al. 2009). Sie beschreiben GPR30 als einen Marker für aggressives Tumorverhalten und für eine geringe Überlebensrate von Tumorpatienten.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass GPR30 verschiedene zelluläre Funktionen, wie Wachstum, Proliferation und Apoptose beeinflusst, hier aber noch viele offene Fragen zu klären sind.

#### **1.1.1.2.5 Bekannte Verbindungen als Liganden des GPR30**

##### **Steroide**

Während der natürliche Ligand E2 (**Abb. 3**) eine ausgeprägte Affinität zum GPR30 aufweist, konnte weder bei seinem Stereoisomer 17 $\alpha$ -Estradiol, noch bei anderen physiologischen Estrogenen, wie Estron und Estriol eine Bindung an diesen Rezeptor nachgewiesen werden. Auch andere Steroide, wie Progesteron, Testosteron und Kortisol zeigten in Experimenten so gut wie keine Bindung (Thomas, Pang et al. 2005).

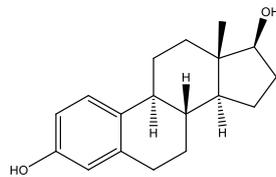
##### **Synthetische nichtsteroidale ER-Liganden**

In der Tumorthherapie sind SERMs (Selektive *Estrogen Rezeptor Modulatoren*) weit verbreitet im klinischen Einsatz. Sie wirken gewebeabhängig als ER $\alpha$ / $\beta$ -Antagonisten oder partielle ER $\alpha$ / $\beta$ -Agonisten und werden insbesondere zur Behandlung des estrogenabhängigen Brustkrebses verwendet. Unter den SERMs stellt Tamoxifen eine Leitstruktur dar (**Abb. 3**). Es weist, ähnlich dem reinen ER $\alpha$  Antiestrogen ICI 182 780, nicht nur eine Affinität zu den nukleären ERs, sondern auch zum GPR30 auf. Beide wirken hier als Agonisten. Hingegen zeigt das synthetische Stilbenderivat Diethylstilbestrol (DES) keine Bindung an GPR30 (Thomas, Pang et al. 2005).

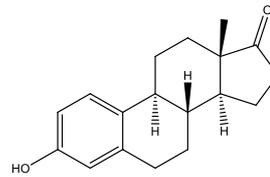
### Phyto- und Xenoestrogene

Neben einigen Phytoestrogenen, wie Genistein (**Abb. 3**), zeigen auch verschiedene Xenoestrogene, wie Bisphenol A (BPA) und Nonylphenol, agonistische Aktivität an GPR30 (Thomas and Dong 2006). Für Genistein wurde sein GPR30 Agonismus durch eine Aktivierung von MAPKs bestätigt. Die Xenoestrogene verdrängen kompetitiv [ $^3\text{H}$ ]-E2 vom GPR30 und zeigen in Adenylatcyclase-Assays agonistisches Verhalten.

#### Steroide

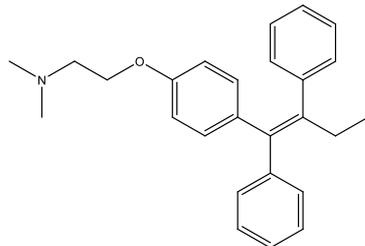


17β-Estradiol

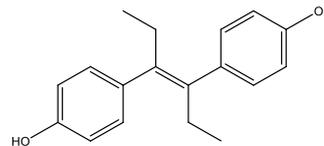


Estron

#### Synthetische Estrogene

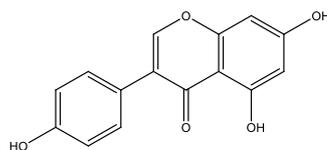


Tamoxifen



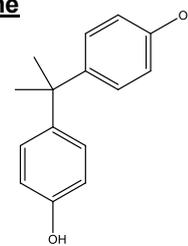
Diethylstilbestrol

#### Phytoestrogene



Genistein

#### Xenoestrogene



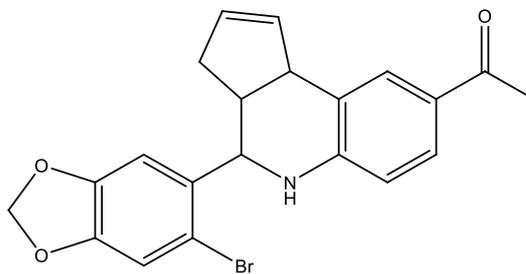
Bisphenol A

**Abb. 3:** Übersicht einiger estrogenwirksamen Verbindungen

Um die biologische Rolle des GPR30 weiter aufklären zu können, war es von besonderem Interesse, eine Verbindung zu finden, die selektiv an GPR30 bindet. Mit der Entdeckung des ersten nichtsteroidalen GPR30 spezifischen Agonisten G1 durch die Forschergruppe um Bologna im Jahr 2006, wurde die Grundlage für weitere Forschung auf diesem Gebiet gelegt.

### 1.1.1.2.6 Die ersten selektiven nichtsteroidalen GPR30 Liganden: G1 und G15

Der G1 (**Abb. 4**) wurde durch ein kombiniertes virtuelles und biomolekulares Screening selektiert. Bei dem virtuellen Auswahlverfahren wurde mittels einer Kombination aus 2D- und 3D-Strukturannäherungsmethoden eine Reihe Substanzen ausgewählt. Für das biomolekulare Screening dienten Konkurrenzexperimente mit fluoreszenzmarkiertem E2 (E2-Alexa 633) an transient transfizierten COS7-Zellen (Bologa, Revankar et al. 2006).



**Abb. 4:** G1, der erste selektive GPR30 Agonist

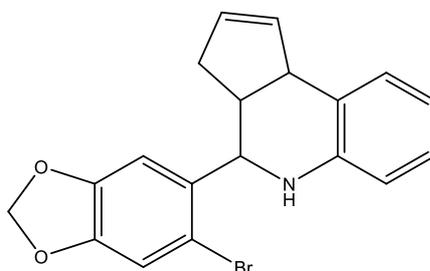
G1 zeigt nicht nur eine hohe Affinität, sondern auch eine hohe Selektivität für GPR30 im Vergleich zu ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Bologa, Revankar et al. 2006).

In mit GPR30 transfizierten COS7-Zellen konnten Bologa et al. zeigen, dass durch die Stimulierung mit G1 eine intrazelluläre Calciummobilisation initiiert wird, zwar etwas langsamer als durch E2, letztendlich aber mit dem gleichen Ergebnis. In den Kontrollzellen, die keinen GPR30 exprimieren, löste G1 keine Antwort aus. Die normale Aktivierung von ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPR30 durch E2 führt zur Stimulierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), was eine Akkumulation von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) zur Folge hat. Im Gegensatz zu E2 initiiert G1 nur in mit GPR30 transfizierten COS7-Zellen einen PIP3 Anstieg (Bologa, Revankar et al. 2006).

Die Selektivität von G1 gegenüber GPR30 wurde in weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt.

Drei Jahre nach der Entdeckung von G1 wurde 2009 der erste selektive GPR30 Antagonist G15 (**Abb. 5**) entwickelt. Er ging wie auch der G1 aus einer Kombination aus virtuellem und biomolekularem Screening hervor. G15 bindet ebenfalls

mit großer Selektivität an GPR30, hemmt aber im Gegensatz zu G1 die intrazelluläre Calciummobilisation und blockiert auch die PI3K Aktivierung (Dennis, Burai et al. 2009). G15 unterscheidet sich von G1 nur durch das Fehlen der Ethanongruppe.



**Abb. 5:** G15, der erste selektive GPR30 Antagonist

Die beiden Verbindungen zeichnen sich durch ein Tetrahydrocyclopentachinolingrundgerüst aus, das in einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf synthetisiert werden kann.

Da bei dieser Synthese Cyclopentadien nicht als Dien, sondern als Dienophil fungiert, das mit einem Azadien unter Einbeziehung einer aromatischen Doppelbindung cyclisiert und darüber hinaus Fragen zur Regiospezifität und zu endo-exo Isomerisierungen zu beantworten sind, wird an dieser Stelle eine kurze Übersicht über den heutigen, hier relevanten Kenntnisstand zur Diels-Alder-Reaktion gegeben.

### 1.1.2 Die Diels-Alder-Reaktion

Die Entdeckung dieser einstufigen Cycloaddition, bei der aus meist einfachen Edukten ein neuer sechsgliedriger Ring aufgebaut werden kann, ist für die organische Synthese von fundamentaler Bedeutung. Die 1928 von Otto Diels und Kurt Alder entdeckte Addition, heute unter dem Namen Diels-Alder-Reaktion bekannt, wurde 1950 mit einem Nobelpreis gewürdigt.

Der weit verbreitete Einsatz dieser Reaktion in der organischen Synthese lässt sich durch die meist einfache Durchführung, die außerordentlich große Variationsmöglichkeit hinsichtlich der einzelnen Komponenten und die meist hohe Regio- und Stereoselektivität erklären (Sauer 1984).

Bei dieser [4+2]-Cycloaddition entstehen zwei neue  $\sigma$ -Bindungen unter gleichzeitiger Aufgabe von zwei  $\pi$ -Bindungen (Sauer 1966). Es resultiert ein Energiegewinn, sodass sogar gespannte Ringsysteme entstehen können.

Die Addition läuft in den meisten Fällen konzertiert, in einer „Einschritt“-Reaktion ab, d.h. die neuen  $\sigma$ -Bindungen werden simultan gebildet. Auch diskutiert wurde ein „Zweischritt“-Mechanismus, bei dem die zwei  $\sigma$ -Bindungen nacheinander gebildet werden, sodass als Zwischenprodukt ein Zwitterion oder ein Biradikal entsteht.

Die neuen Bindungen entstehen durch Überlappung von Grenzorbitalen mit gleichem Vorzeichen, wobei das HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) des einen mit dem LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) des anderen Eduktes wechselwirkt. Es reagiert immer jenes HOMO-LUMO-Paar, das die geringste Energiedifferenz aufweist. Je nach energetischer Lage der Grenzorbitale lässt sich die Diels-Alder-Reaktion in verschiedene Typen unterteilen:

Typ I: Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf

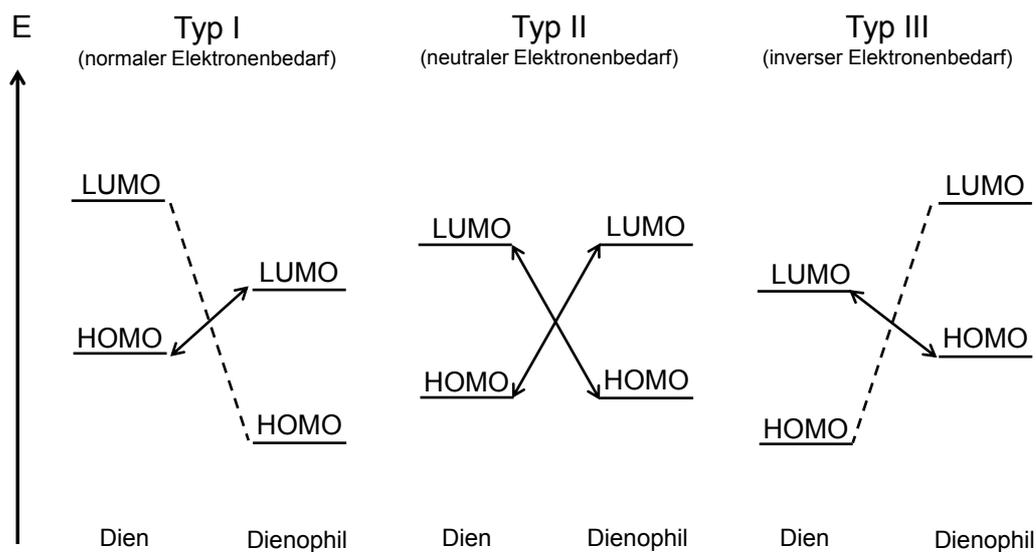
Hierbei kommt es zur Wechselwirkung zwischen dem HOMO des Diens und dem LUMO des Dienophils. Folglich reagieren ein elektronenreiches Dien und ein elektronenarmes Dienophil bevorzugt miteinander.

Typ II: Diels-Alder-Reaktion mit neutralem Elektronenbedarf

In diesem Fall ähneln bzw. gleichen sich die Orbitalenergien der beiden Reaktanden, die HOMO-LUMO-Abstände sind gleich. Die neutralen Reaktionen benötigen meist drastische Bedingungen, wie hohe Temperaturen und hohen Druck.

Typ III: Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Bei Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf reagiert ein elektronenarmes Dien mit einem elektronenreichen Dienophil. Der  $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}\text{-LUMO}_{\text{Dien}}$ -Abstand ist in diesem Fall der kleinere und bestimmt den Reaktionsverlauf (**Abb. 6**).



**Abb. 6:** Übersicht der drei Typen der Diels-Alder-Reaktion (Sauer 1984)

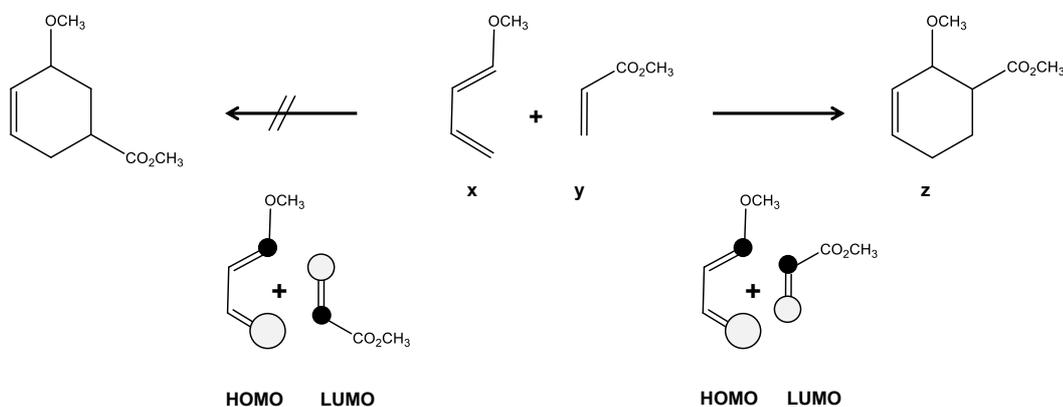
### 1.1.2.1 Einfluss von Substituenten

Unterschiedliche Substituenten können die Reaktionsgeschwindigkeit stark beeinflussen. Während Elektronendonatoren die Orbitalenergien erhöhen, setzen Elektronenakzeptoren ebendiese herab. Eine Umsetzung mit normalem Elektronenbedarf wird durch Elektronendonatoren am Dien und Elektronenakzeptoren am Dienophil beschleunigt. Bei einer Reaktion mit inversem Elektronenbedarf hingegen verhält es sich genau umgekehrt.

### 1.1.2.2 Regioselektivität

Wie schon erwähnt, verläuft die Diels-Alder-Reaktion meist regiospezifisch. Die Regioselektivität hängt von der Größe der Orbitalkoeffizienten der beteiligten Grenzorbitale ab. Wobei die Wechselwirkung jeweils zwischen den beiden großen und zwischen den beiden kleinen Orbitallappen begünstigt ist. Auch hierbei

haben Substituenten einen Einfluss. In **Abb. 7** ist als Beispiel die Umsetzung eines Donor-substituierten Diens (**x**) mit einem Akzeptor-substituierten Ethen (**y**) dargestellt. Diese Reaktion verläuft bevorzugt zum ortho-Addukt (**z**) und wird durch Katalysatoren noch begünstigt, s. auch Kapitel **1.1.2.4**.



**Abb. 7:** Regioselektivität wird gesteuert durch die Molekülorbitalkoeffizienten

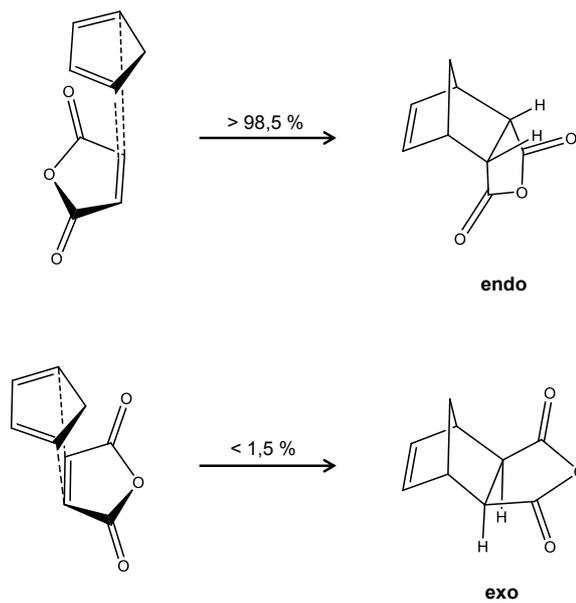
### 1.1.2.3 Stereoselektivität

#### 1.1.2.3.1 cis-Prinzip

Nach dem cis-Prinzip bleibt die sterische Anordnung der Substituenten des Dienophils und des Diens im entstehenden Addukt erhalten.

#### 1.1.2.3.2 Aldersche endo-Regel

Nach der endo-Regel entsteht bei der Diels-Alder-Reaktion bevorzugt das endo-Produkt, obwohl das exo-Produkt das thermodynamisch stabilere darstellt. Nähern sich die beiden Reaktanden, kommt es zu einem „Sandwich“-ähnlichen Übergangszustand. Das Dienophil wird so an das Dien addiert, dass maximale Orbitalwechselwirkungen erreicht werden. Das betrifft nicht nur die  $\pi$ -Systeme, die direkt an der Reaktion beteiligt sind, sondern auch die der Substituenten. Zum Beispiel reagieren Maleinsäureanhydrid und Cyclopentadien fast ausschließlich zum endo-Addukt (**65**), während das thermodynamisch stabilere exo-Produkt nur zu unter 1,5 % gebildet wird (**Abb. 8**), (Sauer 1967).



**Abb. 8:** „Sandwich“ Übergangszustand mit Maximum an Orbitalwechselwirkungen (oben)

Temperaturabhängig kann es zu einer endo-exo-Isomerisierung durch eine sog. Retro-Diels-Alder-Reaktion kommen. Bei höherer Temperatur führt eine Rückspaltung zur anschließenden Bildung der thermodynamisch stabileren exo-Form.

#### 1.1.2.4 Lösungsmittel und Katalysatoreffekte

Auch Lösungsmittel und Lewissäurekatalysatoren haben Einfluss auf die Regio- und Stereoselektivität. Der Einsatz von Lewissäuren führt zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und zur Erhöhung der endo-Selektivität (Sauer 1967).

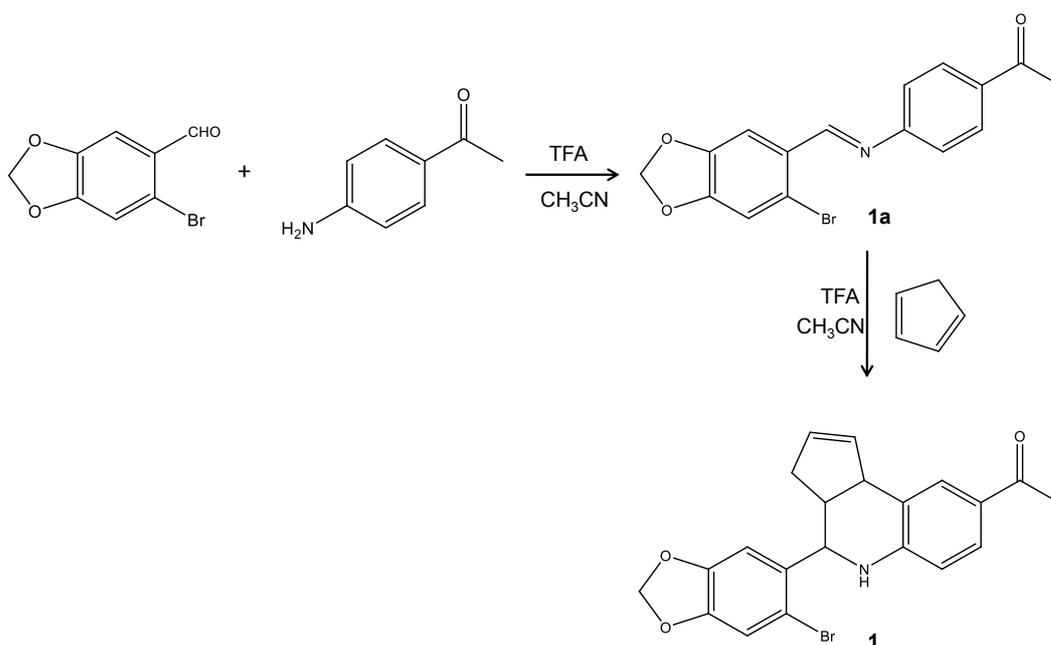
## 1.2 Problemstellung

Die Entwicklung des ersten nichtsteroidalen GPR30 Agonisten lieferte die Motivation für weiterführende Forschungen auf dem Gebiet von estrogenwirksamen Verbindungen, deren Rezeptoren und ihrer Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen und deren Behandlung.

Im Arbeitskreis von Prof. Gust wurden bereits umfangreiche Arbeiten auf dem Gebiet der Tumorforschung geleistet, unter anderem die Entwicklung von selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs). Zahlreiche synthetisierte Verbindungen wurden auf ihre pharmakologische Wirkung und ihre Bindungsaffinität zu den klassischen Estrogenrezeptoren untersucht. Hierzu wurden spezielle Testsysteme etabliert, wie z.B. ein Luciferase-Assay, mit dem agonistische bzw. antagonistische Wirkungen der neuen Strukturen an ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  in vitro untersucht werden.

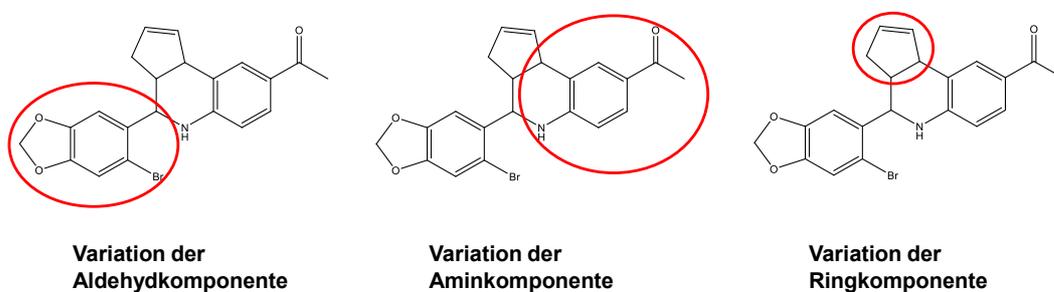
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten ausgehend von G1 analoge Strukturen synthetisiert werden, die ebenfalls möglichst selektiv den GPR30 und/oder die nukleären Rezeptoren aktivieren.

G1 lässt sich, wie oben erwähnt, in einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf herstellen. In diesem Fall reagiert das bei Diels-Alder-Reaktionen häufig verwendete Cyclopentadien nicht als Dien, sondern als elektronenreiches Dienophil. Als elektronenarmes Dien fungiert hier die protonierte Schiffsche Base unter Einbeziehung einer Doppelbindung des aromatischen Ringes (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Synthese von G1

Als Edukte dienen 6-Brompiperonal, 4-Aminoacetophenon und Cyclopentadien. Betrachtet man ebendiese Komponenten, dann sind folgende Modifikationen möglich:



**Abb. 10:** Modifikationsmöglichkeiten des G1

Für die Synthese der gewünschten Verbindungen sollten diverse aromatische Aldehyde, unterschiedliche primäre aromatische Amine und verschiedene cyclische Dienophile zum Einsatz kommen. Neben der Strukturklärung der synthetisierten Verbindungen, sollte auch die Untersuchung der Zytotoxizität und deren Beeinflussung durch Substituenten im Vordergrund stehen. Hierfür stehen im Arbeitskreis von Prof. Gust verschiedene Krebszelllinien, wie die hormonabhän-

gige MCF7- und die hormonunabhängige MDA-MB-231-Mammakarzinomzelllinien und die Osteosarkomzelllinie U2OS zur Verfügung.

Anschließend sollten die neu gewonnenen Substanzen auf ihre Affinität zum GPR30, sowie zu den nukleären Rezeptoren untersucht werden. Für die Testung an den nukleären Rezeptoren steht, wie oben erwähnt, ein Luciferase-Assay zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um einen zellbasierten Transaktivierungsassay, der an transient mit ER $\alpha$  oder ER $\beta$  transfizierten U2OS Zellen durchgeführt wird. Für die Untersuchungen am GPR30 steht ein Testsystem in Planung.

Die Entwicklung von neuen Liganden, die agonistisch oder antagonistisch am GPR30 angreifen, soll dazu beitragen, die Rolle des GPR30 in vivo besser zu verstehen und seinen Einfluss bei der Tumorentstehung und -progression weiter aufzuklären, um möglicherweise neue Therapieansätze für verschiedenen Tumorerkrankungen zu finden.



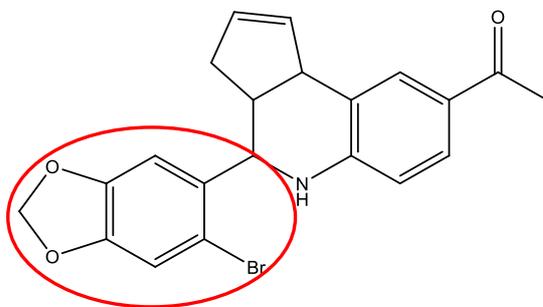
## 2 Synthetischer Teil

### 2.1 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

In Analogie zu 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (G1) wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene, damit verwandte Verbindungstypen synthetisiert. Im Folgenden werden die synthetisierten Substanzen vorgestellt.

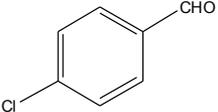
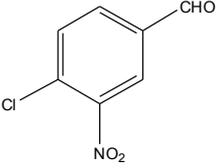
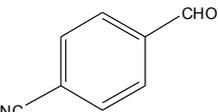
#### 2.1.1 Variation der einzelnen Molekülbausteine

##### 2.1.1.1 Variation der Aldehydkomponente



G1 (1)

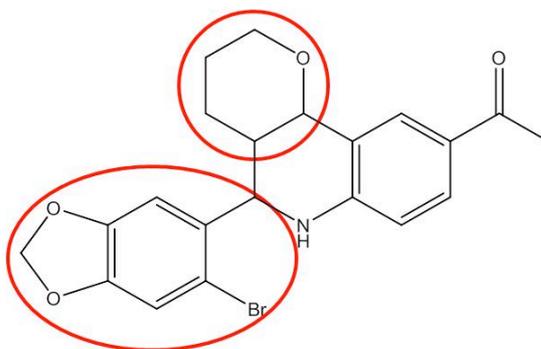
Aldehyd	Verbindung	Konfiguration
	<b>2</b>	endo:exo 4:1
	<b>3</b>	endo
	<b>4</b>	endo
	<b>5</b>	exo

Aldehyd	Verbindung	Konfiguration
	<b>6</b>	endo
	<b>7</b>	endo
	<b>8</b>	endo

**Tab. 1:** Verbindungen **2-8**, erhalten durch Variation der Aldehydkomponente

### 2.1.1.2 Variation der Dienophil- und der Aldehydkomponente

Als Dienophil wurde bei den Verbindungen **9-12** statt Cyclopentadien Dihydropyran verwendet.

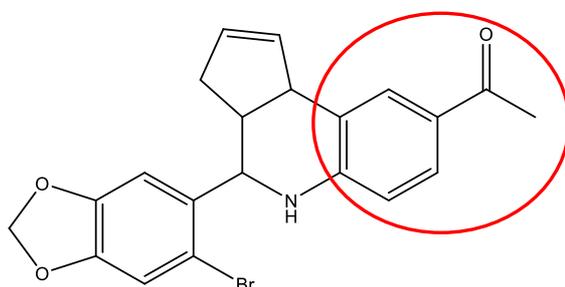


**9**

Aldehyd	Dienophil	Verbindung	Konfiguration
		<b>9</b>	exo
		<b>10</b>	exo
		<b>11</b>	endo
		<b>12</b>	exo

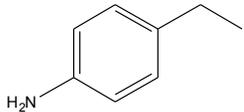
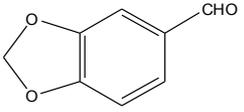
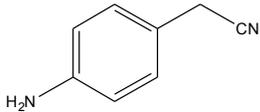
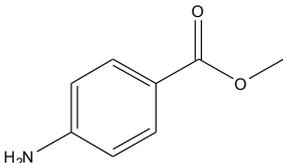
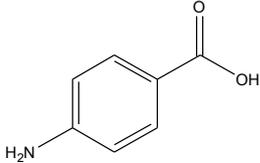
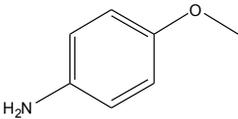
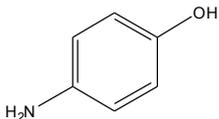
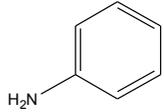
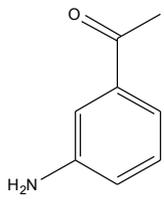
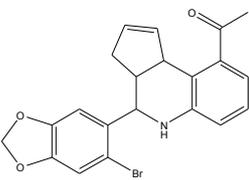
**Tab. 2:** Verbindungen **9-12**, erhalten durch Variation der Aldehyd- und der Dienophilkomponente

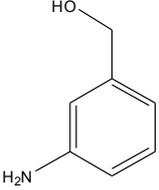
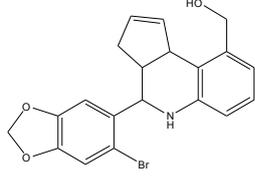
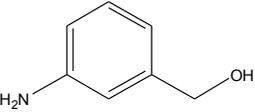
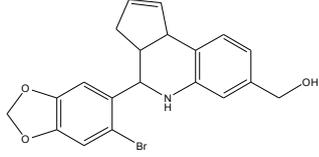
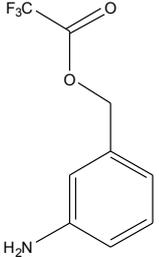
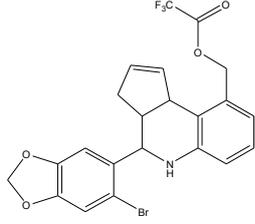
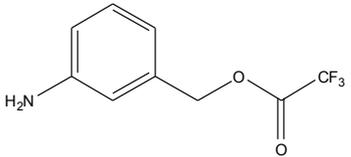
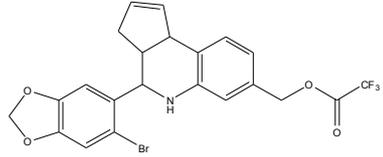
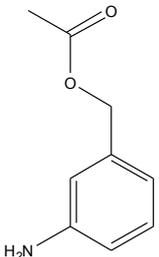
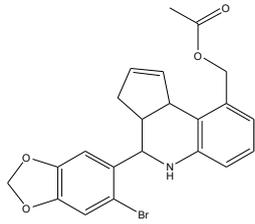
## 2.1.1.3 Variation der Aminkomponente

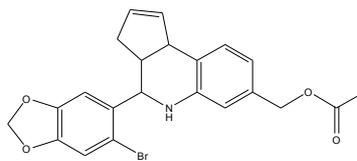
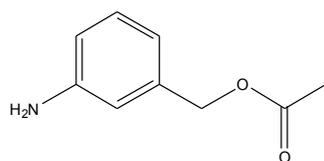


1 (G1)

Amin	Verbindung	Konfiguration
		endo
		endo
	<b>15</b>	endo
	<b>16</b>	endo
	<b>17</b>	endo

Amin	Aldehyd	Verbindung	Konfiguration
		<b>18</b>	endo
Amin	Verbindung	Konfiguration	
	<b>19</b>	endo	
	<b>20</b>	endo	
	<b>21</b>	endo:exo 4:1	
	<b>22</b>	endo	
	<b>23</b>	endo	
	<b>24</b> <b>(G15)</b>	endo	
		<b>25</b>	endo

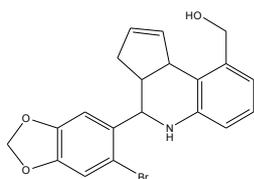
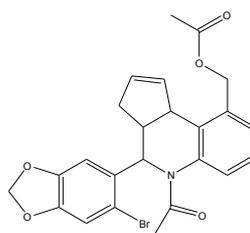
Amin	Verbindung	Konfiguration
	 <b>26</b>	endo
	 <b>27</b>	endo
	 <b>28</b>	endo
	 <b>29</b>	endo
	 <b>30</b>	endo



endo

**31**

---

**Acetylierung von Verbindung 26:****26**

endo

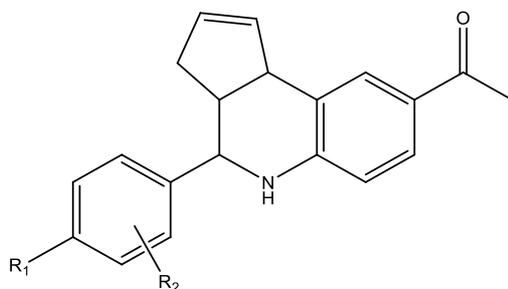
**32**

---

**Tab. 3:** Verbindungen 13-32, erhalten durch Variation der Aminkomponente

### 2.1.2 Verbindungen in Anlehnung an Estron

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des G1 mit Estron, wurden Verbindungen in Anlehnung an Estron und auch Estradiol (s.u.) synthetisiert.



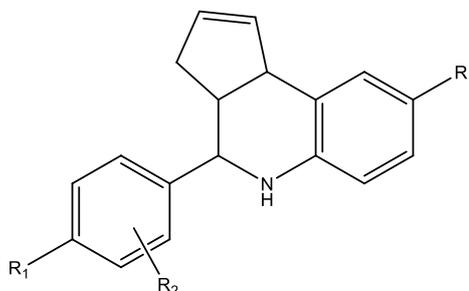
**33-40**

<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Verbindung</b>	<b>Konfiguration</b>
OCH <sub>3</sub>	H	<b>33</b>	endo
OH	H	<b>34</b>	endo:exo 1:1
OCH <sub>3</sub>	2-F	<b>35</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-F, 6-F	<b>36</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-Cl	<b>37</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-Cl, 6-Cl	<b>38</b>	exo
OH	2-F	<b>39</b>	exo
OH	2-Cl	<b>40</b>	exo

**Tab. 4:** Verbindungen in Anlehnung an Estron

### 2.1.3 Verbindungen in Anlehnung an Estradiol

Für die Ähnlichkeit mit Estradiol sind hier vor allem die endständigen Hydroxygruppen verantwortlich.



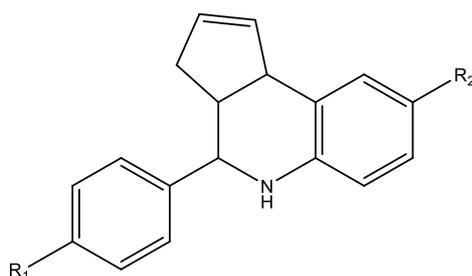
**41-50**

<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Verbindung</b>	<b>Konfiguration</b>
OCH <sub>3</sub>	H	<b>41</b>	exo
OH	H	<b>42</b>	endo:exo 4:1
OCH <sub>3</sub>	2-F	<b>43</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-F, 6-F	<b>44</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-Cl	<b>45</b>	endo
OCH <sub>3</sub>	2-Cl, 6-Cl	<b>46</b>	exo
OH	2-F	<b>47</b>	endo
OH	2-F, 6-F	<b>48</b>	endo:exo 3:1
OH	2-Cl	<b>49</b>	endo

<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Verbindung</b>	<b>Konfiguration</b>
OH	2-Cl, 6-Cl	<b>50</b>	exo

**Tab. 5:** Verbindungen in Anlehnung an Estradiol

### 2.1.3.1 Variation der funktionellen Gruppen

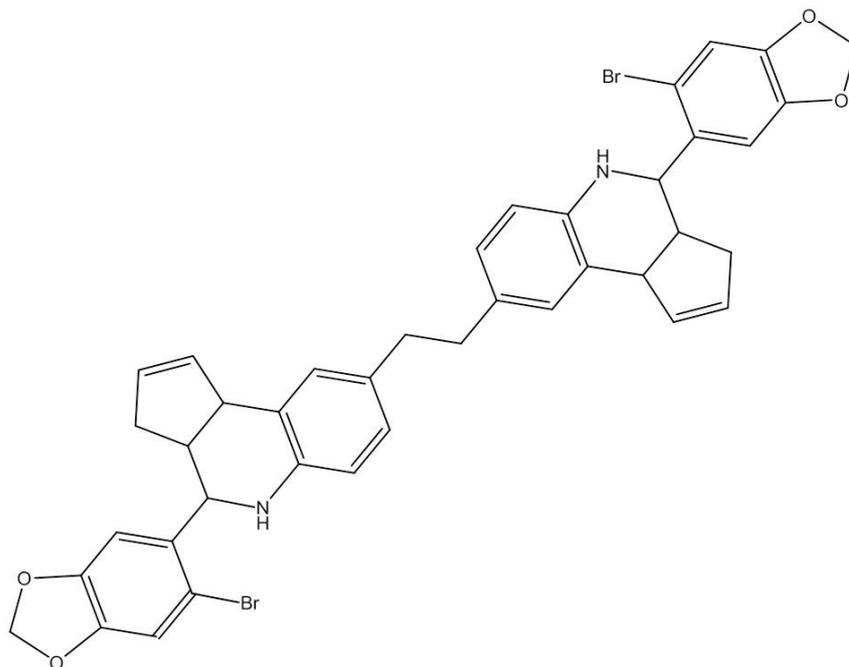


**51-54**

<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Verbindung</b>	<b>Konfiguration</b>
SCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>51</b>	endo
NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>52</b>	endo
NH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>53</b>	endo
NH <sub>2</sub>	OH	<b>54</b>	endo

**Tab. 6:** Verbindungen **51-54**, erhalten durch Variation der funktionellen Gruppen

### 2.1.4 Dimere Verbindung



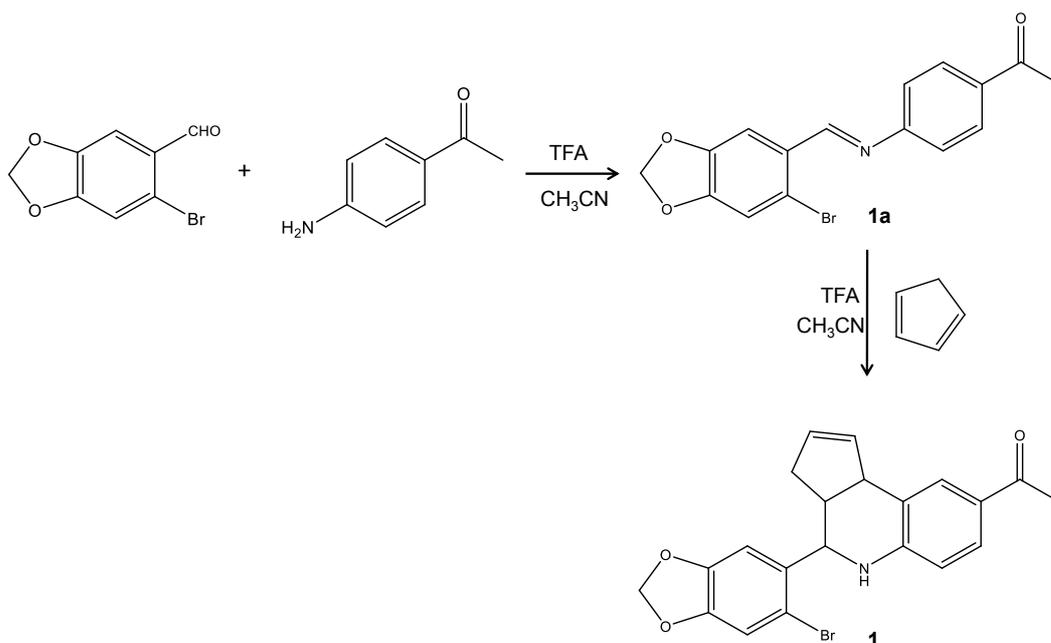
**55**

**Abb. 11:** Dimer, Verbindung **55**

## 2.2 Synthese der Tetrahydrochinolingrundstruktur

### 2.2.1 Synthese mit Trifluoressigsäure als Katalysator

Das Tetrahydrochinolingrundgerüst erhält man in einer Dreikomponenten-aza-Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf nach einer Vorschrift von Baudelle (Baudelle, Melnyk et al. 1998). Hierfür werden zu einer Lösung des einzusetzenden Amins in Acetonitril einige Tropfen Trifluoressigsäure gegeben. Nach Zugabe des gewünschten Aldehyds entsteht als Zwischenprodukt die entsprechende Schiffsche Base, die nicht isoliert wurde. Anschließend kommt es durch Zugabe frisch destillierten Cyclopentadiens zur Cycloaddition, bei der das Cyclopentadien als „elektronenreiches“ Dienophil und die protonierte Schiffsche Base als elektronenarmes Dien reagieren.



**Abb. 12:** Syntheseweg des G1

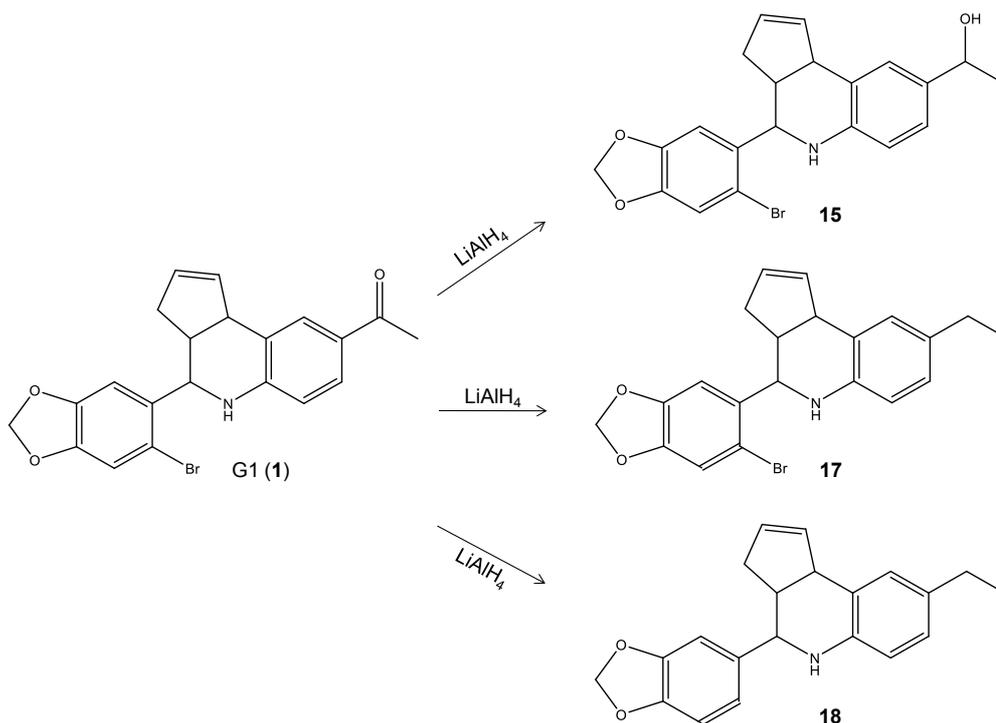
Anstelle des Cyclopentadiens eignet sich für diese Cycloaddition auch das 3,4-Dihydro-2H-pyran als Dienophil. So wurden die Verbindungen **9-12** erhalten (**Tab. 2**).

### 2.2.2 Synthese mit Scandiumtrifluormethansulfonat als Katalysator

Da die Verbindungen **21**, **33** und **34** nach der obigen Synthesevorschrift mittels TFA als Katalysator nur in sehr geringen Ausbeuten isoliert werden konnten, wurden sie nach einer Variante von Kobayashi unter Katalyse mit Scandiumtrifluormethansulfonat erfolgreich synthetisiert (Kobayashi, Hachiya et al. 1993). Dazu werden der entsprechende Aldehyd und das gewünschte Amin mit einem Überschuss an frisch destilliertem Cyclopentadien in absolutem Acetonitril gelöst und durch Zugabe von  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  als Katalysator zur Reaktion gebracht. Nach anschließender Aufarbeitung, wie im Experimentellen Teil beschrieben, wurden die gewünschten Produkte rein erhalten.

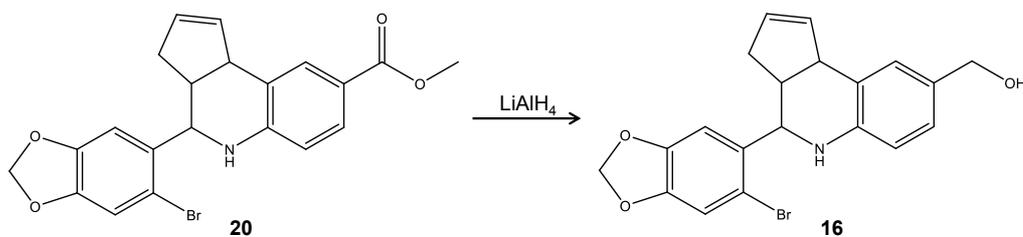
### 2.2.3 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

Der sekundäre Alkohol (**15**) konnte direkt durch Reduktion des G1 (**1**) mit  $\text{LiAlH}_4$  gewonnen werden. Die Reduktion wurde nach einer Vorschrift aus dem Organikum, 19. Auflage, S.510-512, durchgeführt (Becker H. G. O., Berger W. et al. 1993). Dabei war die eingesetzte Menge an  $\text{LiAlH}_4$  von besonderer Bedeutung. Mit steigender Konzentration an  $\text{LiAlH}_4$  führte die Reduktion der Ketogruppe über den sekundären Alkohol bis zur Ethylgruppe. Bei sehr hoher Konzentration kam es sogar zur Abspaltung des Bromids. Die Verbindungen **15**, **17** und **18** wurden erhalten.



**Abb. 13:** Reduktion von **G1 (1)** mit steigenden Mengen  $\text{LiAlH}_4$

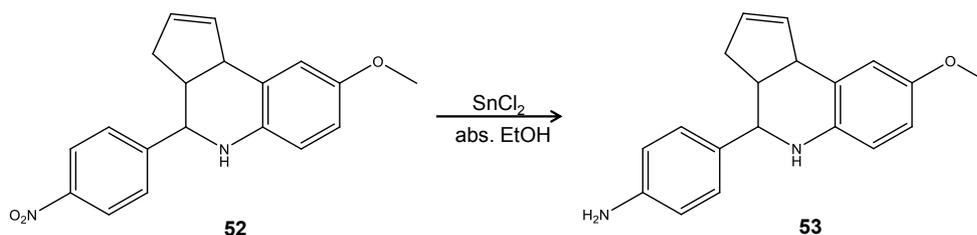
Da die Reduktion der Säure **21** mit  $\text{LiAlH}_4$  zum primären Alkohol **16** nicht erfolgreich war, wurde der Ester **20** wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben synthetisiert. Die anschließende Reduktion mit  $\text{LiAlH}_4$  führte zum gewünschten Produkt **16**.



**Abb. 14:** Reduktion des Esters **20** mit  $\text{LiAlH}_4$

## 2.2.4 Reduktion von Nitrogruppen am aromatischen Ring mittels Zinnchlorid

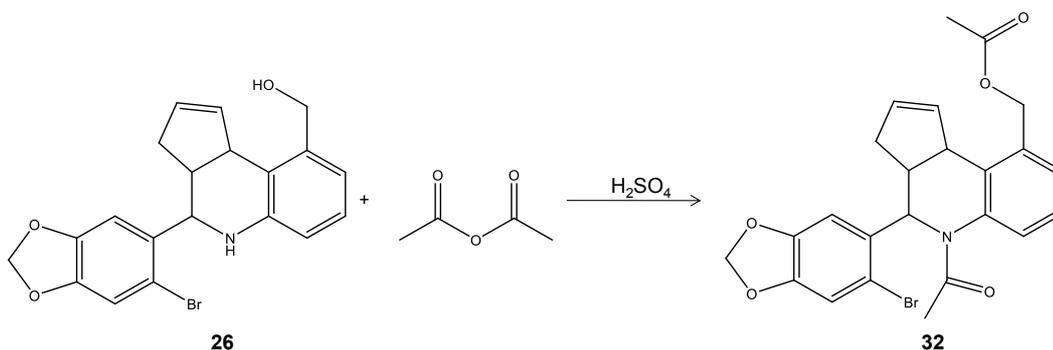
Die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe in Verbindung **52** wurde mit  $\text{SnCl}_2$  in absolutem Ethanol durchgeführt (Bellamy and Ou 1984). Erhalten wurde das Amin **53**.



**Abb. 15:** Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$

### 2.2.5 Acetylierung an Stickstoff und Sauerstoff

Die Verbindung **32** konnte durch Acetylierung der Verbindung **26**, die nach Vorschrift 2.2.1 synthetisiert wurde, erhalten werden (**Abb. 16**). Die zu acetylierende Substanz wurde nach einer Vorschrift aus dem Organikum, 19. Auflage, S.422, mit absolutem Acetanhydrid und wenigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure umgesetzt (Becker H. G. O., Berger W. et al. 1993). Nach weiterer Aufarbeitung, wie im Experimentellen Teil beschrieben, wurde die Verbindung **32** gewonnen.



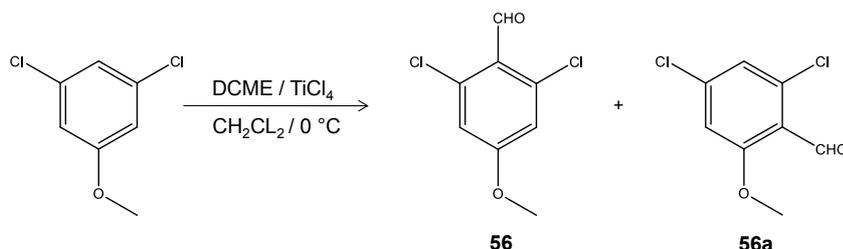
**Abb. 16:** Acetylierung mit Acetanhydrid

## 2.3 Synthese der von Estron und Estradiol abgeleiteten Verbindungen

Für die Synthese der von Estron und Estradiol abgeleiteten Verbindungen **33-50** nach der Vorschrift 2.2.1 wurden die 2-Halo-4-methoxybenzaldehyde und die 2,6-Dihalo-4-methoxybenzaldehyde benötigt. Diese konnten ausgehend von den entsprechenden Haloanisolen, wie im Folgenden beschrieben, synthetisiert werden.

### 2.3.1 Synthese der chloresubstituierten 4-Methoxybenzaldehyde

Die chloresubstituierten 4-Methoxybenzaldehyde konnten aus den entsprechenden Anisolen durch Formylierung mittels Dichlormethylmethylether und  $\text{TiCl}_4$  erhalten werden (Bai 2006). Die beiden entstandenen Stellungsisomere **56** und **56a** konnten mit Hilfe der Säulenchromatographie voneinander getrennt werden.

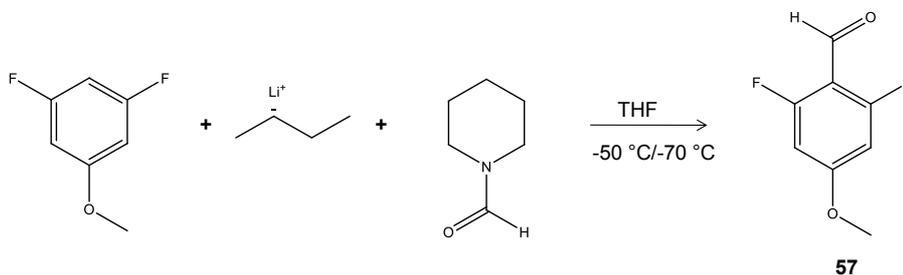


**Abb. 17:** Formylierung mit DCME und  $\text{TiCl}_4$

Die monochloresubstituierten Methoxybenzaldehyde hingegen konnten weder durch Umkristallisation noch mit Hilfe der Säulenchromatographie aus dem entstandenen Isomerenpaar getrennt isoliert werden. Sie wurden als Gemisch in die nachfolgende Synthese eingesetzt und konnten nach der Umsetzung zu den entsprechenden Tetrahydrochinolinen voneinander getrennt und strukturell identifiziert werden. (s. Kapitel 3.4.1)

### 2.3.2 Synthese des 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyds

Der 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyd konnte direkt aus dem 3,5-Difluoranisol synthetisiert werden (Gust 1987). Die Formylierung erfolgt unter Verwendung von sec. Butyllithium und N-Formylpiperidin in absolutem THF bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ .

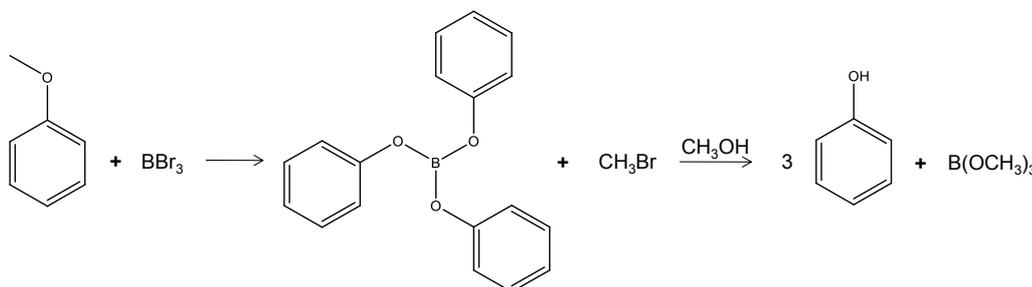


**Abb. 18:** Formylierung mit sec. BuLi und N-Formylpiperidin

Nach dieser Methode entsteht selektiv der 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyd, da die beiden Fluorsubstituenten in die gemeinsame ortho-Position dirigieren. Zuerst findet die Metallierung mit der Li-organischen Verbindung, hier sec. BuLi, statt. Hierbei wird infolge des  $-I$ -Effekts der Fluorsubstituenten der ortho-ständige Wasserstoff durch Lithium ausgetauscht. Anschließend kommt es durch N-Formylpiperidin zur Formylierung.

### 2.3.3 Etherspaltung mit Bortribromid

Die Etherspaltung wurde nach einer Methode von Benton mit Bortribromid durchgeführt (Benton and Dillon 1942). Dabei greift die Lewissäure Bortribromid an dem Ethersauerstoff unter Bildung des Borsäuretriphenylesters und Methylbromid an. Aus sterischen Gründen ist es möglich, dass auch weniger als drei Phenolderivate mit einem Bortribromidmolekül reagieren. Durch Zugabe von Methanol kommt es zur Methanolyse, wobei das entsprechende Phenol und der Borsäuretrimethylester entstehen. Letzterer ist flüchtig und kann abgedampft werden.



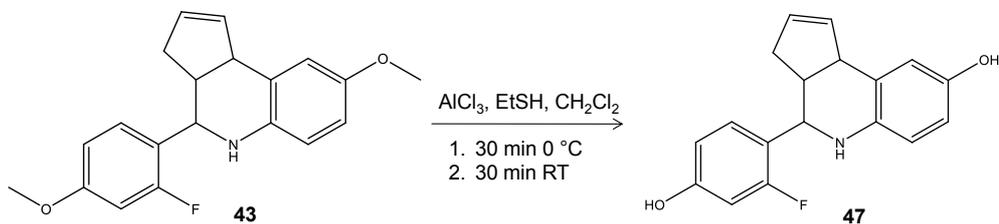
**Abb. 19:** Etherspaltung mit Bortribromid

Da die Etherspaltung mit Bortribromid jedoch nicht bei allen Verbindungen erfolgreich war, d.h. kein gewünschtes Produkt isoliert werden konnte, wurde nach einer schonenderen Methode gesucht. Geeignet schien die Etherspaltung mit  $\text{AlCl}_3$  und Ethanthiol.

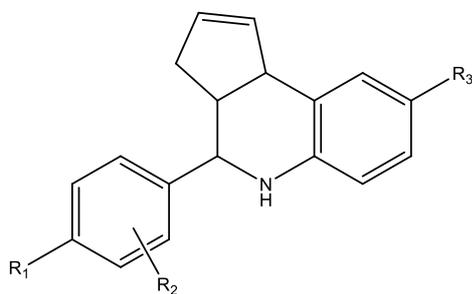
### 2.3.4 Etherspaltung mit $\text{AlCl}_3$ und Ethanthiol

Die Abspaltung der Methylgruppen erfolgte unter Verwendung von  $\text{AlCl}_3$  und Ethanthiol (Dettmann 2006).  $\text{AlCl}_3$  als Lewissäure führt hierbei zur Polarisierung

der O-Alkylbindung und erleichtert so den Angriff des stark nucleophilen Ethanthiols an der O-Methylgruppe.



**Abb. 20:** Etherspaltung mit  $\text{AlCl}_3$  und Ethanthiol am Beispiel der Verbindung **43**



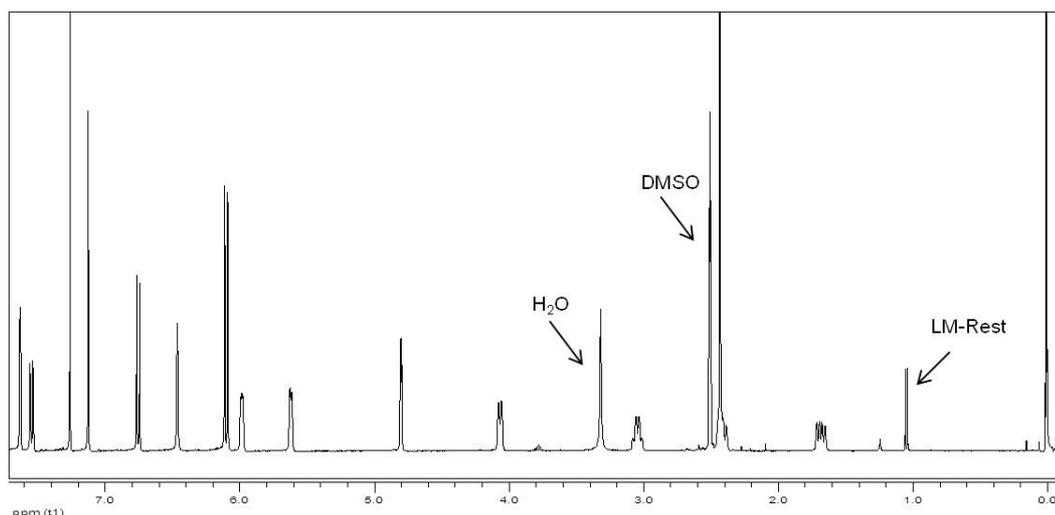
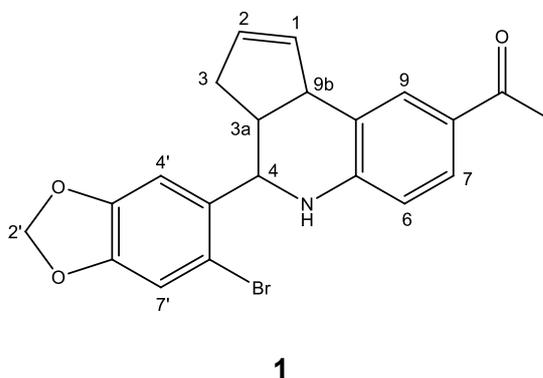
$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	$\text{R}_3$	Verbindung
OH	H	$\text{COCH}_3$	<b>34</b>
OH	2-F	$\text{COCH}_3$	<b>39</b>
OH	2-Cl	$\text{COCH}_3$	<b>40</b>
OH	H	OH	<b>42</b>
OH	2-F	OH	<b>47</b>
OH	2-F, 6-F	OH	<b>48</b>
OH	2-Cl	OH	<b>49</b>
OH	2-Cl, 6-Cl	OH	<b>50</b>

**Tab. 7:** Übersicht der phenolischen Verbindungen nach der Etherspaltung

### 3 Strukturuntersuchungen

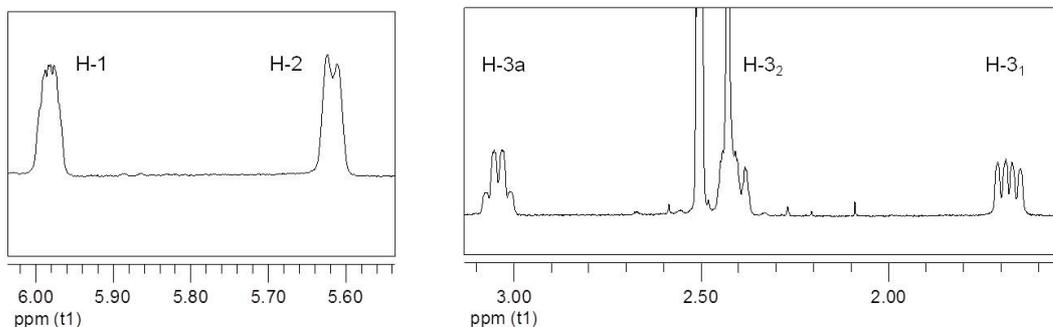
#### 3.1 Strukturanalyse der Tetrahydrocyclopentachinolin-Derivate am Beispiel von G1

Für die Strukturuntersuchung der synthetisierten Verbindungen dienten vor allem spektroskopische Methoden, wobei die bedeutendste die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie mit den zweidimensionalen Techniken COSY und NOE darstellt. Im Folgenden werden anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**1**), G1, die interessanten Signale der Tetrahydro-cyclopenta-chinolingrundstruktur erläutert.



**Abb. 21:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**1**)

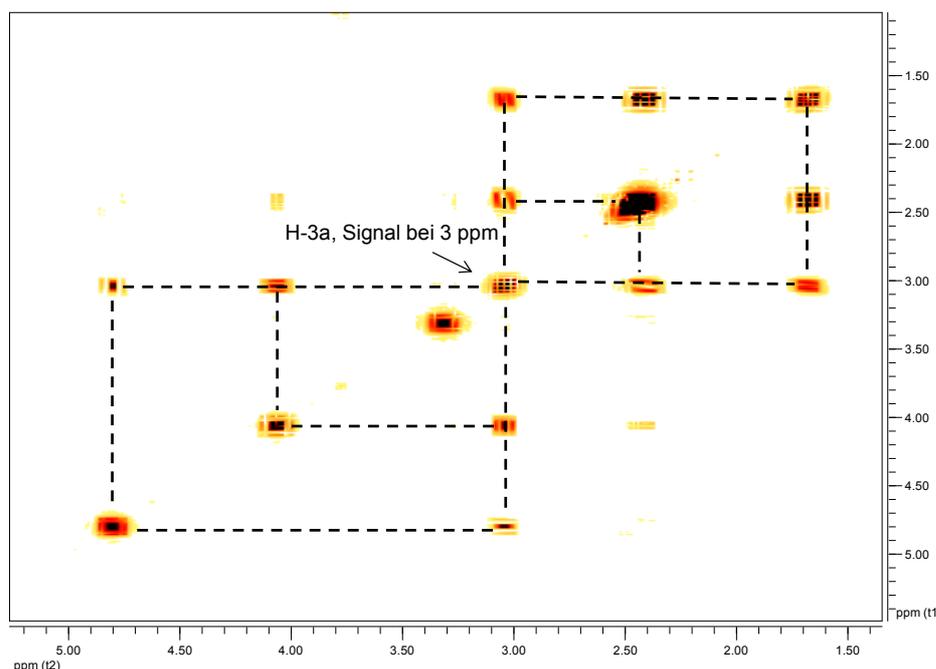
Charakteristisch für das Tetrahydrocyclopentachinolingrundgerüst sind die Signale der Doppelbindung im annelierten Cyclopentenring, die zwischen 5 und 6 ppm liegen, siehe **Abb. 22** links.



**Abb. 22:** links: Signale der Doppelbindung (H-1 und H-2), rechts: Signale der Protonen H-3 und H-3a

Die beiden Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe im Cyclopentenring (H-3) liefern zwei unterschiedliche Signalaufspaltungen (**Abb. 22** rechts). Dennoch zeigt eine Kopplungskonstante von über 15 Hz im Signal bei 1,7 ppm die geminale Kopplung der beiden Protonen miteinander.

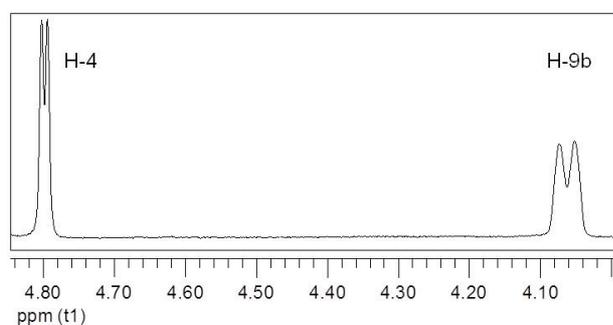
Im Gegensatz zu der Zuordnung von Burai (Burai, Ramesh et al. 2010), liefert das Proton H-3a das Signal bei 3 ppm. Mit Hilfe eines H,H-COSY Spektrums konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Signal um das des genannten Protons handelt, da dieses nicht nur mit den beiden Protonen der benachbarten CH<sub>2</sub>-Gruppe koppelt, sondern auch mit H-4 und H-9b.



**Abb. 23:** H,H-COSY von 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**1**)

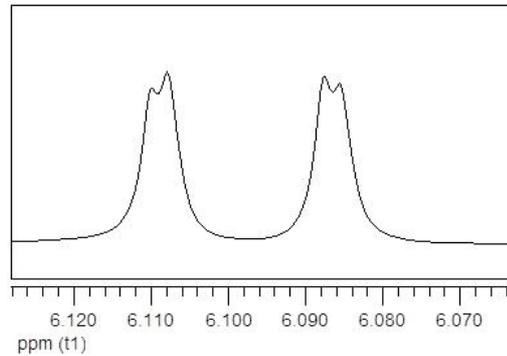
In **Abb. 23** gut zu erkennen ist die Kopplung des Protons H-3a (Signal bei 3 ppm) mit den beiden Protonen der benachbarten CH<sub>2</sub>-Gruppe (Signale bei 1,7 ppm und 2,4 ppm) und den Protonen H-4 und H-9b (Signale bei 4,8 ppm und 4,1 ppm).

Nach der oben beschriebenen allgemeinen Synthese wurden in den meisten Fällen die endo-Formen erhalten. Ausnahmen werden in den Kapiteln **3.2** und **3.4.2** beschrieben. Die für die endo-Form charakteristische syn-Orientierung der Protonen H-3a und H-4 folgt aus der Kopplungskonstante von 3 Hz für das H-4 Signal bei 4,8 ppm, s. **Abb. 24**.



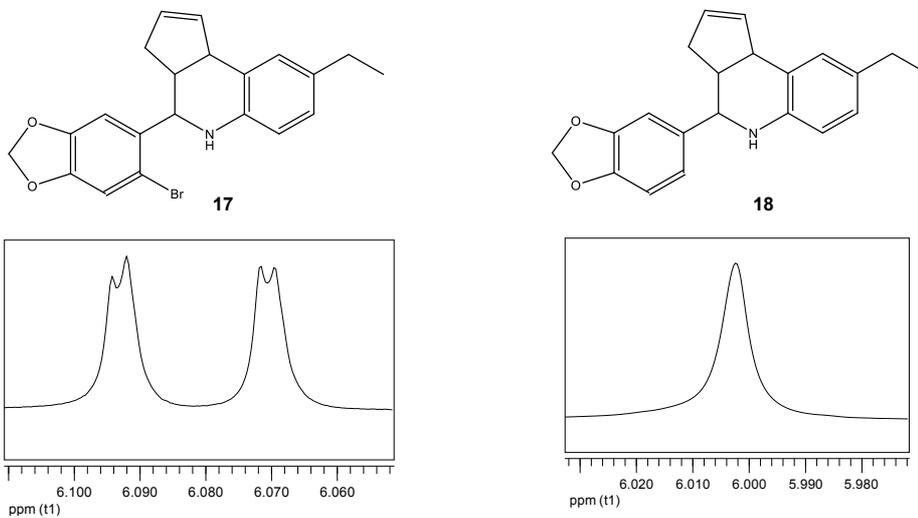
**Abb. 24:** Dubletts zur Charakterisierung der endo-Form.

Typisch für den Brompiperonalrest ist das Signal der beiden Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe im Benzodioxolrest. Jedes Proton liefert hier ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 0,8 Hz.



**Abb. 25:** Dubletts der  $\text{CH}_2$ -Gruppe des Benzodioxolrestes

Interessant ist, dass dieses Aufspaltungsmuster nur in Zusammenhang mit einem Halogensubstituenten am Piperonylrest auftritt. Bei der Verbindung **18** beispielsweise, ohne Halogen am Piperonylrest, liefern die beiden Protonen des Dioxolanringes ein Singulett (**Abb. 26**).



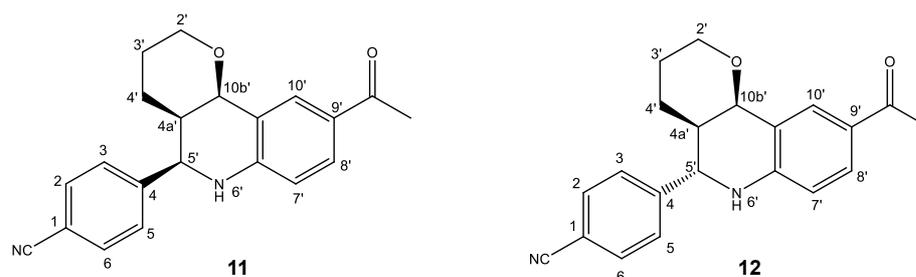
**Abb. 26:** Signale der  $\text{CH}_2$ -Gruppe im Benzodioxolanring links: **17**, rechts: **18**

## 3.2 Strukturanalyse der Hexahydropyranochinolin-Derivate

Im Falle der Hexahydropyranochinolin-Derivate sind vorwiegend die *exo*-Formen isoliert worden. Eine Ausnahme bildet 4-(9-Acetyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-*c*]chinolin-5-yl)benzonnitril. Von dieser Verbindung konnte neben der *exo*-Form (**12**) auch ein kleiner Anteil der *endo*-Form (**11**) isoliert werden. Die Diels-Alder-Cycloaddition ergibt in der Regel die thermodynamisch instabilere *endo*-Form. Der elektronenreiche Dihydropyranring führt unter den gewählten Reaktionsbedingungen im polaren Milieu überwiegend zum *exo*-Produkt. Das Entstehen des thermodynamisch stabileren Produkts lässt vermuten, dass in diesem Fall anstatt der synchron verlaufenden Diels-Alder-Reaktion ein stufenweiser Cyclisierungsprozess abläuft. Ähnliches wurde bei der Verwendung von Furan als Dienophil von Burai et al. berichtet (Burai, Ramesh et al. 2010). Die Autoren konnten ein Abfangprodukt der Zwischenstufe isolieren.

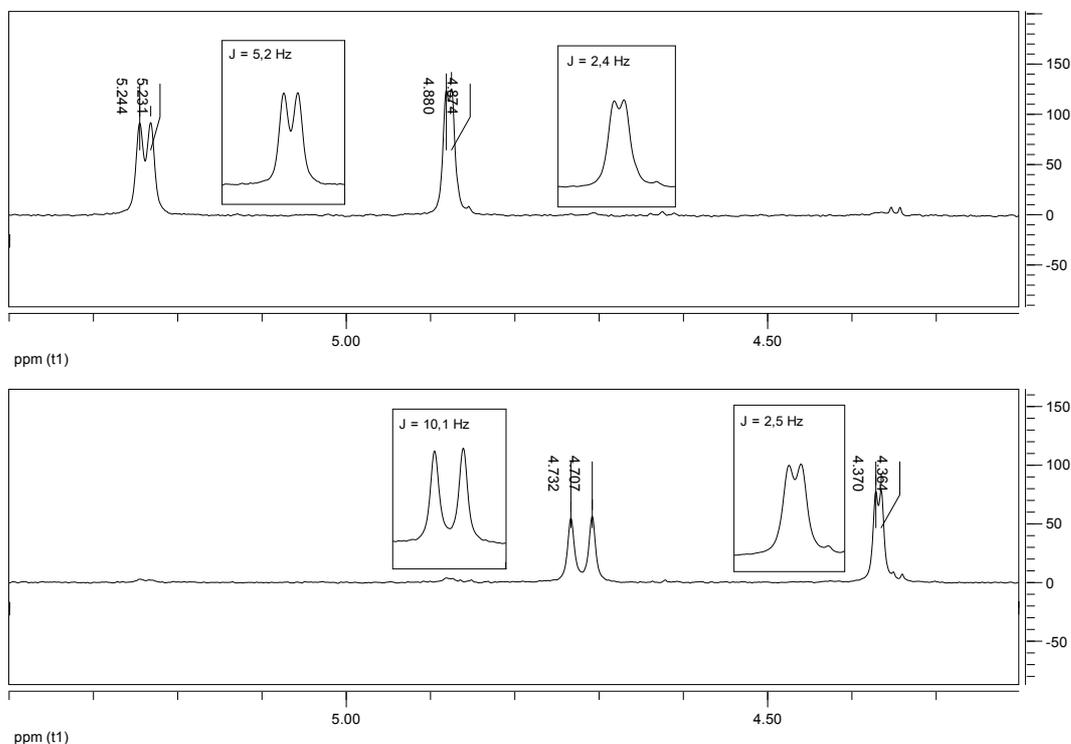
### 3.2.1 Konfigurationszuordnung der Diastereomere

Das 4-(9-Acetyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-*c*]chinolin-5-yl)benzonnitril stellt die einzige Verbindung dar, bei der beide Diastereomere (**11** und **12**) voneinander getrennt und rein isoliert werden konnten.



**Abb. 27:** Diastereomere Strukturen **11** und **12**

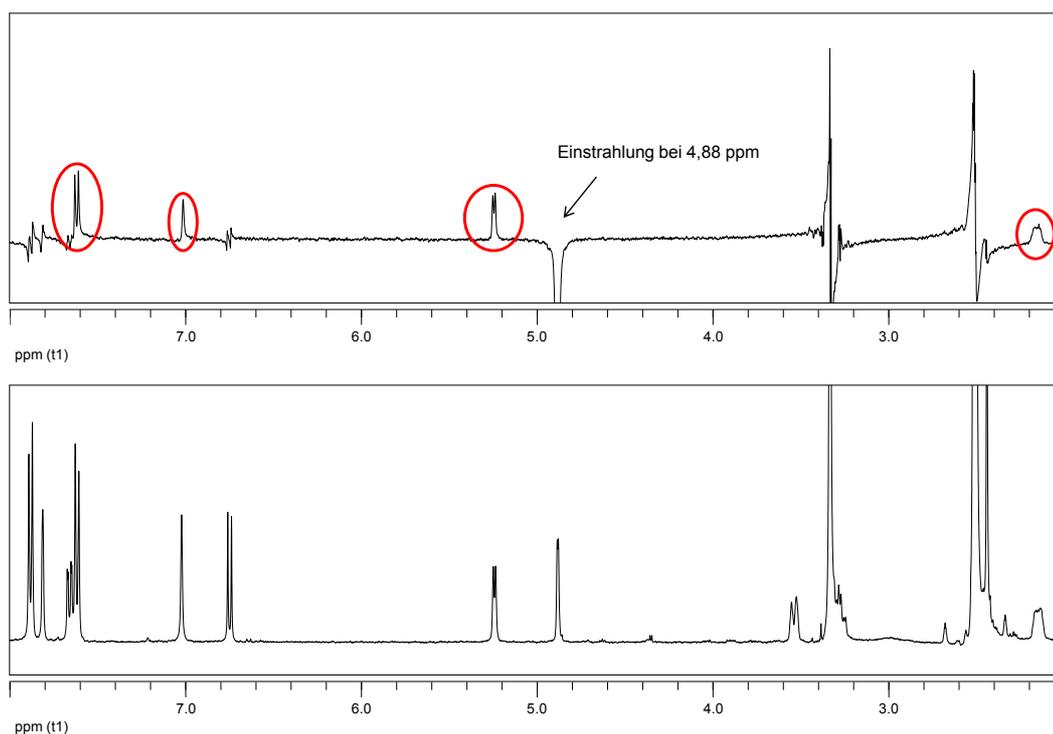
Die für die Unterscheidung der beiden Diastereomere interessanten Signale im NMR liefern die Protonen H-5' und H-10b', deren Signale zwischen 4,3 und 5,3 ppm liegen (**Abb. 28**).



**Abb. 28:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrenausschnitte, oben: Verbindung 11, unten: Verbindung 12

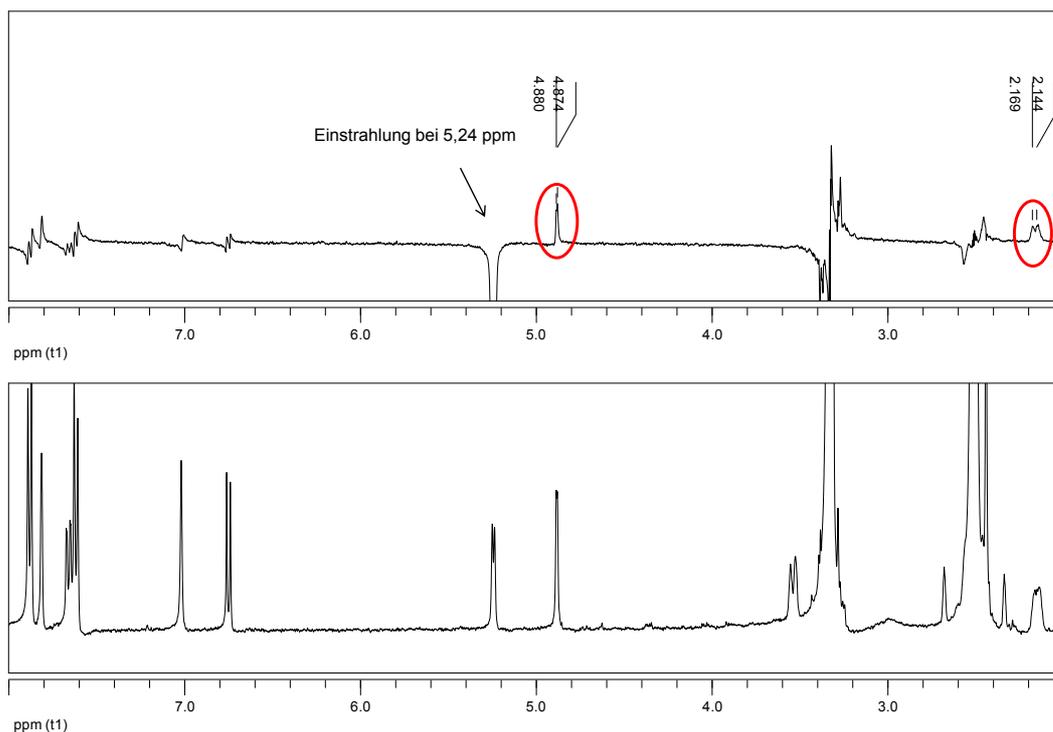
Zur Unterscheidung dieser beiden Isomere wurden Nuclear Overhauser Effect (NOE)-Differenzspektren aufgenommen. Bei dieser Methode wird durch eine definierte zusätzliche Einstrahlung die Resonanz eines Protons gesättigt. Infolge eines Sättigungstransfers kommt es zur Signalverstärkung von räumlich benachbarten Protonen.

Zu klären war zunächst welches Signal jeweils dem Proton H-5' und welches dem Proton H-10b' zugeordnet werden kann, um anschließend mittels der Kopplungskonstanten sagen zu können, wie die Protonen zueinander stehen. Dazu wurde im Falle der Verbindung 11 bei 4,88 und 5,24 ppm (**Abb. 29** und **Abb. 30**) eingestrahlt, für die Verbindung 12 bei 4,37 und 4,72 ppm (**Abb. 31** und **Abb. 32**).



**Abb. 29:** oben: NOE-Differenzspektrum von **11** durch Einstrahlung bei 4,88 ppm, unten:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **11** in DMSO- $d_6$

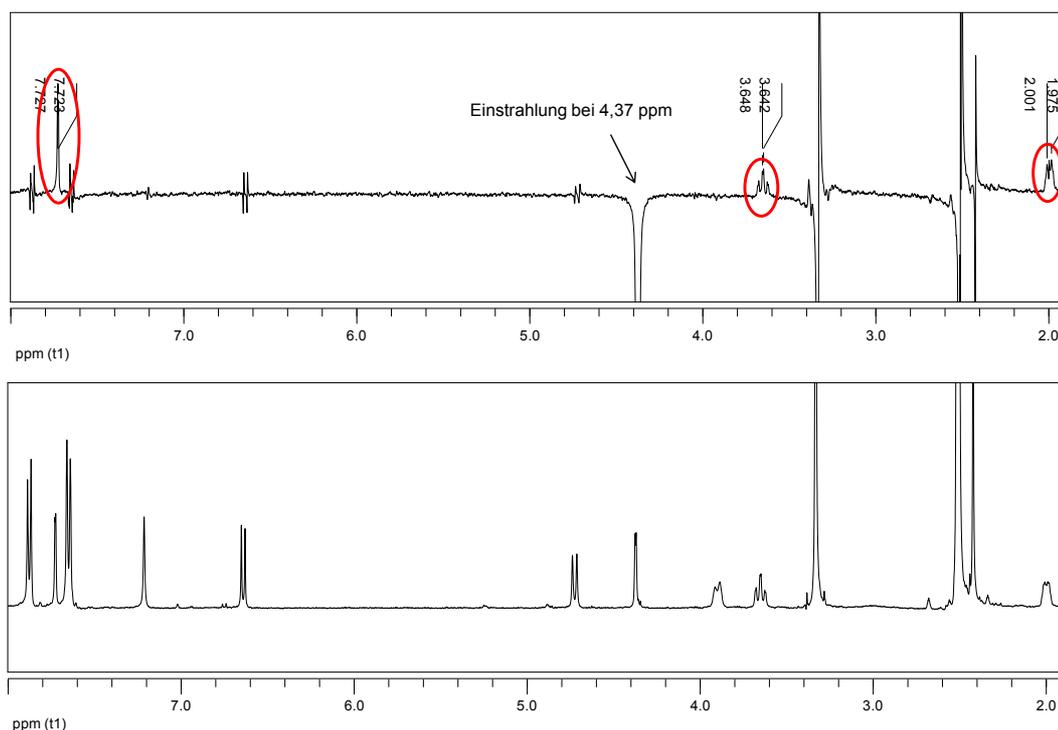
Bei Verbindung **11** ist ein Sättigungstransfer des untersuchten Protons (Signal bei 4,88 ppm) zu dem Proton NH (Signal bei 7 ppm) und den Protonen H-3 und H-5 im Cyanophenylrest (Signal bei 7,6 ppm) klar ersichtlich. Damit kann das Signal bei 4,88 ppm dem Proton H-5' zugeordnet werden. Auch sichtbar ist eine Signalverstärkung bei den Protonen H-4a' und H-10b' (Signale bei 2,1 und 5,2 ppm), die aber nicht der eindeutigen Zuordnung dienen, da beide Protonen, H-5' und H-10b', mit dem Proton H-4a' und auch beide miteinander über den Raum wechselwirken. Auch das NOE-Differenzspektrum mit der Einstrahlung bei 5,24 ppm lieferte keine sichere Zuordnung, siehe **Abb. 30**.



**Abb. 30:** oben: NOE-Differenzspektrum von **11** durch Einstrahlung bei 5,24 ppm, unten:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **11** in  $\text{DMSO-d}_6$

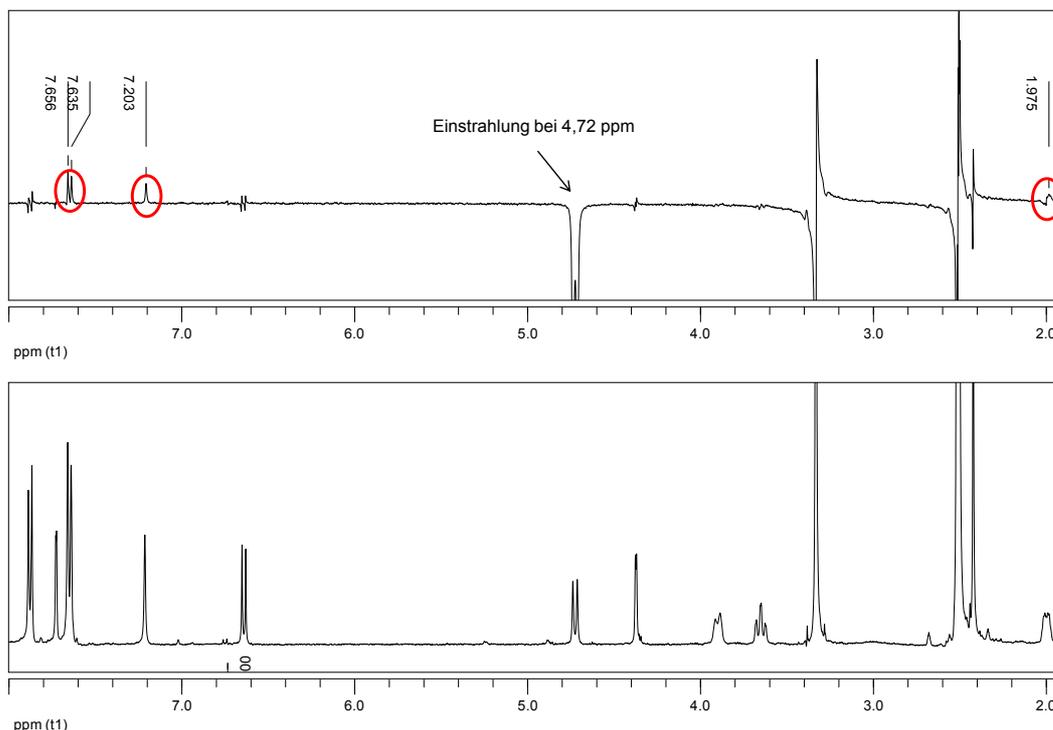
Strahlt man nämlich bei 5,24 ppm ein, ist nur eine Signalverstärkung bei den Protonen H-4a' und H-5' sichtbar.

Betrachtet man nun die Spektren der Verbindung **12**, so sieht man, dass das Proton, welches das Signal bei 4,37 ppm liefert, mit den Protonen H-2', H-4a' und H-10' über den Raum wechselwirkt (Signale bei 3,6 ppm, 2,0 ppm und 7,7 ppm), (**Abb. 31**).



**Abb. 31:** oben: NOE-Differenzspektrum von **12** durch Einstrahlung bei 4,37 ppm, unten:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **12** in DMSO- $d_6$

Durch die Einstrahlung bei 4,72 ppm findet eine Signalverstärkung bei 1,9 ppm, 7,2 ppm und 7,6 ppm statt. Diese drei Signale sind den Protonen H-4a', NH, H-3 und H-5 zuzuordnen (**Abb. 32**). Damit ist eindeutig belegt, dass das Proton H-5' das Signal bei 4,72 ppm liefert und das Proton H-10b' das Signal bei 4,37 ppm.



**Abb. 32:** oben: NOE-Differenzspektrum von **12** durch Einstrahlung bei 4,72 ppm, unten:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **12** in DMSO- $d_6$

Die Betrachtung der Kopplungskonstanten bestätigt, dass es sich bei der Verbindung **12** um die *exo*-Form handelt.

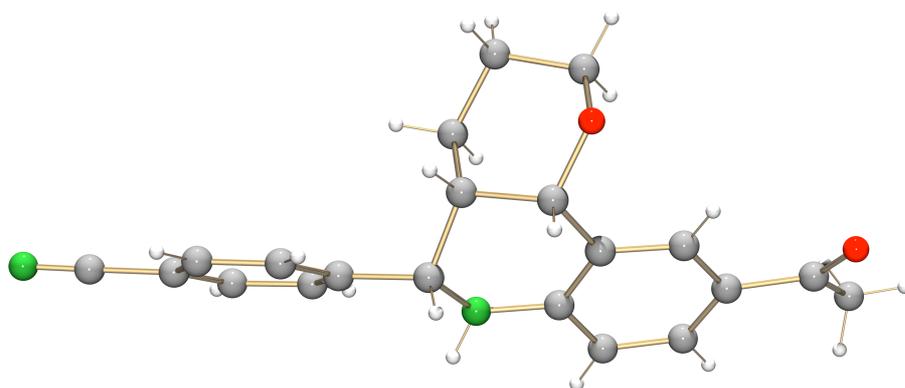
	Kopplungskonstanten Verbindung <b>11</b>	Kopplungskonstanten Verbindung <b>12</b>
$J$ (H-4a'/H-5')	2,4 Hz	10,1 Hz
$J$ (H-4a'/H-10b')	5,2 Hz	2,5 Hz

**Tab. 8:** Kopplungskonstanten der beiden Diastereomere **11** und **12**

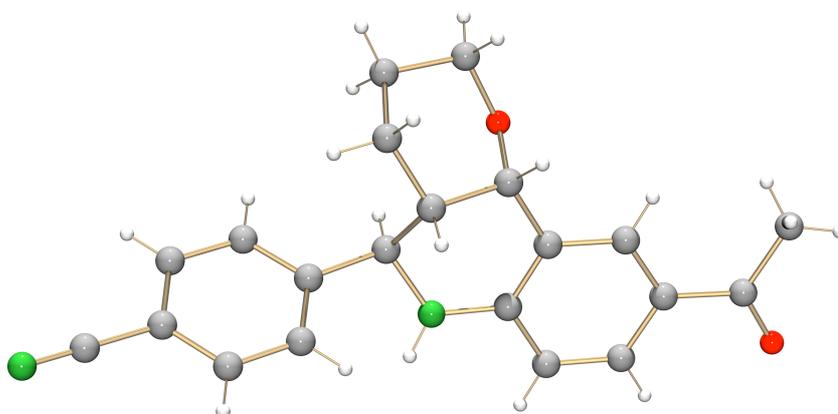
Die Kopplungskonstante von 10,1 Hz zeigt die *anti*-Orientierung der Protonen H-4a' und H-5' zueinander. Bei der *endo*-Form (**11**) beträgt die Kopplungskonstante dieser Protonen 2,4 Hz.

Unabhängig davon wurden zur Bestätigung der NMR-Ergebnisse von beiden Diastereomeren Kristallstrukturaufnahmen gemacht. Es konnten für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle gezüchtet werden. Kristalle der Verbindung **11**

wurden durch langsames Einengen aus Acetonitril und Kristalle der Verbindung **12** aus Aceton gewonnen. Die Kristallaufnahmen belegen die syn-Orientierung der Protonen H-4a' und H-5' in Verbindung **11** und die anti-Orientierung in Verbindung **12** (**Abb. 33** und **Abb. 34**).



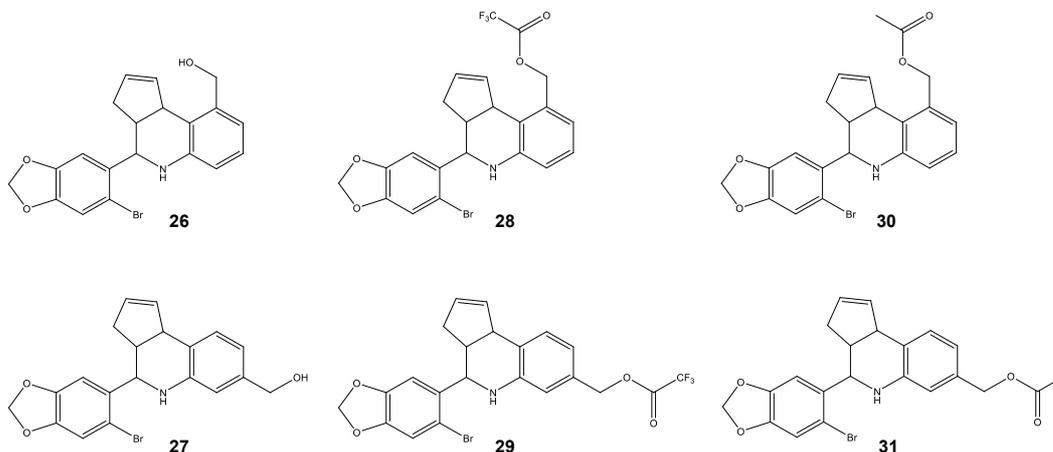
**Abb. 33:** Röntgenkristallstruktur der Verbindung **11**, endo-Form



**Abb. 34:** Röntgenkristallstruktur der Verbindung **12**, exo-Form

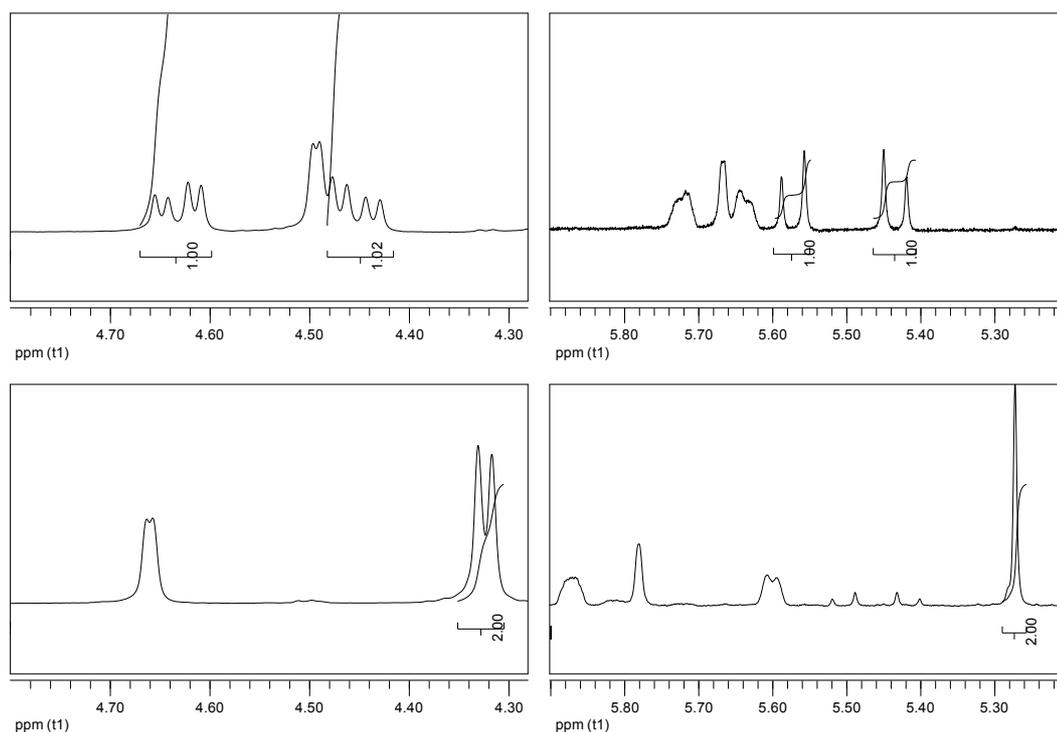
### 3.3 Strukturanalyse mittels Hochtemperatur-NMR

Die Verbindungen **26-31** zeigen im Bereich des Signals der  $-\text{CH}_2\text{OR}$ -Gruppe interessante Aufspaltungsmuster, die hier näher beschrieben werden sollen.



**Abb. 35:** Übersicht der Verbindungen **26-31**

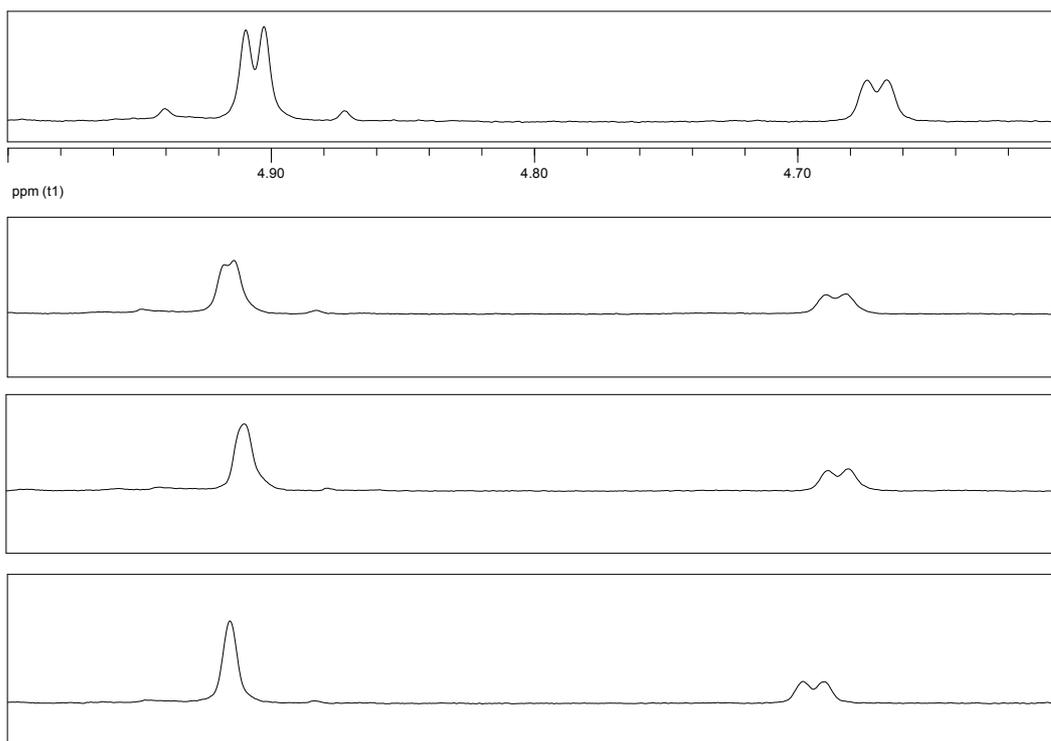
Im Falle der Verbindungen **26, 28** und **30** (**Abb. 35** oben) zeigt diese  $\text{CH}_2$ -Gruppe ein AB-System. Die OH-Gruppe in Verbindung **26** führt zu einer zusätzlichen Aufspaltung, die durch  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch entfällt. Hingegen zeigt die  $\text{CH}_2$ -Gruppe in Verbindungen **27** nur ein einfaches Dublett (d) und die der Verbindung **29** ein Singulett (s), s. **Abb. 36**. Eine Ausnahme ist Verbindung **31**. Hier liegt im Vergleich zu **29** überraschenderweise ein AB-System vor. Dieses Verhalten wird weiter unten diskutiert.



**Abb. 36:** <sup>1</sup>H-NMR-Ausschnitte der Verbindungen links oben: **26**, links unten: **27**, rechts oben: **28** und rechts unten: **29**

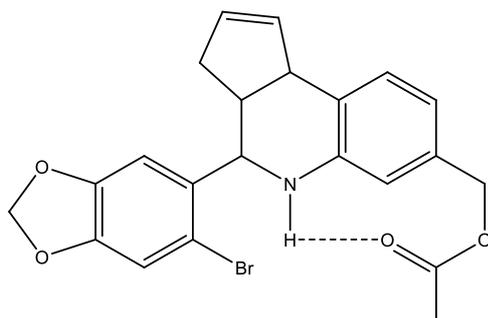
Das Aufspaltungsmuster der CH<sub>2</sub>-Gruppe in den Verbindungen **26**, **28** und **30** lässt auf eine Rotationseinschränkung durch den Cyclopentenring schließen. Um diese Vermutung zu belegen, wurden <sup>1</sup>H-Hochtemperatur-NMR-Messungen durchgeführt. Durch Erwärmung lässt sich normalerweise eine Rotationseinschränkung aufheben. Die Protonen sollten dann nicht mehr miteinander koppeln und ein Signal bei gleicher chemischer Verschiebung liefern, d.h. für **26** ein Dublett und für **28** und **30** ein Singulett. Bis zu Temperaturen von 90 °C in DMSO konnte keine Aufhebung der geminalen Kopplung beobachtet werden. Also bleibt auch bei diesen Temperaturen eine magnetische Nichtäquivalenz dieser Protonen bestehen, sie sind diastereotop.

Besonders auffällig in diesem Zusammenhang war das Spektrum der Verbindung **31**. Im Unterschied zu Verbindung **29**, bei der die CH<sub>2</sub>-Gruppe ein Singulett liefert, zeigt sie bei **31** ein AB-System. Auch hier wurde durch <sup>1</sup>H-Hochtemperatur-NMR-Messungen versucht eine Rotationseinschränkung nachzuweisen (**Abb. 37**).



**Abb. 37:**  $^1\text{H}$ -Hochtemperatur-NMR der Verbindung **31** in DMSO von oben nach unten: Raumtemperatur, 40 °C, 50 °C und 60 °C

Schon ab einer Temperatur von 50 °C geht das Dublett in ein Singulett über. In diesem Fall weist das Dublett auf eine Rotationseinschränkung hin, die bei höherer Temperatur aufgehoben wird. Ursache für die Rotationseinschränkung ist vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Esters und der NH-Gruppe im Tetrahydrochinolinring.

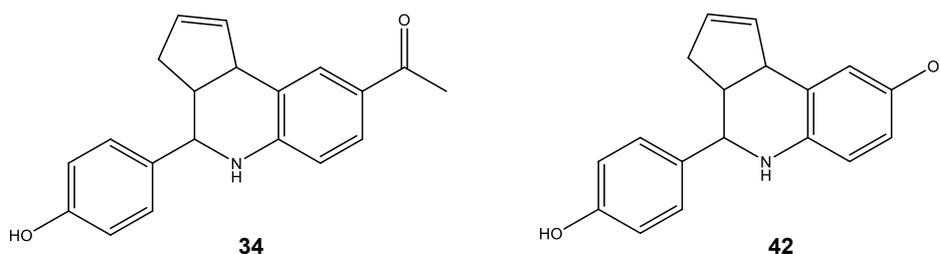


**Abb. 38:** Mögliche Wasserstoffbrückenbindung in **31**

Dieses Phänomen ist bei dem Trifluoressigester **29** nicht zu beobachten. Der induktive Effekt der  $\text{CF}_3$ -Gruppe vermindert in diesem Fall die Polarisierung der Carbonylgruppe als Akzeptor für die Wasserstoffbrückenbindung.

### 3.4 Dem Estron und Estradiol angepasste Verbindungen

Interessant schien die Überlegung, die Struktur des G1 soweit abzuwandeln, dass eventuell eine Affinität zu den Estrogenrezeptoren  $\text{ER}\alpha$  und/oder  $\text{ER}\beta$  erreicht werden kann. Dazu wurde der Abstand zwischen Ethanon- und phenolischer OH-Gruppe der Verbindung **34** mit dem Abstand der endständigen Sauerstofffunktionen im Estron verglichen. In gleicher Weise wurde der O-O-Abstand in Verbindung **42** mit dem in E2 verglichen (**Tab. 9**).

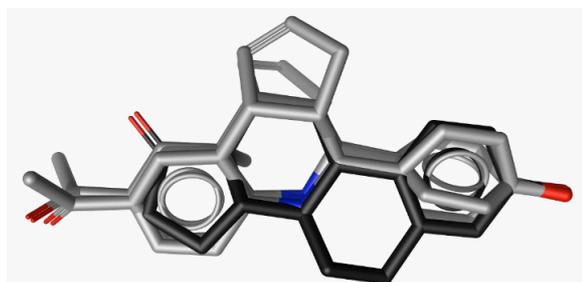


	Estron	Verbindung <b>34-exo</b>	Estradiol	Verbindung <b>42-exo</b>
<b>Abstände [Å]</b>	10,9	12,7	10,9	11,8

**Tab. 9:** Übersicht der O-O-Abstände in den Verbindungen **34** und **42** verglichen mit Estron und Estradiol

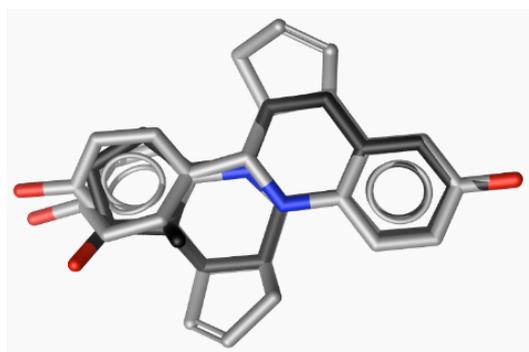
Die Abstände zwischen Keton und Hydroxygruppe unterscheiden sich bei Estron und Verbindung **34-exo** um 1,8 Ångström. Der O-O-Abstand in Estradiol und Verbindung **42-exo** variiert nur um 0,9 Ångström. Die entsprechenden endo-Formen haben einen um 0,1 Ångström größeren Abstand der terminalen funktionellen Gruppen. Der insgesamt relativ geringe Unterschied der Moleküllängen lässt vermuten, dass zumindest Verbindung **42** wie Estradiol in der ER-Bindungstasche Platz finden könnte, da bekanntermaßen die Proteinstrukturen

eine gewisse Flexibilität besitzen. Die formbasierte Überlagerung von Verbindung **34** und Estron mit dem Programm ROCS (rapid overlay of chemical structures) lässt eine deutliche Ähnlichkeit der beiden Strukturen in ihrer räumlichen Form erkennen. Beide Diastereomere der Verbindung **34** lassen sich gut auf die Struktur von Estron legen (**Abb. 39**). Allerdings ragt der Cyclopentenring sowohl bei der endo- als auch der exo-Form seitlich unter Verbreiterung des Moleküls heraus.



**Abb. 39:** Überlagerung der diastereomeren Strukturen von **34** (grau) und Estron (schwarz)

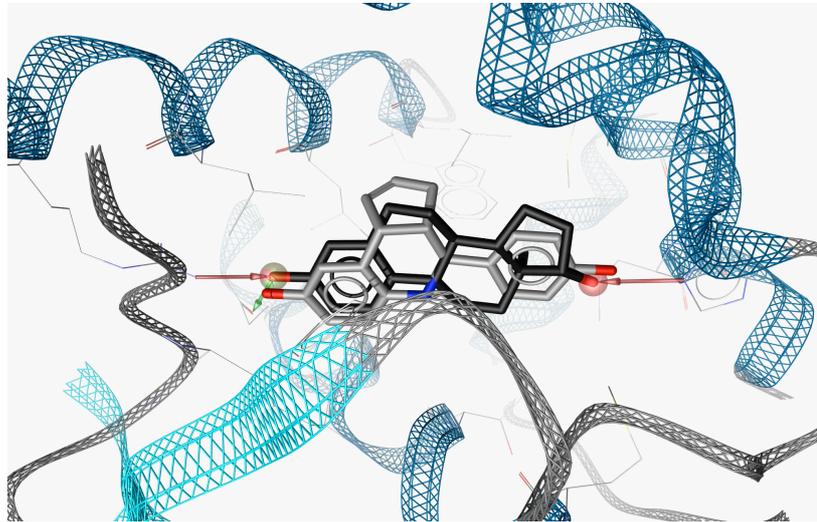
Die Verbindung **42** wurde mit der Struktur von Estradiol überlagert. Auch hier sind deutliche Ähnlichkeiten in der Raumerfüllung zu erkennen.



**Abb. 40:** Überlagerung der diastereomeren Strukturen von **42** (grau) mit 17 $\beta$ -Estradiol (schwarz)

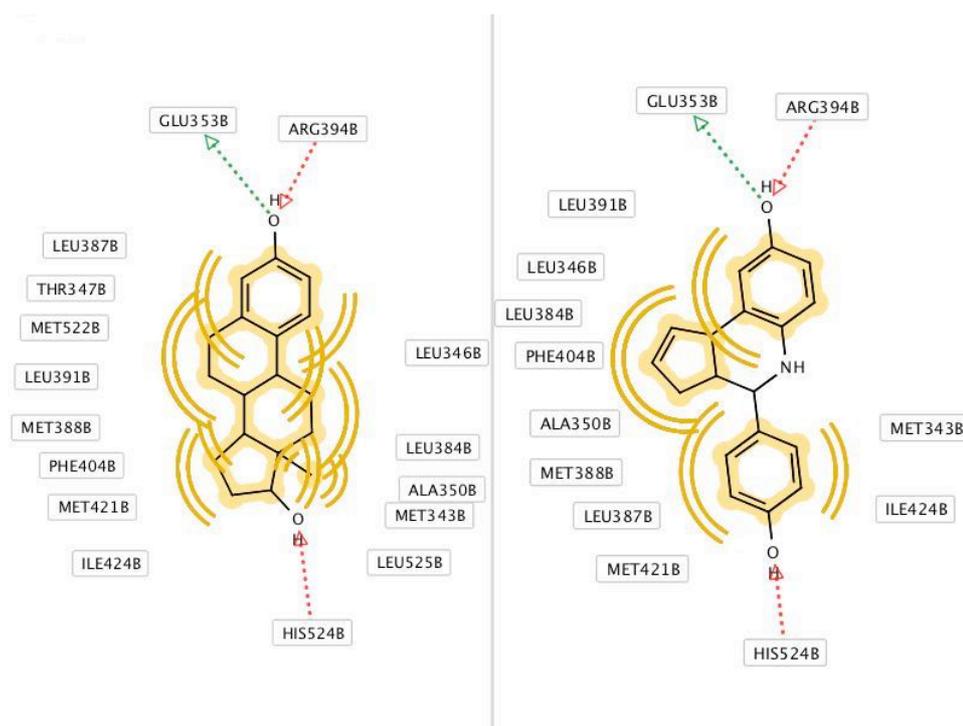
Nach den Ergebnissen der formbasierten Überlagerung von Verbindung **42** und Estradiol lag es nahe zu prüfen, ob Verbindung **42** tatsächlich in die ER $\alpha$ -Rezeptortasche passt. Hierfür wurde eine pharmakophorbasierte Überlagerung von E2 und Verbindung **42**-exo in dem Komplex 3HM1 aus der Proteindatenbank

durchgeführt (Rajan, Kim et al. to be published). Die Verbindung **42**-exo wurde flexibel in das rezeptorbasierte Pharmakophor von E2 gelegt und anschließend mit dem MMFF-94-Kraffteld im Protein minimiert (Wolber, Dornhofer et al. 2006).



**Abb. 41:** Pharmakophorbasierte Überlagerung von E2 und Verbindung **42**-exo in dem Komplex 3HM1 mit Ligand-Scout 3.02 (Wolber and Langer 2004)

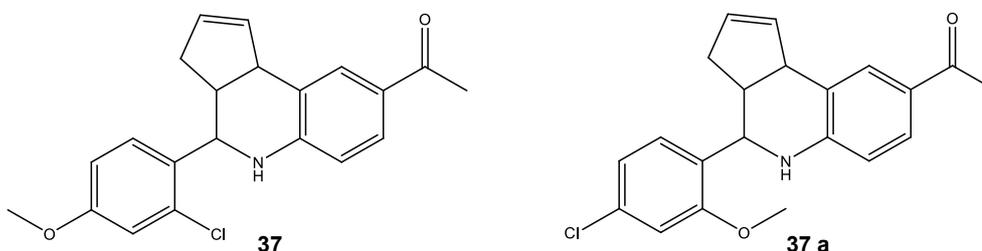
Ein interessantes Ergebnis ist, dass auch der aus der Ebene herausragende Cyclopentenring in der Rezeptorbindungstasche Platz findet (**Abb. 41**). Die polaren Hydroxygruppen der Verbindung **42** können wie die des E2 Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren His 524, Glu 353 und Arg 394 in der Bindungstasche von ER $\alpha$  ausbilden. Das lipophile Grundgerüst kann, ähnlich dem des E2, mit verschiedenen Aminosäuren, wie in **Abb. 42** ersichtlich, hydrophobe Wechselwirkungen eingehen.



**Abb. 42:** Darstellung der möglichen hydrophoben Wechselwirkungen von E2 (links) und Verbindung **42** (rechts) mit Aminosäuren der ER $\alpha$ -Bindungstasche

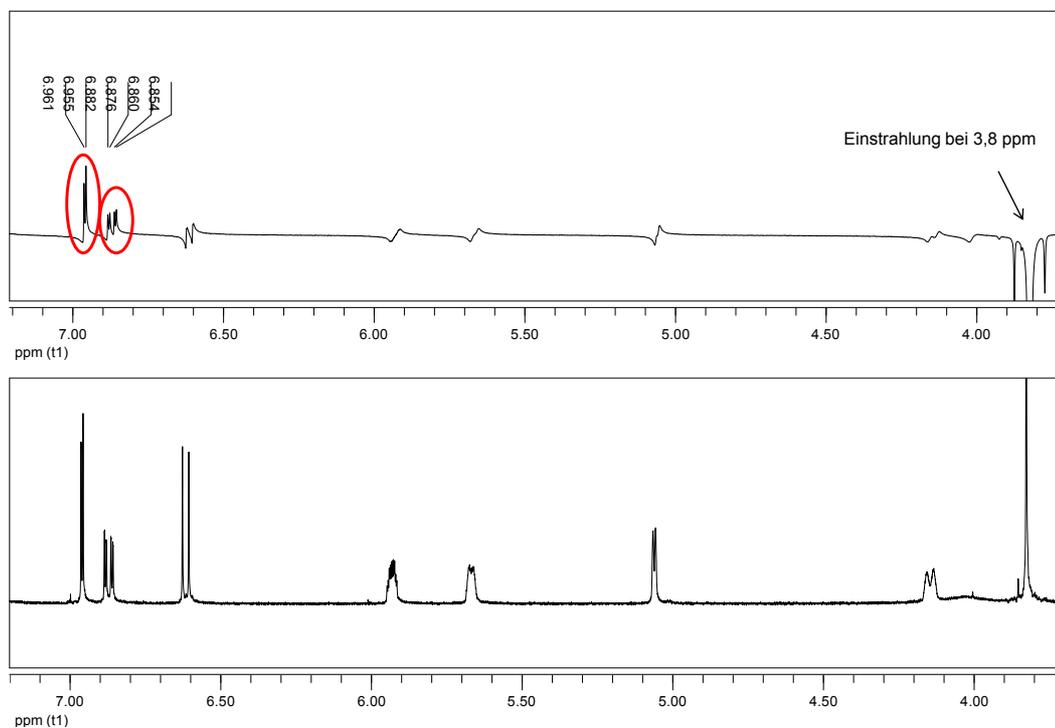
### 3.4.1 Strukturklärung von 1-(4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon

Wie im Kapitel 2.3.1 des Synthetischen Teil erwähnt, konnte der als Vorstufe gewünschte 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd nicht von seinem Strukturisomer 4-Chlor-2-methoxybenzaldehyd getrennt werden und wurde daher als Gemisch in die weitere Synthese eingesetzt. Nach erfolgter Umsetzung war eine Trennung und Isolierung der erhaltenen Isomere **37** und **37a** erfolgreich. Mit Hilfe von NOE-Differenzspektren ließen sich die Strukturen zuordnen.



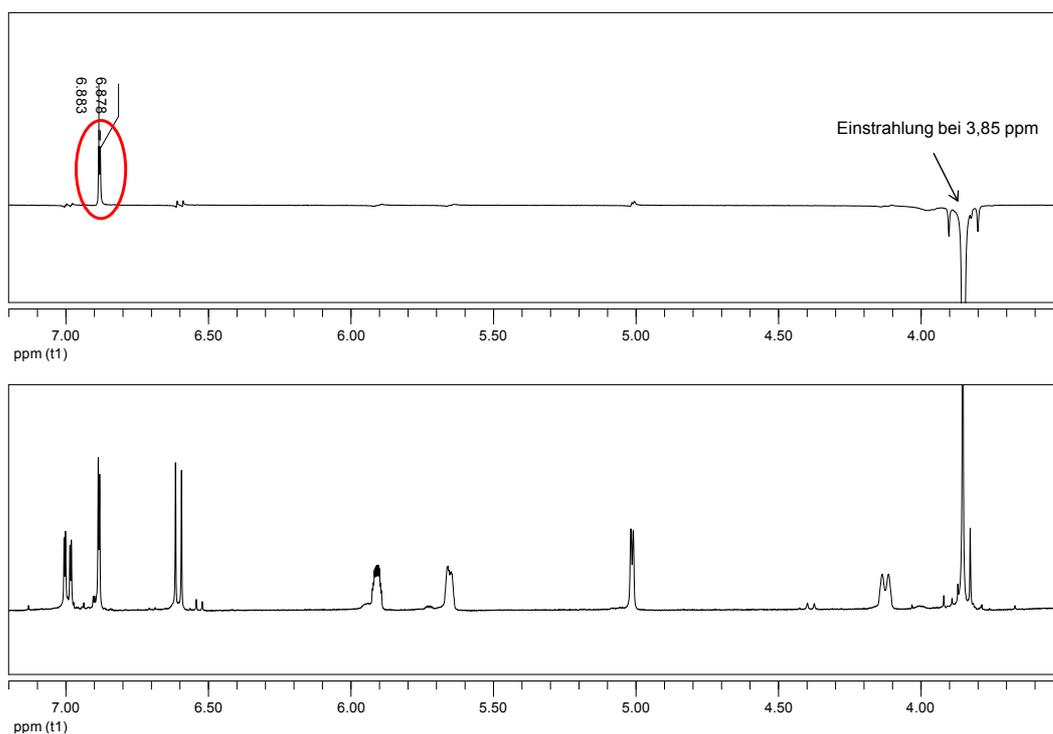
**Abb. 43:** Strukturisomere **37** und **37a**

Eingestrahlt wurde in beiden Fällen im Bereich des Signals der Methoxygruppe bei 3,8 ppm.



**Abb. 44:** NOE-Spektrum der 2-Chlor-4-methoxyverbindung (**37**)

Im Falle der 2-Chlor-4-methoxyverbindung (**37**) sind Raumkopplungen mit zwei Aromatenprotonen erkennbar (**Abb. 44**), während bei der 4-Chlor-2-methoxyverbindung (**37a**) nur die Kopplung zu einem Aromatenproton sichtbar ist (**Abb. 45**).

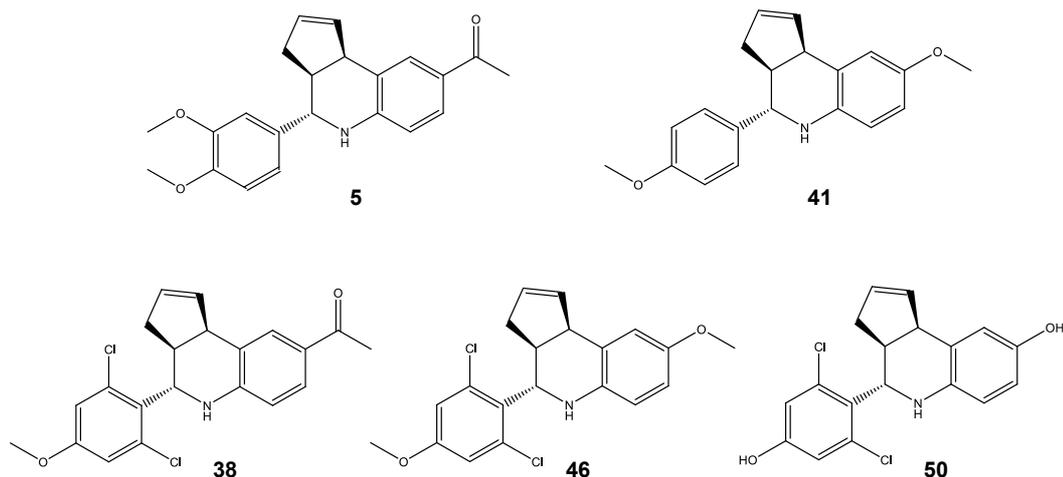


**Abb. 45:** NOE-Spektrum der 4-Chlor-2-methoxyverbindung (**37a**)

Für die Verbindung **45** (s. **Tab. 5**) wurden ebenfalls NOE-Spektren aufgenommen, die hier nicht aufgeführt werden. Sie wurden analog ausgewertet und nur die 2-Chlor-4-methoxyverbindung wurde in die Etherspaltung eingebracht.

### 3.4.2 Endo- und exo-Formen

Wie schon im Kapitel 3.1 erwähnt, entstanden bei den meisten Synthesen, mit einigen wenigen Ausnahmen, hauptsächlich die endo-Formen. Im Folgenden werden die Ausnahmen vorgestellt, bei denen entweder vornehmlich die exo-Form isoliert wurde oder endo- und exo-Form als Gemisch vorliegen.

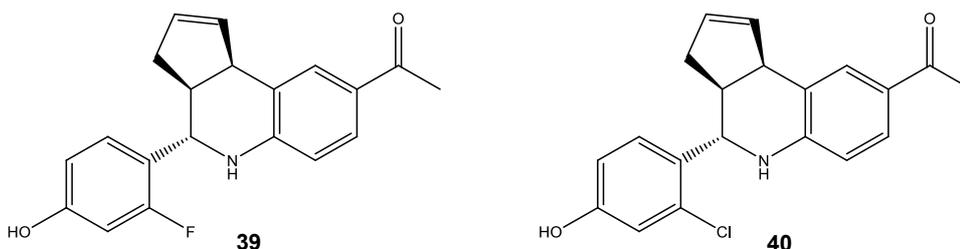


**Abb. 46:** Verbindungen, die in der exo-Form vorliegen, abgebildet ist jeweils das (3a*S*,4*S*,9*bR*)-Enantiomer

Von den Verbindungen **5**, **41**, **38** und **46** wurden bei der Synthese nach Vorschrift **2.2.1** nur die exo-Formen isoliert. Sucht man eine Erklärung dafür, warum bei dieser Diels-Alder-Reaktion die Endo-Regel nicht eingehalten wurde, könnte man bei den Verbindungen **38** und **46** anführen, dass die zwei ortho-Chlorsubstituenten die Annäherung des Cyclopentadiens im Übergangszustand sterisch beeinträchtigen. Zu dieser Erklärung passt, dass die weniger Platz beanspruchenden Fluorsubstituenten in den analogen Difluorverbindungen (**36**, **44**) zum reinen endo-Addukt führen. Bei der Etherspaltung von **46**-exo zu **50**-exo bleibt die Exokonfiguration erhalten.

### 3.4.2.1 Endo-exo-Isomerisierung bei Etherspaltung

Interessanterweise erfolgte eine Konfigurationsumkehr von der endo- zur exo-Form bei der Etherspaltung mit Ethanthiol und  $\text{AlCl}_3$ , die zu den Verbindungen **39** und **40** führte. Ihre Vorstufen lagen in reiner endo-Form vor.

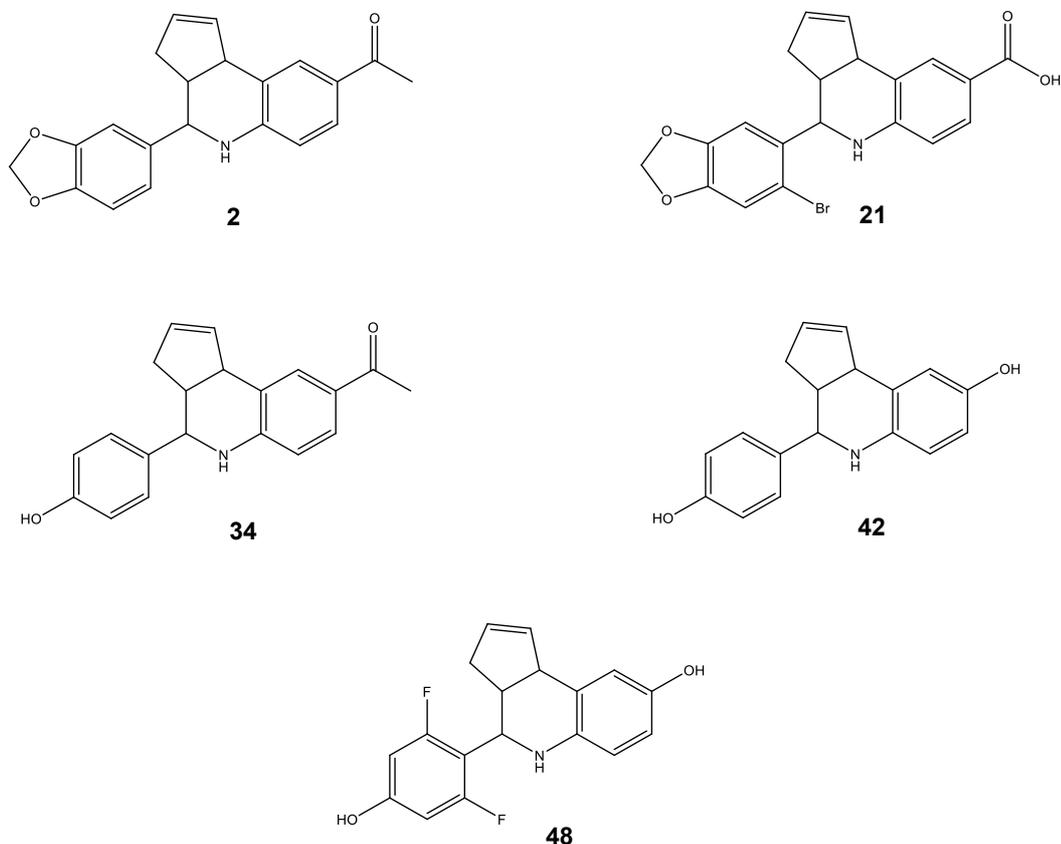


**Abb. 47:** Exoformen entstanden aus Endoformen bei Etherspaltung, abgebildet ist jeweils das (3aS,4S,9bR)-Enantiomer

Um zu überprüfen, ob das  $\text{AlCl}_3$  allein diese Isomerisierung auslöst, wurde eine Reaktion unter den gleichen, milden Bedingungen der Etherspaltung, jedoch ohne Ethanthiol durchgeführt. Nach der Aufarbeitung ließen sich endo- und exo-Form in etwa gleicher Menge im NMR-Spektrum nachweisen. Eine Retro-Diels-Alder Reaktion erscheint unter diesen milden Bedingungen als sehr unwahrscheinlich. Sie würde eine C-C-Bindungsöffnung zwischen dem aromatischen Ring und dem anellierten Cyclopentenring erfordern.

Eine alternative Erklärung für die Epimerisierung wäre, dass diese durch den Angriff des  $\text{AlCl}_3$  am basischen Stickstoff des Tetrahydrochinolinringes ausgelöst wird. Dieser Vorgang ist chemisch aber schwer zu erklären.

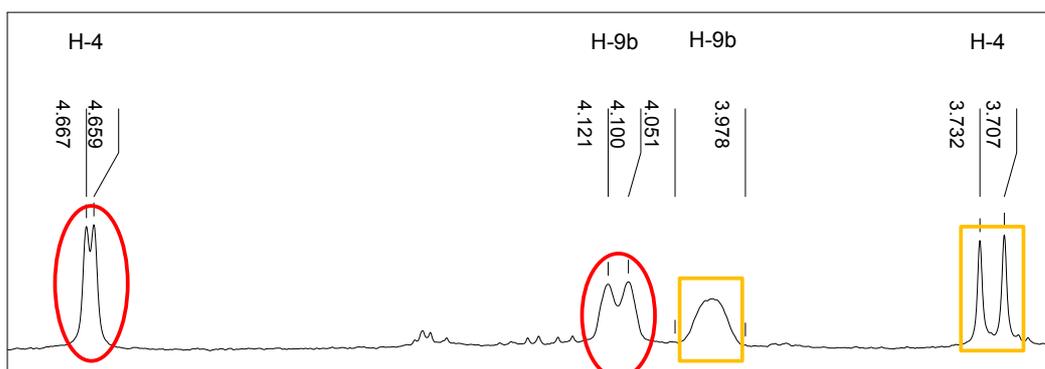
### 3.4.2.2 Endo-exo-Gemische



**Abb. 48:** Übersicht der Verbindungen, die als endo-exo-Gemisch vorliegen

Die Verbindungen **21** und **34** wurden nach der Vorschrift **2.2.2** unter Scandiumtriflatkatalyse als Gemisch aus endo- und exo-Form isoliert. Die Verbindungen **2** und **42** liegen nach der Synthese mit Trifluoressigsäure als Katalysator (**2.2.1**) ebenfalls als Gemisch vor. Zur Gewinnung der Verbindung **48** wurde die reine endo-Form der entsprechenden Dimethoxyverbindung in die Etherspaltung mit Ethanthiol eingebracht. Wiederum erfolgte unter den Bedingungen dieser Etherspaltung eine, in diesem Falle teilweise, endo-exo-Isomerisierung.

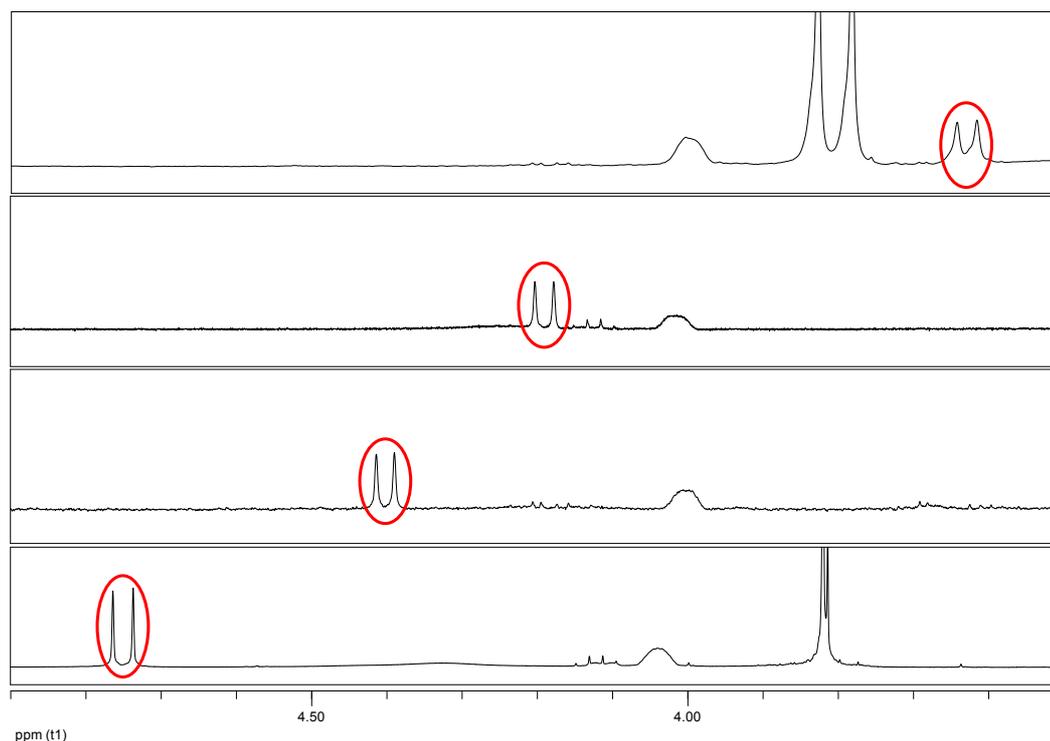
**Abb. 49** zeigt einen Ausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums der Verbindung **34**. Hier liegen beide Formen in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 vor.



**Abb. 49:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von Verbindung **34**

Rot eingekreist sind die Signale der endo-Form und in gelben Rechtecken die der exo-Form. Interessant ist die unterschiedliche Lage des Signals für das Proton H-4. Bei der endo-Form ist dieses Protonensignal deutlich tieffeldverschoben (bei 4,66 ppm), was mit einer geringeren Elektronendichte in der Umgebung des Protons in Zusammenhang gebracht werden kann. Bei der exo-Form befindet sich um das entsprechende Proton eine höhere Elektronendichte, für die wohl der Cyclopentenring verantwortlich ist. Daher kommt das Signal hier durch die stärkere Abschirmung bei einer deutlich niedrigeren Frequenz (bei 3,72 ppm)

Interessant zu beobachten ist auch der Einfluss von Halogensubstituenten am aromatischen Ring auf die Lage des Signals für das Proton H-4. In **Abb. 50** sind vier  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrenausschnitte von den Verbindungen **41**, **39**, **40** sowie **38**, von denen ausschließlich die exo-Form isoliert wurde, dargestellt.



**Abb. 50:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrenausschnitte der Verbindungen **41**, **39**, **40**, **38** (von oben nach unten), gemessen in  $\text{CDCl}_3$

Jeweils rot umrandet ist das Signal des Protons H-4. Die o-Fluorsubstitution in Verbindung **39** führt erwartungsgemäß zu einer Tieffeldverschiebung des Signals für das Proton H-4, verglichen mit der halogenfreien Verbindung **41** (obere zwei Spektren). Überraschenderweise führt die Einführung eines o-Chlorsubstituenten (**40**, Spektrum drei) zu einer stärkeren Tieffeldverschiebung. Zu erwarten wäre, infolge des stärkeren induktiven Effekts des Fluors, die umgekehrte Reihenfolge. Zwei o-Chlorsubstituenten verursachen eine signifikante weitere Tieffeldverschiebung für das Dublett von H-4 (**38**, unteres Spektrum). Vermutlich wirken die Chloratome zusätzlich zu ihrer schwächeren induktiven Wirkung über die vier  $\sigma$ -Bindungen stärker negativ induktiv über den Raum.



## 4 Pharmakologische Untersuchungen

### 4.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Für die Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen diente ein in vitro Zelltestsystem. Untersucht wurde der Einfluss der Substanzen auf drei Tumorzelllinien, hormonabhängige MCF-7 Zellen, hormonunabhängige MDA-MB-231 Zellen und die Osteosarkomzelllinie U2OS.

#### 4.1.1 Verwendete Zelllinien

##### MCF-7

Hierbei handelt es sich um eine humane, hormonabhängige Mammakarzinomzelllinie, die 1970 aus einem Pleuraerguss einer 69 jährigen weißen Frau aus dem Kaukasus gewonnen wurde. Die Patientin war vorher drei Jahre mit Radio- und Hormontherapie behandelt worden (Soule, Vazquez et al. 1973). Die Zelllinie weist Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron auf (Horwitz, Costlow et al. 1975).

##### MDA-MB-231

Die MDA-MB-231 Zelllinie ist eine humane, hormonunabhängige Mammakarzinomzelllinie (Engel and Young 1978). Sie wurde 1973 aus einem malignen Pleuraerguss einer 51 jährigen Brustkrebspatientin isoliert, die zuvor mit Chemotherapeutika behandelt worden war (Cailleau, Young et al. 1974).

##### U2OS

Bei den U2OS Zellen, ursprünglich als 2T Zellen bezeichnet, handelt es sich um eine humane Knochenkrebszelllinie. Sie wurde 1964 aus einem mäßig differenzierten Osteosarkom der Tibia einer 15 jährigen Patientin isoliert und als Zelllinie etabliert (Ponten and Saksela 1967).

#### 4.1.2 Das verwendete Testsystem

Die Testung erfolgt mittels eines kolorimetrischen Verfahrens, das erstmals 1986 beschrieben wurde (Gillies, Didier et al. 1986). Nach dieser etwas modifizierten Methode werden 750 Zellen pro Well in 96-Loch-Platten ausgesät. Anschließend

lässt man die Zellen 72 Stunden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, die 5 % CO<sub>2</sub> enthält, im Brutschrank anwachsen. Nach der Substanzzugabe werden die Platten für weitere 96 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird anschließend abgesaugt und die noch lebenden Zellen mit einer 1 %igen Glutardialdehydlösung am Boden der Wells fixiert. Die Zellen werden danach mit PBS überschichtet, sodass ein Austrocknen verhindert wird. Die Platten werden bis zum Anfärben im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Färbung wird eine 0,02 %ige Kristallviolett-Lösung verwendet. Der Farbstoff bindet vorwiegend an DNA-assoziierte Nukleoproteine. Sein Überschuss wird anschließend mit Wasser ausgewaschen. Der verbleibende Anteil wird mit 70 %igem Ethanol extrahiert und bei 590 nm photometrisch vermessen. Die gemessene Absorption korreliert mit der Zellmenge. Aus den erhaltenen Absorbationswerten wird dann, wie im Experimentellen Teil (Kapitel.9.2.6) beschrieben, die relative prozentuale Wachstumshemmung  $T/C_{\text{corr}}$  bzw.  $\tau$  berechnet. Dabei werden die Negativkontrolle und die Zellmenge zum Zeitpunkt der Substanzzugabe berücksichtigt. Als Negativkontrolle dient jeweils das entsprechende Lösungsmittel und als Positivvergleich Cisplatin.

Der  $T/C_{\text{corr}} = 50\%$  wird als  $IC_{50}$ -Wert bezeichnet. Die  $IC_{50}$  gibt diejenige Substanzkonzentration an, bei der eine 50% ige Wachstumshemmung vorliegt.

### 4.1.3 Testergebnisse

Zur Beurteilung des Einflusses der Strukturvariation auf die Zytotoxizität wird die Verbindung **1** (G1) als Referenz verwendet. Für **1** wurden mit dem oben beschriebenen Testsystem folgende  $IC_{50}$ -Werte ermittelt:

MCF-7:  $0,40 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$

MDA-MB-231:  $0,45 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$

U2OS:  $0,36 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$

Zur allgemeinen Einschätzung der zytotoxischen Eigenschaften wird Cisplatin, ein häufig verwendetes Zytostatikum, mit folgenden  $IC_{50}$ -Werten herangezogen:

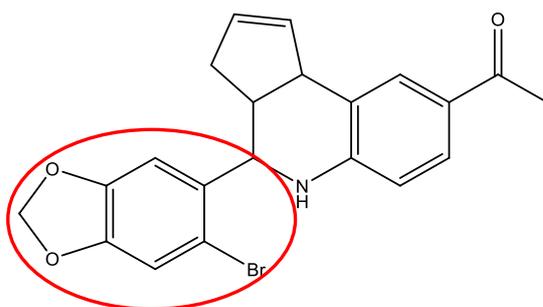
MCF-7:  $2,6 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$

MDA-MB-231:  $4,6 \pm 1,8 \mu\text{mol/l}$

U2OS:  $2,9 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$

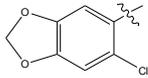
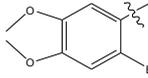
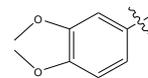
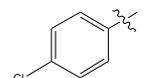
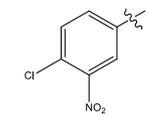
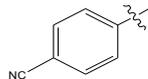
#### 4.1.3.1 Einfluss der Aldehydkomponente

Zunächst wurde der Einfluss der Aldehydkomponente als Baustein des modifizierten G1 auf die zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die getesteten  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **2-8** sind in **Tab. 10** aufgeführt.



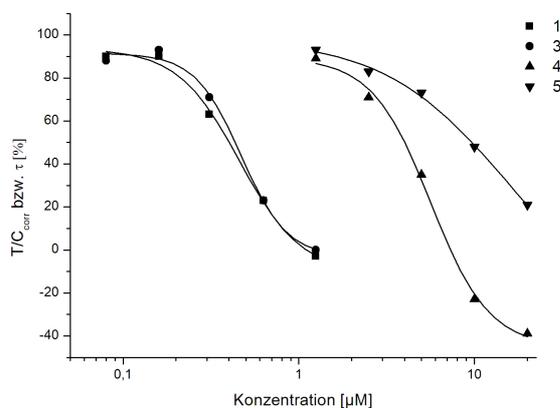
**1** (G1)

	Nr.	$IC_{50}$ in $\mu\text{mol/l}$		
		MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
	<b>2</b>	$5,2 \pm 0,7$	$11,5 \pm 2,7$	$6,1 \pm 0,9$

	Nr.	IC <sub>50</sub> in µmol/l	IC <sub>50</sub> in µmol/l	IC <sub>50</sub> in µmol/l
		MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
	<b>3</b>	0,44 ± 0,01	0,58 ± 0,05	0,49 ± 0,01
	<b>4</b>	4,1 ± 0,6	6,9 ± 0,8	5,5 ± 1,1
	<b>5</b>	10,0 ± 1,1	16,8 ± 2,5	13,6 ± 3,7
	<b>6</b>	7,5 ± 1,3	4,8 ± 1,3	6,9 ± 1,8
	<b>7</b>	2,3 ± 0,08	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1
	<b>8</b>	10,1 ± 3	> 20	> 20

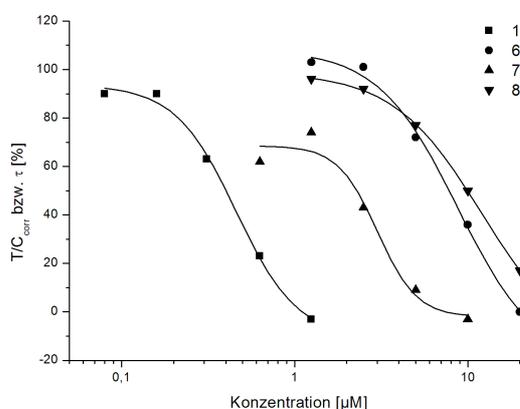
**Tab. 10:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **2-8** in µmol/l an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

Als Folge der Strukturvariation sind hier verschiedene Einflüsse auf die zytotoxischen Eigenschaften zu erkennen. Ersetzt man das Brom in **1** durch Chlor (**3**) verändert das die Zytotoxizität nicht. Hingegen führt die Ringöffnung des Dioxolans, wie in **4**, zu einer Abnahme der Zytotoxizität auf etwa ein zehntel. Zu einer weiteren Verringerung kommt es durch Eliminierung des Broms (**5**). Hier liegen die IC<sub>50</sub>-Werte nur noch bei 10,0 ± 1,1 µmol/l für MCF-7, 16,8 ± 2,5 µmol/l für MDA-MB-231 und 13,6 ± 3,7 µmol/l für U2OS. In **Abb. 51** sind exemplarisch die Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1**, **3**, **4** und **5** an MCF-7 Zellen dargestellt.



**Abb. 51:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1**, **3**, **4** und **5** an MCF-7 Zellen

Verbindung **6** zeigt im Gegensatz zu **1** eine schwächere Hemmung der Zellproliferation mit  $IC_{50}$ -Werten von 5-8  $\mu\text{mol/l}$  an den unterschiedlichen Zelllinien. Die Einführung einer Nitrogruppe in Position 3 (**7**) führt dagegen wieder zu einer Zunahme der Zytotoxizität mit  $IC_{50}$ -Werten von 1,6-2,5  $\mu\text{mol/l}$ , s. **Abb. 52**.



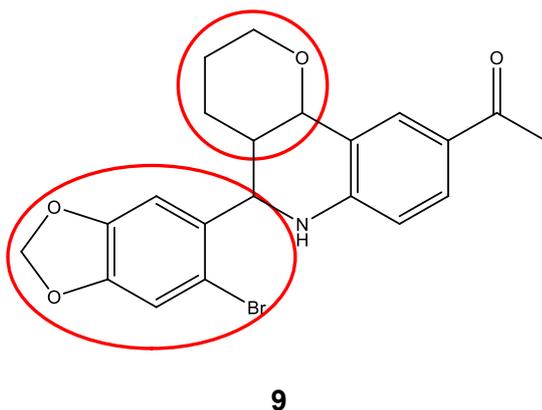
**Abb. 52:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1**, **6**, **7** und **8** an MCF-7 Zellen

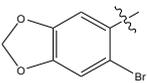
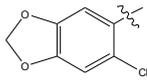
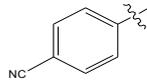
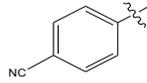
Interessant sind die zytotoxischen Eigenschaften der Verbindung **8** mit p-Cyanophenylsubstitution. Hier ist eine gewisse Selektivität hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber MCF-7 Zellen zu erkennen. Während an den MCF-7 Zellen eine Hemmung der Zellproliferation mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $10,1 \pm 3 \mu\text{mol/l}$  auf-

tritt, zeigt sie an MDA-MB-231- und U2OS-Zellen keine Hemmung mehr ( $>20 \mu\text{mol/l}$ ), (Tab. 10).

#### 4.1.3.2 Einfluss der Dienophil- und der Aldehydkomponente

Als Dienophil wurde bei den Verbindungen **9-12** statt Cyclopentadien Dihydropyran verwendet.

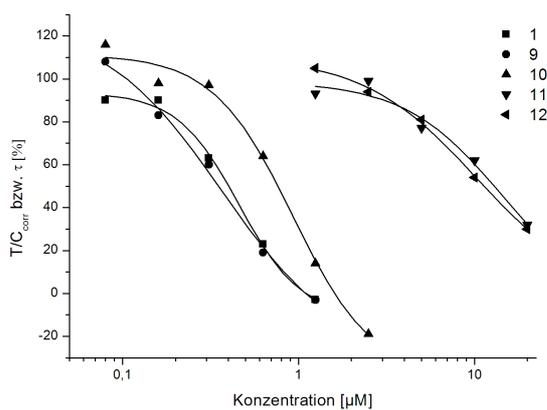


	Nr.	IC <sub>50</sub> in $\mu\text{mol/l}$ MCF-7	IC <sub>50</sub> in $\mu\text{mol/l}$ MDA-MB-231	IC <sub>50</sub> in $\mu\text{mol/l}$ U2OS
	<b>9</b>	0,36 ± 0,02	0,48 ± 0	0,47 ± 0,02
	<b>10</b>	0,80 ± 0,09	1,2 ± 0,2	0,86 ± 0,2
	<b>11</b>	12,9 ± 0,9	> 20	> 20
	<b>12</b>	9,6 ± 1,3	> 20	> 20

**Tab. 11:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **9-12** in  $\mu\text{mol/l}$  an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

Der Ringaustausch führt im Allgemeinen zu keiner nennenswerten Veränderung der Zytotoxizität. Nur bei Verbindung **10** verringert sich im Vergleich zu der ent-

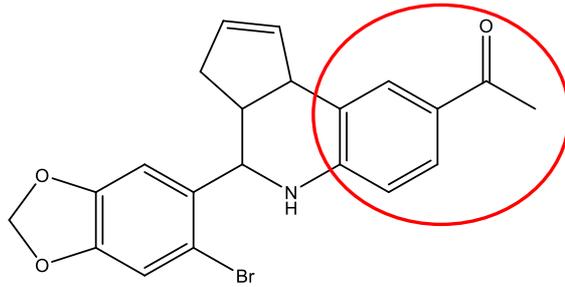
sprechenden Cyclopentenverbindung **3** (Tab. 10) die Zytotoxizität um etwa die Hälfte. Die diastereomeren Verbindungen **11** und **12** zeigen wie Verbindung **8** (Tab. 10) eine Selektivität der zytotoxischen Eigenschaften gegenüber MCF-7 Zellen. Sie wirken weder an MDA-MB-231- noch an U2OS-Zellen zytotoxisch (Tab. 11). In Abb. 53 sind die Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **9-12** im Vergleich zu **1** an MCF-7 Zellen wiedergegeben.



**Abb. 53:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1** und **9-12** an MCF-7 Zellen

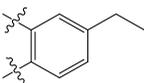
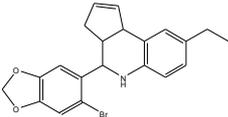
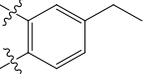
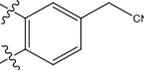
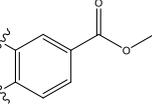
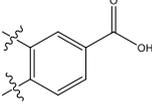
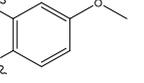
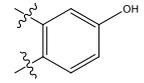
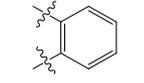
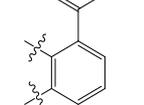
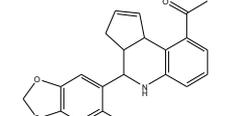
### 4.1.3.3 Einfluss der Aminkomponente

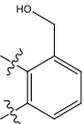
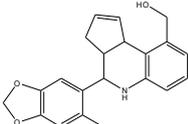
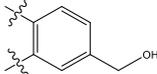
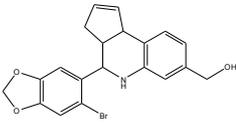
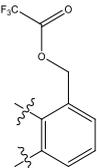
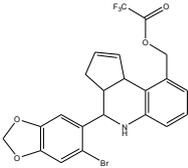
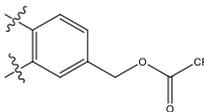
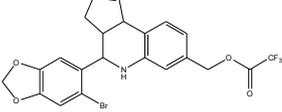
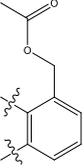
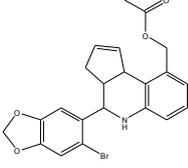
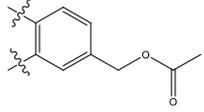
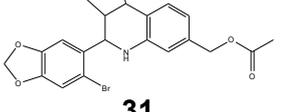
Im Folgenden wurde der Einfluss der Aminkomponente als variabler Baustein auf die zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **13-32** können der **Tab. 12** entnommen werden.

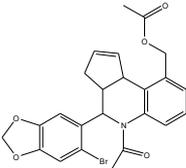
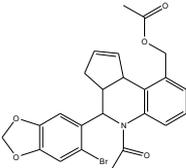


**1 (G1)**

	<b>Nr.</b>	<b><math>IC_{50}</math> in <math>\mu\text{mol/l}</math> MCF-7</b>	<b><math>IC_{50}</math> in <math>\mu\text{mol/l}</math> MDA-MB- 231</b>	<b><math>IC_{50}</math> in <math>\mu\text{mol/l}</math> U2OS</b>
		$0,61 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,07$
<b>13</b>				
		$5,1 \pm 1$	$6,8 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,3$
<b>14</b>				
	<b>15</b>	$3,2 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$
	<b>16</b>	$1,9 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,2$

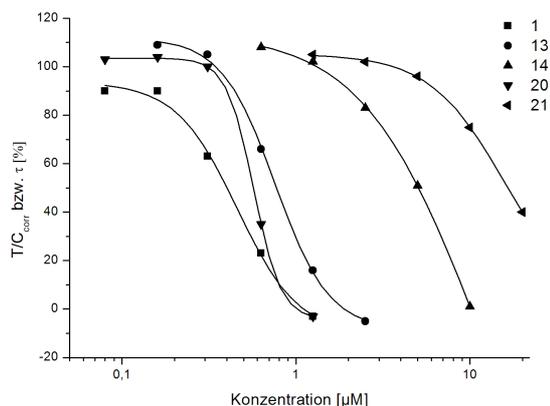
	Nr.	IC <sub>50</sub> in μmol/l MCF-7	IC <sub>50</sub> in μmol/l MDA-MB- 231	IC <sub>50</sub> in μmol/l U2OS
		10,1 ± 2	15 ± 3	9,7 ± 0,6
	<b>17</b>			
	<b>Verb. 17 ohne Brom</b>	2,0 ± 0,09	1,0 ± 0,01	2,0 ± 0,1
	<b>18</b>			
	<b>19</b>	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
	<b>20</b>	0,57 ± 0	0,57 ± 0,09	0,48 ± 0,01
	<b>21</b>	16,6 ± 1,4	> 20	> 20
	<b>22</b>	1,7 ± 0,06	2,3 ± 0,07	2 ± 0,2
	<b>23</b>	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,7	3,2 ± 0,5
	<b>24</b>	5,2 ± 0,04	6,6 ± 0,2	4,9 ± 0,8
		2,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2	2,5 ± 0,02
	<b>25</b>			

Nr.		IC <sub>50</sub> in μmol/l MCF-7	IC <sub>50</sub> in μmol/l MDA-MB- 231	IC <sub>50</sub> in μmol/l U2OS
		2,6 ± 0,2	4,0 ± 0,3	2,8 ± 0,3
<b>26</b>				
		2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,1	1,8 ± 0,04
<b>27</b>				
		2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,01
<b>28</b>				
		1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,05	1,1 ± 0,4
<b>29</b>				
		3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,3	2,3 ± 0,05
<b>30</b>				
		3,1 ± 0,5	3,8 ± 0,4	2,9 ± 0,3
<b>31</b>				

Nr.		IC <sub>50</sub> in μmol/l	IC <sub>50</sub> in μmol/l MCF-7 MDA-MB- 231	IC <sub>50</sub> in μmol/l U2OS
Acetylierung von 26		2,8 ± 0,3	3,6 ± 0,2	3,1 ± 0,5
	<b>32</b>			

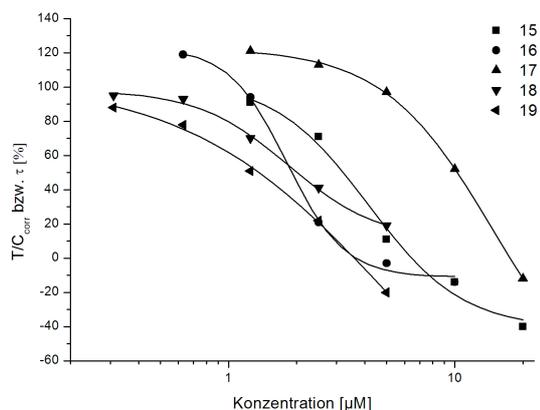
**Tab. 12:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **13-32** in μmol/l an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

Der Ringschluss zum cyclischen Keton (**13**) führt zu keiner wesentlichen Abnahme der Zytotoxizität, verglichen mit dem Ethanon **1**. Das Strukturisomer **14** jedoch zeigt eine beachtlich geringere Hemmung der Zellproliferation mit IC<sub>50</sub>-Werten von 5-7 μmol/l (**Tab. 12**). Betrachtet man allgemein den Einfluss der Strukturmodifikation im Bereich der Aminkomponente auf die Hemmung der Zellproliferation, so scheint die Ethanongruppe, sowie ihre Stellung in Verbindung **1** für die ausgeprägte Zytotoxizität von Bedeutung zu sein. Auch der Ester **20** mit seinem doppelgebundenen Sauerstoff weist eine zu **1** vergleichbare Zytotoxizität auf. Hingegen kommt es bei der Säure **21** zu einer beachtlichen Abnahme bis hin zum Verlust der Zytotoxizität. Man könnte vermuten, dass infolge der Deprotonierung und Delokalisierung im Carboxylatanion der doppelgebundene Sauerstoff nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht.



**Abb. 54:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1**, **13**, **14**, **20** und **21** an MCF-7 Zellen

Im Folgenden sollen die Verbindungen **15-19** näher betrachtet werden. Hier kommt es zu einer Abnahme der Zytotoxizität in der Reihenfolge **19**, **16**, **15** und **17**. Während Verbindung **19** mit dem Cyanomethylrest und der primäre Alkohol **16** vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte von 1-2  $\mu\text{mol/l}$  aufweisen, zeigt der sekundäre Alkohol **15** eine geringere Zytotoxizität. Bei Verbindung **17** mit der terminalen Ethylgruppe kommt es zu einer ausgeprägten Abnahme der Zytotoxizität mit  $IC_{50}$ -Werten von 10-15  $\mu\text{mol/l}$  (**Tab. 12**). Interessant ist, dass Verbindung **18**, die sich von **17** nur durch das Fehlen des Broms unterscheidet, eine wesentlich stärkere Zytotoxizität als **17** aufweist ( $IC_{50}$ -Werte zwischen 1 und 2  $\mu\text{mol/l}$ ), s. **Abb. 55**.

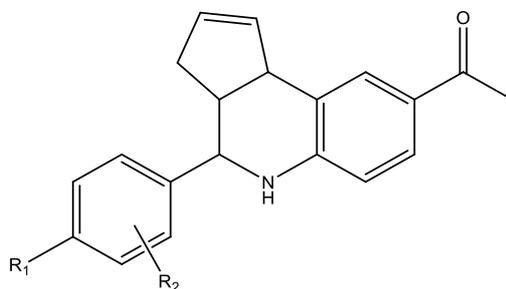


**Abb. 55:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **15-19** an MCF-7 Zellen

Bei den Verbindungen **22-24** nimmt die Hemmung der Zellproliferation von der Methoxy- (**22**) über die Hydroxyverbindung (**23**) bis zur Verbindung **24**, dem selektiven GPR30 Antagonisten G15, mit freier p-Position, ab (**Tab. 12**).

Verändert man die Stellung der Ethanongruppe in Verbindung **1** von Position 8 auf 9 (**25**), verringert sich die Zytotoxizität, wie oben bereits erwähnt. Die  $IC_{50}$ -Werte steigen von 0,4-0,5  $\mu\text{mol/l}$  auf 2-4  $\mu\text{mol/l}$  an. Ob statt der Ethanongruppe ein primärer Alkohol (**26/27**), ein Trifluoressigester- (**28/29**) oder ein Essigsäureesterrest (**30/31**) an Position 9 sitzt, hat keinen weiteren Einfluss auf die Zytotoxizität. Das gleiche gilt, wenn der entsprechende Rest an Position 7 hängt (**Tab. 12**).

#### 4.1.3.4 Zytotoxizität der Verbindungen in Anlehnung an Estron

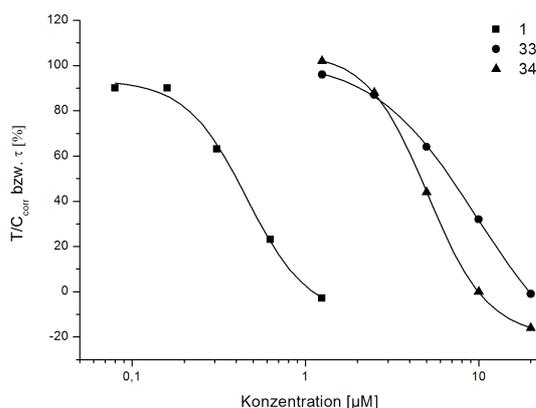


**33-40**

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nr.	IC <sub>50</sub> in µmol/l		
			MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
OCH <sub>3</sub>	H	<b>33</b>	7,0 ± 1,3	10,3 ± 0,5	10,8 ± 3,1
OH	H	<b>34</b>	4,7 ± 0,8	6,8 ± 0,2	5,8 ± 0,6
OCH <sub>3</sub>	2-F	<b>35</b>	8,9 ± 0,6	15,2 ± 1,3	15,1 ± 2,8
OCH <sub>3</sub>	2-F, 6-F	<b>36</b>	10,2 ± 2,1	15,6 ± 1,8	13,4 ± 1,7
OCH <sub>3</sub>	2-Cl	<b>37</b>	8,7 ± 0,04	11,6 ± 0,3	9,7 ± 1,4
OCH <sub>3</sub>	2-Cl, 6-Cl	<b>38</b>	8,4 ± 0,6	10,5 ± 1,5	9,5 ± 0,5
OH	2-F	<b>39</b>	9,4 ± 0,5	7,8 ± 0,04	7,2 ± 0,6
OH	2-Cl	<b>40</b>	8,4 ± 1	11,5 ± 1,3	11,7 ± 3,5

**Tab. 13:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **33-40** in µmol/l an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

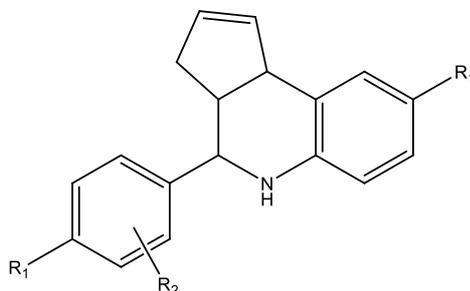
Ersetzt man den Brompiperonylrest in Verbindung **1** durch einen p-Methoxy- oder p-Hydroxyphenylrest, so verringert sich die Zytotoxizität auf etwa ein zehntel bis ein zwanzigstel (**34**, **33**). **Abb. 56** zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **33** und **34** im Vergleich zu **1** exemplarisch für MCF-7 Zellen.



**Abb. 56:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **1**, **33** und **34** an MCF-7 Zellen

Durch die Einführung von Fluor- oder Chlorsubstituenten kommt es zu einer geringfügigen Abnahme der zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu den entsprechenden halogenfreien Methoxy- oder Hydroxyverbindungen (**Tab. 13**). Keinen Unterschied macht es, ob ein oder zwei Halogensubstituenten eingeführt werden. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen zwischen 8 und 16  $\mu\text{mol/l}$ . Im Falle der Chlorverbindungen zeigt sich zwischen Hydroxy- und Methoxyverbindung kein Unterschied in der Zytotoxizität. Hingegen weisen sonst die Hydroxyverbindungen eine geringfügig stärkere Zytotoxizität auf als ihre Methoxyvorläufer. **34** ist toxischer als **33** und **39** ist toxischer als **35** (**Tab. 13**).

#### 4.1.3.5 Zytotoxizität der Verbindungen in Anlehnung an Estradiol



**41-50**

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nr.	IC <sub>50</sub> in µmol/l		
			MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
OCH <sub>3</sub>	H	<b>41</b>	14,1 ± 2,5	13,7 ± 1,3	11 ± 1
OH	H	<b>42</b>	> 20	> 20	13 ± 0,08
OCH <sub>3</sub>	2-F	<b>43</b>	14,5 ± 0,4	> 20	> 20
OCH <sub>3</sub>	2-F, 6-F	<b>44</b>	> 20	> 20	> 20
OCH <sub>3</sub>	2-Cl	<b>45</b>	9,5 ± 0,4	> 20	> 20
OCH <sub>3</sub>	2-Cl, 6-Cl	<b>46</b>	9,9 ± 4,4	> 20	19,3 ± 3,3
OH	2-F	<b>47</b>	17,5 ± 2,1	> 20	> 20
OH	2-F, 6-F	<b>48</b>	12,2 ± 1,1	18,2 ± 0,4	13,3 ± 1,6
OH	2-Cl	<b>49</b>	9,7 ± 0,5	17,3 ± 0,6	12,9 ± 1,5
OH	2-Cl, 6-Cl	<b>50</b>	7,1 ± 1,1	4,5 ± 0,3	8,6 ± 0,6

**Tab. 14:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **41-50** in µmol/l an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

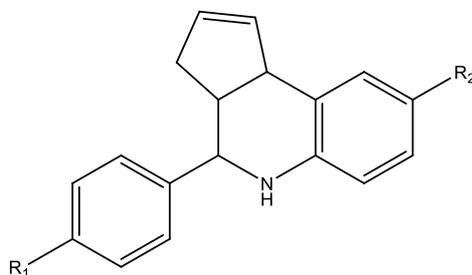
Die Verbindungen **41-50** zeigen im Vergleich zur Leitstruktur G1 (**1**) eine stark verminderte Hemmung der Zellproliferation und z.T. auch gar keine. Interessant ist, dass die Einführung von Halogensubstituenten im Falle der Methoxyverbindungen zu einer selektiven Zytotoxizität gegenüber den MCF-7 Zellen führt. Eine Ausnahme ist die Difluorverbindung **44**, die an keiner der Zelllinien zytotoxische Effekte aufweist. Ihre Hydroxyverbindung **48** hingegen zeigt an allen drei Zelllinien Zytotoxizität. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen zwischen 12 und 18  $\mu\text{mol/l}$  (**Tab. 14**).

Bei den Monofluorverbindungen zeigt die Hydroxyverbindung **47** eine im Vergleich zu der Methoxyverbindung (**43**) geringere Zytotoxizität an MCF-7 Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 17,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Bei den chloresubstituierten Methoxyverbindungen (**45** und **46**) wird beim Übergang zu den Hydroxyderivaten (**49** und **50**) die Selektivität aufgehoben. **49** und **50** zeigen an allen drei Zelllinien zytotoxische Eigenschaften, wobei die Dichlorhydroxyverbindung (**50**) die stärkeren aufweist. Hier liegen die  $IC_{50}$ -Werte zwischen 5 und 9  $\mu\text{mol/l}$  (**Tab. 14**).

#### 4.1.3.6 Einfluss der Amin- und Aldehydkomponente

Im Hinblick auf die Verbindungen, die in Anlehnung an Estradiol synthetisiert wurden, sollte jetzt auch der Einfluss anderer Heteroatome in den terminalen funktionellen Gruppen untersucht werden. Verbindung **51** besitzt statt der beiden endständigen Methoxygruppen (**41**) eine Methoxygruppe und einen Thiomethylrest. Bei Verbindung **54** ist im Vergleich zu **42** eine phenolische OH-Gruppe durch eine NH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt. Die direkten Vorstufen **52** und **53** wurden ebenfalls auf ihr zytotoxisches Verhalten untersucht. Die IC<sub>50</sub>-Werte sind der **Tab. 15** zu entnehmen.



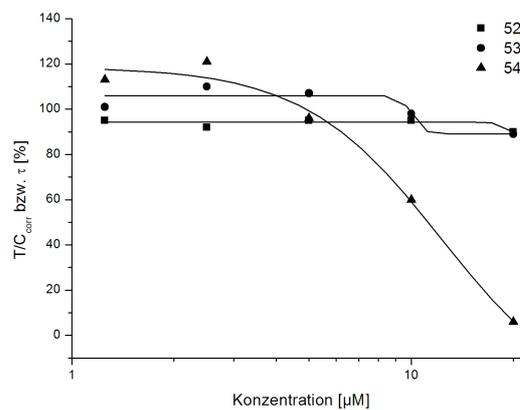
**51-54**

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nr.	IC <sub>50</sub> in µmol/l	IC <sub>50</sub> in µmol/l	IC <sub>50</sub> in µmol/l
			MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
SCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>51</b>	8,8 ± 1,8	2,6 ± 0,3	4,7 ± 0,6
NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>52</b>	> 20	> 20	> 20
NH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>53</b>	> 20	16,1 ± 1,6	17,2 ± 1,2
NH <sub>2</sub>	OH	<b>54</b>	9,3 ± 0,6	> 20	> 20

**Tab. 15:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **51-54** in µmol/l an den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

Verbindung **51** mit dem Thiomethylrest zeigt im Vergleich zu **41** (Methoxyrest), s. **Tab. 14**, eine stärkere Zytotoxizität mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 3 und 9 µmol/l für die verschiedenen Zelllinien. Dennoch ist die Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zu G1 (**1**) stark vermindert.

Betrachtet man die Verbindungen **52-54**, so ist es interessant, dass Verbindung **54** eine selektive Zytotoxizität an MCF-7 aufweist, während die beiden Vorstufen **52** und **53** an allen Zelllinien wenig bis gar keine zytotoxischen Effekte besitzen, s. **Abb. 57**.



**Abb. 57:** Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen **52**, **53** und **54** an MCF-7 Zellen

#### 4.1.3.7 Zytotoxizität der dimeren Verbindung

Die dimere Verbindung **55** (**Abb. 11**) zeigt an keiner der getesteten Zelllinien zytotoxische Eigenschaften. Dieses Verhalten könnte aber auch auf die schlechte Löslichkeit dieser Verbindung zurückzuführen sein.

## 4.2 Estrogenitätsuntersuchungen

### 4.2.1 Das verwendete Testsystem

Der Luciferase-Assay zur Bestimmung der Estrogenität und Antiestrogenität erfolgte nach einer im Arbeitskreis um Prof. Gust etablierten, modifizierten Methode (Schäfer, Wellner et al. 2011). Bei dem Luciferase-Assay handelt es sich um einen *in vitro* Transaktivierungsassay auf zellulärer Basis. Solche zellbasierten Tests kommen den *in vivo* Bedingungen näher als Konkurrenzexperimente am isolierten Rezeptor, da auch endokrine Eigenschaften erfasst werden können. Für den Transaktivierungsassay werden U2OS Zellen, die endogen keine ER enthalten, transient mit einem Rezeptor- und einem Reporterplasmid transfiziert. Das Rezeptorplasmid enthält jeweils das Gen für einen ER-Subtyp und das Reporter-gen, isoliert aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*), kodiert für das Enzym Luciferase. Bindet eine Substanz an den ER, so kommt es zur Dimerisierung und Bindung der Ligand/ER-Dimere an "estrogen responsive elements" (EREs), was zu deren Aktivierung führt. Daraus wiederum resultiert die Bildung von Luciferase, deren Aktivität mit einem entsprechenden Substrat (Luciferin) quantifiziert wird. Die gebildete Enzymmenge korreliert mit der estrogenen Potenz der Untersuchungssubstanz (Biberger and von Angerer 1998).

Das Substrat Luciferin wird durch die gebildete Luciferase unter Emission von Fluoreszenzlicht zu Oxyluciferin gespalten, s. **Abb. 58** (de Wet, Wood et al. 1987).



**Abb. 58:** Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert durch Luciferase nach de Wet (de Wet, Wood et al. 1987)

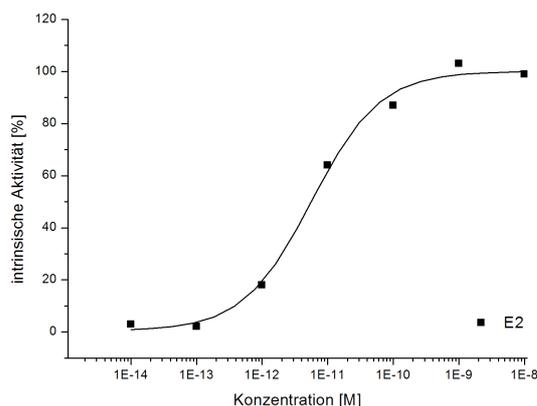
Unmittelbar nach Zugabe des Luciferins setzt die Lumineszenz ein und klingt innerhalb von wenigen Minuten wieder ab (de Wet, Wood et al. 1987). Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts erstreckt sich von 490 bis 630 nm. Die

Messung erfolgt mit einem Luminometer über einen Zeitraum von 10 s bei einem Wellenlängenbereich von 390 bis 520 nm in RLU (relative light units).

#### 4.2.2 Testergebnisse

Mit Hilfe des Transaktivierungsassays werden Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt, aus denen der Estrogenitätswert  $EC_{50}$  als Wendepunkt einer sigmoiden Kurve abgelesen werden kann.  $EC_{50}$  ist die Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt erzielt wird. Für die Testung auf agonistische Eigenschaften werden die Zellen, nach erfolgter Transfektion, mit verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  M bzw.  $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M) der Substanz inkubiert und anschließend die substanzbedingte Luciferaseexpression bestimmt. Zur Untersuchung der antiestrogenen Eigenschaften werden die Zellen, ebenfalls nach erfolgter Transfektion, mit verschiedenen Konzentrationen (s.o.) der Verbindung und einer konstanten Konzentration an E2 inkubiert. Hier wird die substanzbedingte reduzierte Luciferaseexpression bestimmt.

Als Negativkontrolle werden die Zellen mit Medium, das 0,1 % Lösungsmittel (DMSO) enthält, inkubiert. Als Positivkontrolle wird E2 in den Konzentrationen  $10^{-8}$ - $10^{-14}$  M eingesetzt. Bei der ermittelten sigmoiden Kurve des E2 wird der Wert des Plateaus als 100 % Aktivierung gesetzt. Die intrinsische Aktivität (IA) der getesteten Verbindungen wird in Bezug auf diesen E2-Wert ermittelt.

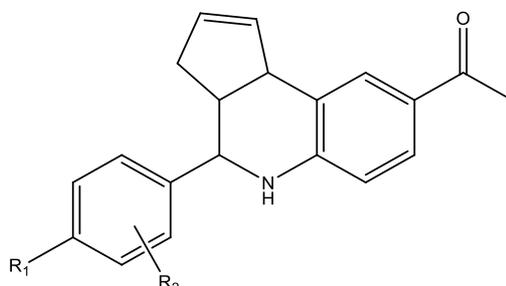


**Abb. 59:** Beispiel einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve von E2

Der  $EC_{50}$ -Wert kann, wie bereits erwähnt, als Wendepunkt der Kurve berechnet werden. Er liegt für E2 im Falle der Aktivierung von  $ER\alpha$  bei 0,004 nmol/l und für  $ER\beta$  bei 0,01 nmol/l.

Bei den getesteten Verbindungen konnte in den meisten Fällen kein Plateau erreicht und somit keine sigmoidale Kurve zur Berechnung des Wendepunkts erhalten werden. Der  $EC_{50}$ -Wert wurde in diesen Fällen, wenn möglich, als Konzentration abgelesen, bei der die intrinsische Aktivität 50 % beträgt. Die intrinsische Aktivität ist im Folgenden bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l angegeben.

#### 4.2.2.1 Verbindungen in Anlehnung an Estron



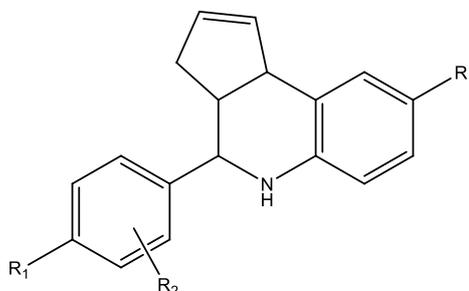
$R_1$	$R_2$	Verbin- dung	$ER\alpha$		$ER\beta$	
			$EC_{50}$ [nM]	IA [%]	$EC_{50}$ [nM]	IA [%]
$OCH_3$	H	<b>33</b>	-	-	-	-
OH	H	<b>34</b>	2700	$83 \pm 10$	1200	$106 \pm 5$
OH	2-F	<b>39</b>	-	$71 \pm 0$	-	$70 \pm 3$
OH	2-Cl	<b>40</b>	800	$88 \pm 10$	-	-

**Tab. 16:** IA der Verbindungen **33**, **34**, **39** und **40**

Während Verbindung **33** keine Estrogenität aufweist, zeigt **34** mit freier phenolischer OH-Gruppe an  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  eine Transaktivierung (**Tab. 16**). Durch Einführung eines Fluorsubstituenten (**39**) wird die estrogene Wirkung herabgesetzt, die intrinsische Aktivität liegt nur noch bei etwa 70 %. Verbindung **40** zeigt eine

selektive Estrogenität an ER $\alpha$  mit einer intrinsischen Aktivität von 88 % und einer EC<sub>50</sub> von 800 nM.

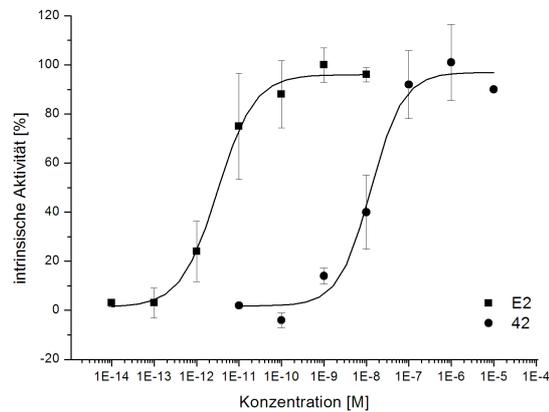
#### 4.2.2.2 Verbindungen in Anlehnung an Estradiol



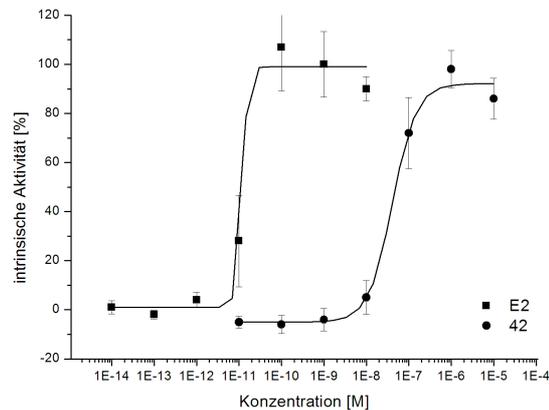
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Verbin- dung	ER $\alpha$		ER $\beta$	
			EC <sub>50</sub> [nM]	IA [%]	EC <sub>50</sub> [nM]	IA [%]
OCH <sub>3</sub>	H	<b>41</b>	-	-	-	-
OH	H	<b>42</b>	13	90 ± 0,5	49	86 ± 8,4
OH	2-F	<b>47</b>	1200	108 ± 14	110	84 ± 11
OH	2-F, 6-F	<b>48</b>	150	83 ± 7	92	97 ± 11
OH	2-Cl	<b>49</b>	-	45 ± 5	180	72 ± 7
OH	2-Cl, 6-Cl	<b>50</b>	101	62 ± 11	35	58 ± 9

**Tab. 17:** EC<sub>50</sub>-Werte und IA der Verbindungen **41**, **42**, **47**, **48**, **49** und **50**

Auch bei den Verbindungen in Anlehnung an Estradiol zeigt die Vorstufe **41** keine estrogenere Wirkung. Hingegen weist Verbindung **42** mit den freien phenolischen OH-Gruppen, mit einer intrinsischen Aktivität von etwa 90 %, Estrogenität auf. Die EC<sub>50</sub> liegt für ER $\alpha$  bei 13 nmol/l und für ER $\beta$  bei 49 nmol/l. Es besteht hier also ein Vorzug für ER $\alpha$  (**Abb. 60** und **Abb. 61**).



**Abb. 60:** Konzentrations-Wirkungs-Kurven von E2 und **42** an ER $\alpha$

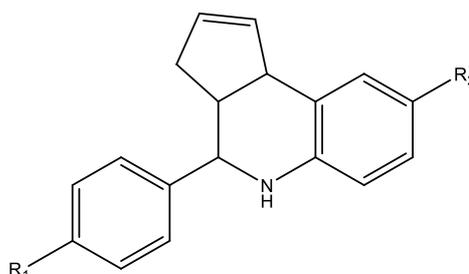


**Abb. 61:** Konzentrations-Wirkungs-Kurven von E2 und **42** an ER $\beta$

Die Einführung von einem bzw. zwei Fluorsubstituenten (**47** bzw. **48**) führt zu keiner wesentlichen Veränderung der intrinsischen Aktivität. Die Transaktivierung liegt zwischen 80 und 100 % (**Tab. 17**). Dennoch ist ersichtlich, dass es zu einer starken Abnahme der estrogenen Potenz kommt, die  $EC_{50}$  liegt mit Werten bei 1200 nmol/l (Monofluorverbindung) und 150 nmol/l (Difluorverbindung) für ER $\alpha$  deutlich höher. Auch die Einführung von Chlorsubstituenten (**49** und **50**) führt zu einer Abnahme der estrogenen Potenz an ER $\alpha$  mit intrinsischen Aktivitäten zwischen 45 und 60 %. Die Dichlorverbindung (**50**) zeigt aber an ER $\beta$  eine minimal höhere Estrogenität als **42** mit einer  $EC_{50}$  von 35 nmol/l. Die intrinsische Aktivität bei  $10^{-5}$  mol/l liegt hier nur bei 58 %, während die bei einer Konzentration von

$10^{-6}$  mol/l über 90 % beträgt. Hierfür ist vermutlich die starke Zytotoxizität verantwortlich.

#### 4.2.2.3 Verbindungen mit Variation der Aldehyd- und Aminkomponente

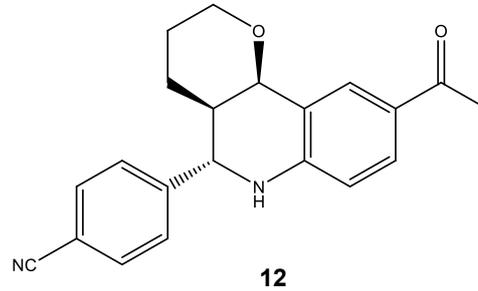
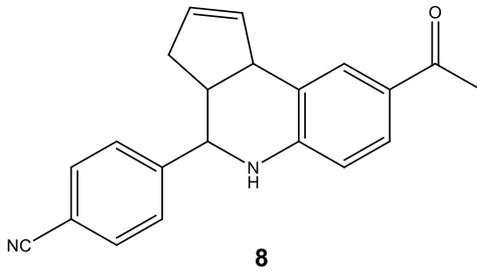


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Verbin- dung	ER $\alpha$		ER $\beta$	
			EC <sub>50</sub> [nM]	IA [%]	EC <sub>50</sub> [nM]	IA [%]
NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>52</b>	-	-	-	-
NH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>53</b>	-	68 ± 3,5	-	43 ± 3,8
NH <sub>2</sub>	OH	<b>54</b>	2200	95 ± 1,2	1800	106 ± 9,8

**Tab. 18:** IA der Verbindungen **52**, **53** und **54**

Die Vorstufe **52** mit einer Nitro- und einer Methoxygruppe als terminale Gruppen weist keine estrogenen Eigenschaften auf. Verbindung **53** mit dem primären aromatischen Amin zeigt eine relativ geringe Estrogenität mit einer Transaktivierung von  $68 \pm 3,5$  % an ER $\alpha$ . Verbindung **54** mit OH und NH<sub>2</sub> als polare terminale Gruppen hingegen zeigt ausgeprägte estrogenen Eigenschaften mit einer intrinsischen Aktivität von  $95 \pm 1,2$  % an ER $\alpha$  und  $106 \pm 9,8$  % an ER $\beta$ . Die EC<sub>50</sub>-Werte liegen bei 1800 nM für ER $\beta$  und bei 2200 nM für ER $\alpha$ .

#### 4.2.2.4 Verbindungen mit selektiver Zytotoxizität an MCF-7 Zellen



Wenige Verbindungen zeigten bei den zytotoxischen Untersuchungen Selektivität gegenüber MCF-7 Zellen. Zu diesen gehören die Verbindungen **8** und **12**. Aufgrund dieses Verhaltens sollten sie beispielhaft auf ihre estrogenen Eigenschaften untersucht werden, um zu klären, ob die Zytotoxizität mit der Estrogenität im Zusammenhang steht. Keine der beiden Verbindungen zeigte estrogenen Wirkung. In diesem Fall kann die Zytotoxizität nicht mit einer Interaktion der Verbindungen mit den intrazellulären Estrogenrezeptoren erklärt werden.

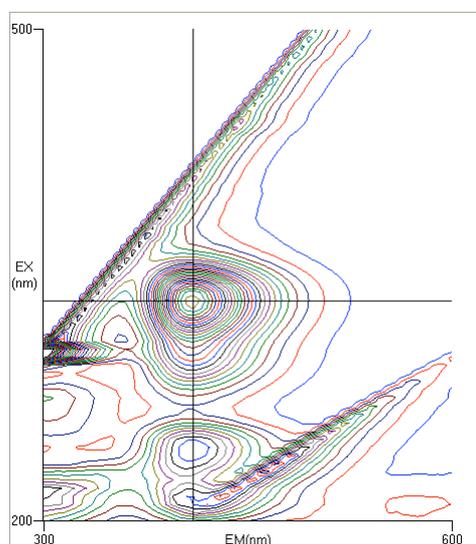
#### 4.2.2.5 Antiestrogenität

Keine der auf Estrogenität und Antiestrogenität untersuchten Verbindungen zeigte antiestrogenes Verhalten.

## 5 Fluoreszenzuntersuchungen

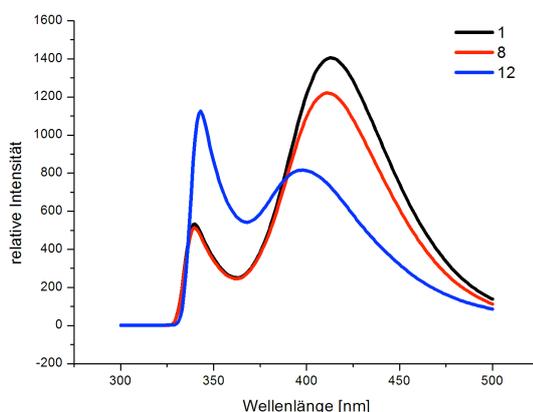
Mit dem Hintergrund, die Zellaufnahme der synthetisierten Verbindungen eventuell mittels Fluoreszenz nachzuweisen, wurden von einigen Substanzen Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dazu wurden von den entsprechenden Verbindungen Verdünnungsreihen in Methanol hergestellt ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$  mol/l) und diese anschließend fluorimetrisch vermessen. Zunächst wurden 3D-Spektren aufgenommen um die Anregungswellenlängen der Emissionsmaxima zu bestimmen.

**Abb. 62** zeigt exemplarisch das 3D-Spektrum der Verbindung **1** (G1). Bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm ist ein Emissionsmaximum bei 410 nm zu erkennen.



**Abb. 62:** 3D-Fluoreszenzspektrum der Verbindung **1** in Methanol bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M, EX: Exzitationswellenlänge in nm, EM: Emissionswellenlänge in nm

Für die Aufnahme des 2D-Fluoreszenzspektrums wurde in diesem Fall bei 334 nm eingestrahlt.



**Abb. 63:** Emissionsspektrum der Verbindungen **1** (10  $\mu$ M), **8** (10  $\mu$ M) und **12** (10  $\mu$ M) in Methanol

Die Exzitations- und Emissionswellenlängen sind der **Tab. 19** zu entnehmen.

Verbindung	Konzentration [ $\mu$ M]	Exzitation [nm]	Emission [nm]	relative Intensität
<b>1</b>	10	334	410	1379
<b>8</b>	10	334	407	1193
<b>12</b>	10	337	393	809

**Tab. 19:** Exzitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen **1**, **8** und **12** in Methanol

Die Emissionen der Verbindungen liegen zwischen 393 und 410 nm. Für die Untersuchung der Zellaufnahme wäre es wichtig, dass die Emissionsmaxima deutlich im länger welligen Bereich (>400 nm) liegen, damit eine bessere Abgrenzung gegen die Hintergrundfluoreszenz erreicht wird. Die Emission der Zellen und Proteine mit Tyrosin- und Tryptophanresten liegt zwar unter 400 nm (Tyrosin:  $\lambda_{EM} = 303$  nm, Tryptophan:  $\lambda_{EM} = 348$  nm), jedoch kann es durch Bandenverbreiterung zu Überlagerungen kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Zellaufnahme vorgenommen, da die Lage der Emissionsmaxima um 400 nm problematisch ist. Außerdem stellt die ausgeprägte Zytotoxizität der synthetisier-

ten Verbindungen ein Hindernis dar, da während der Untersuchung die Zahl der lebenden Zellen zu stark abnimmt.



## 6 Diskussion und Ausblick

Mit der Entdeckung des ersten GPR30 spezifischen Agonisten G1 wurde ein neuer Meilenstein in der Geschichte der Tumorforschung gesetzt.

Weitere Verbindungen zu entwickeln, die ebenfalls selektiv als Agonist oder Antagonist an den GPR30 binden, ist von großem Interesse für die zukünftige Forschung auf dem Gebiet von Tumorentstehung und –progression, sowie der Diagnose und Therapie auch anderer hormonell bedingter Erkrankungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 54 Verbindungen synthetisiert, die sich strukturell von dem ersten selektiven GPR30 Agonisten G1 ableiten. Das Grundgerüst des G1 ist ein Tetrahydrocyclopentachinolin. Die Strukturvarianten wurden, analog zu G1, in einer Dreikomponenten-Aza-Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf synthetisiert. Bei dieser Synthese entsteht entsprechend der Alderschen-endo-Regel (s. Einleitung unter **1.1.2.3.2**) hauptsächlich das entsprechende thermodynamisch instabilere endo-Addukt.

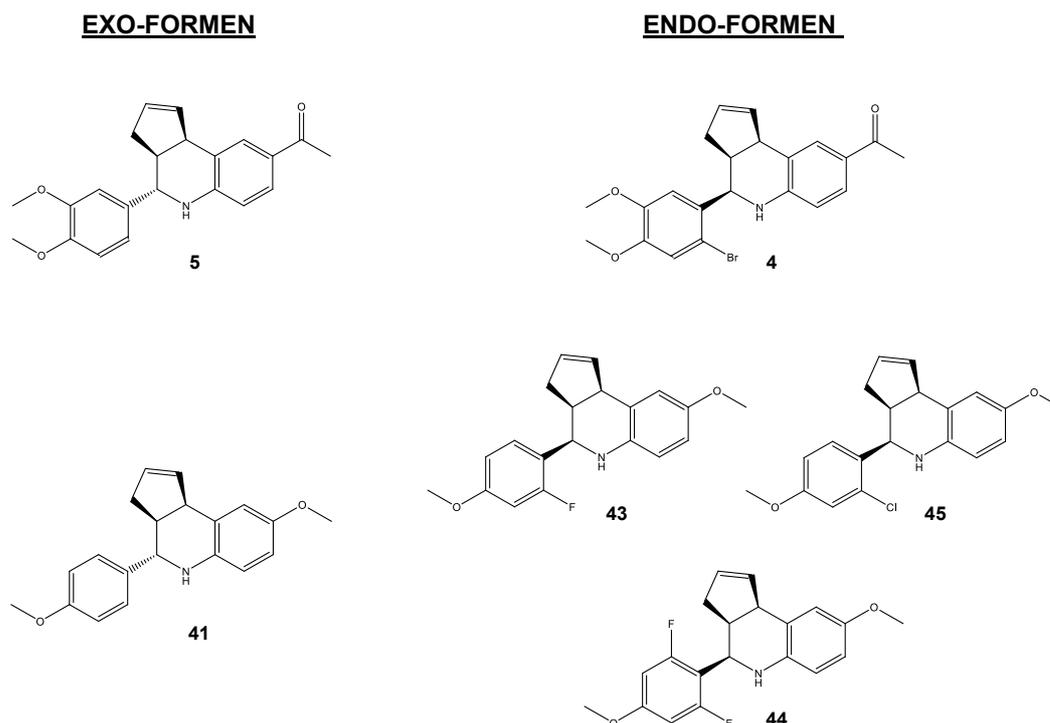
### 6.1 Endo-exo Selektivität

Interessant war, dass in einigen Fällen ein Gemisch aus etwa gleichen Teilen der endo- und exo-Form entstand und teilweise sogar ausschließlich die reine exo-Form isoliert wurde. Es konnte in diesen Fällen zunächst kein Zusammenhang zwischen der angewendeten Synthesemethode und der Entstehung der exo-Form gefunden werden. Es stellte sich die Frage, ob die Entstehung der exo-Form möglicherweise strukturellen Ursprungs ist.

Bei dem Einsatz von Dihydropyran als Dienophil entstand überwiegend die exo-Verbindung. Die Bildung des thermodynamisch stabileren Produkts lässt vermuten, dass in diesem Fall anstatt der konzertiert verlaufenden Diels-Alder-Reaktion ein stufenweiser Cyclisierungsprozess abläuft. Ähnliches wurde bei der Verwendung von Furan als Dienophil von Burai et al. berichtet (Burai, Ramesh et al. 2010). Die Autoren konnten ein Abfangprodukt der Zwischenstufe isolieren.

In einem Fall konnten endo und exo Diastereomer (**11** und **12**) getrennt kristallin erhalten werden und durch Röntgenstrukturanalyse und NOE Differenzspektroskopie strukturell eindeutig zugeordnet werden.

Im Falle der Verbindungen **5** und **41** (**Abb. 64**), bei denen ausschließlich die exo-Formen isoliert werden konnten, sind am 4-Phenylring keine orthoständigen Substituenten mit –i-Effekt vorhanden. Die übrigen vier Verbindungen der **Abb. 64** enthalten am 4-Phenylring orthoständig entweder Brom, Chlor, Fluor oder Difluor als Substituenten. Sie alle bilden unter den gleichen Reaktionsbedingungen nur die endo-Produkte.

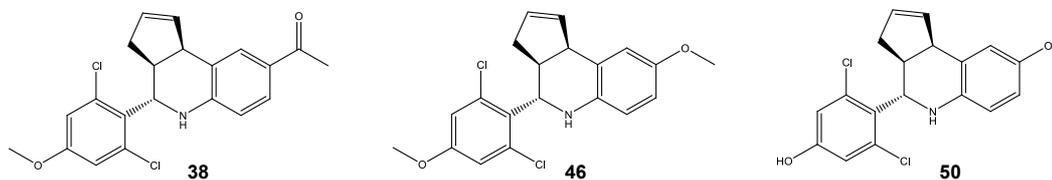


**Abb. 64:** Exo-Formen: jeweils das (3a*S*,4*S*,9*bR*)-Enantiomer abgebildet, endo-Formen: jeweils das (3a*S*,4*R*,9*bR*)-Enantiomer abgebildet

Als Erklärung für die so eindeutig zu den endo- bzw. exo-Produkten verlaufenden Reaktionen kann man den wohl geringen Energieunterschied der Übergangszustände zwischen dem kinetisch und dem thermodynamisch kontrollierten Reaktionsverlauf annehmen. Dies zeigt den deutlichen Einfluss schon eines einzelnen Substituenten auf die energetische Lage des Übergangszustandes.

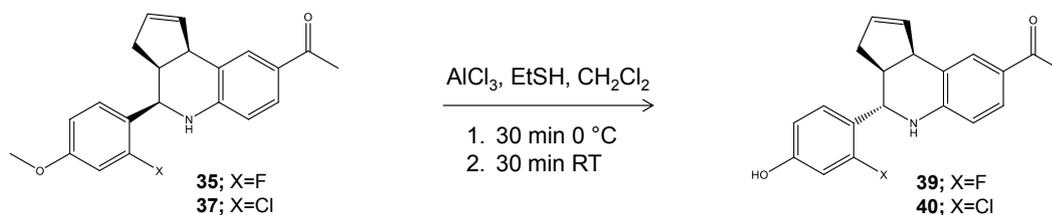
Eine Überraschung boten in diesem Zusammenhang die Verbindungen **38**, **46** und **50** (**Abb. 65**). Sie tragen am 4-Phenylring zwei orthoständige Chlorsubstituenten. Bei der Synthese dieser Verbindungen wurden ausschließlich die exo-Isomere isoliert. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in diesem

Fall die sterische Behinderung des endo-Übergangszustandes infolge der beiden relativ großen Chlorsubstituenten sein.



**Abb. 65:** Exo-Formen der Verbindungen **38**, **46** und **50**: jeweils das (3a*S*,4*S*,9*bR*)-Enantiomer abgebildet

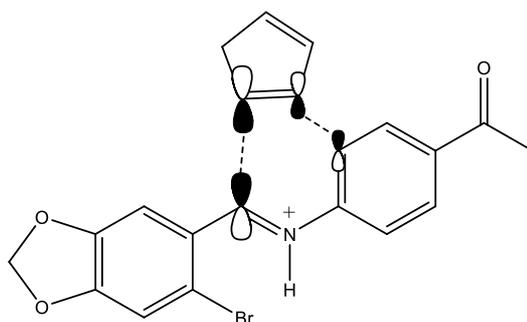
Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die endo-exo-Isomerisierung unter milden Bedingungen, die bei der Etherspaltung mit Ethanthiol und  $\text{AlCl}_3$  bei den Verbindungen **35** und **37** eintrat (**Abb. 66**). Hier stellte sich die Frage, ob das  $\text{AlCl}_3$  allein diese Epimerisierung auslösen kann, möglicherweise durch den Angriff des  $\text{AlCl}_3$  am basischen Stickstoff. Eine Testreaktion ohne Ethanthiol, nur mit  $\text{AlCl}_3$  führte ebenfalls zu einer Epimerisierung, was die Beteiligung von  $\text{AlCl}_3$  belegt. Der genaue Mechanismus, der hier zur endo-exo-Isomerisierung führt, bleibt jedoch noch ungeklärt. Eine Retro-Diels-Alder Reaktion erscheint in diesem Fall eher unwahrscheinlich, da hierfür die Öffnung der Sigmabindung zwischen dem anelierten Cyclopentenring und dem Aromaten nötig wäre.



**Abb. 66:** Epimerisierung bei der Etherspaltung mit Ethanthiol und  $\text{AlCl}_3$ , jeweils nur ein Enantiomer abgebildet

## 6.2 Regioselektivität des Angriffs von Cyclopentadien an das Azadien

Zu klären war noch die Frage, warum das Cyclopentadien ausschließlich in eine Richtung orientiert die Cycloaddition eingeht. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppe weist in allen Fällen zur Seite des 4-Phenylsubstituenten. Betrachtet man Größe und Vorzeichen der in Wechselwirkung tretenden Atomorbitale, so liefert die Abschätzung der Orbitalkoeffizienten eine Erklärung für die Regioselektivität. Im vorliegenden Fall liegt ein Azadien vor, dessen Position 2 als Akzeptor fungiert, was am Nachbar-C-atom zu einer Vergrößerung des Orbitalkoeffizienten führt und insgesamt die Energie des LUMO erniedrigt (Fleming 1988). Das hier als Dienophil reagierende Cyclopentadien weist an Position 1 gegenüber Position 2 den größeren Koeffizienten auf, sodass die Wechselwirkung mit Position 1 des Azadiens begünstigt ist. Das HOMO der reagierenden Doppelbindung ist durch die konjugative Wechselwirkung mit der zweiten Doppelbindung energetisch erhöht. Somit ist in diesem Falle die Reaktion zwischen dem LUMO des Diens und dem HOMO des Dienophils der energetisch günstigste Weg. Wie in der folgenden Abbildung veranschaulicht, reagieren die Atomorbitale mit annähernd gleichgroßen Koeffizienten und gleichen Vorzeichen miteinander (s. auch Einleitung 1.1.2.2).

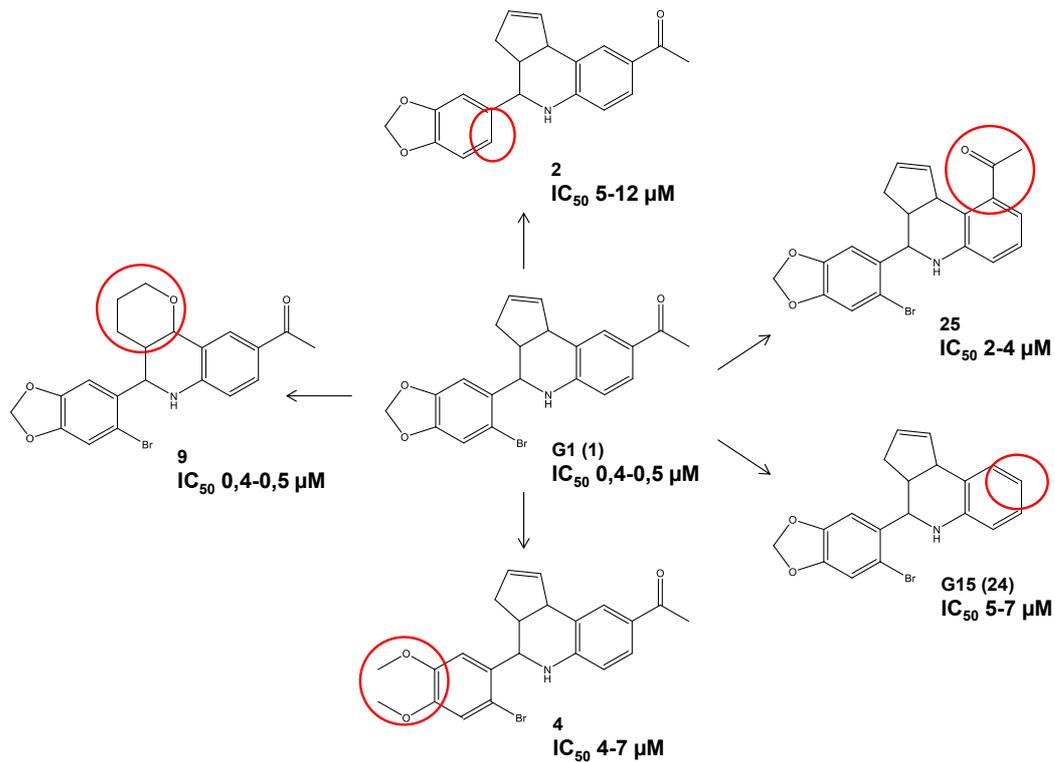


**Abb. 67:** Orbitalwechselwirkung der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

### 6.3 Zytotoxizität

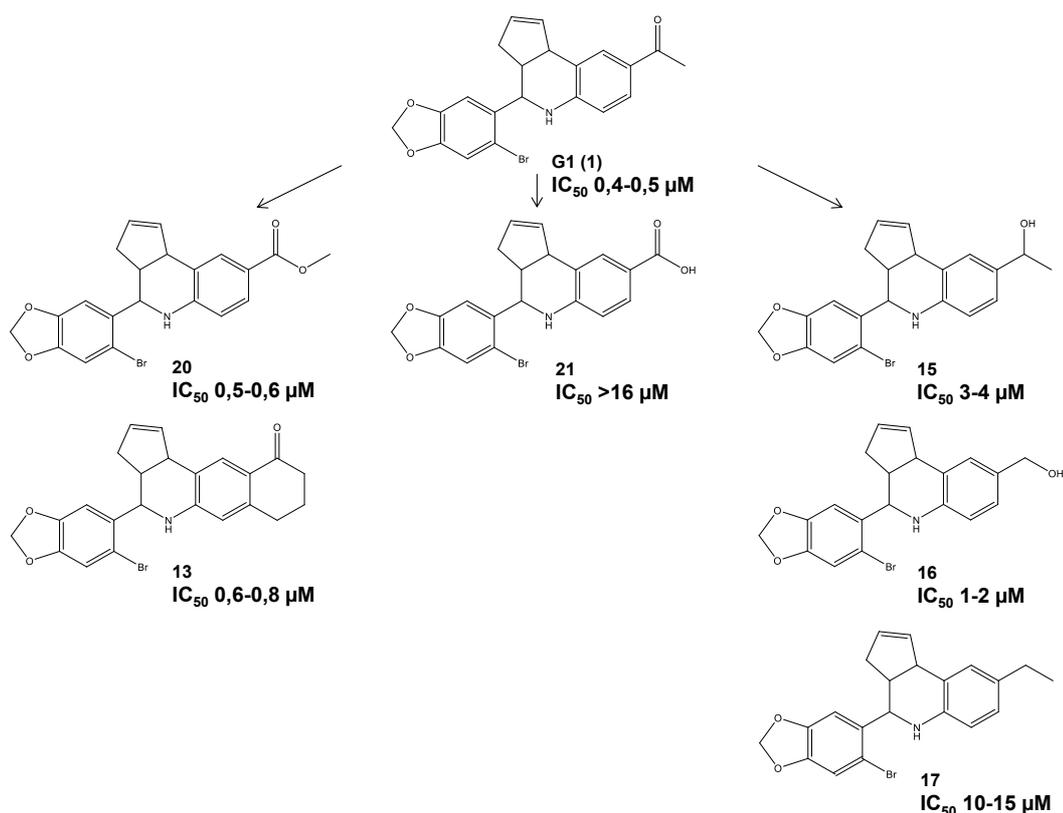
Die neuen Verbindungen, wie auch der G1, wurden auf ihr zytotoxisches Verhalten an verschiedenen Zelllinien untersucht. Sie wurden dazu sowohl an hormonabhängigen als auch hormonunabhängigen Brustkrebszellen, sowie an Osteosarkomzellen getestet. Es stellte sich heraus, dass der G1 ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften, mit  $IC_{50}$ -Werten um 0,4-0,5  $\mu\text{mol/l}$  an den unterschiedlichen Zelllinien, aufweist. Diese auffallend starke Zytotoxizität erweist sich als problematisch für weitere Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung auf zellulärer Ebene. Daher sollte nun versucht werden, die Zytotoxizität durch möglichst geringe Strukturveränderungen des Moleküls zu verringern.

Der G1 wird aus drei Molekülbausteinen, dem 6-Brompiperonal, dem 4-Aminoacetophenon und Cyclopentadien, aufgebaut. Diese drei Komponenten wurden durch andere Aldehyde, Amine oder Dienophile ersetzt. Als weiteres Dienophil wurde das Dihydropyran verwendet. Dessen Einbau führte zu keiner nennenswerten Abnahme der Zytotoxizität im Vergleich zu den entsprechenden Cyclopentenverbindungen. Betrachtet man hingegen die Aldehydkomponente, so ist ersichtlich, dass schon geringe Veränderungen, wie das Öffnen des Dioxolanringes (**4**) oder auch das Fehlen des Bromsubstituenten (**2**) zu einer Abnahme der Zytotoxizität gegenüber G1 führt (**Abb. 68**). Bei der Variation der Aminkomponente kommt es zu einer Zytotoxizitätsabnahme durch Verschiebung der Ethanongruppe von Position 8 auf 9. Der ebenfalls untersuchte Antagonist G15 (**24**), bei dem die Ethanongruppe fehlt, weist eine noch geringere Zytotoxizität auf.



**Abb. 68:** Variation der einzelnen Komponenten und ihre Auswirkung auf die Zytotoxizität

Dies zeigt, dass die Ethanongruppe und auch ihre Position für die Zytotoxizität von besonderer Bedeutung sind. Unterstützt wird dies dadurch, dass das cyclische Keton (**13**) und auch der Ester (**20**) eine mit G1 vergleichbare Zytotoxizität aufweisen. Schon die Reduktion zum sekundären Alkohol (**15**) hingegen vermindert die Zytotoxizität (**Abb. 69**). Auch der primäre Alkohol (**16**) weist geringere zytotoxische Eigenschaften als G1 auf. Bei Verbindung **17** mit der Ethylgruppe liegt die  $IC_{50}$  nur noch bei 10-15  $\mu$ M. Interessant ist, dass die Säure **21** so gut wie keine Zytotoxizität aufweist. Dass die Deprotonierung und Ladungsdelokalisation im Carboxylatanion dafür verantwortlich ist, lässt sich nur vermuten.



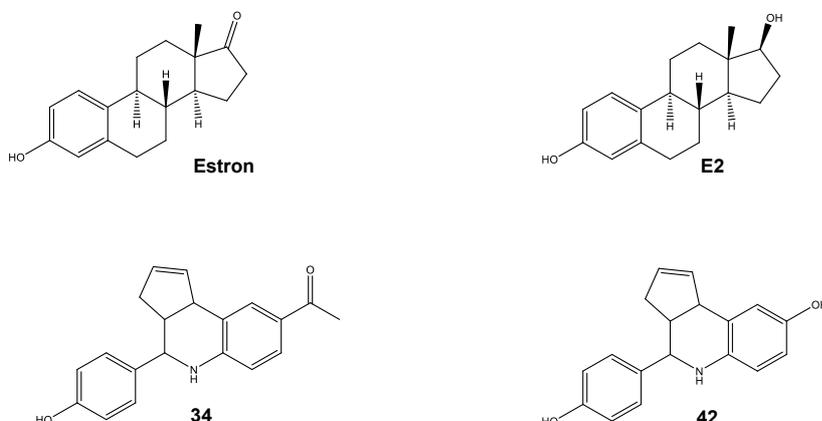
**Abb. 69:** Veränderung der Ethanongruppe und ihre Auswirkung auf die Zytotoxizität

## 6.4 Verbindungen in Anlehnung an Estron und Estradiol

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des G1 zu Estron, wurden Verbindungen sowohl in Anlehnung an Estron als auch an E2 synthetisiert.

Durch Einsatz von p-Hydroxybenzaldehyd anstelle des 6-Brompiperonals konnte Verbindung **34** erhalten werden. Die Ähnlichkeit dieser Verbindung zu Estron besteht einerseits in dem p-Hydroxyphenylrest, der an den aromatischen Ring A des Estrons mit der phenolischen OH-Gruppe erinnert, sowie einem lipophilen Grundkörper, der hydrophobe Wechselwirkungen in der Rezeptortasche eingehen kann, wie in Kapitel **3.4** beschrieben. Als weitere funktionelle Gruppe findet man in **34** ebenso wie in Estron eine Ketofunktion (**Abb. 70**). Während es sich im Estron um ein cyclisches Keton handelt, steht in **34** die Ethanongruppe an einem

aromatischen Ring. Die O-O Abstände in den beiden Verbindungen unterscheiden sich um 1,8 Å.

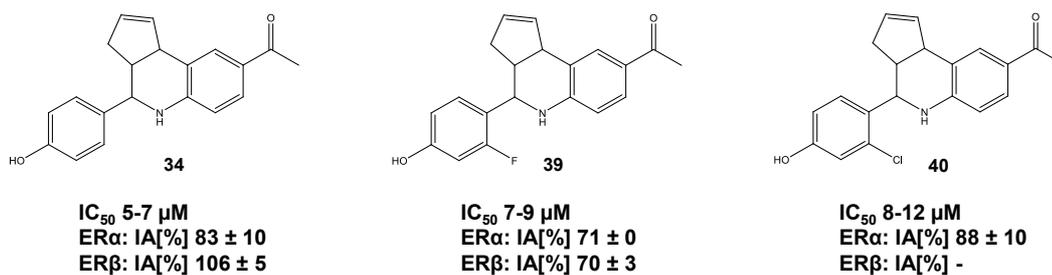


**Abb. 70:** Strukturen von Estron und Verbindung **34** sowie von E2 und Verbindung **42**

Für die Verbindung **42** wurde anstelle des 6-Brompiperonal ebenfalls p-Hydroxybenzaldehyd und statt 4-Aminoacetophenon p-Aminophenol eingesetzt. **42** enthält wie E2 zwei Hydroxygruppen und einen lipophilen Grundkörper. Die O-O Abstände unterscheiden sich in diesem Fall nur um 0,9 Å.

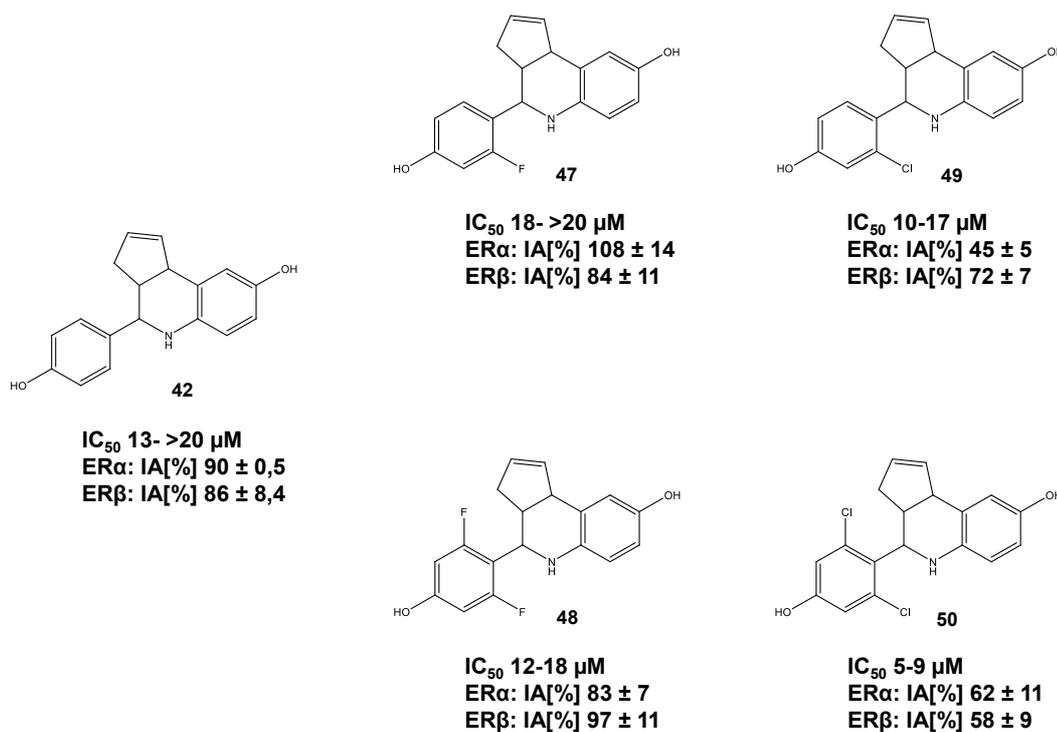
#### 6.4.1 Untersuchungen der Zytotoxizität und Estrogenität

Die Verbindungen **34** und **42** wurden sowohl auf ihre Zytotoxizität als auch auf ihre estrogenen Potenz getestet. Zusätzlich wurde der Einfluss von Fluor- und Chlorsubstituenten untersucht. **34** zeigt im Vergleich zu G1 eine viel geringere Zytotoxizität mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 5-7  $\mu\text{mol/l}$ . Durch Einführung eines Fluor- bzw. eines Chlorsubstituenten wird die antiproliferative Wirkung weiter herabgesetzt (**Abb. 71**). Die Estrogenität nimmt ebenfalls durch die Einführung von Halogensubstituenten ab. Während **34** noch eine intrinsische Aktivität von etwa 80 % an  $ER\alpha$  und etwa 100 % an  $ER\beta$  zeigt, weist **39** an beiden Rezeptoren nur noch eine von etwa 70 % auf. Durch die Einführung eines Chlorsubstituenten geht die  $ER\beta$  Aktivierung vollständig verloren. Es liegt hier eine selektive  $ER\alpha$  Affinität vor.



**Abb. 71:** Verbindungen in Anlehnung an Estron mit IC<sub>50</sub>-Werten und intrinsischer Aktivität an ERα und ERβ

Bei den Verbindungen in Anlehnung an Estradiol hat die Einführung von Fluor- substituente n kaum Einfluss auf die Zytotoxizität. Chlorsubstituenten hingegen erhöhen die Zytotoxizität. Die Estrogenität ist bei den Chlorverbindungen geringer als die der fluor- und unsubstituierten Verbindungen (**Abb. 72**).



**Abb. 72:** Verbindungen in Anlehnung an Estradiol mit IC<sub>50</sub>-Werten und intrinsischer Aktivität an ERα und ERβ

## 6.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit bleiben einige Fragen auf der chemischen wie auch auf der pharmakologischen Seite noch ungeklärt, was Anregung zu weiterer Forschung auf diesem Gebiet gibt. Zum einen könnte man versuchen die endo-exo Selektivität der Synthese mittels Temperaturverschiebung in die gewünschte Richtung zu drängen, sodass sie nicht kinetisch kontrolliert, sondern thermodynamisch kontrolliert abläuft. Im Hinblick auf die Zytotoxizität, wäre es interessant zu untersuchen, welches zytotoxische Verhalten die synthetisierten Verbindungen auf gesunde menschliche Zellen, „Nichtkrebszellen“ ausüben. Zeigt der G1 auch an gesunden Zellen diese ausgeprägte Zytotoxizität?

Ziel dieser Arbeit war, neue GPR30 Agonisten bzw. Antagonisten zu entwickeln, sie auf ihr zytotoxisches Verhalten gegenüber verschiedenen Krebszellen und auf ihre Affinität zum GPR30 zu untersuchen. Aufgrund der Tatsache, dass momentan noch kein etabliertes Testsystem zur Verfügung steht, bleibt die Aufgabe, die Bindung der synthetisierten Substanzen an den GPR30 zu untersuchen.

## 7 Zusammenfassung

Die Entdeckung des ersten selektiven GPR30 Agonisten G1 lieferte die Anregung für weitere Forschung auf dem Gebiet der Estrogene und ihrer Rezeptoren. Mit der Entwicklung neuer Verbindungen, die ebenfalls selektiv an den GPR30 binden, diesen aktivieren oder auch blockieren, wird die Grundlage geschaffen, die Rolle dieses Rezeptors in vivo besser zu verstehen, sowie seinen Einfluss auf das Tumorgeschehen weiter aufzuklären.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen zahlreiche neue Verbindungen zu synthetisieren, die sich strukturell vom G1 ableiten. Dessen Grundgerüst, ein Tetrahydrocyclopentachinolin, lässt sich in einer Dreikomponenten-Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf herstellen. Der G1 wird aus folgenden drei Molekülbausteinen synthetisiert: 6-Brompiperonal, 4-Aminoacetophenon und Cyclopentadien als Dienophil. Die durch Variation dieser drei Komponenten erhaltenen neuen Verbindungen wurden spektroskopisch und klassisch analytisch strukturell identifiziert. Anschließend erfolgte die Untersuchung ihres zytotoxischen Verhaltens im Vergleich zu G1. Getestet wurde an hormonabhängigen MCF-7- und hormonunabhängigen MDA-MB-231 Zellen, sowie an der Osteosarkomzelllinie U2OS. Es stellte sich heraus, dass der G1 an allen drei Zelllinien ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften aufweist. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung auf zellulärer Ebene könnten daher Probleme bereiten. Aufgrund dessen wurde versucht, durch möglichst geringe Strukturveränderungen des Moleküls, die Zytotoxizität zu mindern. Gelungen ist dies u.a. durch Öffnung des Dioxolanringes, sowie durch Entfernung des Bromsubstituenten im G1, als auch durch Entfernung der Ethanongruppe, was zum ersten schon bekannten selektiven GPR30 Antagonisten G15 führt. In diesen Fällen ist die Zytotoxizität schon auf ein zehntel bis ein zwanzigstel verringert.

Die Strukturähnlichkeit des G1 zu Estron führte zu der Überlegung Verbindungen sowohl in Anlehnung an Estron als auch an Estradiol zu synthetisieren. Die auf dieser Grundlage synthetisierten neuen Substanzen wurden anschließend auf ihre Zytotoxizität und zusätzlich auf ihre estrogene Potenz an ER $\alpha$  und ER $\beta$  un-

tersucht. Hierfür wurde ein im Arbeitskreis um Prof. Gust bereits etablierter Transaktivierungsassay verwendet. Die Estrogenität wird hierbei in Form einer Luciferaseaktivierung bestimmt. Die estron- und estradiolähnlichen Verbindungen zeigten im Vergleich zu G1 sehr viel geringere zytotoxische Eigenschaften und zusätzlich eine Affinität zu den intrazellulären Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  mit intrinsischen Aktivitäten zwischen 58 und 108 % verglichen mit Estradiol (IA = 100 %). In den meisten Fällen führte eine Halogensubstitution zu einer Abnahme der estrogenen Potenz.

Da momentan noch kein GPR30 Testsystem zur Verfügung steht, konnten die neuen Verbindungen noch nicht auf ihre Affinität zum GPR30 untersucht werden. Dies bietet einen Ansatzpunkt für weiterführende Forschung auf diesem Gebiet.

## 8 Summary

The discovery of the first GPR30 agonist G1 motivates for further research on estrogens and their receptors. New compounds which selectively bind to GPR30 either as agonists or antagonists would help to characterize the *in vivo* function of this receptor and clarify his contribution on tumor formation and progression.

Within this work several new compounds, structurally related to G1, were synthesized. Its scaffold, a cyclopentatetrahydroquinoline, is obtained in a three component Diels-Alder-reaction with inverse electron demand. To get G1, 6-bromopiperonal was reacted with 4-aminoacetophenon and cyclopentadien as dienophil. Variation of these components led to numerous new compounds which were spectroscopically characterized especially by NMR spectroscopy with its two-dimensional technics NOE and COSY. Their cytotoxic effects were investigated on hormone-dependent MCF-7 cells, hormone-independent MDA-MB-231 cells and the sarcoma cell line U2OS. Interestingly, G1 showed high growth inhibitory properties in all three cell lines, which we tried to reduce by structural modifications. Thus opening of the dioxolanring, removing of the bromine substituent or removing the ethanon group led to compounds with 10 to 20 fold less antiproliferative potency which allow the determination with GPR 30 in cellular systems.

The structural relation of G1 to estron induced us to design compounds with similarity to steroidal estrogens. These novel compounds were tested for cytotoxic effects as well as estrogenic potency on ER $\alpha$  and ER $\beta$  in an established luciferase transactivation assay. All these compounds, structurally related to estron and estradiol, showed less cytotoxicity than G1 and affinity for the intracellular estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . The intrinsic activities ranged between 58 and 108 % compared to estradiol. In most cases a halogen substitution led to a decreased estrogenicity.

To complete this structure activity study it is necessary to study the interaction of G1 analogues to GPR 30. These investigations are in progress and will give more insight into the mode of action.



## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Synthetischer und analytischer Teil

#### 9.1.1 Allgemeine Angaben

##### Chemikalien und verwendete Geräte

###### Chemikalien und Lösungsmittel:

Die für die Synthesen und Analytik verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Acros Organics, Sigma Aldrich und Alfa Aesar bezogen.

###### Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-60-F<sub>254</sub> Folien von der Firma Merck und ein UV-Betrachter von Benda, Wiesloch verwendet.

###### Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0,063-0,100 mm und für die Flashchromatographie mit einer Korngröße von 0,040-0,063 mm von den Firmen Merck und Grace Davison GmbH eingesetzt.

###### Rotationschromatographie:

Es wurde Kieselgel 60 von der Firma Merck und ein Chromatotron 7924 T (Harrison Research) verwendet.

###### Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Büchi Schmelzpunktapparatur B-545 bestimmt. Sie sind unkorrigiert.

###### Kernresonanzspektroskopie:

Die Aufnahme der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erfolgte mit einem Avance/DPX 400 der Bruker Analytische Messtechnik GmbH bei 400 MHz. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind relativ zu dem internen Standard Tetramethylsilan in ppm angegeben. Das jeweils verwendete Lösungsmittel ist angegeben. Es gelten folgende

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dq = Dublett vom Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, br = breite Bandenform,  $J$  = Betrag der Kopplungskonstante.

### **Massenspektroskopie:**

Die Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) wurden mit einem CH-7A-Varian MAT bei 70 eV aufgenommen. Die jeweiligen Verdampfungstemperaturen, sowie die relativen Signallagen und -intensitäten sind angegeben.

### **Elementaranalyse:**

Die Elementaranalysen wurden mit einem Vario EL (Elementar Hanau) durchgeführt.

## **9.1.2 Synthesevorschriften und analytische Daten**

### **9.1.2.1 Variation der Aldehydkomponente**

#### **9.1.2.1.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Tetrahydrocyclopentachinolinderivate**

5 mmol des entsprechenden Amins werden in 5 ml Acetonitril gelöst und mit 5 mmol Trifluoressigsäure versetzt. Nach 5 minütigem Rühren bei Raumtemperatur werden 5 mmol des gewünschten Aldehyds, gelöst in 5 ml Acetonitril, zugegeben und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 5 mmol frisch destilliertes Cyclopentadien zugefügt. Das Gemisch wird 2-4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion mittels DC überwacht. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie und Umkristallisation gereinigt. Das verwendete Fließmittelgemisch ist jeweils angegeben.

#### **9.1.2.1.2 Allgemeine Vorschrift zur Synthese mit Scandium(III)trifluormethansulfonat (Scandiumtriflat)**

5 mmol des entsprechenden Aldehyds werden mit 5 mmol des einzusetzenden Amins und 25 mmol frisch destilliertes Cyclopentadien in 10 ml absolutem Aceto-

nitril gelöst. Anschließend werden 0,5 mmol Scandiumtriflat, gelöst in 5 ml absolutem Acetonitril, hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC überwacht. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und das Produkt erst säulenchromatographisch isoliert und anschließend durch Umkristallisation gereinigt.

**1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (1)**

Aus 20 mmol (2,7 g) 4-Aminoacetophenon, 19,4 mmol (4,45 g) 6-Bromopiperonal, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 36,6 mmol (3 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Acetonitril

**Ausbeute:** 9,9 mmol (4,1 g), 51 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 174 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.67 (br dd, *J* = 8.6, 15.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.39-2.44 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.99-3.09 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.8 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.62 (m, 1 H, CH=CH), 5.95-6.01 (m, 1 H, CH=CH), 6.09 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.11 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.48 (s, 1H, NH), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.12 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.27 (s, 1 H, Ar'-7'H), 7.55 (dd, *J* = 1.8, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.63 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (412,28 g/mol)

berechnet: C: 61,18 % H: 4,40 % N: 3,40 %

gefunden: C: 61,21 % H: 4,41 % N: 3,41 %

**1-(4-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c] chinolin-8-yl)ethanon**

**Ausbeute:** 0,6 mmol (206 mg), 12 %

Endo-Exogemisch: 80 % endo und 20 % exo

rosafarbene Kristalle

**Schmb:** 90-93 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.83-1.92 (br dd, *J* = 8.5, 16.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.51 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.51-2.57 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.92-3.0 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.14 (d, *J* = - Hz, unter dem Ethylacetatquartett, 1 H, ArCHCH=CH), 4.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.65-5.69 (m, 1 H, CH=CH), 5.89-5.96 (m, 1 H, CH=CH), 5.98 (s, 2 H, OCH<sub>2</sub>O), 6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz 1 H, Ar'-7'H), 6.87 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz 1 H, Ar'-6'H), 6.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H, Ar'-4'H), 7.61 (dd, *J* = 1.9, 8.4 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.7 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (333,38 g/mol)

berechnet: C: 75,66 % H: 5,74 % N: 4,20 %

+1/4 Ethylacetat: C: 74,35 % H: 5,96 % N: 3,94 %

gefunden: C: 74,36 % H: 5,95 % N: 4,02 %

**1-(4-(6-Chlorbenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (3)**

Aus 5 mmol (0,675 g) 4-Aminoacetophenon, 5 mmol (0,925 g) 6-Chlorpiperonal, 5,3 mmol (0,4 ml) Trifluoressigsäure und 4,9 mmol (0,4 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Acetonitril

**Ausbeute:** 1,6 mmol (0,58 g), 31 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 166 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.68 (dd, *J* = 8.6, 15 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.35-2.4 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.97-3.08 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.85 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.61 (m, 1 H, CH=CH), 5.98 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.09 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.11 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.44 (s, 1 H, NH), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.13 (s, 2 H, Ar'-4'H, Ar'-7'H), 7.54 (dd, *J* = 1.8, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.63 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub> (367,83 g/mol)

berechnet: C: 68,57 % H: 4,93 % N: 3,81 %

gefunden: C: 68,53 % H: 4,96 % N: 3,83 %

**1-(4-(2-Brom-4,5-dimethoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (4)**

Aus 5 mmol (0,679 g) 4-Aminoacetophenon, 5 mmol (1,23 g) 6-Bromveratraldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 2 mmol (0,87 g), 41%

altrosafarbene Kristalle

**Schmp:** 179 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.66 (br dd, *J* = 8.6, 15.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH(1 H)), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.44-2.48 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.01-3.1 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.79 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.79 (d, *J* = 3.2 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.62 (m, 1 H, CH=CH), 5.98 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.51 (s, 1H, NH), 6.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.12 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.19 (s, 1 H, Ar'-7'H), 7.55 (dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.64 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>3</sub> (428,32 g/mol)

berechnet: C: 61,69 % H: 5,18 % N: 3,27 %

gefunden: C: 61,59 % H: 5,27 % N: 3,33 %

**1-(4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (5)**

Aus 10,1 mmol (1,36 g) 4-Aminoacetophenon, 10,36 mmol (1,72 g) 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Isopropanol/n-Hexan 1+9

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 0,1 mmol (35 mg), 1 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 180 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 2.13 (d, *J* = 16.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.47 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.54 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.63-2.69 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.72 (d, *J* = 10.2 Hz, 1 H, ArCHNH), 3.91 (br s, 6 H, 2 mal OCH<sub>3</sub>), 4.03 (m<sub>c</sub>, 1 H, ArCHCH=CH), 5.71-5.74 (m, 1 H, CH=CH), 5.94-5.96 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.92 (dd, *J* = 1.6, 10.1 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 6.94 (s, 1 H, Ar'-2'H), 7.66 (dd, *J* = 1.7, 8.4 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.9 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> (349,42 g/mol)

berechnet: C: 75,62 % H: 6,63 % N: 4,01 %

gefunden: C: 75,63 % H: 6,71 % N: 4,20 %

**1-(4-(4-Chlorphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (6)**

Aus 5,2 mmol (0,698 g) 4-Aminoacetophenon, 6,7 mmol (0,941 g) 4-Chlorbenzaldehyd, 5,3 mmol (0,4 ml) Trifluoressigsäure und 4,9 mmol (0,4 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 2+8

**Ausbeute:** 1,4 mmol (0,446 g), 28 %

goldfarbene Kristallnadeln

**Schmp:** 183°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.7 (dd, *J* = 8.6, 15.4 Hz, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.36-2.43 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.49 (s, 3 H, **COCH<sub>3</sub>**), 2.93-3.06 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 4.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.74 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.65 (m, 1 H, **CH=CH**), 6.04 (m<sub>c</sub>, 1 H, **CH=CH**), 6.62 (s, 1 H, **NH**), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, **Ar-6H**), 7.52, 7.54 (AA'/BB', *J* = 8.8 Hz, 4 H, **Ar'-H**), 7.6 (dd, *J* = 1.7, 8.5 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 7.69 (br s, 1 H, **Ar-9H**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO (323,82 g/mol)

berechnet: C: 74,18 % H: 5,60 % N: 4,33 %

gefunden: C: 74,18 % H: 5,62 % N: 4,35 %

**1-(4-(4-Chlor-3-nitrophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (7)**

Aus 5,1 mmol (0,693 g) 4-Aminoacetophenon, 5,1 mmol (1,03 g) 4-Chlor-3-nitrobenzaldehyd, 6,6 mmol (0,5 ml) Trifluoressigsäure und 6,1 mmol (0,5 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 1,8 mmol (0,668 g), 35 %

dunkelbraune Kristalle

**Schmp:** 175 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.82 (dd,  $J$  = 8.3, 15.8 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.49-2.55 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.53 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.95-3.07 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.15 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.16 (s, 1 H, NH), 4.79 (br s, 1 H, ArCHNH), 5.67 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 5.95 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.67 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.57-7.60 (m, 2 H, Ar'-5'H, Ar'-6'H), 7.65 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.72 (s, 1 H, Ar-9H), 7.97 (s, 1 H, Ar'-2'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (368,81 g/mol)

berechnet: C: 65,13 % H: 4,65 % N: 7,60 %

gefunden: C: 65,13 % H: 4,67 % N: 7,60 %

**4-(8-Acetyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-yl)benzonnitril  
(8)**

Aus 5 mmol (0,677 g) 4-Aminoacetophenon, 4,9 mmol (0,641 g) 4-Cyanobenzaldehyd, 5,9 mmol (0,45 ml) Trifluoressigsäure und 4,9 mmol (0,4 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Acetonitril

**Ausbeute:** 0,9 mmol (0,294 mg), 19 %

dunkelbraunes Pulver

**Schmp:** 193 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.59 (br dd,  $J$  = 8.6, 15.3 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.30 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.94-3.02 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.09 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.76 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.57 (m, 1 H, CH=CH), 5.98 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.64 (br s, 1 H, NH), 6.78 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 7.55 (dd,  $J$  = 2.0, 8.4 Hz, 1 H, Ar'-7'H), 7.64 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1 H, Ar'-9'H), 7.66, 7.87 (AA',BB',  $J$  = 8.3 Hz, 4 H, Ar-H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O (314,38 g/mol)

berechnet: C: 80,23 % H: 5,77 % N: 8,91 %

gefunden: C: 80,31 % H: 5,79 % N: 8,99 %

### 9.1.2.2 Variation der Ring- und Aldehydkomponente

#### 9.1.2.2.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Hexahydropyrano- chinolinderivate

5 mmol 4-Aminoacetophenon werden in 5 ml Acetonitril gelöst und mit 5 mmol Trifluoressigsäure versetzt. Nach 5 minütigem Rühren bei Raumtemperatur werden 5 mmol des entsprechenden Aldehyds, gelöst in 5 ml Acetonitril, zugegeben und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 5 mmol 3,4-Dihydro-2H-pyran zugefügt. Das Gemisch wird 2-4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion mittels DC überwacht. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie und Umkristallisation gereinigt. Das verwendete Fließmittelgemisch ist jeweils angegeben.

#### 1-(5-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]chinolin-9-yl)ethanon (9)

Aus 5,1 mmol (0,690 g) 4-Aminoacetophenon, 5 mmol (1,155 g) 6-Bromopiperonal, 6,6 mmol (0,5 ml) Trifluoressigsäure und 4,4 mmol (0,4 ml) 3,4-Dihydro-2H-pyran nach Vorschrift 9.1.2.2.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Ausbeute:** 1,34 mmol (0,577 g), 31 %

gelbe Kristalle

**Schmb:** 178-182 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.35 (dd, *J* = 2.5, 13.6 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.4-1.44 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.67-1.82 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.83-1.94 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 2.11-2.21 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH),

2.47 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.69 (dt,  $J = 1.8, 10.9$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 3.95 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 4.45 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, Ar-CHOCH<sub>2</sub>), 4.99 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1 H, ArCHNH), 6.13 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.15 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.66 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.07 (s, 1 H, NH), 7.11 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.3 (s, 1 H, Ar'-7'H), 7.69 (dd,  $J = 1.9, 8.6$  Hz, 1 H, Ar-8H), 7.78 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1 H, Ar-10H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>4</sub> (430,29 g/mol)

berechnet: C: 58,62 % H: 4,69 % N: 3,26 %

gefunden: C: 58,69 % H: 4,69 % N: 3,29 %

**1-(5-(6-Chlorbenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]chinolin-9-yl)ethanon (10)**

Aus 5 mmol (0,678 g) 4-Aminoacetophenon, 5 mmol (0,927 g) 6-Chlorpiperonal, 6,1 mmol (0,46 ml) Trifluoressigsäure und 4,3 mmol (0,39 ml) 3,4-Dihydro-2H-pyran nach Vorschrift **9.1.2.2.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Umkristallisation:** Acetonitril

**Ausbeute:** 0,2 mmol (0,060 g), 4 %

orangegelbe Kristalle

**Schmb:** 170-174 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.30$  (dd,  $J = 3.0, 13.3$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.33-1.37 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.63-1.73 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.73-1.85 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 2.03-2.13 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 2.41 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.62 (dt,  $J = 1.9, 10.9$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 3.89 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 4.39 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, Ar-CHOCH<sub>2</sub>), 4.98 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1 H, ArCHNH), 6.08 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.09 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.6 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.02 (s, 1 H, NH), 7.05 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.12 (s, 1 H, Ar'-7'H), 7.63 (dd,  $J = 1.9, 8.6$  Hz, 1 H, Ar-8H), 7.72 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1 H, Ar-10H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> (385,84 g/mol)

berechnet: C: 65,37 % H: 5,22 % N: 3,63 %

gefunden: C: 65,39 % H: 5,23 % N: 3,63 %

**Endo-4-(9-Acetyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]chinolin-5-yl)benzonnitril (11)**

Aus 11 mmol (1,48 g) 4-Aminoacetophenon, 10,7 mmol (1,4 g) 4-Cyanobenzaldehyd, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 16,7 mmol (1,5 ml) 3,4-Dihydro-2H-pyran nach Vorschrift **9.1.2.2.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1+1

**Ausbeute:** 0,9 mmol (0,3 g), 8 %

zitronengelbes Pulver

**Schmp:** 250 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 0.98 (br d, *J* = 10.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.16-1.26 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.32-1.43 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.1-2.19 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.53 (br d, *J* = 11.1 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 3.27 (dt, *J* = 4.2, 11.1 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 4.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.24 (d, *J* = 5.2 Hz, 1 H, ArCHOCH<sub>2</sub>), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar'-7'**H**), 7.02 (s, 1 H, NH), 7.62, 7.88 (AA'BB', *J* = 8.2 Hz, 4 H, Ar-**H**), 7.66 (dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz, 1 H, Ar'-8'**H**), 7.81 (sb, 1 H, Ar'-10'**H**) ppm.

**MS** (EI, 180 °C): *m/z* (%) = 332 [M<sup>+</sup>] (56), 273 (49), 43 (100)

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (332,40 g/mol)

berechnet: C: 75,88 % H: 6,06 % N: 8,43 %

gefunden: C: 75,85 % H: 6,10 % N: 8,63 %

**Exo-4-(9-Acetyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]chinolin-5-yl)benzotrifluorid (12)**

Aus 11 mmol (1,48 g) 4-Aminoacetophenon, 10,7 mmol (1,4 g) 4-Cyanobenzaldehyd, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 16,7 mmol (1,5 ml) 3,4-Dihydro-2H-pyran nach Vorschrift **9.1.2.2.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1+1

**Ausbeute:** 1,6 mmol (0,520), 15 %

zitronengelbes Pulver

**Schmp:** 240 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.20 (dd, *J* = 2.6, 11.0 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.33 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.67 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.74-1.89 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 1.95-2.03 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 2.41 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.64 (dt, *J* = 2.1, 10.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)) 3.89 (db, *J* = 11.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O (1 H)), 4.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, ArCHOCH<sub>2</sub>), 4.72 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 6.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, Ar'-7'H), 7.21 (s, 1 H, NH), 7.65, 7.88 (AA'BB', *J* = 7.9 Hz, 5 H, Ar'-8'H, Ar-H, Ar-H), 7.72 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H, Ar'-10'H) ppm.

**MS** (EI, 180 °C): *m/z* (%) = 332 [M<sup>+</sup>] (47), 273 (100), 43 (63)

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (332,40 g/mol)

berechnet: C: 75,88 % H: 6,06 % N: 8,43 %

gefunden: C: 75,76 % H: 6,23 % N: 8,41 %

**9.1.2.3 Variation der Aminkomponente**

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4,5,7,8,9,11b-hexahydro-3H-benzo[g]cyclopenta[c]chinolin-10(3aH)-on (13)**

Aus 10,9 mmol (1,75 g) 6-Amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenon, 10 mmol (2,3 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 6+4

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 0,6 mmol (0,270 g), 6 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 206°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.65 (dd, *J* = 8.7, 15.0 Hz, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 1.94 (quin, 2 H, **CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**), 2.31-2.41 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.43 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H, **COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**), 2.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 2 H, **COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**), 2.94-3.04 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 4.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar-**CHCH=CH**), 4.79 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, Ar**CHNH**), 5.60 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.90-5.94 (m, 1 H, **CH=CH**), 6.09 (d, *J* = 0.7 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.11 (d, *J* = 0.7 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.47 (s, 1 H, **NH**), 6.53 (s, 1 H, Ar-**6H**), 7.1 (s, 1 H, Ar'-**4'H**), 7.26 (s, 1 H, Ar'-**7'H**), 7.53 (s, 1 H, Ar-**11H**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>3</sub> (438,31 g/mol)

berechnet: C: 63,02 % H: 4,60 % N: 3,20 %

gefunden: C: 63,09 % H: 4,86 % N: 3,42 %

#### **4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4,5,9,10,11,11c-hexahydro-3H-benzo[f]cyclopenta[c]chinolin-8(3aH)-on (14)**

Aus 10,9 mmol (1,75 g) 6-Amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenon, 10 mmol (2,3 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 6+4

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 1,9 mmol (0,814 g), 19 %

gelbes Pulver

**Schmp:** 180°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.72 (dd, *J* = 9.0, 16.2 Hz, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 1.82-1.96 (m, 1H, **COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>** (1 H)), 2.04-2.12 (m, 1 H, **COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>** (1 H)), 2.41-2.48 (m, 2 H, **COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>**), 2.52-2.6 (m, 1 H,

$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$  (1 H)), 2.71-2.83 (m, 1 H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  (1 H)), 3.0-3.08 (m, 1 H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  (1 H)), 3.16-3.26 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}$ ), 4.24 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H,  $\text{ArCHCH}=\text{CH}$ ), 4.67 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H,  $\text{ArCHNH}$ ), 5.63 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 5.87-5.92 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 6.09 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)), 6.11 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)), 6.35 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1 H,  $\text{NH}$ ), 6.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H,  $\text{Ar-6H}$ ), 7.12 (s, 1 H,  $\text{Ar}'\text{-4}'\text{H}$ ), 7.26 (s, 1 H,  $\text{Ar}'\text{-7}'\text{H}$ ), 7.56 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H,  $\text{Ar-7H}$ ) ppm.

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrNO}_3$  (438,31 g/mol)

berechnet: C: 63,02 % H: 4,60 % N: 3,20 %

gefunden: C: 63,06 % H: 4,43 % N: 3,22 %

#### 9.1.2.3.1 Allgemeine Vorschrift zur Reduktion mit $\text{LiAlH}_4$

Die entsprechende Menge Lithiumaluminiumhydrid mit 10%igem Überschuss (0,25 mol pro 1 mol Keton bzw. 0,5 mol pro 1 mol Ester) wird mit 10 ml absolutem Tetrahydrofuran versetzt. Unter ständigem Rühren werden 4 mmol der zu reduzierenden Verbindung, gelöst in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran, vorsichtig zugetropft, so dass die Reaktion unter Kontrolle gehalten werden kann. Anschließend wird für 1 h erhitzt. Nach Abkühlen des Kolbens versetzt man tropfenweise mit Eiswasser, solange bis keine Wasserstoffentwicklung mehr stattfindet. Durch Zugabe von 10%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wird der entstandene Aluminiumhydroxidniederschlag wieder aufgelöst. Die wässrige Phase wird dreimal mit THF ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das entstandene Rohprodukt wird mit Hilfe der Säulenchromatographie und Umkristallisation gereinigt.

#### 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanol (15)

Aus 3,7 mmol (1,53 g) 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**1**) und 1,3 mmol (50 mg) Lithiumaluminiumhydrid nach Vorschrift **9.1.2.3.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 1,77 mmol (0,733 g), 48 %

gelbe Kristalle

**Schmp:** 160 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CD<sub>3</sub>CN, 400 MHz): δ = 1.34 (dd, *J* = 0.9, 6.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CHOH), 1.67-1.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.46-2.56 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.94 (dd, *J* = 1.0, 3.8 Hz, 1 H, OH) 3.1-3.2 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.22 (s, 1 H, NH), 4.61-4.69 (m, *J* = 3.8, 6.3 Hz, 1 H, CH<sub>3</sub>CHOH), 4.77 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.60-5.65 (m, 1 H, CH=CH), 5.86-5.90 (m, 1 H, CH=CH), 5.99 (d, *J* = 1.0 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.01 (d, *J* = 1.0 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.94 (td, *J* = 2.1, 8.2 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.03 (br s, 1 H, Ar-9H), 7.10 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.19 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**MS** (EI, 150 °C): *m/z* (%) = 413 [M<sup>+</sup>] (58), 395 (86), 334 (13)

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>3</sub> (414,29 g/mol)

berechnet: C: 60,88 % H: 4,87 % N: 3,38 %

gefunden: C: 61,09 % H: 4,97 % N: 3,43 %

**(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)methanol (16)**

Aus 3,5 mmol (1,5 g) Methyl-4-(6-brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-carboxylat (**20**) und 4,7 mmol (180 mg) Lithiumaluminiumhydrid nach Vorschrift **9.1.2.3.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,17 mmol (68 mg), 5 %

weißes Pulver

**Schmp:** Verfärbung ab 175 °C, bei 240 °C schwarz

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.61-1.70 (br dd, *J* = 8.7, 14.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.41-2.48 (m, 1 H CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.97-3.05 (m, 1 H,

CH<sub>2</sub>CHCH), 3.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.31 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>OH), 4.64 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1 H, ArCHNH), 4.86 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OH), 5.52 (s, 1H, NH), 5.59 (m, 1 H, CH=CH), 5.84-5.88 (m, 1 H, CH=CH), 6.08 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.10 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.65 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.85 (dd,  $J = 1.8, 8.1$  Hz, 1 H, Ar-7H), 6.94 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1 H, Ar-9H), 7.15 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.24 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (400,27 g/mol)

berechnet: C: 60,01 % H: 4,53 % N: 3,50 %

gefunden: C: 60,31 % H: 4,76 % N: 3,42 %

#### 4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-8-ethyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin (17)

Aus 10,4 mmol (1,3 ml) 4-Ethylanilin, 9,6 mmol (2,2 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Umkristallisation:** 1. Isopropanol, 2. Ether

**Ausbeute:** 5 mmol (2 g), 52 %

weiße Kristalle

**Schmp:** 152°C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.12$  (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.65 (br dd,  $J = 8.9, 15.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.44 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.41-2.47 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.96-3.06 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.97 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.62 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H, ArCHNH), 5.38 (s, 1 H, NH), 5.58 (m, 1 H, CH=CH), 5.84-5.89 (m, 1 H, CH=CH), 6.07 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.09 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.62 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.74 (dd,  $J = 1.8, 8.1$  Hz, 1 H, Ar-7H), 6.83 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1 H, Ar-9H), 7.15 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.23 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>2</sub> (398,29 g/mol)

berechnet: C: 63,33 % H: 5,06 % N: 3,52 %

+ ½ H<sub>2</sub>O: C: 61,93 % H: 5,20 % N: 3,44 %

gefunden: C: 61,65 % H: 5,12 % N: 3,54 %

**4-Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-8-ethyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (18)**

Aus 4,7 mmol (1,93 g) 1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**1**) und 26 mmol (1 g) Lithiumaluminiumhydrid nach Vorschrift **9.1.2.3.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 2+8

**Umkristallisation:** Petrolether

**Ausbeute:** 0,3 mmol (0,082 g), 6 %

hellgelbe Kristalle

**Schmp:** 124°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.11 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.66 (br dd, *J* = 8.9, 15.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43 (q, *J* = 7.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.43 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)) → Unter dem Quartett, 2.80-2.91 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.34 (s, 1H, NH), 5.57 (m, 1 H, CH=CH), 5.84 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.00 (s, 2 H, OCH<sub>2</sub>O), 6.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.72 (br d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.81 (br s, 1 H, Ar-9H), 6.91 (m, 2 H, Ar'-6'H, Ar'-7'H), 7.00 (s, 1 H, Ar'-4'H) ppm.

**MS** (EI, 200 °C): *m/z* (%) = 319 [M<sup>+</sup>] (100), 198 (12), 121 (10)

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub> (319,40 g/mol)

berechnet: C: 78,97 % H: 6,63 % N: 4,39 %

gefunden: C: 78,99 % H: 6,63 % N: 4,39 %

**2-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)acetonitril (19)**

Aus 5,1 mmol (0,667 g) 4-Aminobenzylcyanid, 5,16 mmol (1,18 g) 6-Bromopiperonal, 6,1 mmol (0,46 ml) Trifluoressigsäure und 5 mmol (0,41 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Umkristallisation:** Acetonitril

**Ausbeute:** 3,5 mmol (1,44 g), 70 %

sandfarbenes Pulver

**Schmp:** 206 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.66 (br dd, J = 8.3, 15 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.41-2.46 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.97-3.08 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.80 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>CN), 4.01 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.66 (d, J = 2.7 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.61 (m, 1 H, CH=CH), 5.69 (s, 1 H, NH), 5.86 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.08 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.10 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.71 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.87 (dd, J = 1.3, 8.2 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.97 (br s, 1 H, Ar-9H), 7.14 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.25 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (409,28 g/mol)

berechnet: C: 61,63 % H: 4,19 % N: 6,84 %

gefunden: C: 61,69 % H: 4,20 % N: 6,87 %

**Methyl-4-(6-brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-carboxylat (20)**

Aus 11,1 mmol (1,67 g) 4-Aminomethylbenzoat, 11,3 mmol (2,6 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 2+8

**Ausbeute:** 9,9 mmol (4,25 g), 89 %

orangefarbene Kristalle

**Schmp:** 105 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.67 (br dd,  $J$  = 8.6, 16 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.38-2.45 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.98-3.08 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.76 (s, 3 H, **COOCH<sub>3</sub>**), 4.06 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.79 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.62 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.94 (m<sub>c</sub>, 1 H, **CH=CH**), 6.09 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.11 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.44 (s, 1H, **NH**), 6.75 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, **Ar-6H**), 7.13 (s, 1 H, **Ar'-4'H**), 7.27 (s, 1 H, **Ar'-7'H**), 7.52 (dd,  $J$  = 2.0, 8.5 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 7.61 (br s, 1 H, **Ar-9H**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>4</sub> (428,28 g/mol)

berechnet: C: 58,89 % H: 4,24 % N: 3,27 %

gefunden: C: 58,82 % H: 4,40 % N: 3,26 %

#### **4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-carbonsäure (21)**

Aus 5,3 mmol (0,734 g) 4-Aminobenzoesäure, 5,1 mmol (1,178 g) 6-Bromopiperonal, 0,48 mmol (0,236 mg) Scandiumtriflat und 6,1 mmol (0,5 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.2**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Ausbeute:** 0,4 mmol (0,16 g), 8 %

Endo-Exogemisch: 80 % endo und 20 % exo

weiße Pulver

**Schmp:** Zersetzung 250 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.67 (br dd,  $J$  = 8.2, 16.3 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.39-2.45 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.97-3.07 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 4.05 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.78 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.62 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.93 (m, 1 H, **CH=CH**), 6.09 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.11 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.35 (s, 1H, **NH**), 6.73 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, **Ar-6H**), 7.13 (s, 1 H, **Ar'-4'H**), 7.27 (s, 1 H, **Ar'-7'H**), 7.5 (dd,  $J$  = 2.0, 8.6 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 7.59 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 1 H, **Ar-9H**), 12.2 (br s, 1 H, **-COOH**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>4</sub> (414,25 g/mol)

berechnet: C: 57,99 % H: 3,89 % N: 3,38 %

gefunden: C: 57,70 % H: 3,84 % N: 3,64 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (22)**

Aus 5,8 mmol (0,71 g) p-Anisidin, 5,4 mmol (1,24 g) 6-Bromopiperonal, 5,3 mmol (0,4 ml) Trifluoressigsäure und 4,9 mmol (0,4 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift

**9.1.2.1.1.**

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 2+8

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 1,3 mmol (0,527 g), 27 %

beigefarbene Kristalle

**Schmb:** 185-189 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.81 (br dd, *J* = 8.9, 15.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.56-2.63 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 3.13-3.21 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.82 (d, *J* = 2.8 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.68 (m, 1 H, CH=CH), 5.85 (m, 1 H, CH=CH), 5.99 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.00 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.57-6.63 (m, 2 H, Ar-6H, Ar-7H), 6.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Ar-9H), 7.03 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.2 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (400,27 g/mol)

berechnet: C: 60,01 % H: 4,53 % N: 3,50 %

gefunden: C: 60,17 % H: 4,76 % N: 3,78 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (23)**

Aus 10,5 mmol (1,14 g) 4-Aminophenol, 11,7 mmol (2,67 g) 6-Bromopiperonal, 15,8 mmol (1,2 ml) Trifluoressigsäure und 14,6 mmol (1,2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 2+8

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 1,4 mmol (0,543 g), 13 %

hellgelbe Kristalle

**Schmp:** 213 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.64 (br dd, *J* = 8.9, 15.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.42-2.45 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.94-3.04 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.54 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.07 (s, 1 H, **NH**), 5.59 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.8 (m, 1 H, **CH=CH**), 6.07 (br s, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.09 (br s, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.37 (dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 6.44 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, **Ar-9H**), 6.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, **Ar-6H**), 7.15 (s, 1 H, **Ar'-4'H**), 7.23 (s, 1 H, **Ar'-7'H**), 8.5 (s, 1 H, **OH**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>3</sub> (386,24 g/mol)

berechnet: C: 59,08 % H: 4,18 % N: 3,63 %

gefunden: C: 59,21 % H: 4,44 % N: 3,80 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (24)**

Aus 11 mmol (1 ml) Anilin, 10,1 mmol (2,32 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 7,4 mmol (2,7 g), 73 %

sandfarbenes Pulver

**Schmp:** 170 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.66 (br dd, *J* = 8.3, 15 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.44-2.48 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.98-3.08 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.66 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.58 (s, 1H, NH), 5.59 (m, 1 H, CH=CH), 5.87 (m, 1 H, CH=CH), 6.08 (d, *J* = 0.8 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.11 (d, *J* = 0.8 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.62 (dt, *J* = 1.1, 7.3 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.7 (dd, *J* = 1.0, 8.0 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.89 (dt, *J* = 1.3, 8.3 Hz, 1 H, Ar-8H), 6.99 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, Ar-9H), 7.15 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.26 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>2</sub> (370,24 g/mol)

berechnet: C: 61,64 % H: 4,36 % N: 3,78 %

+H<sub>2</sub>O: C: 60,17 % H: 4,52 % N: 3,69 %

gefunden: C: 59,86 % H: 4,52 % N: 3,85 %

### **1-(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)ethanon (25)**

Aus 5,4 mmol (0,728 g) 3-Aminoacetophenon, 5,6 mmol (1,28 g) 6-Bromopiperonal, 5,3 mmol (0,4 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 0,67 mmol (0,273 g), 12 %

hellgelbe Kristalle

**Schmp:** 204 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.67 (br dd, *J* = 8.9, 15.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.5 (m, 1 H, unter DMSO-d<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.53 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.03-3.14 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.61 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, ArCHNH), 4.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 5.51 (m, 1 H, CH=CH), 5.57 (m, 1 H, CH=CH), 5.81 (s, 1 H, NH), 6.08 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.10 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)),

6.92 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, Ar-6H), 7.04 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.10 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, Ar-8H), 7.12 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.26 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (412,28 g/mol)

berechnet: C: 61,18 % H: 4,40 % N: 3,40 %

gefunden: C: 61,27 % H: 4,48 % N: 3,40 %

#### **4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)methanol (26)**

Aus 20 mmol (2,46 g) 3-Aminobenzylalkohol, 20 mmol (4,57 g) 6-Bromopiperonal, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 36,6 mmol (3 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 5,2 mmol (2,07 g), 26 %

gelbe Kristalle

**Schmb:** 100-110 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.70$  (br dd,  $J = 9.1, 15.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.54-2.6 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.13-3.25 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.25 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.45 (dd,  $J = 5.8, 13.3$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OH (1 H)), 4.49 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, ArCHNH), 4.63 (dd,  $J = 5.8, 13.3$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OH (1 H)), 5.01 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, OH), 5.42 (s, 1 H, NH), 5.59 (m, 1 H, CH=CH), 5.80 (m, 1 H, CH=CH), 6.08 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.10 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.66 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, Ar-H), 6.77 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H, Ar-H), 6.90 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.13 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.25 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (400,27 g/mol)

berechnet: C: 60,01 % H: 4,53 % N: 3,50 %

gefunden: C: 60,04 % H: 4,53 % N: 3,45 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-7-yl)methanol (27)**

Aus 20 mmol (2,46 g) 3-Aminobenzylalkohol, 20 mmol (4,57 g) 6-Bromopiperonal, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 36,6 mmol (3 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 2,9 mmol (1,18 g), 15 %

gelbe Kristalle

**Schmb:** 112-116 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.64 (br dd,  $J$  = 8.6, 15.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.41-2.47 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.93-3.06 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.98 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.32 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2 H, **CH<sub>2</sub>OH**), 4.66 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.96 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1 H, **OH**), 5.56 (s, 1 H, **NH**), 5.57 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.86 (m<sub>c</sub>, 1 H, **CH=CH**), 6.08 (br s, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.10 (br s, 1 H, **OCH<sub>2</sub>O** (1 H)), 6.57 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H, **Ar-8H**), 6.68 (s, 1 H, **Ar-6H**), 6.93 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H, **Ar-9H**), 7.14 (s, 1 H, **Ar'-4'H**), 7.24 (s, 1 H, **Ar'-7'H**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>3</sub> (400,27 g/mol)

berechnet: C: 60,01 % H: 4,53 % N: 3,50 %

gefunden: C: 60,09 % H: 4,71 % N: 3,49 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)methyl-2,2,2-trifluoracetat (28)**

Aus 19,5 mmol (2,4 g) 3-Aminobenzylalkohol, 18,8 mmol (4,3 g) 6-Bromopiperonal, 26 mmol (2 ml) Trifluoressigsäure und 42,7 mmol (3,5 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 0,46 mmol (0,182 g), 2 % Nebenprodukt

weiße Kristalle

**Schmp:** 147 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.74 (br dd, *J* = 8.8, 15.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.53-2.62 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.18-3.27 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.31 (dd, *J* = 1.6, 9.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.52 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.43 (d, *J* = 12.4 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OCOCF<sub>3</sub>), 5.57 (d, *J* = 12.4 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OCOCF<sub>3</sub>), 5.63 (m, 1 H, CH=CH), 5.66 (s, 1 H, NH), 5.70-5.74 (m, 1 H, CH=CH), 6.09 (d, *J* = 0.8 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.10 (d, *J* = 0.8 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.73 (dd, *J* = 0.9, 7.7 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.82 (dd, *J* = 0.9, 7.9 Hz, 1 H, Ar-8H), 6.99 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.13 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.25 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**MS** (EI, 150 °C): *m/z* (%) = 495 [M<sup>+</sup>] (100), 416 (29), 213 (45)

**Elementaranalyse:** C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> (496,27 g/mol)

berechnet: C: 53,24 % H: 3,45 % N: 2,82 %

gefunden: C: 53,51 % H: 3,47 % N: 2,85 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-7-yl)methyl-2,2,2-trifluoracetat (29)**

Aus 19,5 mmol (2,4 g) 3-Aminobenzylalkohol, 18,8 mmol (4,3 g) 6-Bromopiperonal, 26 mmol (2 ml) Trifluoressigsäure und 42,7 mmol (3,5 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7, die folgenden Säulen: Ether/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 0,19 mmol (0,076 g), 1 % (Stellungsisomerenmischung), Nebenprodukt gelbe Kristalle

**Schmp:** 59 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.66 (br dd, *J* = 8.7, 15.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.4-2.48 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.98-3.08 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.69 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.27 (s,

2 H,  $\text{CH}_2\text{OCOCF}_3$ ), 5.60 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 5.78 (s, 1 H,  $\text{NH}$ ), 5.85-5.89 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 6.08 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)), 6.10 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)), 6.68 (dd,  $J = 1.5, 7.8$  Hz, 1 H, Ar-8H), 6.77 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1 H, Ar-6H), 7.04 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, Ar-9H), 7.14 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.24 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

Zu einem Fünftel ist noch das andere Stellungsisomer enthalten, Gemisch aber CHN-rein.

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BrF}_3\text{NO}_4$  (496,27 g/mol)

berechnet: C: 53,24 % H: 3,45 % N: 2,82 %

gefunden: C: 53,36 % H: 3,48 % N: 2,96 %

**4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)methylacetat (30)**

Aus 20 mmol (2,46 g) 3-Aminobenzylalkohol, 20 mmol (4,57 g) 6-Bromopiperonal, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 36,6 mmol (3 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7, zweite Säule: Fließmittel: Ether/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,03 mmol (14 mg), 0,2 % Nebenprodukt

weiße Kristalle

**Schmp:** 145 °C

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta = 1.73$  (dd,  $J = 9.0, 16$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$  (1H)), 2.09 (s, 3 H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 2.52-2.6 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$  (1 H)), 3.16-3.26 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}$ ), 4.31 (dd,  $J = 1.2, 9.2$  Hz, 1 H, Ar $\text{CHCH}=\text{CH}$ ), 4.52 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1 H, Ar $\text{CHNH}$ ), 5.43 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ ), 5.57 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ ), 5.63 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 5.67 (s, 1 H,  $\text{NH}$ ), 5.72 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 6.09 (br s, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)), 6.10 (br s, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$  (1 H)),

6.73 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.82 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H, Ar-8H), 6.99 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.13 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.26 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>4</sub> (442,30 g/mol)

berechnet: C: 59,74 % H: 4,56 % N: 3,17 %

gefunden: C: 59,62 % H: 4,71 % N: 3,36 %

#### **4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-7-yl)methylacetat (31)**

Aus 20 mmol (2,46 g) 3-Aminobenzylalkohol, 20 mmol (4,57 g) 6-Bromopiperonal, 19,7 mmol (1,5 ml) Trifluoressigsäure und 36,6 mmol (3 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7, zweite Säule: Ether/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 0,14 mmol (61 mg), 0,7 % Nebenprodukt

goldene Kristalle

**Schmp:** 87 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.65$  (br dd,  $J = 8.8, 15.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.04 (s, 3 H, OCOCH<sub>3</sub>), 2.40-2.45 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.96-3.07 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.99 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.67 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, ArCHNH), 4.89 (d,  $J = 12.4$  Hz, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub> (1 H)), 4.93 (d,  $J = 12.4$  Hz, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub> (1 H)), 5.59 (m, 1 H, CH=CH), 5.67 (s, 1 H, NH), 5.86 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.08 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.11 (br s, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.6 (br d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, Ar-8H), 6.69 (s, 1 H, Ar-6H), 6.98 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, Ar-9H), 7.13 (s, 1 H, Ar'-4'H), 7.25 (s, 1 H, Ar'-7'H) ppm.

**MS** (EI, 150 °C):  $m/z$  (%) = 441 [M<sup>+</sup>] (72), 398 (6), 43 (100)

**Elementaranalyse:** C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>4</sub> (442,30 g/mol)

berechnet: C: 59,74 % H: 4,56 % N: 3,17 %

gefunden: C: 59,77 % H: 4,69 % N: 3,17 %

### 9.1.2.3.2 Allgemeine Vorschrift zur Acetylierung

3 mmol der zu acetylierenden Verbindung werden in 20 ml absolutem Acetanhydrid gelöst und mit 10 Tropfen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz. aktiviert. Der Ansatz wird für 2 h auf 100 °C erwärmt und nach dem Abkühlen auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird dreimal mit Ether ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung entsäuert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

#### (5-Acetyl-4-(6-brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)methylacetat (32)

Aus 5 mmol (2 g) 4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-9-yl)methanol (**AL22-III**) und 20 ml absolutem Acetanhydrid nach Vorschrift 9.1.2.3.2.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Umkristallisation:** Ethylacetat/Petrolether

**Ausbeute:** 1,1 mmol (0,52 g), 22 %

weiße Kristalle

**Schmb:** 162-165 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 2.15 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.56 (d, *J* = 17.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.74 (ddd, *J* = 2.3, 8.1, 17.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.28-3.38 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.32 (dd, *J* = 2.4, 5.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 5.18 (d, *J* = 12.7 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub> (1 H)), 5.34 (d, *J* = 12.7 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub> (1 H)), 5.56 (m, 1 H, CH=CH), 5.65 (m, 1 H, CH=CH), 5.73 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, ArCHN), 5.86 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 5.90 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>O (1 H)), 6.39 (s, 1 H, Ar'-4'H), 6.97 (s, 1 H, Ar'-7'H), 7.26-7.32 (m, 3 H, Ar-H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>5</sub> (484,34 g/mol)

berechnet: C: 59,52 % H: 4,58 % N: 2,89 %

gefunden: C: 59,52 % H: 4,64 % N: 2,90 %

### 9.1.2.4 Von Estron abgeleitete Strukturen

#### 9.1.2.4.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der chloresubstituierten Benzaldehydvorstufen

53 mmol des entsprechenden chloresubstituierten Anisols werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren werden vorsichtig erst 180 mmol  $\text{TiCl}_4$  und dann 110 mmol Dichlormethylmethylether zugetropft. Der Ansatz wird 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend durch Zugabe von Eis abgestoppt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Als Fließmittel dient Ether/Petrolether 2+8.

#### 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd

Aus 26,5 mmol (3,3 ml) 3-Chloranisol, 90 mmol (10 ml)  $\text{TiCl}_4$  und 55 mmol (5 ml) DCME nach Vorschrift **9.1.2.4.1**.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{ClO}_2$  (170 g/mol)

**Ausbeute:** 18,6 mmol (3,18 g), 70 %

(Isomerengemisch: zu 1/10 4-Chlor-2-methoxybenzaldehyd enthalten)

farblose Kristalle

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  = 3.89 (s, 3 H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7.10 (ddd,  $J$  = 0.7, 2.5, 8.7 Hz, 1 H, 5-**H**), 7.20 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1 H, 3-**H**), 7.84 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1 H, 6-**H**), 10.2 (d,  $J$  = 0.7 Hz, 1 H,  $-\text{CHO}$ ) ppm

#### 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd

Aus 32,2 mmol (5,7 g) 3,5-Dichloranisol, 99,9 mmol (10,8 ml)  $\text{TiCl}_4$  und 30,6 mmol (5,4 ml) DCME nach Vorschrift **9.1.2.4.1**.

$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_2$  (205 g/mol)

**Ausbeute:** 13,6 mmol (2,8 g), 44 %

farblose Kristalle

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 3.90 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 7.20 (s, 2 H, 3-H, 5-H), 10.3 (s, 1 H, -CHO) ppm

#### 9.1.2.4.2 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der fluorsubstituierten Benzaldehydvorstufen

Zu 25 mmol des entsprechenden fluorsubstituierten Anisols werden 60 ml absolutes THF gegeben und mittels Kryostat auf -70 °C abgekühlt. Der Ansatz wird nach vorsichtiger Zugabe von 25 mmol sec. BuLi für 3 Stunden gerührt, sodass die Temperatur nicht über -50 °C steigt. Anschließend werden 25 mmol N-Formylpiperidin zugegeben und weiter eine Stunde gerührt. Der Ansatz wird langsam auf Raumtemperatur gebracht mit 2N HCl angesäuert, die organische Phase abgetrennt, getrocknet und einrotiert. Das Produkt wird in Form farbloser Kristalle erhalten.

#### 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyd

Aus 25 mmol (2,9 mol) 3,5-Difluoranisol, 25 mmol (17,9 ml) sec. BuLi in Cyclohexan und 25 mmol (2,8 ml) N-Formylpiperidin nach Vorschrift 9.1.2.4.2.

C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>F<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (172 g/mol)

**Ausbeute:** 11,6 mmol (2 g), 47 %

farblose Kristalle

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.88 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 6.50 (d, J = 10.7 Hz, 2 H, 3-H, 5-H), 10.2 (s, 1 H, -CHO) ppm

#### 1-(4-(4-Methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (33)

Aus 5,6 mmol (0,761 g) 4-Aminoacetophenon, 5 mmol (0,61 ml) 4-Methoxybenzaldehyd, 0,48 mmol (0,237 mg) Scandiumtriflat und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.2.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,7 mmol (0,233 g), 15 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 131 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.85 (dd, *J* = 8.5, 15.2 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.54-2.61 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.95-3.02 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.83 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 4.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.68 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.67 (m, 1 H, CH=CH), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.92, 7.33 (AA'BB', *J* = 8.6 Hz, 4 H, Ar'-H), 7.62 (dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.71 (br s, 1 H, Ar-9H), ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub> (319,40 g/mol)

berechnet: C: 78,97 % H: 6,63 % N: 4,39 %

gefunden: C: 78,85 % H: 6,78 % N: 4,48 %

### **1-(4-(4-Hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (34)**

Aus 5,5 mmol (0,743 g) 4-Aminoacetophenon, 6 mmol (0,739 ml) 4-Hydroxybenzaldehyd, 0,53 mmol (0,254 mg) Scandiumtriflat und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.2**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Isopropanol/n-Hexan 2+8, zweite Säule: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,1 mmol (34 mg), 2 %

Endo-Exogemisch: 56 % endo und 44 % exo

beigefarbene Kristalle

**Schmb:** 200-206°C

Endoform:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.85 (br dd, *J* = 8.4, 16.1 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.45-2.60 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H) (Endo + Exo)), 2.51 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.94-3.01 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.66 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.67 (m, 1 H, CH=CH), 5.89-5.97 (m, 1 H, CH=CH),

6.59 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.85 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H, AA'BB'-System, Ar'-3'H, Ar-5'H), 7.25-7.29 (m, 4 H, AA'BB'-System, Ar'-2'H, Ar'-6'H (Endo + Exo)), 7.62 (dd,  $J = 1.9, 8.4$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.71 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

Exoform:

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta = 2.09$  (br d,  $J = 17$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.45-2.60 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)(Endo + Exo)), 2.54 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.61-2.67 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.72 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1 H, ArCHNH), 3.98-4.05 (m, 1 H, ArCHCH=CH), 5.70-5.73 (m, 1 H, CH=CH), 5.89-5.97 (m, 1 H, CH=CH), 6.53 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.85 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H, AA'BB'-System, Ar'-3'H, Ar-5'H), 7.25-7.29 (m, 4 H, AA'BB'-System, Ar'-2'H, Ar'-6'H (Endo + Exo)), 7.65 (dd,  $J = 1.8, 8.4$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.91 (br s, 1 H, Ar-9H) ppm.

ESI: [M+Na]<sup>+</sup> 328

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (305,37 g/mol)

berechnet: C: 78,66 % H: 6,27 % N: 4,59 %

+ ½ C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH: C: 76,99 % H: 6,91 % N: 4,18 %

gefunden: C: 77,10 % H: 6,64 % N: 4,50 %

### 1-(4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (35)

Aus 10,4 mmol (1,41 g) 4-Aminoacetophenon, 10,1 mmol (1,55 g) 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 7,1 mmol (2,4 g), 71 %

rosafarbene Kristalle

**Schmp:** 111 °C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.71$  (br dd,  $J = 8.7, 15.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.33-2.39 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.89-3.01 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.78 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH),

4.83 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1 H, ArCHNH), 5.6 (m, 1 H, CH=CH), 5.97 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.45 (s, 1H, NH), 6.77 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.85 (s, 1 H, Ar'-3'H), 6.87-6.88 (m, 1 H, Ar'-5'H), 7.47 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, Ar'-6'H), 7.54 (dd,  $J = 1.8, 8.5$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.63 (s, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>2</sub> (337,39 g/mol)

berechnet: C: 74,76 % H: 5,97 % N: 4,15 %

gefunden: C: 74,66 % H: 6,07 % N: 4,18 %

### 1-(4-(2,6-Difluor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (36)

Aus 5,3 mmol (0,72 g) 4-Aminoacetophenon, 4,9 mmol (0,84 g) 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyd, 6,6 mmol (0,5 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 2 mmol (0,69 g), 41 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 141 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta = 2.1$  (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.5 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.76-2.82 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.03-3.10 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.8 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.31 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 5.06 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1 H, ArCHNH), 5.69 (m, 1 H, CH=CH), 5.86-5.9 (m, 1 H, CH=CH), 6.48 (d,  $J = 10.7$  Hz, 2 H, Ar'-H), 6.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H, Ar-6H), 7.61 (dd,  $J = 2.0, 8.4$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.7 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (355,38 g/mol)

berechnet: C: 70,97 % H: 5,39 % N: 3,94 %

gefunden: C: 70,86 % H: 5,66 % N: 3,82 %

**1-(4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (37)**

Aus 8,6 mmol (1,16 g) 4-Aminoacetophenon, 7,1 mmol (1,2 g) 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 4+6, zweite Säule: Ether/Petrolether 1+1

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 1,2 mmol (0,424 g), 17 %

zitronengelbe Kristalle

**Schmp:** 151 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.75-1.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.47-2.56 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.52 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.18-3.25 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.82 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (br d,  $J$  = 8.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 5.06 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.65-5.69 (m, 1 H, CH=CH), 5.91-5.95 (m, 1 H, CH=CH), 6.61 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 6.87 (dd,  $J$  = 2.6, 8.7 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.96 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 7.50 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.63 (ddd,  $J$  = 0.5, 2.1, 8.4 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.72 (dd,  $J$  = 0.9, 2.0 Hz, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub> (353,84 g/mol)

berechnet: C: 71,28 % H: 5,70 % N: 3,96 %

gefunden: C: 71,25 % H: 5,91 % N: 3,98 %

**1-(4-(4-Chlor-2-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (37a)**

Aus 8,6 mmol (1,16 g) 4-Aminoacetophenon, 7,1 mmol (1,2 g) 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 4+6, zweite Säule: Ether/Petrolether 1+1

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,8 mmol (0,293 g), 12 %

gelbe Kristalle

**Schmp:** 197 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.73-1.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.43-2.50 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.51 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 3.12-3.19 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.85 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (br d, J = 8.9 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 5.01 (d, J = 3.2 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.63-5.67 (m, 1 H, CH=CH), 5.88-5.93 (m, 1 H, CH=CH), 6.60 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 6.88 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 6.99 (dd, J = 1.9, 8.2 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 7.42 (dd, J = 0.4, 8.2 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.61 (ddd, J = >1, 2.0, 8.2 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.72 (dd, J = 0.9, 2.0 Hz, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub> (353,84 g/mol)

berechnet: C: 71,28 % H: 5,70 % N: 3,96 %

gefunden: C: 71,35 % H: 5,85 % N: 4,05 %

**1-(4-(2,6-Dichlor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (38)**

Aus 10,1 mmol (1,36 g) 4-Aminoacetophenon, 9,3 mmol (1,9 g) 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether/Petrolether

**Ausbeute:** 2,5 mmol (0,962 g), 27 %

dunkelgelbe Kristalle

**Schmp:** 177 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.98 (br d, J = 16.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.45-2.52 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.53 (s, 3 H, -COCH<sub>3</sub>), 3.34-3.40 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.82 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.01-4.07 (m<sub>c</sub>, 1 H, ArCHCH=CH), 4.75 (d, J = 10.8 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.73-5.78 (m, 1 H, CH=CH), 5.92-5.96 (m, 1 H,

CH=CH), 6.53 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.92 (s, 2 H, Ar'-3'H, Ar'-5'H), 7.66 (dd,  $J = 2.1, 8.5$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.9 (dd,  $J = 0.8, 2.0$  Hz, 1 H, Ar-9H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (388,29 g/mol)

berechnet: C: 64,96 % H: 4,93 % N: 3,61 %

gefunden: C: 64,90 % H: 5,04 % N: 3,72 %

#### 9.1.2.4.3 Vorschrift zur Etherspaltung mit AlCl<sub>3</sub> und Ethanthiol

1,5 mmol der zu spaltenden Verbindung werden in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 1,6 g AlCl<sub>3</sub> versetzt. Anschließend werden 3 ml Ethanthiol hinzugefügt. Der Ansatz wird eine halbe Stunde auf Eis und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser beendet. Anschließend wird dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgetrennt.

#### 1-(4-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (39)

Aus 1,7 mmol, (0,557 g) 1-(4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (35) nach Vorschrift 9.1.2.4.3.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Etylacetat/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,5 mmol (0,16 g), 29 %

braunes Pulver

**Schmp:** 215 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.93$  (br d,  $J = 16.3$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.4-2.44 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)) (unter dem Singulett), 2.44 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.56-2.62 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.92 (d,  $J = 9.9$  Hz, 2 H, ArCHNH, Ar-CHCH=CH), 5.69-5.74 (m, 1 H, CH=CH), 5.97 (m, 1 H, CH=CH), 6.58 (dd,  $J = 2.4, 12.3$  Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.66-6.69 (m, 3 H, NH, Ar'-3'H, Ar-6H), 7.29 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, Ar'-6'H), 7.56 (dd,  $J = 1.9, 8.4$  Hz, 1 H, Ar-7H), 7.79 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1 H, Ar-9H), 9,92 (s, 1 H, OH) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>2</sub> (323,36 g/mol)

berechnet: C: 74,29 % H: 5,61 % N: 4,33 %

gefunden: C: 74,09 % H: 5,86 % N: 4,39 %

**1-(4-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (40)**

Aus 0,85 mmol, (0,3 g) 1-(4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethanon (**37**) und 1 g AlCl<sub>3</sub> nach Vorschrift **9.1.2.4.3**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1, zweite Säule: Ethylacetat/Petrolether 4+6

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,04 mmol (15 mg), 5 %

dunkelgrünes Pulver

**Schmp:** Zersetzung ab 176 °C, 224 °C alles geschmolzen

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.95 (br d, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.38-2.42 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.44 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 2.52-2.62 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.90 (m<sub>c</sub>, 1 H, ArCHCH=CH), 4.14 (d, J = 9.6 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.74 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 5.97 (m, 1 H, CH=CH), 6.67 (s, 1 H, NH), 6.68 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 6.82 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.84 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar-6H), 7.56 (dd, J = 1.9, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 7.79 (br s, 1 H, Ar-9H), 9.91 (s, 1 H, OH) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub> (339,82 g/mol)

berechnet: C: 70,69 % H: 5,34 % N: 4,12 %

gefunden: C: 70,87 % H: 5,51 % N: 4,03 %

### 9.1.2.5 Von Estradiol abgeleitete Strukturen

#### 8-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (41)

Aus 10,3 mmol (1,27 g) p-Anisidin, 10 mmol (1,2 ml) 4-Methoxybenzaldehyd, 15,8 mmol (1,2 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1+9, zweite Säule: Ether/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 0,2 mmol (56 mg), 2%

grüngelbe Kristalle

**Schmp:** 121°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 2.08 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.39-2.5 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.66-2.78 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.63 (d, *J* = 10.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 3.78 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.9-4.0 (m, 1 H, ArCHNH), 5.69 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 5.93 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.63 (dd, *J* = 2.6, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.84 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.9, 7.33 (AA'BB', *J* = 8.5 Hz, 4 H, Ar'-H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub> (307,39 g/mol)

berechnet: C: 78,15 % H: 6,89 % N: 4,56 %

gefunden: C: 78,27 % H: 7,06 % N: 4,35 %

#### 4-(4-Hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (42)

Aus 21 mmol (2,3 g) 4-Aminophenol, 19,9 mmol (2,43 g) 4-Hydroxybenzaldehyd, 26,3 mmol (2 ml) Trifluoressigsäure und 30,5 mmol (2,5 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 4+6, zweite Säule: Ether/Petrolether 6+4

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 0,5 mmol (0,15 g), 3 %

Endo-Exogemisch: 77 % endo und 23 % exo

gelber Feststoff

**Schmp:** 93 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.64 (br dd, *J* = 9.1, 16.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.4-2.46 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.75-2.85 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.29 (d, *J* = 2.4 Hz 1 H, ArCHNH), 4.92 (s, 1 H, NH), 5.57 (m, 1 H, CH=CH), 5.74-5.79 (m, 1 H, CH=CH), 6.33 (dd, *J* = 2.7, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.41 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Ar-9H), 8.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.73, 7.22 (AA'BB', *J* = 8.5 Hz, 4 H, Ar'-H), 8.42 (s, 1 H, OH), 9.23 (s, 1 H, OH) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (279,33 g/mol)

berechnet: C: 77,40 % H: 6,13 % N: 5,01 %

gefunden: C: 77,42 % H: 5,95 % N: 5,22 %

#### **4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (43)**

Aus 10 mmol (1,2 g) p-Anisidin, 10,4 mmol (1,6 g) 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 3+7

**Ausbeute:** 2 mmol (0,643 g), 20 %

gelbbraune Kristalle

**Schmp:** 112 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.68 (br dd, *J* = 8.6, 15.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.4-2.46 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.86-2.97 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.6 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.18 (s, 1H, NH), 5.58 (m, 1 H, CH=CH), 5.83-5.87 (m, 1 H, CH=CH), 6.53 (dd, *J* = 2.7, 8.6 Hz, 1 H, Ar-7H) 6.62 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H,

Ar-9H), 6.67 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.82 (m, 2 H, Ar'-3'H, Ar'-5'H) 7.5 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, Ar'-6'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>2</sub> (325,38 g/mol)

berechnet: C: 73,83 % H: 6,20 % N: 4,30 %

gefunden: C: 73,73 % H: 6,42 % N: 4,29 %

#### 4-(2,6-Difluor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (44)

Aus 10,6 mmol (1,3 g) p-Anisidin, 8,7 mmol (1,5 g) 2,6-Difluor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 3+7

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 2,8 mmol (0,955 g), 32 %

weiße Kristalle

**Schmp:** 157 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.97$  (br dd,  $J = 8.9, 15.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.70-2.77 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.80-2.89 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.64 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.00 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.69 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, ArCHNH), 5.36 (s, 1H, NH), 5.62 (m, 1 H, CH=CH), 5.83 (m, 1 H, CH=CH), 6.52 (dd,  $J = 2.7, 8.6$  Hz, 1 H, Ar-7H) 6.58 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, Ar-6H), 6.61 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, Ar-9H), 6.73 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2 H, Ar'-H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (343,37 g/mol)

berechnet: C: 69,96 % H: 5,58 % N: 4,08 %

gefunden: C: 70,12 % H: 5,58 % N: 3,92 %

**4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (45)**

Aus 8 mmol (0,98 g) p-Anisidin, 7 mmol (1,2 g) 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 2+8

**Ausbeute:** 1,6 mmol (0,555 g), 23 %

goldene Kristalle

**Schmp:** 154 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.72-1.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.54-2.64 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.15-3.23 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.76 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.88 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.67 (m, 1 H, CH=CH), 5.81-5.86 (m, 1 H, CH=CH), 6.57-6.63 (m, 2 H, Ar-6H, Ar-7H) 6.66 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.85 (dd, J = 2.6, 8.7 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.94 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 7.57 (d, J = 8.7 Hz, 1 H, Ar'-6'H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub> (341,83 g/mol)

berechnet: C: 70,27 % H: 5,90 % N: 4,10 %

gefunden: C: 70,01 % H: 6,05 % N: 4,02 %

**4-(4-Chlor-2-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (45a)**

Aus 8 mmol (0,98 g) p-Anisidin, 7 mmol (1,2 g) 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift **9.1.2.1.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 2+8

**Ausbeute:** 0,8 mmol (0,267 g), 11 % Nebenprodukt

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>2</sub> (341,83 g/mol)

gelbe Kristalle

**Schmp:** nb

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.72-1.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.50-2.59 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.09-3.17 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.75 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (br d, J = 8.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.83 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.65 (m, 1 H, CH=CH), 5.79-5.83 (m, 1 H, CH=CH), 6.56-6.61 (m, 2 H, Ar-6H, Ar-7H), 6.65 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.86 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 6.97 (dd, J = 2.0, 8.2 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 7.49 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, Ar'-6'H) ppm.

**Elementaranalyse:** nicht CHN rein

#### 4-(2,6-Dichlor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (46)

Aus 11,3 mmol (1,39 g) p-Anisidin, 9,6 mmol (1,96 g) 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 24,4 mmol (2 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Umkristallisation:** Ether

**Ausbeute:** 6,4 mmol (2,4 g), 67 %

hellgelbes Pulver

**Schmp:** 145 °C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.99 (br d, J = 16.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.50-2.6 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.6-3.69 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.1 (m<sub>c</sub>, 1 H, ArCHCH=CH), 4.83 (d, J = 11.8 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.77-5.83 (m, 1 H, CH=CH), 5.88-5.93 (m, 1 H, CH=CH), 6.76 (dd, J = 2.5, 8.7 Hz, 1 H, Ar-7H) 6.9 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.93 (s, 2 H, Ar'-3'H, Ar'-5'H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, Ar-6H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (376,28 g/mol)

berechnet: C: 63,84 % H: 5,09 % N: 3,72 %

gefunden: C: 64,06 % H: 5,06 % N: 3,87 %

**4-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (47)**

Aus 1,3 mmol (0,427 g) 4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (**43**) nach Vorschrift **9.1.2.4.3**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1

**Ausbeute:** 0,6 mmol (0,193 g), 50 %

braune Kristalle

**Schmp:** 173 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.67 (br dd, *J* = 9.1, 15.8 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.39-2.49 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.81-2.91 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 4.92 (s, 1H, **NH**), 5.57 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.74-5.78 (m, 1 H, **CH=CH**), 6.35 (dd, *J* = 2.5, 8.2 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 6.42 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, **Ar-9H**), 6.52-6.56 (m, 2 H, **Ar'-3'H, Ar-6H**), 6.63 (dd, *J* = 2.3, 8.4 Hz, 1 H, **Ar'-5'H**), 7.35 (t, *J* = 8.6 Hz, 1 H, **Ar'-6'H**), 8.46 (s, 1 H, **OH**), 9.74 (d, *J* = 0.8 Hz, 1 H, **OH**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>2</sub> (297,32 g/mol)

berechnet: C: 72,71 % H: 5,42 % N: 4,71 %

+1/2 H<sub>2</sub>O: C: 70,58 % H: 5,59 % N: 4,57 %

gefunden: C: 70,47 % H: 5,94 % N: 4,56 %

**4-(2,6-Difluor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (48)**

Aus 1,4 mmol (0,472 g) 4-(2,6-Difluor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (**44**) nach Vorschrift **9.1.2.4.3**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1

**Ausbeute:** 1,2 mmol (0,369 g), 84 %

Endo-Exogemisch: 75 % endo und 25 % exo

grüngraue Kristalle

**Schmp:** 200 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.91-2.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.69-2.82 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H), CH<sub>2</sub>CHCH), 3.93 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.61 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.09 (s, 1H, NH), 5.62 (m, 1 H, CH=CH), 5.72-5.76 (m, 1 H, CH=CH), 6.34 (dd, J = 2.7, 8.4 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.42-6.48 (m, 4 H, Ar'-3'H, Ar'-5'H, Ar-6H, Ar-9H), 8.63 (s, 1 H, OH), 10.25 (s, 1 H, OH) ppm.

Zu einem Drittel ist die Exoform enthalten

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (315,31 g/mol)

berechnet: C: 68,56 % H: 4,80 % N: 4,44 %

gefunden: C: 68,62 % H: 4,96 % N: 4,48 %

#### **4-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (49)**

Aus 1,7 mmol (0,570 g) 4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (**45**) nach Vorschrift **9.1.2.4.3**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1

**Ausbeute:** 0,9 mmol (0,292 g), 55 %

beigefarbene Kristalle

**Schmp:** 202 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.56-1.64 (br dd, J = 8.7, 15.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.40-2.49 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.90-3.01 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.92 (d, J = 8.7 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.58 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, ArCHNH), 4.94 (s, 1 H, NH), 5.58 (m, 1 H, CH=CH), 5.75-5.79 (m, 1 H, CH=CH), 6.35 (dd, J = 2.7, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.43 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.54 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.78 (dd, J = 2.5, 8.5 Hz, 1 H, Ar'-5'H), 6.82 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, Ar'-3'H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, Ar'-6'H), 8.45 (s, 1 H, OH), 9.75 (s, 1 H, OH) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>2</sub> (313,78 g/mol)

berechnet: C: 68,9 % H: 5,14 % N: 4,46 %

gefunden: C: 68,77 % H: 5,22 % N: 4,24 %

**4-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (50)**

Aus 1,4 mmol (0,540 g) 4-(2,6-Dichlor-4-methoxyphenyl)-8-methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (**46**) nach Vorschrift **9.1.2.4.3**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1

**Ausbeute:** 0,34 mmol (0,119 g), 24 %

grüner Feststoff

**Schmb:** 130-134 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.81 (br d, *J* = 15.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.36-2.43 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 3.28-3.36 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH (unter dem Wasserpeak)), 3.81 (m<sub>c</sub>, 1 H, ArCHCH=CH), 4.33 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, Ar-CHNH), 5.18 (s, 1 H, NH), 5.66-5.7 (m, 1 H, CH=CH), 5.84-5.98 (m, 1 H, CH=CH), 6.38 (dd, *J* = 2.6, 8.5 Hz, 1 H, Ar-7H), 6.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, Ar-6H), 6.60 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Ar-9H), 6.86 (s, 2 H, Ar'-3'H, Ar'-5'H), 8.41 (s, 1H, OH), 10.32 (s, 1 H, OH) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (348,22 g/mol)

berechnet: C: 62,09 % H: 4,34 % N: 4,02 %

+H<sub>2</sub>O: C: 59,03 % H: 4,68 % N: 3,82 %

gefunden: C: 59,16 % H: 4,98 % N: 3,67 %

**8-Methoxy-4-(4-methylthio)phenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin (51)**

Aus 10,8 mmol (1,33 g) p-Anisidin, 10 mmol (1,3 ml) p-Methylthiobenzaldehyd, 15,8 mmol (1,2 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 1+9

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 0,3 mmol (0,1 g), 3 %

weiße Kristalle

**Schmp:** 129 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 2.83 (dd, *J* = 8.8, 16.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.5 (s, 3 H, SCH<sub>3</sub>), 2.58-2.65 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.93-3.00 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.76 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.53 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, ArCHNH), 5.6 (m, 1 H, CH=CH), 5.8 (m<sub>c</sub>, 1 H, CH=CH), 6.57-6.62 (m, 2 H, Ar-6H, Ar-7H), 6.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Ar-9H), 7.26, 7.36 (AA'BB', *J* = 8.0 Hz, 4 H, AA'BB' (mit CDCl<sub>3</sub>-Peak), Ar'-H) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NOS (323,45 g/mol)

berechnet: C: 74,27 % H: 6,54 % N: 4,33 %

gefunden: C: 74,32 % H: 6,77 % N: 4,41 %

**8-Methoxy-4-(4-nitrophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (52)**

Aus 11 mmol (1,35 g) p-Anisidin, 11,1 mmol (1,67 g) p-Nitrobenzaldehyd, 15,8 mmol (1,2 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 9,8 mmol (3,15 g), 89 %

braunes Pulver

**Schmp:** 214 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ = 1.59 (dd, *J* = 8.8, 15.7 Hz, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.35-2.41 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.91-3.03 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.67 (s, 3 H, **OCH<sub>3</sub>**), 4.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.61 (br s, 1 H, **ArCHNH**), 5.49 (br s, 1 H, **NH**), 5.58 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.9 (m<sub>c</sub>, 1 H, **CH=CH**), 6.57 (dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz, 1 H, **Ar-7H**), 6.66 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, **Ar-9H**), 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, **Ar-6H**), 7.75, 8.26 (AA'BB', *J* = 8.6 Hz, 4 H, **Ar'-H**) ppm.

**Elementaranalyse:** C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (322,36 g/mol)

berechnet: C: 70,79 % H: 5,63 % N: 8,69 %

gefunden: C: 70,88 % H: 5,86 % N: 8,76 %

#### 9.1.2.5.1 Vorschrift zur Reduktion von Nitrogruppen mit SnCl<sub>2</sub>

3 mmol der zu reduzierenden Verbindung und 3 g SnCl<sub>2</sub> werden mit 10 ml absolutem Ethanol versetzt und 1 Stunde auf 70 °C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen und durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> auf pH 8-9 gebracht. Die wässrige Phase wird dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.

#### 4-(8-Methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-yl)anilin (53)

Aus 3,3 mmol (1,062 g) 8-Methoxy-4-(4-nitrophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin (**52**) und 2,98 g SnCl<sub>2</sub> nach Vorschrift **9.1.2.5.1**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Ether/Petrolether 1+1

**Ausbeute:** 1,4 mmol (0,4 g), 42 %

gelbe Kristalle

**Schmp:** 125 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.87 (dd, *J* = 8.6, 16.2 Hz, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.61-2.67 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CH=CH** (1 H)), 2.90-2.97 (m, 1 H, **CH<sub>2</sub>CHCH**), 3.75 (s, 3 H, **OCH<sub>3</sub>**), 4.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, **ArCHCH=CH**), 4.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, **ArCHNH**), 5.63-5.72 (m, 1 H, **CH=CH**), 5.82 (m<sub>c</sub>, 1 H, **CH=CH**), 6.56 (d,

$J = 8.6$  Hz, 1 H, Ar'-6'**H**), 6.60 (dd,  $J = 2.0, 8.7$  Hz, 1 H, Ar'-7'**H**), 6.65 (br s, 1 H, Ar'-9'**H**), 6.69, 8.26 (AA'BB',  $J = 8.0$  Hz, 4 H, Ar-**H**) ppm.

**MS** (EI, 125 °C):  $m/z$  (%) = 292 [ $M^{+}$ ] (100), 277 (5), 187 (28)

**Elementaranalyse:** C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O (292,37 g/mol)

berechnet: C: 78,05 % H: 6,90 % N: 9,58 %

gefunden: C: 78,20 % H: 7,02 % N: 9,75 %

#### 9.1.2.5.2 Allgemeine Vorschrift zur Etherspaltung mit Bortribromid

1 mmol der zu entschützenden Verbindung wird in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend werden vorsichtig 2,5 mmol BBr<sub>3</sub> (Schlenk 2006), (Schwegler 2009) dazugetropft. Der Ansatz wird über Nacht (0 °C → RT) gerührt. Danach kühlt man wieder auf 0 °C ab und methanolisiert das überschüssige BBr<sub>3</sub>. Dazu tropft man vorsichtig Methanol und lässt den Ansatz abreagieren. Anschließend wird das Lösungsmittel abgedampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Fließmittelgemisch dient Dichlormethan/Methanol 9+1.

#### 4-(4-Aminophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-ol (**54**)

Aus 1 mmol (0,3 g) 4-(8-Methoxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-yl)anilin (**53**) und 2,5 mmol (0,24 ml) BBr<sub>3</sub> nach Vorschrift **9.1.2.5.2**.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1

**Umkristallisation:** Dichlormethan/Methanol

**Ausbeute:** 0,12 mmol (34 mg), 12 %, (68 % als HBr)

braune Kristalle

**Schmp:** 112 °C

**Schmb:** 245-248 °C (vorliegend als Salz)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.67$  (dd,  $J = 8.6, 15.8$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.4-2.48 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1 H)), 2.74-2.81 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 3.89 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H, ArCHCH=CH), 4.22 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, ArCHNH), 4.81 (s, 1 H, NH), 4.90 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.57 (m, 1 H, CH=CH), 5.73-5.78 (m, 1 H, CH=CH),

6.33 (dd,  $J = 2.5, 8.4$  Hz, 1 H, Ar-7H), 6.04 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, Ar-9H), 7.54, 7.06 (AA'BB',  $J = 8.4$  Hz, 5 H, Ar-6H, Ar'-H) ppm.

**MS** (EI, 200 °C):  $m/z$  (%) = 278 [ $M^{+}$ ] (100), 186 (10)

**Elementaranalyse:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O (278,35 g/mol)

berechnet: C: 77,67 % H: 6,52 % N: 10,06 %

gefunden: C: 77,89 % H: 6,69 % N: 10,33 %

### 9.1.2.6 Dimere Verbindung

#### 1,2-bis(4-(6-Brombenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-yl)ethan (55)

Aus 4,9 mmol (1,03 g) 4,4'-Ethylidianilin, 9,8 mmol (2,24 g) 6-Bromopiperonal, 13 mmol (1 ml) Trifluoressigsäure und 12,2 mmol (1 ml) Cyclopentadien nach Vorschrift 9.1.2.1.1.

**Umkristallisation:** Isopropanol

**Ausbeute:** 2,7 mmol (2,1 g), 55 %

braunes Pulver

**Schmp:** Zersetzung 247-250 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta = 1.81$  (br dd,  $J = 8.8, 15.5$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.57-2.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH (1H)), 2.73-2.79 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.12-3.23 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CHCH), 4.09 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H, ArCHCH=CH), 4.88 (s, 2 H, ArCHNH), 5.68 (m, 2 H, CH=CH), 5.86 (m, 2 H, CH=CH), 6.00 (d,  $J = 4.1$  Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>O), 6.58 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, Ar-6H), 6.85 (s, 2 H, Ar-9H), 6.90 (d,  $J = 22.4$  Hz, 2 H, Ar-7H), 7.03 (s, 2 H, Ar'-4'H), 7.19 (s, 2 H, Ar'-7'H) ppm.

**MS** (EI, 250 °C):  $m/z$  (%) = 767 [ $M^{+}$ ] (6), 382 (100)

**Elementaranalyse:** C<sub>40</sub>H<sub>33</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (766,52 g/mol)

berechnet: C: 62,68 % H: 4,47 % N: 3,65 %

gefunden: C: 62,71 % H: 4,45 % N: 3,66 %

## 9.2 Biochemischer und pharmakologischer Teil

### 9.2.1 Verwendete Geräte

Analysenwaage BP211D	Sartorius
Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH
Brutschrank HERAcell 240 CO <sub>2</sub> Incubator	Heraeus
Ein- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf
8-Kanalabsauger	Integra Bioscience
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik
Mikroplattenreader FLASHScan S12	Analytik Jena
Mikroskop Axiovert 25C	Zeiss
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss
Multilabel Counter mit Injektor 1420 Viktor <sup>2</sup>	Wallac / Perkin Elmer
Multipette® plus	Eppendorf
Neubauerzählkammer	Marienfeld
Pipettierhilfe PIPETBOY acu	Integra Bioscience
Schüttelmaschine Gerhardt LS10	Gerhardt
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin
Vakuumpumpe KNF Neuberger Laboport	KNF Neuberger GmbH
Vortexer Genie2	IKA Labortechnik
Wasserbad Haake fisons	Haake
Zentrifuge Megafuge® 1.0 R	Heraeus

### 9.2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen	Braun
Einmalspritzen	Braun
Pasteurpipetten	Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Sarstedt
Spitzen für Multipette® plus	Eppendorf
Spritzenfilter 0,22 µm	Roth
UV-Lampe UVC30	Thermo Scientific
96-Well-Mikrotiterplatten (steril)	Nunc
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt

### 9.2.3 Reagenzien und Lösungen

Akasolv	Akadia-Chemie
Cell Culture Lysis Reagent	Promega
Dextran 60 (MG: 60000-90000)	Sigma
DMEM mit/ohne Phenolrot, 4,5 % Glucose	PAA Laboratories
DMSO/DMF p.a.	Roth
Ecoscint H	National Diagnostics
Ethanol 96%	Merck
17β-Estradiol	Fluka
[ <sup>3</sup> H]-Estradiol	Perkin Elmer
FCS	Biochrom AG
Glutardialdehyd (25 %ige wässrige Lösung)	Merck

Kristallviolett	Roth
Luciferaseassay-Reagenz (Bright-Glo™)	Promega
Norit A Aktivkohle	Serva
PBS: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, KCl	Roth/Merck/Sigma
TransIT LT1 Transfection Reagent	Mirus
Trypsin	Sigma

**ct-FCS:**

5 % Norit A, 0,05 % Dextran 60 in Tris-Puffer 200 ml (pH 7,5), abzentrifugieren, Pellet mit 500 ml FCS 3 Stunden bei 4 °C rühren und abfiltrieren, genauere Anweisung siehe Ricarda Hoffmann (Hoffmann 2007).

**Glutardialdehydlösung 1 %:**

12,5 ml PBS und 0,5 ml Glutardialdehyd 25 %

**Kristallviolettlösung:**

0,02 % Kristallviolett in Aqua dest.

**PBS:**

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0 g NaCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl

**Tris-Puffer:**

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>

**Trypsinlösung:**

0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS

## 9.2.4 Biologisches Material

### MCF-7:

humane, hormonabhängige Mammakarzinomzelllinie

### MDA-MB-231:

humane, hormonunabhängige Mammakarzinomzelllinie

### U2OS:

humane Osteosarkomzelllinie

### Plasmide: p(ERE)<sub>2</sub>luc<sup>+</sup>

pSG5-ER $\alpha$

pSG5-ER $\beta$

## 9.2.5 Allgemeine Kultivierungsbedingungen

### 9.2.5.1 Zellkulturmedium

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eadle Medium) mit einem Zusatz von 5 % FCS, in gesättigter Wasserdampfatmosfera bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

### 9.2.5.2 Passagieren und Mediumwechsel

Alle Arbeiten mit den Zellen bis zum Abstoppen eines Zelltests werden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen werden einmal in der Woche passagiert. Drei bis vier Tage nach der Passage wird ein Mediumwechsel vorgenommen. U2OS Zellen werden zweimal pro Woche passagiert. Für das Passagieren wird das alte Medium aus den 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 0,05 %igen Trypsinlösung benetzt. Anschließend werden die Zellen für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Jetzt lassen sich die Zellen mit 5 ml frischem Medium leicht von der Zellkulturflaschenwand spülen und werden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Von den MCF-7 und MDA-MB-231 Zellsuspensionen werden je 0,5 ml in eine neue Zellkulturflasche mit 5 ml frischem Medium überführt. Von der U2OS

Zellsuspension 0,3 ml. Für den Mediumwechsel wird das alte Medium abgesaugt und durch 5 ml Frisches ersetzt.

### **9.2.5.3 Zellzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer. Sie besitzt acht Quadrate mit einem jeweiligen Füllvolumen von 0,1  $\mu$ l. Nach Befuchtung der Ränder wird ein Deckgläschen vorsichtig bis zur Ausbildung der Newton'schen Ringe auf die Zählkammer gedrückt. Anschließend wird die gut durchmischte Zellsuspension zwischen Deckgläschen und Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden die Zellen in den einzelnen Quadraten gezählt und gemittelt. Multipliziert man den Mittelwert mit  $10^4$  erhält man die Zellzahl pro ml.

## **9.2.6 Zytotoxizitätsuntersuchungen**

### **9.2.6.1 Aussaat der Zellen**

Zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes nach 96 h werden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Dazu werden die Zellen wie beim Passagieren behandelt und nach Vereinzelung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen können mit Trypanblau angefärbt und dann nicht mitgezählt werden. Es werden pro Vertiefung 750 MCF-7- oder MDA-MB-231- Zellen in 100  $\mu$ L Medium ausgesät. Für die  $IC_{50}$ -Bestimmung an der U2OS Zelllinie werden 400 Zellen in 100  $\mu$ l pro Well benötigt. Eine entsprechende Menge an Zellsuspension wird mit Medium so verdünnt, dass die gewünschte Anzahl an Zellen pro 100  $\mu$ l Medium enthalten ist. Anschließend werden je 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension mit einer Mehrkanalpipette in die Vertiefungen der 96-Lochplatten pipettiert. Die Platten werden für drei Tage in einem Brutschrank inkubiert, damit die Zellen anwachsen können.

### **9.2.6.2 Substanzzugabe**

Für die  $IC_{50}$ -Bestimmung werden von den Substanzen Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM und 1,25 mM in DMSO oder DMF hergestellt. Liegt der  $IC_{50}$ -Wert unterhalb dieser Konzentrationen, werden die Verdünnungsreihen so angepasst, dass möglichst zwei Konzentrationen

oberhalb und zwei Konzentrationen unterhalb des  $IC_{50}$ -Wertes liegen. Von den Verdünnungen werden je 5  $\mu$ l mit 2,5 ml Medium in einem tip-tub gemischt und 100  $\mu$ l dieser Lösung nach unten stehendem Pipettierschema auf die 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Als Vergleichssubstanz wird Cisplatin in den Konzentrationen 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM und 0,63 mM in DMF eingesetzt.

DMF	Cisplatin			5	10	DMSO	Substanz 1			10	20
	0,63	1,25	2,5				1,25	2,5	5		
DMSO	Substanz 2			10	20	DMSO	Substanz 3			10	20
	1,25	2,5	5				1,25	2,5	5		

**Tab. 20:** Die Konzentrationen sind in  $\mu$ mol/l angegeben.

Als Negativkontrolle werden in den Reihen eins und sieben 100  $\mu$ l Medium mit 0,2 % des entsprechenden Lösungsmittels pro Vertiefung pipettiert. Nach der Substanzzugabe wird eine Platte zur Bestimmung der initialen Zelldichte wie unten beschrieben abgestoppt.

### 9.2.6.3 Abstoppen des Zelltests

Für die  $IC_{50}$ -Bestimmung wird der Zelltest 96 h nach der Substanzzugabe abgestoppt. Das Medium wird abgesaugt und es werden in jede Vertiefung 100  $\mu$ l Abstopplösung (1 %ige Glutardialdehydlösung in PBS) pipettiert. Nach einer halben Stunde wird die Lösung abgeklopft und durch 180  $\mu$ l PBS pro Well ersetzt. Anschließend können die Platten bis zum Färben im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 9.2.6.4 Färben und Auswertung des Zelltests

Zum Färben des Zelltests wird das PBS entfernt und 100  $\mu$ l einer 0,02 %igen Kristallviolettlösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer halben Stunde werden die Platten für 30 Minuten mit Wasser gewaschen. Anschließend werden die Platten gut ausgeklopft und in jede Vertiefung 180  $\mu$ l 70 %iger Ethanol pipettiert. Nach 3 h auf der Schüttelmaschine können die Platten photometrisch bei 590 nm

vermessen werden. Die erhaltenen Werte werden auf die Lösungsmittelkontrolle und auf die Ausgangszellmasse bezogen:

$$T / C_{\text{corr}} [\%] = \frac{T - C_0}{C - C_0} \cdot 100$$

**Abb. 73:**  $T/C_{\text{corr}}$ :

T: Mittelwert der Extinktionen der jeweiligen Substanzverdünnungen

C: Mittelwert der Extinktionen der Lösungsmittelblindwerte

$C_0$ : Mittelwert der Extinktionen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ )

### 9.2.6.5 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Die  $T/C_{\text{corr}}$ -Werte werden nach oben beschriebener Gleichung berechnet und gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentrationen aufgetragen. In Origin Pro 7.5G wird mit Hilfe der Boltzmann-Funktion der sigmoide Kurvenverlauf ermittelt. Als  $IC_{50}$ -Wert kann diejenige Substanzkonzentration aus der erhaltenen Kurve errechnet werden, bei der der  $T/C_{\text{corr}}$ -Wert 50 % annimmt.

## 9.2.7 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Estrogenität und Antiestrogenität

### 9.2.7.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen

Die U2OS Zellen werden wie bei den Allgemeinen Kultivierungsbedingungen unter 9.2.5 beschrieben kultiviert. Vier Tage vor der Aussaat eines Tests wird auf phenolrotfreies Medium mit 5 % ct-FCS und 1 % Natriumpyruvat passagiert. Es werden 10000 Zellen pro Well in weiße 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät.

### 9.2.7.2 Transfektion

Die Transfektion erfolgt 24 Stunden nach der Aussaat. Die im Folgenden angegebenen Mengen gelten für eine Platte. Für die Transfektion werden 54,06  $\mu\text{l}$  PBS mit 10,812  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz TransIT gemischt. Als zweite Mischung werden 31,8  $\mu\text{l}$  PBS, 5,3  $\mu\text{l}$  Reporterplasmid  $p(\text{ERE})_2\text{-luc}^+$  und entweder 1,06  $\mu\text{l}$  pSG5-ER $\alpha$  oder 1,06  $\mu\text{l}$  pSG5 $\beta$  vereint. Das zweite Gemisch wird dann zu der Lösung aus PBS und TransIT gegeben und 20 Minuten unter der LAF-Box inku-

biert. Anschließend werden 6,254 ml Medium vorsichtig dazugegeben und 60  $\mu$ l dieser Mischung in jedes Well auf die Zellen pipettiert.

### 9.2.7.3 Substanzzugabe

5-6 Stunden nach der Transfektion erfolgt die Substanzzugabe. Dazu wird das alte Medium abgesaugt und durch Neues und die entsprechenden Substanzverdünnungen ersetzt.

#### Herstellen der Verdünnungsplatten

Für die Substanzzugabe werden zunächst Substanzverdünnungen auf einer 96-Well-Platte hergestellt (**Abb. 74**). Dazu werden in jedes Well 90  $\mu$ l PBS pipettiert. Anschließend kommen in die ersten drei Wells der Reihe A je 10  $\mu$ l der Estriolstammlösung ( $10^{-5}$  M) und in die übrigen neun Wells je 10  $\mu$ l der jeweiligen Substanzstammlösung ( $10^{-2}$  M). Jeweils drei Spalten enthalten die gleiche Substanz.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E2		$10^{-6}$ M	Substanz 1		$10^{-3}$ M	Substanz 2		$10^{-3}$ M	Substanz 3		$10^{-3}$ M
B			$10^{-7}$ M			$10^{-4}$ M			$10^{-4}$ M			$10^{-4}$ M
C			$10^{-8}$ M			$10^{-5}$ M			$10^{-5}$ M			$10^{-5}$ M
D			$10^{-9}$ M			$10^{-6}$ M			$10^{-6}$ M			$10^{-6}$ M
E			$10^{-10}$ M			$10^{-7}$ M			$10^{-7}$ M			$10^{-7}$ M
F			$10^{-11}$ M			$10^{-8}$ M			$10^{-8}$ M			$10^{-8}$ M
G			$10^{-12}$ M			$10^{-9}$ M			$10^{-9}$ M			$10^{-9}$ M
H			$10^{-13}$ M			$10^{-10}$ M			$10^{-10}$ M			$10^{-10}$ M

**Abb. 74:** Pipettierschema der Verdünnungsplatte für den Luciferase-Assay

Mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette werden die Lösungen der Reihe A gut durchmischt. 10  $\mu$ l der Wells in Reihe A werden in die Reihe B übertragen. Nach erneutem Mischen wird in gleicher Weise bis zur Reihe H verfahren. In jeder Reihe erfolgt also eine Verdünnung von 1:10. Die Pipettenspitzen werden zwischen den einzelnen Reihen gewechselt.

#### Übertragen der Verdünnungsplatte auf die Testplatte

##### Testung auf Estrogenität

Für die Testung auf Estrogenität wird das alte Medium abgesaugt und durch 90  $\mu$ l Neues pro Vertiefung ersetzt. In Reihe A werden 10  $\mu$ l einer 1:100 verdün-

ten DMSO-Lösung hinzupipettiert. Ab Reihe B werden die Lösungen der Verdünnungsplatte übertragen. Dazu werden aus der Reihe B der Verdünnungsplatte 10 µl je Well in die Reihe B der Testplatte überführt. In gleicher Weise wird bis zur Reihe H verfahren. Bei der Übertragung erfolgt wieder eine Verdünnung von 1:10, sodass auf der Testplatte folgende Konzentrationen, wie in **Abb. 75** ersichtlich, vorliegen. Estradiol liegt in den Konzentrationen  $10^{-8}$  bis  $10^{-14}$  mol/l und die Testsubstanzen in  $10^{-5}$  bis  $10^{-11}$  mol/l vor. Es können pro Platte vier Verbindungen in je 7 Konzentrationen getestet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO			DMSO			DMSO			DMSO	
B		E2	$10^{-8}$ M	Substanz 1	$10^{-5}$ M	Substanz 2	$10^{-5}$ M	Substanz 3	$10^{-5}$ M			$10^{-5}$ M
C			$10^{-9}$ M			$10^{-6}$ M			$10^{-6}$ M			$10^{-6}$ M
D			$10^{-10}$ M			$10^{-7}$ M			$10^{-7}$ M			$10^{-7}$ M
E			$10^{-11}$ M			$10^{-8}$ M			$10^{-8}$ M			$10^{-8}$ M
F			$10^{-12}$ M			$10^{-9}$ M			$10^{-9}$ M			$10^{-9}$ M
G			$10^{-13}$ M			$10^{-10}$ M			$10^{-10}$ M			$10^{-10}$ M
H			$10^{-14}$ M			$10^{-11}$ M			$10^{-11}$ M			$10^{-11}$ M

**Abb. 75:** Pipettierschema der Testplatte für den Luciferase-Assay

#### Testung auf Antiestrogenität

Bei der Testung auf Antiestrogenität wird in gleicher Weise wie bei der Testung auf Estrogenität verfahren, nur dass das frische Medium zusätzlich eine bestimmte Menge an Estradiol enthält. Für die Testung an ER $\alpha$  wird eine Konzentration von  $3 \cdot 10^{-11}$  M und bei ER $\beta$  von  $3 \cdot 10^{-10}$  M benötigt.

#### **9.2.7.4 Abstoppen des Zelltests**

21 h nach erfolgter Substanzzugabe wird das Medium abgesaugt und die Zellen mittels Cell Culture Lysis Reagent lysiert. Dazu werden 30 µl von diesem Reagenz in jedes Well pipettiert und die Platten dann 20 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe des Luciferaseassay-Reagenz (30 µl je Well) wird die Lumineszenz (in relative light units: RLU) für 10 s an einem Luminometer gemessen.

#### **9.2.7.5 Auswertung**

Die Estrogenität wird in Prozent angegeben, bezogen auf die Positivkontrolle  $3 \cdot 10^{-9}$  M Estradiol. Das Plateau der sigmoidalen Kurve wird als 100 % gesetzt.

### **9.3 Fluoreszenzspektroskopie**

#### **9.3.1 Gerät**

Fluorimeter F4500 (Hitachi)

#### **9.3.2 Aufnahme der Fluoreszenzspektren**

Für die Aufnahme der Spektren werden ausgehend von einer  $10^{-2}$  M Stammlösung in Methanol, Verdünnungen in den Konzentrationen  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \cdot 10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  M hergestellt. Die Messungen werden mit einer Scangeschwindigkeit von 240 nm/min für 2D-Spektren und 1200 nm/min für 3D-Spektren durchgeführt. Der Exzitations- und Emissionsspalt beträgt je 5 nm.



## 10 Literatur

Albanito, L., A. Madeo, et al. (2007). "G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) Mediates Gene Expression Changes and Growth Response to 17 -Estradiol and Selective GPR30 Ligand G-1 in Ovarian Cancer Cells." Cancer Research **67**(4): 1859-1866.

Ariazi, E. A., E. Brailoiu, et al. (2010). "The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells." Cancer Research **70**(3): 1184-1194.

Bai, Z. (2006). Substituted Stilbenes and 1,2-Diaryl-1,2-diazidoethanes as Potential Anticancer Agents: Syntheses and Estrogenic / Antiestrogenic Properties in MCF-7-2a Cells, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Baudelle, R., P. Melnyk, et al. (1998). "Parallel synthesis of polysubstituted tetrahydroquinolines." Tetrahedron **54**: 4125-4140.

Becker H. G. O., Berger W., et al. (1993). Organikum, Johann Ambrosius Barth Leipzig, Berlin, Heidelberg.

Bellamy, F. D. and K. Ou (1984). "Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in nonacidic and nonaqueous medium." Tetrahedron Lett. **25**: 839-842.

Benton, F. L. and T. E. Dillon (1942). "Cleavage of ethers with boron bromide. I. Some common ethers." J. Am. Chem. Soc. **64**: 1128-1129.

Biberger, C. and E. von Angerer (1998). "1-Benzyl-2-phenylindole- and 1,2-diphenylindole-based antiestrogens. Estimation of agonist and antagonist activities in transfection assays." J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **64**: 277-285.

Bologa, C. G., C. M. Revankar, et al. (2006). "Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30." Nature Chemical Biology **2**(4): 207-212.

Brzozowski, A. M., A. C. W. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor." Nature (London) **389**: 753-758.

Burai, R., C. Ramesh, et al. (2010). "Highly efficient synthesis and characterization of the GPR30-selective agonist G-1 and related tetrahydroquinoline analogs." Organic & Biomolecular Chemistry **8**(9): 2252.

Cailleau, R., R. Young, et al. (1974). "Breast tumor cell lines from pleural effusions." J Natl Cancer Inst **53**: 661-674.

Carmeci, C., D. A. Thompson, et al. (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." Genomics **45**: 607-617.

Cowley, S. M., S. Hoare, et al. (1997). "Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA." J. Biol. Chem. **272**: 19858-19862.

de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**: 725-737.

Dennis, M. K., R. Burai, et al. (2009). "In vivo effects of a GPR30 antagonist." Nature Chemical Biology **5**(6): 421-427.

Denton, R. R., N. J. Koszewski, et al. (1992). "Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding." J. Biol. Chem. **267**: 7263-7268.

Dettmann, S. (2006). Synthese und pharmakologische Untersuchung neuer Benzimidazole als fluoreszierende Liganden des Estrogenrezeptors, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Engel, L. W. and N. A. Young (1978). "Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review." Cancer Res. **38**: 4327-4339.

Filardo, E., J. Quinn, et al. (2007). "Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane." Endocrinology **148**(7): 3236-3245.

Filardo, E. J. (2002). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer." J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **80**: 231-238.

Filardo, E. J., C. T. Graeber, et al. (2006). "Distribution of GPR30, a Seven Membrane-Spanning Estrogen Receptor, in Primary Breast Cancer and its Association with Clinicopathologic Determinants of Tumor Progression." Clinical Cancer Research **12**(21): 6359-6366.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." Mol. Endocrinol. **14**: 1649-1660.

Fleming, I. (1988). Grenzorbitale und Reaktionen chemischer Verbindungen.

Funakoshi, T., A. Yanai, et al. (2006). "G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane." Biochem. Biophys. Res. Commun. **346**: 904-910.

Gillies, R. J., N. Didier, et al. (1986). "Determination of cell number in monolayer cultures." Anal. Biochem. **159**: 109-113.

Gust, R. (1987). Entwicklung von Platinkomplexen mit einer spezifischen Wirkung am Mammacarcinom, Universität Regensburg.

Haas, E., I. Bhattacharya, et al. (2009). "Regulatory Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor for Vascular Function and Obesity." Circ. Res. **104**: 288-291.

Haas, E., M. R. Meyer, et al. (2007). "Differential Effects of 17 -Estradiol on Function and Expression of Estrogen Receptor , Estrogen Receptor , and GPR30 in Arteries and Veins of Patients With Atherosclerosis." Hypertension **49**(6): 1358-1363.

Heino, T. J., A. S. Chagin, et al. (2008). "The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone." J. Endocrinol. **197**: R1-R6.

Ho, K. J. and J. K. Liao (2002). "Nonnuclear Actions of Estrogen." Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. **22**: 1952-1961.

Hoffmann, R. (2007). Synthese und pharmakologische Untersuchung neuer Triaryl-1H-pyrrole mit estrogenen, zytotoxischen und COX-inhibitorischen Eigenschaften, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Horwitz, K. B., M. E. Costlow, et al. (1975). "MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors." Steroids **26**: 785-795.

Jensen, E. V. and E. R. DeSombre (1973). "Estrogen-receptor interaction." Science **182**: 126-134.

Joab, I., C. Radanyi, et al. (1984). "Common nonhormone binding component in nontransformed chick oviduct receptors of four steroid hormones." Nature (London) **308**: 850-853.

Kanda, N. and S. Watanabe (2003). "17 $\beta$ -Estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages." J. Invest. Dermatol. **121**: 771-780.

Kanda, N. and S. Watanabe (2003). "17 $\beta$ -estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression." J. Invest. Dermatol. **121**: 1500-1509.

Kanda, N. and S. Watanabe (2004). "17 $\beta$ -Estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression." J. Invest. Dermatol. **123**: 319-328.

Katzenellenbogen, B. S., M. M. Montano, et al. (1997). "Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer." Breast Cancer Res. Treat. **44**: 23-38.

Kobayashi, S., I. Hachiya, et al. (1993). "Scandium trifluoromethanesulfonate (Sc(OTf)<sub>3</sub>). A novel reusable catalyst in the Diels-Alder reaction." Tetrahedron Lett. **34**: 3755-3758.

Kuhn, J., O. A. Dina, et al. (2008). "GPR30 estrogen receptor agonists induce mechanical hyperalgesia in the rat." Eur J Neurosci **27**: 1700-1709.

Kuiper, G. G. J. M., B. Carlsson, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ." Endocrinology **138**: 863-870.

Le Goff, P., M. M. Montano, et al. (1994). "Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity." J. Biol. Chem. **269**: 4458-4466.

Lee, S. and S. Hahn (1995). "Model for binding of transcription factor TFIIIB to the TBP-DNA complex." Nature (London) **376**: 609-612.

Malek, D. (2006). Interaction of estrogen receptors and the TGF- $\beta$  signal transduction pathway – impact on migration of human breast cancer cells, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Martensson, U. E. A., S. A. Salehi, et al. (2009). "Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice." Endocrinology **150**: 687-698.

O'Dowd, B. F., T. Nguyen, et al. (1998). "Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes." Genomics **47**: 310-313.

Olde, B. and L. M. F. Leeb-Lundberg (2009). "GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology." Trends Endocrinol. Metab. **20**: 409-416.

Owman, C., P. Blay, et al. (1996). "Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues." Biochem. Biophys. Res. Commun. **228**: 285-292.

Pandey, D. P., R. Lappano, et al. (2009). "Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF." EMBO J **28**: 523-532.

Pettersson, K., K. Grandien, et al. (1997). "Mouse estrogen receptor  $\beta$  forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor  $\alpha$ ." Mol. Endocrinol. **11**: 1486-1496.

Ponten, J. and E. Saksela (1967). "Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours." Int J Cancer **2**: 434-447.

Prossnitz, E., L. Sklar, et al. (2008). "GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease." Trends in Pharmacological Sciences.

Prossnitz, E. R. and M. Barton (2009). "Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER." Prostaglandins Other Lipid Mediators **89**: 89-97.

Rajan, S. S., Y. Kim, et al. (to be published). "Crystal structure of human Estrogen Receptor Alpha Ligand-Binding Domain in complex with a Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1 Nr Box II Peptide and estrone ((8R,9S,13S,14S)-3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15, 16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-one)."

Renoir, J. M., T. Buchou, et al. (1986). "Involvement of a non-hormone-binding 90-kilodalton protein in the nontransformed 8S form of the rabbit uterus progesterone receptor." Biochemistry **25**: 6405-6413.

Revankar, C. M., D. F. Cimino, et al. (2005). "A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling." Science (Washington, DC, U. S.) **307**: 1625-1630.

Revankar, C. M., H. D. Mitchell, et al. (2007). "Synthetic Estrogen Derivatives Demonstrate the Functionality of Intracellular GPR30." ACS Chemical Biology **2**(8): 536-544.

Sanchez, E. R., S. Meshinchi, et al. (1987). "Demonstration that the 90-kilodalton heat shock protein is bound to the glucocorticoid receptor in its 9S nondeoxynucleic acid binding form." Mol. Endocrinol. **1**: 908-912.

Sauer, J. (1966). "Diels-Alder reactions. I. New preparative aspects." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **5**: 211-230.

Sauer, J. (1967). "Diels-Alder reactions. II. Reaction mechanism." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **6**: 16-33.

Sauer, J. (1984). "Diels-Alder additions: a still-new reaction." Naturwissenschaften **71**: 37-39.

Schäfer, A., A. Wellner, et al. (2011). "Development of 2,3,5-Triaryl-1H-pyrroles as Estrogen Receptor  $\alpha$  Selective Ligands." ChemMedChem: n/a-n/a.

Schlenk, M. (2006). (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazoline als Liganden des Estrogenrezeptors: Untersuchungen zur Synthese, Stabilität, Pharmakologie und Biochemie, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Schwegler, F. (2009). Synthese und Testung von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-Imidazolen, Dissertation, Freie Universität Berlin.

Smith, H. O., K. K. Leslie, et al. (2007). "GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma." Am. J. Obstet. Gynecol. **196**: e386/381-e386/311.

Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine.): 1409-1416.

Thomas, P. and J. Dong (2006). "Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption☆." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **102**(1-5): 175-179.

Thomas, P., Y. Pang, et al. (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." Endocrinology **146**: 624-632.

Tsai, M. J. and B. W. O'Malley (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." Annu. Rev. Biochem. **63**: 451-486.

Vivacqua, A., D. Bonofiglio, et al. (2006). "17beta-Estradiol, Genistein, and 4-Hydroxytamoxifen Induce the Proliferation of Thyroid Cancer Cells through the G Protein-Coupled Receptor GPR30." Molecular Pharmacology **70**(4): 1414-1423.

Vivacqua, A., D. Bonofiglio, et al. (2006). "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17β-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells." Mol. Endocrinol. **20**: 631-646.

Windahl, S. H., N. Andersson, et al. (2009). "The role of the G protein-coupled receptor GPR30 in the effects of estrogen in ovariectomized mice." Am. J. Physiol. **296**: E490-E496.

Wolber, G., A. A. Dornhofer, et al. (2006). "Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores." J. Comput.-Aided Mol. Des. **20**: 773-788.

Wolber, G. and T. Langer (2004). "LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters." Journal of Chemical Information and Modeling **45**(1): 160-169.

Xu, H., S. Qin, et al. (2009). "Extra-nuclear estrogen receptor GPR30 regulates serotonin function in rat hypothalamus." Neuroscience (Amsterdam, Neth.) **158**: 1599-1607.

# 11 Anhang

## 11.1 Poster

1. Synthesis and analytical evaluation of selectively acting GPR30 agonists/antagonists, SFB 765 Symposium in Rheinsberg 7.-9. September 2009
2. Synthese und Testung von selektiven GPR30 Agonisten und Antagonisten, Tag der Pharmazie „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“, FU-Berlin 2. Juli 2010
3. Synthesis of Five Classes of Different Spacer-Linked Bivalent Estrogen Analogues, SFB 765 Workshop 2010