

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Chemikalien

Alle für die Synthesen benötigten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Lancaster, Merck oder Fluka bezogen. Das bei der Säulenchromatographie verwendete Kieselgel 60-200 wurde von der Firma Merck bezogen.

### 4.2 Geräte

#### Schmelzpunkte

Lindström-Gerät (unkorrigiert), bei der Beobachtung der Zersetzung einer Substanz ist die Temperatur mit (Z) gekennzeichnet, bei der der Vorgang beginnt.

#### Elementaranalysen

Perkin-Elmer Elementar vario EL

#### IR-Spektren

Perkin-Elmer 1420 Ratio Recording Infrared Spectrophotometer

Die Frequenzangaben erfolgen in  $\text{cm}^{-1}$ .

#### Kernresonanz-Spektren

Bruker AC-300 und Bruker AVANCE DPX 400 in den angegebenen Lösungsmitteln mit TMS als internen Standard, die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala.

Es gelten folgende Abkürzungen:

s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), dt (Dublett vom Triplet), q (Quartett), m (Multiplet).

Die Interpretation der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren erfolgt nach Regeln für Spektren erster Ordnung<sup>157</sup>.

### NOE-Spektren

JEOL-GX-400. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala.

### Massenspektren

EI-MS: CH-7a-Varian MAT (70eV).

FAB-MS: CH-5-DF-MAT-Varian (80eV) in den angegebenen Lösungsmitteln,  
Reaktandgas: Xenon

### Präparative Chromatographie/Flash-Chromatographie (SC)

Adsorbens: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), Korngröße 63-200  $\mu\text{m}$

Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$

### Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck)

### Rotationschromatographie

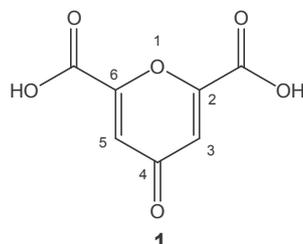
Chromatotron 7924T (Harrison Research) mit Glasplatten, die mit gipshaltigem Kieselgel 60 PF<sub>254</sub> (Merck) in einer Schichtdicke von 1 mm beschichtet sind

### Präparative HPLC

Knauer HPLC-Gradienten-Anlage, 2-Pumpen-System, Variable-Wavelength-Detektor (225 nm), Fließgeschwindigkeit 5 ml/min, bestückt mit einer HPLC-Säule Eurospher 100-C18 (RP18), Korngröße 10  $\mu\text{m}$ , 16 x 250 mm (Knauer)

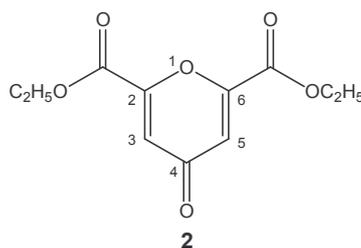
### 4.3 Synthesevorschriften und analytische Daten

#### 4-Oxo-4H-pyran-2,6-dicarbonsäure (1)



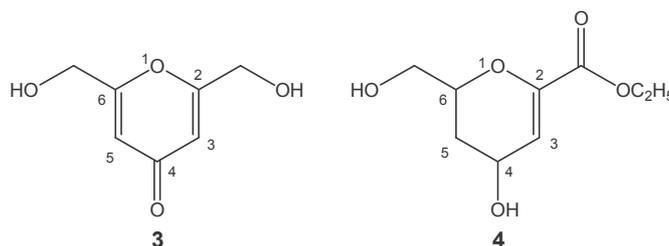
Es werden 45 g (2.0 mol) Natrium in 600 ml abs. Ethanol gelöst. Nach 1 h werden 300 ml dieser Natriumethylat-Lsg. und eine Lösung aus 150 g (1.0 mol) Oxalsäurediethylester in 58 ml abs. Aceton in einen 2l-Dreihalskolben gegeben und mit einem KPG-Rührer gerührt. Nach einer erkennbaren Braunfärbung werden 160 g (1.1 mol) Oxalsäurediethylester und die restlichen 300 ml der Natriumethylat-Lsg. hinzugefügt und 1 h gerührt. Nach 12 h werden 150 ml Ethanol bei 110°C abdestilliert und nach dem Abkühlen wird mit einer Mischung aus 300 ml konz. Salzsäure und 800 g Eis langsam hydrolysiert. Die entstehende Suspension wird abgesaugt und der Rückstand mit Eiswasser (1 x 100 ml) gewaschen. Anschließend wird der Feststoff in 300 ml konz. Salzsäure 20 h auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Feststoff abgesaugt und mit Eiswasser (2 x 50 ml) gewaschen. Der braune Rückstand wird mit Wasser und Aktivkohle umkristallisiert und anschließend 12 h bei 100°C getrocknet.

**1:** Weiße Nadeln, Schmp.: 257°C, Ausb.: 140 g (76%).-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (184.1).

Diethyl-4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylat (2)

Eine Lösung von 5 g (27.2 mmol) **1** in 100 ml abs. Ethanol wird mit 4.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und rückfließend erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 70 ml des Lösungsmittels i. Vak. entfernt und die verbleibende Lösung auf 250 ml Eiswasser gegossen. Man neutralisiert mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. und extrahiert mit Ethylacetat (3 x 200 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lsg. gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird mit Ethylacetat SC gereinigt und aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert.

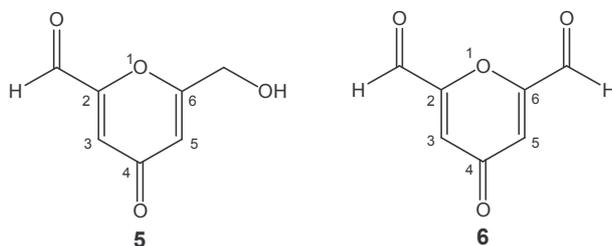
**2**: Blaß gelbe Kristalle, Schmp.: 63°C, Ausb.: 4.5 g (68%).-C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (240.2)<sup>158</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3072 (CH olef.), 2986 (CH aliph.), 1740, 1658 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 7.15 (s, 2H, CH), 4.45 (q, 4H, *J*= 5.4 Hz, 2 CH<sub>2</sub>), 1.42 (t, 6H, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 240 (M<sup>+</sup>, 60%).

2,6-Bis(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-on (3)Ethyl 6-hydroxymethyl-5,6-dihydro-4-oxo-4H-pyran-2-carboxylat (4)

Eine Lösung von 10 g (41.6 mmol) **2** in 100 ml abs. Methanol wird auf  $-20^{\circ}\text{C}$  (Natriumchlorid/Eisbad) gekühlt, mit 3.2 g (84.6 mmol) Natriumborhydrid versetzt und 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gerührt. Anschließend werden 50 ml des Lösungsmittels i. Vak. bei Raumtemperatur entfernt und die verbleibende Suspension auf 100 ml Eiswasser gegossen. Diese wässrige Lösung wird mit Schwefelsäure (10%) neutralisiert und bis zur Trockene i. Vak. bei Raumtemperatur eingedampft. Der gelbe Rückstand wird in 150 ml einer Mischung aus Ethylacetat/Ethanol (9:1) 12 h rückfließend erhitzt, anschließend filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das verbleibende Öl wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (9:1) in seine Produkte getrennt. Substanz **3** wird aus Ethylacetat/n-Hexan und Substanz **4** aus Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

**3**: Farblose Kristalle, Schmp.:  $111^{\circ}\text{C}$ , Ausb.: 2.5 g (42%).- $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4$  (156.1)<sup>158</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3345-3229 (OH), 2924, 2837 (CH aliph.), 1666 (C=O), 1603 (C=C).- **$^1\text{H-NMR}$**  (400MHz/ $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm) 6.24 (s, 2H, CH), 5.72 (t, 2H,  $J= 6.0$  Hz, 2 OH), 4.34 (d, 4H,  $J= 6.0$  Hz, 2  $\text{CH}_2$ ).-**MS** (70 eV):  $m/z$  156 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 64%).

**4**: Farblose Kristalle, Schmp.:  $93^{\circ}\text{C}$ , Ausb.: 2.4 g (29%).- $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_5$  (202.2)<sup>158</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3402 (OH), 2932 (CH aliph.), 1718 (C=O), 1636 (C=C), 1267 (C-O).- **$^1\text{H-NMR}$**  (400MHz/ $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm) 5.88 (s, 1H, H3), 5.15 (s, 1H, OH, austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ), 4.90 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ , austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ), 4.56 (m, 1H, H4), 4.22 (q, 2H,  $J= 7.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 4.03 (m, 1H, H6), 3.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.11 (m, 1H, H5), 1.53 (m, 1H, H5), 1.28 (t,  $J= 7.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).-**MS** (70 eV):  $m/z$  202 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 18%).

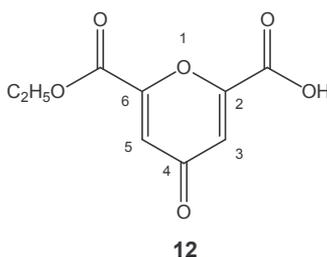
6-Hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-carbaldehyd (5)4-Oxo-4H-pyran-2,6-dicarbaldehyd (6)

Man rührt 1 g (6.4 mmol) **3** in 80 ml Nitriersäure (Salpetersäure, 65%/ Schwefelsäure, 98%, 2:3) 2 h bei 0°C. Anschließend wird der Ansatz auf 100 ml Eiswasser gegossen, mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. neutralisiert und mit Ether (3 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Das verbleibende gelbe Öl wird SC mit Ethylacetat in zwei Fraktionen getrennt.

Die eingeeengte Fraktion I wird in 20 ml Ethylacetat 4 h auf 60°C erhitzt. Dabei fällt der Dialdehyd **6** als weißer Niederschlag aus, der abgesaugt und aus Ethylacetat umkristallisiert wird. Mit der Fraktion II verfährt man analog. Dabei entsteht **5** in Form blaß gelber Kristalle.

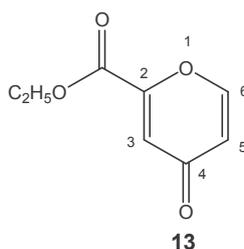
**5**: Blaß gelbe Kristalle, Schmp.: 95°C, Ausb.: 50 mg (5%).-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (154.1)<sup>158</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3352 (OH), 1715, 1662 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.64 (s, 1H, CH), 7.01 (s, 1H, H3), 6.41 (s, 1H, H5), 5.81 (t, 1H, J= 6.0 Hz, OH), 4.37 (d, 2H, J= 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 154 (M<sup>+</sup>, 31%).

**6**: Farblose Kristalle, Schmp.: 196°C, Ausb.: 0.4 g (41%).-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (152.1)<sup>158</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3073 (CH olef.), 1713, 1659 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.79 (s, 2H, CH), 7.01 (s, 2H, 2 CH).-**MS** (70 eV): m/z 152 (M<sup>+</sup>, 47%).

4-Oxo-4H-pyran-2,6-dicarbonsäuremonoethylester (12)

Es werden 120 g (6.5 mol) von **1** mit 600 ml 5%iger ethanolischer Salzsäure (80 ml konz. Salzsäure/520 ml Ethanol) 3 h rückfließend erhitzt. Nach dem Abkühlen auf -10°C wird der Ansatz bei dieser Temperatur 1 h gerührt. Der Rückstand wird abgesaugt und mit Ether (3 x 150 ml) gewaschen.

**12:** Blaß braune Kristalle, Schmp.: 218-220°C, Ausb.: 101.2 g (74%).-C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (212.2)<sup>159</sup>.-IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3072 (CH olef.), 2986 (CH aliph.), 1758, 1650 (C=O), 1173 (C-O).-<sup>1</sup>H-NMR (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 7.01 (m, 2H, H3 u. H5), 4.37 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.41 (s, 1H, OH), 1.32 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).-MS (70 eV): m/z 212 (M<sup>+</sup>, 60%).

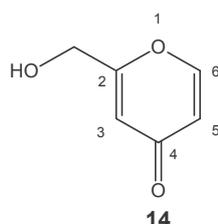
4-Oxo-4H-pyran-2-essigsäureethylester (13)

Man erhitzt 56 g (0.6 mol) von **12** in Portionen von 4x ca. 14 g in einem Kolben mit Luftkühler auf 230°C. Es destilliert eine blaß gelbe Flüssigkeit über, die zum Teil schon im Luftkühler auskristallisiert. Das Reaktionsprodukt wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgearbeitet.

**13:** Weißes Pulver, Schmp.: 96-98°C, Ausb.: 11 g (25%), C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (168.2)<sup>159</sup>.-IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3056 (CH), 2991 (CH), 1729, 1621 (C=O).-<sup>1</sup>H-NMR (400MHz/d<sub>6</sub>-

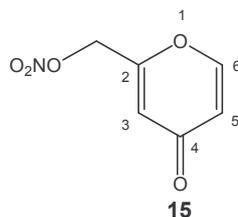
DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.21 (d, 1H,  $J$  = 5.9 Hz, H6), 6.90 (d, 1H,  $J$  = 2.6 Hz, H3), 6.48 (dd, 1H,  $J$  = 2.6 Hz,  $J$  = 5.9 Hz, H5), 4.35 (q, 2H,  $J$  = 7.2 Hz, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, 3H,  $J$  = 7.2 Hz, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).-MS (70 eV):  $m/z$  168 ( $M^{+}$ , 100%).

### 2-(Hydroxymethyl)-4H-pyran-4-on (14)



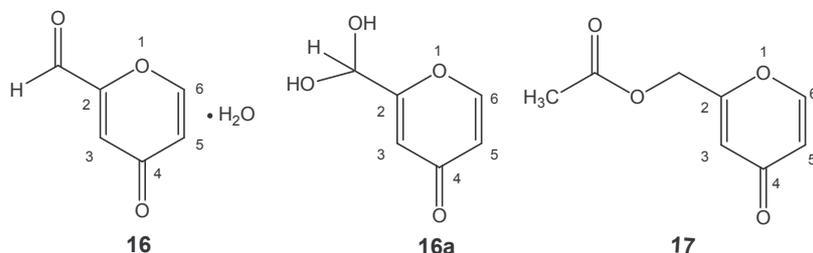
Eine Lösung von 11 g (88.7 mmol) **13** in 114 ml abs. Methanol wird auf -20°C gekühlt, mit 3.6 g (95.2 mmol) Natriumborhydrid versetzt und 1 h bei -20°C gerührt. Anschließend werden 50 ml des Lösungsmittels i. Vak. bei RT entfernt und die verbleibende Suspension auf 100 ml Eiswasser gegossen. Diese wässrige Lösung wird mit Schwefelsäure (10%) neutralisiert und nahezu bis zur Trockene i. Vak. eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird in 100 ml einer Mischung aus Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgenommen und 10 min rückfließend erhitzt. Die organische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das verbleibende braune Öl wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (9:1) gereinigt. Die Substanz wird aus Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

**14**: Weiße Kristalle, Schmp.: 66°C, Ausb.: 5.6 g (50%).-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (126.1) Ber. C 57.1 H 4.80 Gef. C 57.1 H 4.86.-IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3389, 3214 (OH), 2911, 2853 (CH), 1661 (C=O).-<sup>1</sup>H-NMR (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.11 (d, 1H,  $J$  = 5.4 Hz, H6), 6.23 (m, 2H, H3 u. H5), 5.66 (t, 1H,  $J$  = 6.0 Hz, OH), 4.29 (d, 2H,  $J$  = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>).-MS (70 eV):  $m/z$  126 ( $M^{+}$ , 90%).

2-(Nitrooxymethyl)-4H-pyran-4-on (15)

Eine Lösung von 5.6 g (44.4 mmol) **14** in 200 ml Nitriersäure (Salpetersäure, 65%/Schwefelsäure, 98%, 2/3) wird 2 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 100 ml Eiswasser gegossen, mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. neutralisiert und mit Ether (3 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Das verbleibende gelbe Öl wird SC mit Ethylacetat aufgereinigt.

**15:** Gelbes Öl, Ausb.: 4.1 g (53%).-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>N (171.1) Ber. C 42.2 H 2.95 N 8.19 Gef. C 41.9 H 3.21 N 8.38.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2911, 2853 (CH), 1680 (C=O), 1642 (O-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.21 (d, 1H, *J*= 5.9, H6), 6.52 (d, 1H, *J*= 2.5 Hz, H3), 6.35 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 5.9 Hz, H5), 5.52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 171 (M<sup>+</sup>, 51%).

4-Oxo-4H-pyran-2-carbaldehyd (16)2-(Dihydroxymethyl)-4H-pyran-4-on (16a)4-Oxo-4H-pyran-2-ylmethylacetat (17)*Methode A:*

Man löst 3.7 g (21.6 mmol) **15** in 25 ml Eisessig und tropft die Lösung über einen Zeitraum von ca. 15 min in ein Gemisch aus 25 ml Eisessig und 10 Tropfen konz. Schwefelsäure zu. Der Ansatz wird danach 1 h am Rückfluß gerührt. Anschließend

wird der Reaktionsansatz auf 100 ml Wasser gegossen und mit Natriumhydroxid-Lsg. 5% neutralisiert. Die Wasserphase wird bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird SC mit Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgereinigt. Die entstandenen Verbindungen werden aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Man erhält ein Gleichgewicht von **16** und **16a**.

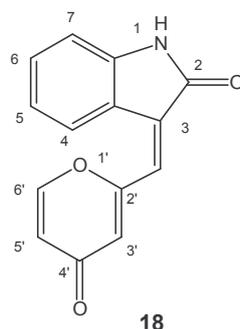
**16/16a:** Blaß gelbe Kristalle, Ausb.: 1.02 g (38%).-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (124.1)/C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O (142.1) Ber. C 53.5 H 3.88 Gef. C 53.2 H 3.78.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3245 (Kristallwasser), 3075 (CH), 1659, 1647 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO) von **16**:  $\delta$  (ppm) 9.64 (s, 1H, CHO), 8.29 (d, 1H, *J*= 5.8 Hz, H6), 7.06 (d, 1H, *J*= 2.6, H3), 6.48 (dd, 1H, *J*= 2.6 Hz, *J*= 5.8 Hz, H5).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO) von **16a**:  $\delta$  (ppm) 8.14 (d, 1H, *J*= 5.8 Hz, H6), 6.84 (d, 2H, *J*= 5.5 Hz, 2 OH), 6.32 (d, 1H, *J*= 2.5 Hz, H3), 6.25 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 5.8 Hz, H5), 5.47 (1H, m, HO-CH-OH).-**MS** (70 eV): *m/z* 124 (M<sup>+</sup>, 71%).

**17:** Gelbes Öl, Ausb.: 630 mg (17%).-C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (168.2) Ber. C 57.1 H 4.80 Gef. C 56.8 H 4.75.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3067 (CH), 1665, 1649 (C=O), 1376, 1348 (CH<sub>3</sub>-CO).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.16 (d, 1H, *J*= 5.9 Hz, H6), 6.38 (d, 1H, *J*= 2.5 Hz, H3), 6.30 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*= 5.9 Hz, H5), 4.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 168 (M<sup>+</sup>, 28%).

#### *Methode B:*

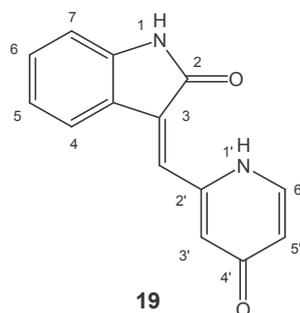
Es werden 150 mg (1.2 mmol) **14** in einem Lösungsmittelgemisch aus je 20 ml Methanol/Aceton/Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wird mit 200 mg Mangan(IV)oxid (MnO<sub>2</sub>) versetzt und 4 h bei 60°C gerührt. Nach je 1 h werden weitere 200 mg MnO<sub>2</sub> hinzugefügt. Man filtriert die Mischung heiß und entfernt das Lösungsmittel i. Vak.. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (8:2) und durch Umkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan. Man erhält ein Gleichgewicht von **16** und **16a**.

**16/16a:** Blaß gelbe Kristalle, Ausb.: 70 mg (48%).

(3E)-3-[(4-Oxo-4H-pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (18)

Es werden 240 mg (1.9 mmol) Gemisch aus **16/16a** und 250 mg (1.9 mmol) 2-Indolinon in 15 ml Pyridin gelöst und 30 min am Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wird auf Eis gegossen und mit 15 ml konz. Salzsäure versetzt (pH 2-3). Anschließend wird mit Ethylacetat (3 x 50 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

**18:** Orange-rote Kristalle, Schmp.: 246°C (Z)/254°C, Ausb.: 200 mg (45%).-  
C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (239.2) Ber. C 70.3 H 3.79 N 5.86 Gef. C 68.8 H 3.71 N 5.73.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3081 (CH), 1717 (CO-NH), 1649, 1630 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  (ppm) 8.58 (s, 1H, NH), 8.10 (m, 2H, H6' u. H4), 7.34 (dt, 1H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 7.8 Hz, H6), 7.09 (s, 1H, CH), 7.05 (dt, 1H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 7.8 Hz, H5), 6.93 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H7), 6.64 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H3'), 6.34 (dd, 1H, *J* = 2.5 Hz, *J* = 5.9 Hz, H6').-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.76 (s, 1H, NH), 8.47 (d, 1H, *J* = 5.8 Hz, H6'), 8.07 (d, 1H, *J* = 7.8, H4), 7.35 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H6), 7.17 (s, 1H, CH), 7.02 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H5), 6.92 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H3'), 6.90 (d, 1H, *J* = 7.8, H7), 6.43 (dd, 1H, *J* = 2.5 Hz, *J* = 5.8 Hz, H5').-**<sup>13</sup>C-NMR** (100MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 177.8, 167.9, 160.1, 155.9 (C6'), 144.5, 131.9 (C6), 131.6 (C3a), 127.1 (C4), 123.9 (CH=), 121.9 (C5), 120.9 (C3'), 119.8, 116.8 (C5'), 110.2 (C7).-**MS** (70 eV): *m/z* 239 (M<sup>+</sup>, 100%).

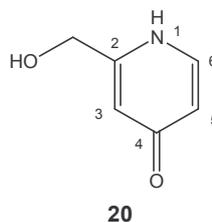
(3Z)-3-[(4-Oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (19)*Methode A:*

Man löst 80 mg (0.3 mmol) **18** und 20 mg Ammoniumacetat in 30 ml Eisessig und erhitzt 3 h am Rückfluß. Der Reaktionsansatz wird auf 200 ml Eiswasser gegossen und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. neutralisiert. Die Wasserphase wird i. Vak. bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in einer Mischung aus Ethylacetat/Ethanol (8:2) aufgenommen. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und die organische Phase wird SC in Ethylacetat/Ethanol (8:2) aufgereinigt. Anschließend wird aus Ethanol umkristallisiert.

*Methode B:*

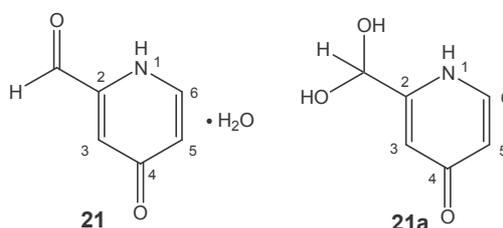
Zu einer Lösung aus 37 mg (0.3 mmol) **21/21a** und 40 mg (0.3 mmol) 2-Indolinon in 5 ml Ethanol gibt man 2 Tropfen Piperidin zu und erhitzt die Mischung 1.5 h rückfließend. Anschließend destilliert man das Lösungsmittel i. Vak. ab. Der verbleibende Rückstand wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (8:2) aufgereinigt und aus Ethanol umkristallisiert.

**19:** Rote Kristalle, Schmp.: 256°C, Ausb.: 39 mg (49%).-C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O (256.3)  
Ber. C 65.6 H 4.72 N 10.9 Gef. C 66.7 H 4.74 N 10.9.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3059, 2920 (CH), 1681 (CO-NH), 1603 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 13.65 (m, 1H, NH1'), 11.37 (s, 1H, NH1), 7.91 (m, 1H, H6'), 7.77 (d, 1H, J= 7.2 Hz, H4), 7.66 (s, 1H, CH=), 7.32 (t, 1H, J= 6.9 Hz, H6), 7.09 (t, 1H, J= 7.2 Hz, H5), 6.93 (d, 1H, J= 6.9 Hz, H7), 6.58 (s, 1H, H3'), 6.15 (d, 1H, J= 5.9 Hz, H5').-**MS** (70 eV): m/z 238 (M<sup>+</sup>, 83%).

2-(Hydroxymethyl)-pyridin-4(1H)-on (20)

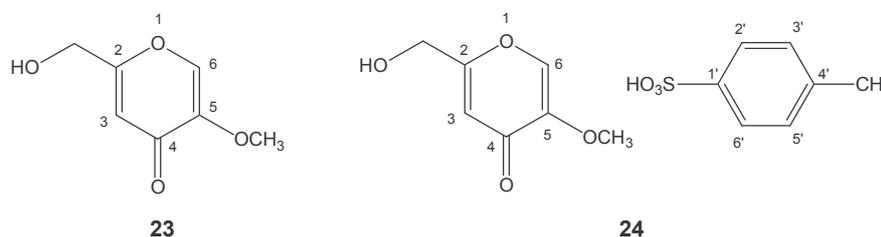
Eine Reaktionsmischung aus 2 g (15.8 mmol) **14**, gelöst in 30 ml 20%iger Ammoniumcarbonat-Lsg. und 15 ml Ammoniak 25% (1:1) wird 1 h rückfließend erhitzt. Der Ansatz wird auf Eis gegeben und mit 10%iger Schwefelsäure neutralisiert. Es wird mit Ethylacetat/Ethanol (9:1) (3 x 150 ml) gewaschen, um die organischen Verunreinigungen zu entfernen. Die Wasserphase wird abgetrennt und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird in 50 ml Ethanol aufgenommen und 15 min rückfließend erhitzt. Anschließend wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Substanz wird aus Ethanol unter Erhitzen umkristallisiert.

**20**: Weißes Pulver, Schmp.: 197°C, Ausb.: 1.3 g (66%).-C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> (125.1) Ber. C 57.6 H 5.64 N 11.2 Gef. C 57.7 H 5.78 N 11.3.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3426 (OH), 3080, 2926 (CH), 1512.-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.08 (br, 1H, NH), 7.69 (m, 1H, H6), 6.26 (m, 1H, H5), 6.15 (s, 1H, H3), 5.50 (m, 1H, OH), 4.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 125 (M<sup>+</sup>, 49%).

4-Oxo-1,4-dihydro-pyridin-2-carbaldehyd (21)2-(Dihydroxymethyl)-pyridin-4(1H)-on (21a)

Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **16/16a** aus 1.3 g (10.4 mmol) **20** und insgesamt 6 g Mangan(IV)oxid. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat. Man erhält ein Gemisch von **21** und **21a**.

**21/21a**: Gelbliches Pulver, Schmp.: 148-153°C, Ausb.: 87.3 mg (71%).-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (123.1)/C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O (141.1) Ber. C 52.6 H 4.82 N 10.2 Gef. C 52.7 H 4. N 10.1.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3431 (Kristallwasser, NH), 1632 (C=O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO) von **21**:  $\delta$  (ppm) 10.65 (s, 1H, NH), 9.94 (s, 1H, CHO), 8.15 (m, 1H, H6), 6.92 (s, 1H, H3), 6.66 (m, 1H, H5).- **<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO) von **21a**:  $\delta$  (ppm) 11.16 (s, 1H, NH), 7.47 (m, 1H, H6), 6.79 (d, 2H,  $J$ = 6.4 Hz, 2 OH), 6.11 (m, 1H, H3), 5.98 (m, 1H, H5), 5.57 (t, 1H,  $J$ = 6.4 Hz, HO-CH-OH)-**MS** (70 eV):  $m/z$  123 (M<sup>+</sup>, 26%).

2-(Hydroxymethyl)-5-methoxy-4H-pyran-4-on (23)2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4H-pyran-4-on mit 4-Methylbenzolsulfonsäure (24)

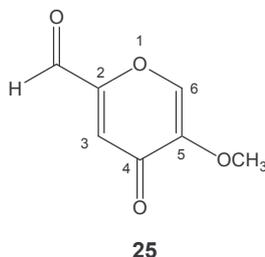
Zu einer Lösung aus 1.42 g (10.0 mmol) Kojisäure und 2.2 g (11.8 mmol) p-Toluensulfonsäuremethylester in 100 ml abs. Methanol werden 0.25 g Natrium, gelöst in 20 ml abs. Methanol, hinzugefügt. Der Ansatz wird 24 h bei RT gerührt und anschließend 1.5 h rückfließend erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak., nimmt man den verbleibenden Rückstand in wenig Wasser auf. Man alkalisiert die wässrige Phase mit NaOH und extrahiert 3 x mit Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Man erhitzt den verbleibenden Rückstand in Toluol rückfließend und filtriert den unlöslichen Rückstand ab. Während des Abkühlens des Filtrates bilden sich gelbe Kristalle, die abfiltriert werden und als Substanz **24** identifiziert werden. Man entfernt das Lösungsmittel des Filtrates i. Vak. und reinigt den verbleibenden Rückstand SC in Dichlormethan/Methanol (9:1) auf. Die entstandenen weißen Kristalle werden als Produkt **23** identifiziert.

**23:** Weiße Kristalle, Schmp.: 146°C, Ausb.: 1.2 g (77%).-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (156.1) Ber. C 53.9 H 5.16 Gef. C 53.7 H 5.17.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3218 (OH), 3080 (CH olef.), 2946, 2921 (CH aliph.), 1638 (C=O), 1603 (C=C), 1150 (C-O), 1006 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.13 (s, 1H, H6), 6.29 (s, 1H, H3), 5.68 (s, 1H, OH), 4.29 (s, 1H, CH<sub>2</sub>), 3,64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 125 (M<sup>+</sup>, 38%).

**24:** Gelbe Kristalle, Schmp.: 192°C (Z), Ausb.: 2.9 g (88%).-C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>S (328.3) Ber. C 51.21 H 4.91 Gef. C 51.93 H 4.75.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3202 (OH), 3078 (CH olef.), 2919, 2841 (CH aliph.), 1640 (C=O), 1602 (C=C), 1261 (SO<sub>2</sub>OH), 1185, 1150, 1129 (C-O), 1042 (SO<sub>2</sub>OH), 1008 (C-C), 688 (SO<sub>2</sub>OH).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.13 (s, 1H, H6), 7.48 (d, 2H, J= 2.0 Hz, H3' u. H5'), 7.12 (d, 2H, J= 2.0 Hz,

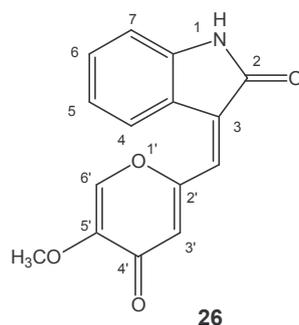
H<sub>2</sub>' u. H<sub>6</sub>'), 6.29 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 5.68 (s, 1H, OH), 4.29 (s, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

5-Methoxy-4-oxo-4H-pyran-2-carbaldehyd (25)



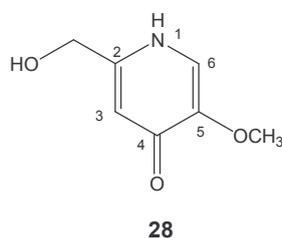
Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **16/16a** aus 2 g (12.8 mmol) **23** und insgesamt 8 g Mangan(IV)oxid. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (9:1).

**25**: Beiges Kristalle, Schmp.: 193-195°C (Z), Ausb.: 610 mg (31%).-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> x 0.5 H<sub>2</sub>O (163.1) Ber. C 51.5 H 4.33 Gef. C 50.6 H 4.18.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3094, 3051 (CH olef.), 2949 (CH aliph.), 1706 (C=O), 1656, 1614 (C=C), 1157, 1098 (C-O), 996 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.64 (s, 1H, CHO), 8.30 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.09 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 154 (M<sup>+</sup>, 79%).

(3E)-3-[(5-Methoxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (26)

Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **19** aus 50 mg (0.3 mmol) **25** und 50 mg (0.3 mmol) 2-Indolinon. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (9:1) und durch Umkristallisation aus Ethanol.

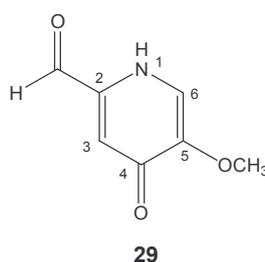
**26:** Gelb-oranges Pulver, Schmp.: 259-261°C (Z), Ausb.: 0.04 g (50%).-C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (287.3) Ber. C 62.7 H 4.56 N 4.88 Gef. C 62.8 H 4.30 N 5.14.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3440 (NH), 3092 (CH arom./olef.), 2939 (CH aliph.), 1711 (C=O), 1639, 1620 (C=C), 1233 (C-N), 1181 (C-O), 1002 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.76 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H6'), 8.11 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H4), 7.36 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H6), 7.18 (s, 1H, -CH=), 7.03 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H5), 6.98 (s, 1H, H3'), 6.90 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, H7), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 269 (M<sup>+</sup>, 67%).

2-(Hydroxymethyl)-5-methoxypyridin-4(1H)-on (28)

Man rührt 100 mg (0.64 mmol) **23** mit 15 ml Ammoniak 25% 2 h bei 100°C. Der verbleibende Ammoniak wird abgedampft. Die Aufreinigung des Rückstandes erfolgt durch Umkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan.

**28:** Hellbraune Kristalle, Schmp.: 151°C, Ausb.: 0.09 g (91%).-C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O (173.2) Ber. C 48.6 H 6.40 N 8.09 Gef. C 48.5 H 6.09 N 8.18.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3439 (NH), 3218 (OH), 3080 (CH olef.), 2921 (CH aliph.), 1638 (C=O), 1603 (C=C), 1233 (C-N), 1150 (C-O), 1006 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.34 (s, 1H, NH), 7.23 (s, 1H, H6), 6.04 (s, 1H, H3), 5.56 (s, 1H, OH), 4.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 155 (M<sup>+</sup>, 100%).

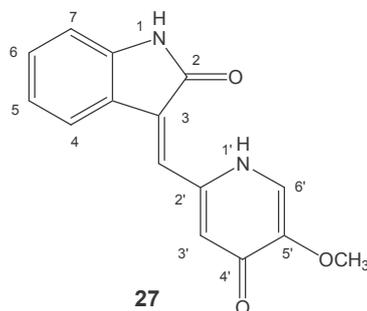
5-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-carbaldehyd (29)



Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **16/16a** aus 150 mg (0.97 mmol) **28** und insgesamt 8 g Mangan(IV)oxid. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (8:2). Anschließend wird aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert.

**29:** Gelbliches Pulver, Schmp.: 62°C, Ausb.: 0.03 g (20%).-C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> (153.0) Ber. C 54.9 H 4.61 N 9.15 Gef. C 54.7 H 4.64 N 9.07.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3389 (NH), 3077 (CH olef.), 2919, 2875 (CH aliph.), 1706 (C=O), 1611, 1557, 1506 (C=C), 1280, 1252 (C-N), 1153 (C-O), 1008 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.94 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, CHO), 8.37 (s, 1H, H6), 7.33 (s, 1H, H3), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 153 (M<sup>+</sup>, 100%).

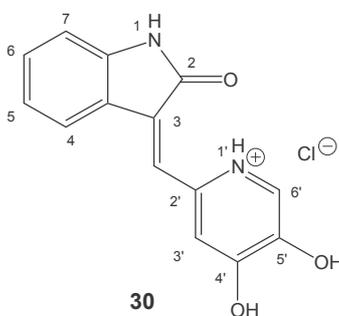
(3Z)-3-[(5-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on  
(27)



Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **19** aus 960 mg (6.3 mmol) **29** und 810 mg (6.3 mmol) 2-Indolinon. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (8:2) und durch Umkristallisation aus Ethanol/Ethylacetat.

**27:** Oranges Pulver, Schmp.: 260°C, Ausb.: 0.56 g (33%).-C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (268.1) Ber. C 53.9 H 5.16 Gef. C 53.7 H 5.17.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3472 (NH), 3060 (CH arom./olef.), 2925 (CH aliph.), 1679 (C=O), 1610, 1555 (C=C), 1283, 1259, 1208 (C-N), 1168, 1101 (C-O), 1015 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 13.79 (s, 1H, NH1'), 11.40 (s, 1H, NH1), 7.82 (s, 1H, H6'), 7.77 (d, 1H, J= 7.6 Hz, H4), 7.69 (s, 1H, -CH=), 7.32 (t, 1H, J= 7.7 Hz, H6), 7.09 (t, 1H, J= 7.6 Hz, H5), 6.93 (d, 1H, J= 7,7, H7), 6.64 (s, 1H, H3'), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 268 (M<sup>+</sup>, 100%).

(3Z)-3-[(4,5-Dihydroxypyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on  
Hydrochlorid (30)

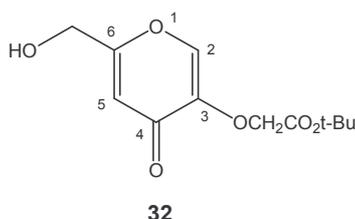


Es werden 30 mg (0.1 mmol) **27** mit 130 mg Pyridin-Hydrochlorid (1.1 mmol) auf ca. 170°C erhitzt. Nach 15 min lässt man den Ansatz abkühlen und gibt ca. 5 ml Ethanol

zu. Dabei fällt ein Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Ethanol nachgewaschen wird.

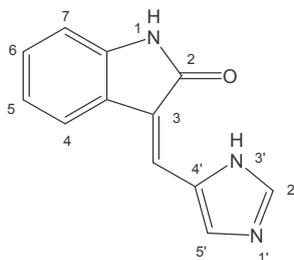
**30:** Gelbe Kristalle, Schmp.: 74°C (Z), Ausb.: 0.02 g (73%).-C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> HCl x H<sub>2</sub>O (307.7) Ber. C 54.7 H 4.26 N 9.10 Gef. C 54.8 H 4.16 N 9.40.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3362 (NH/OH), 3066 (CH arom./olef.), 2691 (NH<sup>+</sup>), 1683 (C=O/N=O), 1603, 1577, 1502 (C=C), 1298, 1272, 1206 (C-N), 1167, 1101 (C-O).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.67 (s, 1H, NH), 8.48 (s, 1H, H6'), 8.03 (s, 1H, H3'), 7.84 (d, 1H, *J*= 7.5 Hz, H4), 7.63 (s, 1H, -CH=), 7.38 (t, 1H, *J*= 7.7 Hz, H6), 7.15 (t, 1H, *J*= 7.5 Hz, H5), 6.99 (d, 1H, *J*= 7,7, H7).-**MS** (70 eV): *m/z* 254 (M<sup>+</sup>, 100%).

Tert-Butyl [(6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-3-yl)oxy]acetat (32)



Es werden 100 mg (0.7 mmol) Kojisäure und 137 mg (0.7 mmol) Bromessigsäure-*t*-butylester in 30 ml abs. Dimethylformamid gelöst und mit 200 mg (1.4 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Der Ansatz wird 6 h bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen, filtriert man das Kaliumcarbonat ab, trocknet mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel i. Vak. Der verbleibende weiße Rückstand wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt.

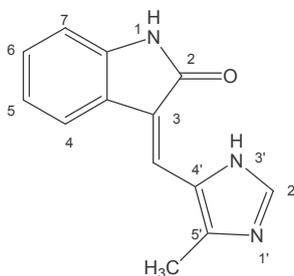
**32:** Weißes Pulver, Schmp.: 132°C, Ausb.: 0.15 g (84%).-C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> x H<sub>2</sub>O (274.3) Ber. C 52.6 H 6.62 Gef. C 52.5 H 6.48.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3400 (OH), 3070 (CH arom./olef.), 2977, 2934 (CH aliphatic.), 1735 (C=O), 1663, 1642, 1620 (C=C), 1173, 1154, 1084, 1059 (C-O), 990 (C-C), 946, 870, 766 (CH arom./olef.).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 8.14 (s, 1H, H6), 6.32 (s, 1H, H3), 5.69 (s, 1H, OH), 4.55 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CO), 4.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 1.43 (s, 9H, *t*Bu).-**MS** (70 eV): *m/z* 256 (M<sup>+</sup>, 0.7%).

(3Z)-3-[(3H-Imidazol-4-yl)methylen]-1,3-dihydro-3H-indol-2-on (35)

35

Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **19** aus 30 mg (0.3 mmol) 5-Imidazolaldehyd und 40 mg (0.3 mmol) 2-Indolinon. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und anschließend aus Ethanol/Ethylacetat umkristallisiert wird.

**35:** Gelbe Kristalle, Schmp.: 244°C, Ausb.: 0.06 g (87%).-C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O x H<sub>2</sub>O (229.2) Ber. C 62.9 H 4.84 N 18.3 Gef. C 62.8 H 4.87 N 18.5.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3121 (NH), 3060, 3019 (CH arom./olef.), 1682 (C=O), 1620, 1605, 1539 (C=C), 1345, 1316, 1262, 1222 (C-N), 1196, 1111 (C-O), 1009 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 13.72 (s, 1H, NH1'), 11.00 (s, 1H, NH1), 8.02 (s, 1H, H2'), 7.85 (s, 1H, -CH=), 7.66 (d, 1H, *J*= 7.6 Hz, H4), 7.64 (s, 1H, H4'), 7.20 (t, 1H, *J*= 7.7 Hz, H6), 7.03 (t, 1H, *J*= 7.6 Hz, H5), 6.89 (d, 1H, *J*= 7.7 Hz, H7).-**MS** (70 eV): *m/z* 211 (M<sup>+</sup>, 100%).

(3Z)-[(5-Methyl-3H-imidazol-4-yl)methylen]-1,3-dihydro-3H-indol-2-on (36)

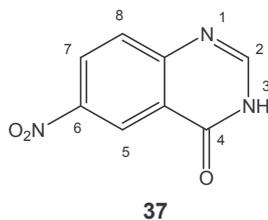
36

Die Synthese erfolgt analog der *Methode B* zur Herstellung von **19** aus 100 mg (0.9 mmol) 4-Methylimidazol-5-carboxaldehyd und 121 mg (0.9 mmol) 2-Indolinon. Die Reaktion verbleibt 24 h bei 60°C. Der Ansatz wird mit Schwefelsäure (10%)

neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. bis zur Trockene abgedampft. Aufgereinigt wird SC mit Ethylacetat/Ethanol (8:2) und durch Umkristallisation aus Ethanol/Ethylacetat.

**36:** Gelbe Kristalle, Schmp.: 254°C, Ausb.: 0.14 g (68%).-C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O x H<sub>2</sub>O (243.3) Ber. C 64.2 H 5.39 N 17.3 Gef. C 64.9 H 5.6 N 17.3.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3427 (NH), 3137, 3061 (CH arom./olef.), 2994, 2874 (CH aliph.), 1681 (C=O), 1613, 1592 (C=C), 1290, 1271, 1225 (C-N), 1181, 1120 (C-O), 1021 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 14.54 (s, 1H, NH1'), 11.17 (s, 1H, NH1), 8.48 (s, 1H, H2'), 7.89 (d, 1H, *J*= 7.6 Hz, H4), 7.83 (s, 1H, -CH=), 7.24 (t, 1H, *J*= 7.7 Hz, H6), 7.06 (t, 1H, *J*= 7.6 Hz, H5), 6.92 (d, 1H, *J*= 7.7, H7), 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 225 (M<sup>+</sup>, 100%).

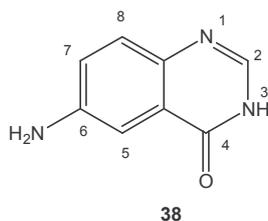
#### 6-Nitro-3*H*-chinazolin-4-on (37)



Eine Lösung aus 1g (5.5 mmol) 5-Nitroanthranilsäure in 20 ml Formamid wird 24 h bei 125°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz auf ca. 20 ml Wasser gegeben. Der dabei entstehende Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

**37:** Weiße Kristalle, Schmp.: 252°C, Ausb.: 0.7 g (67%).-C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (191.1) Ber. C 50.3 H 2.64 N 22.0 Gef. C 50.1 H 2.90 N 21.7.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3424 (NH), 3077 (CH arom./olef.), 1695 (C=O), 1615, 1574 (C-NO<sub>2</sub>), 1525, 1506 (C=C), 1354 (C-NO<sub>2</sub>), 1286, 1262, 1239 (C-N), 1174, 1112, 1065 (C-O), 1022 (C-C), 852 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.75 (s, 1H, NH), 8.81 (d, 1H, *J*= 2.6 Hz, *J*= 8.9 Hz, H7), 8.32 (s, 1H, H2), 7.88 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H8).-**MS** (70 eV): *m/z* 191 (M<sup>+</sup>, 100%).

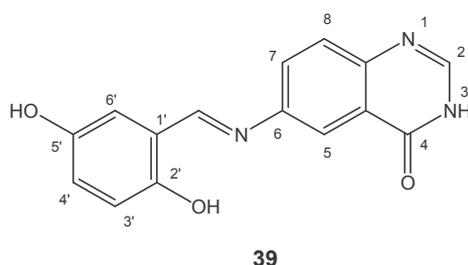
#### 6-Amino-3*H*-chinazolin-4-on (38)



Man nimmt 440 mg (2.3 mmol) **37** in einem Gemisch aus 15 ml Ethanol und 4 ml Essigsäure 50% auf und gibt 350 mg Eisenspäne dazu. Der Ansatz wird 4 h auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung mit 20 ml Wasser versetzt und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. auf pH 5-6 eingestellt. Die wässrige Phase wird mit Ether (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird SC in Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgereinigt.

**38:** Blaß braune Kristalle, Schmp.: 278°C, Ausb.: 0.01 g (25%).-C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O (161.1) Ber. C 59.6 H 4.38 N 26.1 Gef. C 59.5 H 4.58 N 25.9.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3436, 3411, 3384 (NH), 1672 (C=O), 1609, 1498 (CH arom./olef.), 1279, 1214 (C-N), 1166 (C-O), 691 (breit, NH<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.79 (s, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, H2), 7.37 (d, 1H, *J*= 8.6 Hz, H8), 7.17 (d, 1H, *J*= 2.6 Hz, H5), 7.06 (d, 1H, *J*= 2.6 Hz, *J*= 8.6 Hz, H7), 5.60 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 161 (M<sup>+</sup>, 100%).

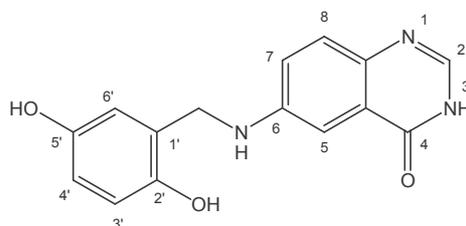
6-[(1*E*)-(2,5-Dihydroxyphenyl)methylen]amino}chinazolin-4(3*H*)-on (**39**)



Eine Lösung aus 150 mg (0.9 mmol) **38** und 129 mg 2,5-Dihydroxybenzaldehyd (0.9 mmol) in 30 ml Eisessig/Ethanol (1:1) wird 2 h rückfließend erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Ansatz auf Eis gegeben und mit einer gesättigten Natriumcarbonat-Lsg. auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

**39:** Blaß braune Kristalle, Schmp.:  $>330^{\circ}\text{C}$ , Ausb.: 0.19 g (73%).- $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$  (290.3) Ber. C 62.1 H 4.51 N 14.5 Gef. C 62.7 H 4.37 N 14.4.-**IR** (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3218 (OH), 3112 (CH arom./olef.), 1670 (C=O), 1613, 1581, 1500 (C=C), 1293 (C-N), 1158 (C-O).- **$^1\text{H-NMR}$**  (400MHz/ $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.31 (br, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, OH2'), 9.13 (s, 1H, OH5'), 8.90 (s, 1H, CH), 8.10 (s, 1H, H2), 8.03 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz, H5), 7.87 (dd, 1H,  $J=2.3$  Hz,  $J=8.6$  Hz, H7), 7.74 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz, H8), 7.11 (d, 1H,  $J=2.8$  Hz, H6'), 6.89 (dd, 1H,  $J=2.8$  Hz,  $J=8.8$  Hz, H4'), 6.82 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz, H3').-**MS** (70 eV):  $m/z$  281 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 100%).

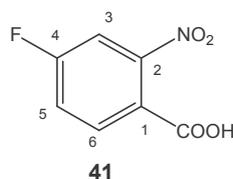
6-[(2,5-Dihydroxybenzyl)amino]chinazolin-4(3H)-on (**40**)



**40**

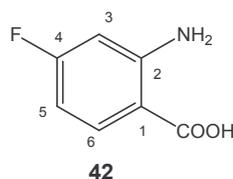
Zu einer Lösung von 150 mg (0.5 mmol) **39** in 15 ml Eisessig wird eine Lösung aus 48 mg (0.8 mmol) Borandimethylamin-Komplex in 15 ml Eisessig unter Kühlung langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wird der Ansatz auf Eis gegossen und mit 10 N Natriumhydroxid-Lsg. auf einen pH-Wert von 5-6 gebracht. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

**40:** Blaß braune Kristalle, Schmp.:  $215^{\circ}\text{C}$ , Ausb.: 0.13 g (87%).- $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (301.3) Ber. C 59.8 H 5.02 N 14.0 Gef. C 60.0 H 5.00 N 13.4.-**IR** (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3374, 3174 (NH/OH), 3070 (CH arom./olef.), 2925 (CH aliph.), 1653 (C=O), 1622, 1509 (C=C), 1255, 1221, 1204 (C-N), 1165, 1077 (C-O), 996 (C-C).- **$^1\text{H-NMR}$**  (400MHz/ $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.85 (s, 1H, NH3), 8.85 (s, 1H, OH), 8.57 (s, 1H, OH), 7.76 (s, 1H, H2), 7.41 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz, H8), 7.16 (m, 1H, H7), 6.99 (s, 1H, H5), 6.54 (m, 4H, 3Ph-H + 1NH), 4.20 (d, 2H,  $J=5.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).-**MS** (70 eV):  $m/z$  283 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 5%).

4-Fluor-2-nitrobenzoesäure (41)

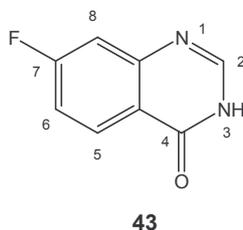
Ein Gemisch aus 2.2 g (13.9 mmol) Kaliumpermanganat und 0.75 g (6.2 mmol) Magnesiumsulfat wird in 50 ml Wasser auf 80°C erhitzt. Anschließend gibt man 0.78 g (5.0 mmol) 4-Fluor-2-nitrotoluol zu. Die Reaktionsmischung wird 45 min rückfließend erhitzt, dann folgt ein erneuter Zusatz von 1.1 g (7.0 mmol) Kaliumpermanganat und 0.38 g (3.1 mmol) Magnesiumsulfat. Nach weiteren 45 min wird der Ansatz heiß filtriert und das Filtrat nach dem Abkühlen mit Ether (3 x 150 ml) extrahiert, um organische Verunreinigungen zu entfernen. Die wässrige Phase wird mit konz. Salzsäure angesäuert und erneut mit Ether (3 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Bei dem verbleibenden Rückstand handelt es sich um Substanz **41**.

**41:** Beige Kristalle, Schmp.: 134°C, Ausb.: 0.38 g (41%).-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>FNO<sub>4</sub> · 0.5 H<sub>2</sub>O (194.1) Ber. C 43.3 H 2.60 N 7.22 Gef. C 43.3 H 2.77 N 7.08.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3107-2921 (COOH), 1717 (C=O), 1617 (C=C), 1531 (C-NO<sub>2</sub>), 1501 (C=C), 1361 (C-NO<sub>2</sub>), 1306 (Aryl-F), 1293, 1272, 1228 (C-N), 1132 (C-O), 879 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 14.59 (s, 1H, COOH), 7.98 (m, 2H, H3 und H6), 7.66 (ddd, 1H,  $J=2.6$  Hz,  $J=8.5$  Hz,  $J_{H-F}=8.5$  Hz, H5).-**MS** (70 eV): m/z 185 (M<sup>+</sup>, 65%).

2-Amino-4-fluorbenzoesäure (42)

Eine Lösung aus 3 g (16.2 mmol) **41** in 50 ml Eisessig werden mit 5 g Eisenpulver/-späne (1:1) versetzt und 3 h auf 95°C erhitzt. Zu Beginn der Reaktion und dann nach jeweils 30 min werden je 6 ml Wasser zugesetzt. Nach dem Erhitzen wird die Mischung mit ca. 10 ml Wasser verdünnt und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. auf pH 5 gebracht. Anschließend extrahiert man vollständig mit Ether (3 x 100 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Bei dem verbleibenden Rückstand handelt es sich um Substanz **42**.

**42**: Weiße Kristalle, Schmp.: 190-192°C, Ausb.: 1.8 g (70%).-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>FNO<sub>2</sub> (155.1).<sup>160</sup>-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3385 (NH), 3200-2800 (COOH), 1662 (C=O), 1601, 1571 (C=C), 1325 (Aryl-F), 1258 (C-N), 1179, 1142 (C-O), 978 (C-C).-<sup>1</sup>**H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 7.74 (dd, 1H,  $J_{H-F}$  = 7.1 Hz,  $J$  = 8.7 Hz, H6), 6.48 (dd, 1H,  $J$  = 2.6 Hz,  $J_{H-F}$  = 11.9 Hz, H3), 6.30 (ddd, 1H,  $J$  = 2.6 Hz,  $J$  = 8.7 Hz,  $J_{H-F}$  = 8.7 Hz, H5).-**MS** (70 eV): m/z 155 (M<sup>+</sup>, 100%).

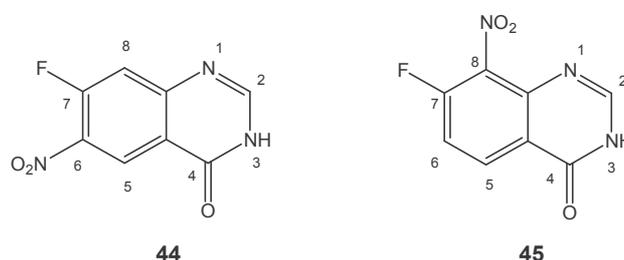
7-Fluor-3H-chinazolin-4-on (43)

Eine Lösung aus 500 mg (3.2 mmol) **42** und 670 mg (6.4 mmol) Formamidinacetat in 10 ml 2-Methoxyethanol wird 18 h rückfließend erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft und der verbleibende Rückstand in 0.01 M Ammoniak aufgenommen. Die Suspension wird abgesaugt und der Niederschlag mit Wasser gewaschen<sup>155</sup>.

**43:** Hellgelbe Kristalle, Schmp.: 218-220°C, Ausb.: 0.4 g (76%).-C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>FN<sub>2</sub>O (164.2) Ber. C 58.5 H 3.07 N 17.1 Gef. C 58.4 H 3.11 N 16.9.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3170 (NH), 3041 (CH arom./olef.), 1693 (C=O/C=N), 1668, 1618, 1499 (C=C), 1290 (C-N), 1257 (Aryl-F).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.36 (s, 1H, NH), 8.18 (dd, 1H,  $J_{H-F}$ = 6.3 Hz,  $J$ = 8.8 Hz, H5), 8.14 (s, 1H, H2), 7.46 (dd, 1H,  $J$ = 2.5 Hz,  $J_{H-F}$ = 10.1 Hz, H8), 7.39 (dt, 1H,  $J$ = 2.6 Hz,  $J$ = 8.8 Hz, H6).-**MS** (70 eV): m/z 164 (M<sup>+</sup>, 100%).

7-Fluoro-6-nitro-3H-chinazolin-4-on (44)

7-Fluoro-8-nitro-3H-chinazolin-4-on (45)

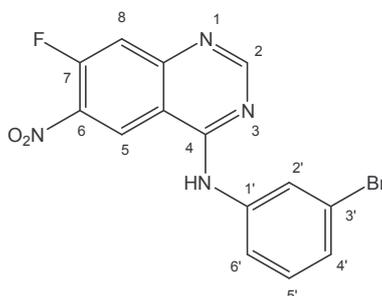


Man erhitzt 2 g (12 mmol) **43** mit einem Gemisch aus 27 ml rauchender Salpetersäure und 27 ml konz. Schwefelsäure auf 100°C und rührt 1 h bei dieser Temperatur. Beim Neutralisieren mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. fällt ein Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Es handelt sich dabei um das Produkt **44**. Das Filtrat wird mit Ether (3 x 200 ml) vollständig extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in SC Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt. Man erhält dabei die Substanzen **44** und **45**.

**44:** Hellgelbe Kristalle, Schmp.: 280°C, Ausb.: 1.35 g (54%).-C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (209.1) Ber. C 45.9 H 1.93 N 20.1 Gef. C 45.7 H 2.28 N 19.0.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3185 (NH), 3081, 3023 (CH arom./olef.), 1678 (C=O), 1627, 1609 (C=C), 1572 (C-NO<sub>2</sub>), 1524 (C=C), 1344 (C-NO<sub>2</sub>), 1281, 1264, 1220 (C-N), 1190, 1102 (F-Aryl), 877 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.85 (s, 1H, NH), 8.82 (d, 1H,  $J$ = 8.3 Hz, H5), 8.39 (s, 1H, H2), 7.87 (d, 1H,  $J_{H-F}$ = 12.4 Hz, H8).-**MS** (70 eV): m/z 209 (M<sup>+</sup>, 100%).

**45:** Hellgelbe Kristalle, Schmp.: 280°C, Ausb.: 0.58 g (23%).-C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (209.1) **-IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3183, 3150 (NH), 3072, 3041 (CH arom./olef.), 2922, 2897 (CH aliph.), 1679 (C=O), 1616, 1551, 1498 (C=C), 1294, 1265, 1228 (C-N), 1163, 1137, 1114 (Aryl-F), 1020 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.82 (s, 1H, NH), 8.37 (dd, 1H, *J*= 6.0 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 9.0 Hz, H5), 8.29 (s, 1H, H2), 7.71 (dd, 1H, *J*= 9.3 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 9.3 Hz, H6).-**MS** (70 eV): *m/z* 209 (M<sup>+</sup>, 55%).

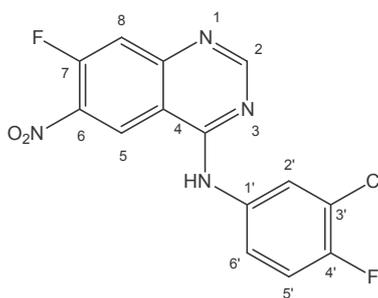
***N***-(3-Bromphenyl)-7-fluor-6-nitrochinazolin-4-amin (**46**)



**46**

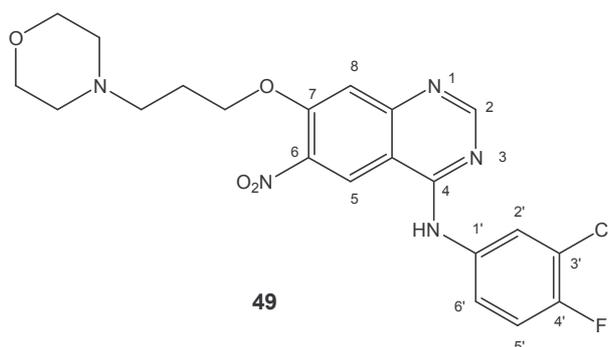
Eine Lösung aus 900 mg (4.3 mmol) **44** in 18 ml Thionylchlorid wird 3 h unter Zusatz von 12 Tropfen DMF rückfließend erhitzt. Das Thionylchlorid wird i. Vak. abgedampft. Anschließend nimmt man den Rückstand in 25 ml abs. Dichlormethan auf und tropft eine Lösung aus 900 mg (5.2 mmol) 3-Bromanilin in abs. Isopropanol zu. Nachdem der Ansatz 15 min bei RT gerührt wird, gibt man n-Hexan bis zur vollständigen Fällung zu. Das entstandene Hydrochlorid wird abfiltriert und in wässrigem Methanol gelöst. Man neutralisiert mit Triethylamin, wobei ein Niederschlag von Substanz **46** entsteht, der abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet wird.

**46:** Gelbe Kristalle, Schmp.: 196°C, Ausb.: 870 mg (56%).-C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>BrFN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (363.1) Ber. C 46.3 H 2.22 N 15.4 Gef. C 46.3 H 2.37 N 15.2.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3402 (NH), 3091, 3061 (CH arom./olef.), 1632 (C=N), 1578 (C-NO<sub>2</sub>), 1532 (C=C), 1380 (C-NO<sub>2</sub>), 1327 (C-N), 1103 (C-O), 1071 (Aryl-Br), 995 (C-C), 873 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.51 (s, 1H, NH), 9.64 (d, 1H, *J*<sub>H-F</sub> 8.0 Hz, H5), 8.77 (s, 1H, H2), 8.17 (s, 1H, H2'), 7.87 (dd, 1H, *J*= 2.2 Hz, *J*= 8.9 Hz, H6'), 7.84 (d, 1H, *J*<sub>H-F</sub>= 12.5 Hz, H8), 7.41 (m, 2H, H4' und H5').-**MS** (70 eV): *m/z* 362/364 (M<sup>+</sup>, 84/70%).

*N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-fluor-6-nitrochinazolin-4-amin (**47**)**47**

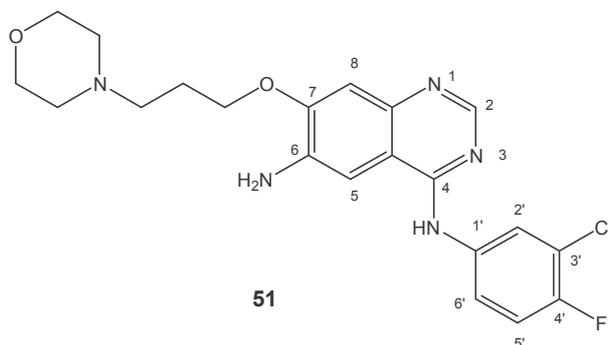
Die Synthese erfolgt analog **46** aus 2 g (9.6 mmol) **44** und 2 g (15.1 mmol) 3-Chlor-4-fluoranilin. Der entstandene Niederschlag von Substanz **47** wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

**47**: Gelbe Kristalle, Schmp.: 238°C, Ausb.: 870 mg (60%).-C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (336.7) Ber. C 49.9 H 2.10 N 16.6 Gef. C 50.2 H 2.16 N 16.6.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3416 (NH), 3048 (CH arom./olef.), 1633 (C=N), 1579 (C-NO<sub>2</sub>), 1538 (C=C), 1380 (C-NO<sub>2</sub>), 1356 (Aryl-F), 1329 (C-N), 1103 (C-O), 1060 (Aryl-Cl), 875 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.54 (s, 1H, NH), 9.60 (d, 1H,  $J_{H-F}$  8.0 Hz, H5), 8.75 (s, 1H, H2), 8.15 (dd, 1H,  $J$  = 2.2 Hz,  $J_{H-F}$  = 6.6 Hz, H2'), 7.87 (d, 1H,  $J_{H-F}$  = 12.5 Hz, H8), 7.80 (m, 1H, H6'), 7.50 (dd, 1H,  $J$  = 9.1 Hz,  $J_{H-F}$  = 9.1 Hz, H5').-**MS** (70 eV):  $m/z$  336 (M<sup>+</sup>, 100%).

*N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-[3-(4-morpholinyl)propoxy]-6-nitrochinazolin-4-amin (**49**)

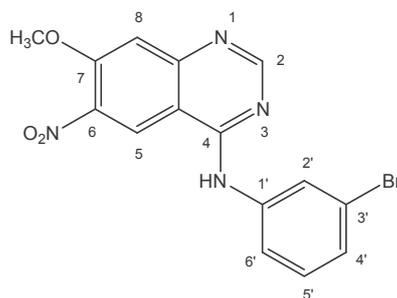
Zu einer Lösung aus 400 mg (2.8 mmol) 3-(4-Morpholinyl)-1-propanol in 10 ml abs. Tetrahydrofuran gibt man 67 mg (2.8 mmol) Natriumhydrid zu und rührt 2h bei RT. Anschließend tropft man das entstandene Alkoholat in eine Lösung aus 230 mg (0.7 mmol) **47** in 6 ml abs. Tetrahydrofuran zu. Die Reaktion wird 18 h rückfließend erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. zur Hälfte abgedampft. Man gibt der verbleibenden Mischung 10 ml Wasser zu und extrahiert vollständig mit Ethylacetat (3 x 15 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt. Man erhält dabei die Substanz **49**.

**49**: Orange-rote Kristalle, Schmp.: 194-195°C, Ausb.: 280 mg (90%).-C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (461.9)<sup>156</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3416 (NH), 3048 (CH arom./olef.), 2997, 2913 (CH aliph.), 1631 (C=N), 1572 (C-NO<sub>2</sub>), 1548 (C=C), 1380 (C-NO<sub>2</sub>), 1323 (Aryl-F), 1321 (C-N), 1103 (C-O), 1060 (Aryl-Cl), 875 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.16 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, H5), 8.68 (s, 1H, H2), 8.17 (dd, 1H,  $J= 2.4$  Hz,  $J_{H-F}= 6.7$  Hz, H2'), 7.88-7.78 (m, 1H, H6'), 7.50 (s, 1H, H8), 7.47 (dd, 1H,  $J= 8.9$  Hz,  $J_{H-F}= 8.9$  Hz, H5'), 4.36 (t, 2H,  $J= 6.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-O), 3.57 (t, 4H,  $J= 4.5$  Hz, MorpholinCH<sub>2</sub>), 2.46 (t, 2H,  $J= 7.0$  Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.37 (m, 4H, MorpholinCH<sub>2</sub>), 1.94 (quin, 2H,  $J= 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 461 (M<sup>+</sup>, 2%).

*N*<sup>4</sup>-(3-Chlor-4-fluorphenyl)- 7-[3-(4-morpholinyl)propoxy]chinazolin-4,6-diamin (**51**)

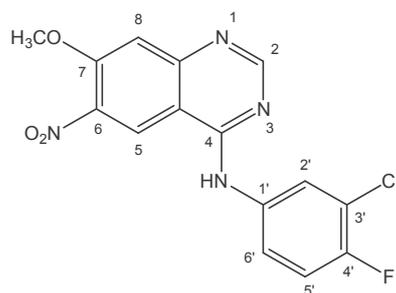
Man rührt eine Lösung von 280 mg (0.6 mmol) **49** und 450 mg Eisenspäne in einem Gemisch aus 5 ml Eisessig und 10 ml Ethanol 3 h bei 90°C. Man gibt den Ansatz auf ca. 5 ml Wasser, bringt mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. auf pH 5-6 und extrahiert vollständig mit Ether (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt.

**51**: Orange-rote Kristalle, Schmp.: 166-167°C, Ausb.: 180 mg (68%).-C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClFN<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (431.9)<sup>156</sup>.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3416 (NH), 3048 (CH arom./olef.), 2997, 2913 (CH aliph.), 1631 (C=N), 1548 (C=C), 1323 (Aryl-F), 1321 (C-N), 1103 (C-O), 1060 (Aryl-Cl).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.37 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.19 (dd, 1H, *J*= 2.5 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 6.9 Hz, H<sub>2'</sub>), 7.83-7.79 (m, 1H, H<sub>6'</sub>), 7.39 (dd, 1H, *J*= 9.1 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 9.1 Hz, H<sub>5'</sub>), 7.38 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.09 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 5.34 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.20 (t, 2H, *J*= 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 3.59 (t, 4H, *J*= 4.5 Hz, MorpholinCH<sub>2</sub>), 2.51 (t, 2H, *J*= 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.41 (m, 4H, MorpholinCH<sub>2</sub>), 1.97 (quin, 2H, *J*= 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 431 (M<sup>+</sup>, 5%).

*N*-(3-Bromphenyl)-7-methoxy-6-nitrochinazolin-4-amin (**56**)**56**

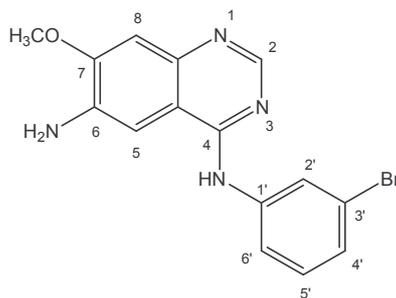
Eine Lösung aus 1 g (2.8 mmol) **46** in 30 ml abs. Tetrahydrofuran wird mit einer Suspension aus 1 g Natriummethylat in 10 ml abs. Tetrahydrofuran versetzt. Die Reaktion wird 18 h rückfließend erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft und der verbleibende Rückstand in Wasser aufgenommen. Der entstandene Niederschlag von Substanz **56** wird abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgearbeitet.

**56**: Gelb-braune Kristalle, Schmp.: 203°C, Ausb.: 0.9 g (87%).-C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (362.3) Ber. C 48.0 H 2.96 N 14.9 Gef. C 48.1 H 3.21 N 14.9.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3404 (NH), 3127, 3062 (CH arom./olef.), 2927 (CH aliph.), 1626 (C=N), 1571 (C-NO<sub>2</sub>), 1530 (C=C), 1355 (C-NO<sub>2</sub>), 1243 (C-N), 1104 (C-O), 1059 (Aryl-Br), 994 (C-C), 856 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.14 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, H5), 8.71 (s, 1H, H2), 8.19 (s, 1H, H2'), 7.87 (d, 1H, *J*= 7.8 Hz, H6'), 7.50 (s, 1H, H8), 7.37 (m, 2H, H4' und H5'), 4.07 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 362/364 (M<sup>+</sup>, 87/74%).

*N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-methoxy-6-nitrochinazolin-4-amin (**57**)**57**

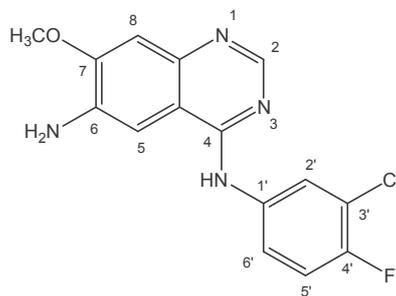
Die Synthese erfolgt analog **56** aus 1 g (3.0 mmol) **47** und 1 g Natriummethylat. Der Niederschlag von Substanz **57** wird abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgearbeitet.

**57**: Orange-gelbe Kristalle, Schmp.: 231°C, Ausb.: 0.86 g (83%).-C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (348.7) Ber. C 51.7 H 2.89 N 16.1 Gef. C 51.4 H 3.04 N 16.0.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3392 (NH), 3123, 3067 (CH arom./olef.), 2929 (CH aliph.), 1627 (C=N), 1572 (C-NO<sub>2</sub>), 1535, 1499 (C=C), 1355 (C-NO<sub>2</sub>), 1339 (Aryl-F), 1234 (C-N), 1104 (C-O), 1062 (Aryl-Cl), 994 (C-C), 856 (C-NO<sub>2</sub>).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 10.18 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, H5), 8.68 (s, 1H, H2), 8.16 (dd, 1H,  $J$ = 2.4 Hz,  $J_{H-F}$ = 6.7 Hz, H2'), 7.80 (m, 1H, H6'), 7.48 (s, 1H, H8), 7.47 (dd, 1H,  $J$ = 9.1 Hz,  $J_{H-F}$ = 9.1 Hz, H5'), 4.07 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV):  $m/z$  348 (M<sup>+</sup>, 100%).

$N^4$ -(3-Bromphenyl)-7-methoxychinazolin-4,6-diamin (**58**)**58**

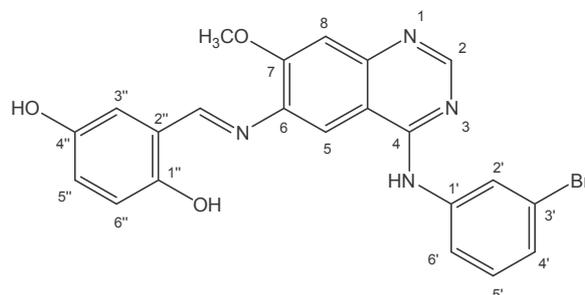
Man rührt eine Lösung aus 480 mg (1.3 mmol) **56** und 900 mg Eisenspäne in einem Gemisch aus 10 ml Essigsäure 10%ig und 20 ml Ethanol 3 h bei 90°C. Man gibt den Ansatz auf ca. 10 ml Wasser, bringt mit gesättigter Natriumcarbonat-Lsg. auf pH 5-6 und extrahiert vollständig mit Ether (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt.

**58**: Braunes Pulver, Schmp.: 224°C (Z), Ausb.: 183 mg (53%).-C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>4</sub>O (345.2) Ber. C 52.2 H 3.80 N 16.2 Gef. C 52.1 H 3.96 N 15.8.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3424, 3324 (NH), 3072 (CH arom./olef.), 2934 (CH aliph.), 1698 (C=N), 1632, 1575, 1517 (C=C), 1241 (C-N), 1063 (Aryl-Br), 1007 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.83 (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, H2), 8.15 (s, 1H, H2'), 7.81 (m, 1H, H6'), 7.46 (s, 1H, H8), 7.34 (t, 1H,  $J$ = 8.0 Hz, H5'), 7.29 (m, 1H, H4'), 7.12 (s, 1H, H5), 5.59 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV):  $m/z$  344/346 (M<sup>+</sup>, 100/82%).

*N*<sup>4</sup>-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-methoxychinazolin-4,6-diamin (**59**)**59**

Die Synthese erfolgt analog **58** aus 1.4 g (4.0 mmol) **57** und 2.6 g Eisenspänen in 24 ml Eisessig und 50 ml Ethanol. Die Aufarbeitung von Substanz **59** erfolgt SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1).

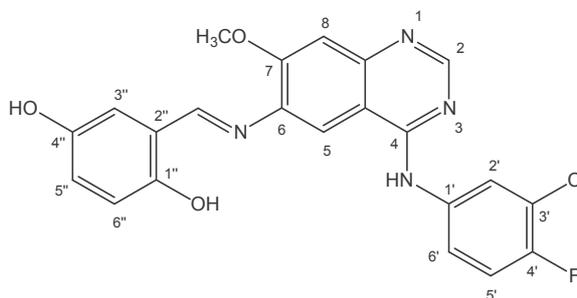
**59**: Gelb-braunes Pulver, Schmp.: 228°C (Z), Ausb.: 550 mg (43%).-C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>4</sub>O (318.7) Ber. C 56.5 H 3.79 N 17.6 Gef. C 56.4 H 3.89 N 17.6.-IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3430, 3334 (NH), 3061 (CH arom./olef.), 2959, 2934 (CH aliph.), 1701 (C=N), 1633, 1577, 1500 (C=C), 1262 (Aryl-F), 1220 (C-N), 1068 (Aryl-Cl), 1008 (C-C).-<sup>1</sup>H-NMR (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.39 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H2), 8.19 (dd, 1H, *J*= 2.4 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 6.8 Hz, H2'), 7.81 (m, 1H, H6'), 7.39 (dd, 1H, *J*= 9.1 Hz, *J*<sub>H-F</sub>= 9.1 Hz, H5'), 7.38 (s, 1H, H8), 7.11 (s, 1H, H5), 5.38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-MS (70 eV): *m/z* 318 (M<sup>+</sup>, 91%).

2-[(E)-({4-[(3-Bromphenyl)amino]-7-methoxychinazolin-6-yl}imino)methyl]benzen-1,4-diol (**60**)**60**

Es werden 240 mg (0.7 mmol) der Aminkomponente **59** mit 97 mg (0.7 mmol) des 2,5-Dihydroxybenzaldehyds in 30 ml Ethanol 2 h rückfließend erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft und der verbleibende Rückstand auf Eis gegeben. Es fällt ein dunkelroter Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Über 48 h wird der Niederschlag in 20 ml Dichlormethan gerührt und abgesaugt. Das Filtrat wird SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgearbeitet. Die so aufgereinigte tiefrote Substanz kann als Verbindung **60** identifiziert werden.

**60**: Tiefrotes Pulver, Ausb.: 220 mg (67%).-C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (465.3).-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3434 (OH), 1631, 1596, 1522 (C=C), 1241 (C-N), 1146 (C-O), 1087 (Aryl-Br).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.32 (s, 1H, OH1''), 9.70 (s, 1H, NH), 9.17 (s, 1H, OH4''), 8.93 (s, 1H, =CH), 8.61 (s, 1H, H2), 8.36 (s, 1H, H5), 8.21 (d, 1H, *J*= 2.0 Hz, H2'), 7.91 (dd, 1H, *J*= 2.0 Hz, *J*= 8.3 Hz, H6'), 7.40 (s, 1H, H8), 7.37 (t, 1H, *J*= 8.3 Hz, H5'), 7.30 (m, 1H, H4'), 7.08 (d, 1H, *J*= 2.9 Hz, H3''), 6.92 (dd, 1H, *J*= 2.9 Hz, *J*= 8.9 Hz, H5''), 6.84 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H6''), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 464/466 (M<sup>+</sup>, 4/2%).

2-[(E)-({4-[3-Chlor-4-fluorphenyl]amino}-7-methoxychinazolin-6-yl)imino)methyl]benzen-1,4-diol (**61**)

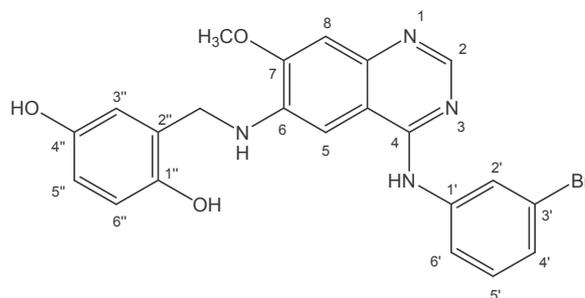


**61**

Die Synthese erfolgt analog **60** aus 240 mg (0.75 mmol) **59** und 104 mg (0.75 mmol) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in 30 ml Ethanol. Die Aufarbeitung von der tiefroten Substanz **61** erfolgt SC in Ethylacetat/Ethanol (9:1).

**61**: Tiefrotes Pulver, Schmp.: 198°C (Z), Ausb.: 280 mg (84%).-C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> · 1.5 H<sub>2</sub>O (465.9) Ber. C 56.7 H 4.11 N 12.0 Gef. C 56.6 H 4.07 N 11.9.-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3431 (OH), 1621, 1577, 1527 (C=C), 1224 (Aryl-F), 1154 (C-O), 1067 (Aryl-Cl), 1007 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 12.39 (s, 1H, OH1''), 9.74 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, OH4''), 8.92 (s, 1H, =CH), 8.59 (s, 1H, H2), 8.33 (s, 1H, H5), 8.19 (dd, 1H, *J* = 2.6 Hz, *J*<sub>H-F</sub> = 6.8 Hz, H2'), 7.83 (m, 1H, H6'), 7.46 (dd, 1H, *J* = 9.1 Hz, *J*<sub>H-F</sub> = 9.1 Hz, H5'), 7.32 (s, 1H, H8), 7.08 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, H3''), 6.92 (dd, 1H, *J* = 2.9 Hz, *J* = 8.9 Hz, H5''), 6.84 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H6''), 4.01 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): *m/z* 438 (M<sup>+</sup>, 20%).

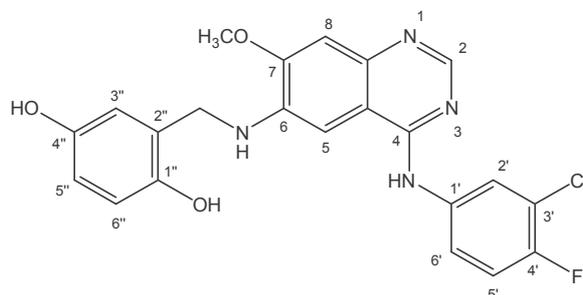
2-[(4-[(3-Bromphenyl)amino]-7-methoxychinazolin-6-yl)imino)methyl]benzen-1,4-diol  
**(62)**

**62**

Zu einer auf 5-10°C gekühlten Lösung aus 90 mg (0.2 mmol) **60** in 10 ml Methanol tropft man langsam eine Lösung aus 12 mg (0.2 mmol) Borandimethylamin-Komplex in 10 ml Methanol zu. Die Mischung wird 90 Minuten bei RT gerührt. Anschließend gießt man auf Eis und extrahiert mit Ether (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. bei 40°C entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in SC Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgereinigt.

**62:** Oranges Pulver, Ausb.: 50 mg (54%).-C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (467.3)-**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3431 (NH/OH), 3085 (CH arom.), 2959, 2928 (CH aliphat.), 1626 (C=N), 1596, 1579, 1520 (C=C), 1286 (C-N), 1148 (C-O), 1072 (Aryl-Br), 1008 (C-C).-**<sup>1</sup>H-NMR** (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.30 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, OH1''), 8.61 (s, 1H, OH4''), 8.39 (s, 1H, H2), 8.15 (s, 1H, H2'), 7.87 (d, 1H, J= 8.3 Hz, H6'), 7.37-7.22 (m, 3H, H4', H5' und H8), 7.12 (s, 1H, H5), 6.66-6.64 (m, 2H, H3'' und H6''), 6.47 (dd, 1H, J= 2.8 Hz, J= 8.5 Hz, H5''), 5.59 (t, 1H, J= 5.9 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.39 (d, 2H, J= 5.9 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-**MS** (70 eV): m/z 466/468 (M<sup>+</sup>, 0.7/0.3%).

2-[(4-[(3-Chlor-4-fluorphenyl)amino]-7-methoxychinazolin-6-yl]imino)methyl]benzen-1,4-diol (**63**)



**63**

Die Synthese erfolgt analog **62** aus 80 mg (0.2 mmol) **61** und 12 mg (0.2 mmol) Borandimethylamin-Komplex. Die Aufarbeitung der orangenen Substanz **63** erfolgt mit Hilfe der präparativen HPLC im isokratischen Fließmittelgemisch Methanol/Wasser (55:45).

**63**: Oranges Pulver, Ausb.: 49 mg (56%).-C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (440.8).-IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3427 (NH/OH), 3083 (CH arom.), 2965, 2919 (CH aliph.), 1635 (C=N), 1586, 1571, 1504 (C=C), 1272 (C-N), 1228, 1210 (Aryl-F), 1153 (C-O), 1072 (Aryl-Cl), 1005 (C-C).-<sup>1</sup>H-NMR (400MHz/d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.32 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, OH1''), 8.61 (s, 1H, OH4''), 8.37 (s, 1H, H2), 8.11 (dd, 1H,  $J = 2.6$  Hz,  $J_{H-F} = 6.8$  Hz, H2'), 7.81-7.77 (m, 1H, H6'), 7.41 (dd, 1H,  $J = 9.1$  Hz,  $J_{H-F} = 9.1$  Hz, H5'), 7.31 (s, 1H, H8), 7.12 (s, 1H, H5), 6.66-6.64 (m, 2H, H3'' und H6''), 6.47 (dd, 1H,  $J = 2.9$  Hz,  $J = 8.6$  Hz, H5''), 5.61 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.39 (d, 2H,  $J = 6.0$  Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).-MS (70 eV): m/z 440 (M<sup>+</sup>, 0.3%).

## 4.4 Pharmakologische Testung

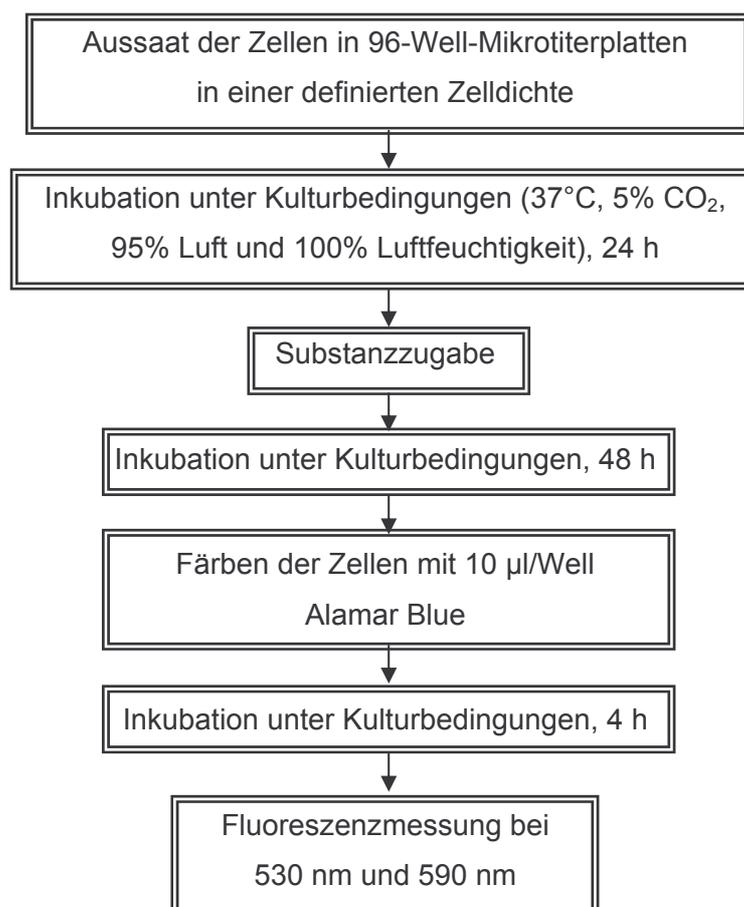
### 4.4.1 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität

Die zytotoxischen Aktivitäten wurden durch das National Cancer Institute, Bethesda, Maryland (USA) durchgeführt.

Bei dem verwendeten *in vitro*-Testmodell handelt es sich um ein Alamar Blue-Assay in Mikrotiterplatten<sup>161</sup>. Dabei erfolgt die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität einer Substanz durch Vergleich des Wachstumsverhaltens der Zellen in Gegenwart und Abwesenheit der zu untersuchenden Substanz.

In

**Abb. 107** wird der Ablauf des Zytotoxizitätstests zur besseren Übersicht dargestellt.



**Abb. 107:** Flussdiagramm für den Testablauf des Zytotoxizitätstest (Alamar Blue-Assay)

Die Aussaat der Zellen in Mikrotiterplatten erfolgt in einer definierten Zelldichte. Dabei beträgt die Dichte der MCF-7-Brustkrebszelllinie 5000 Zellen/Well, der NCI-H460-Lungenkrebszelllinie 1000 Zellen/Well und der SF-268-Zelllinie für das Zentrale Nervensystem 7500 Zellen/Well. Nach einer definierten Inkubationszeit von 24 h erfolgt die Substanzzugabe. Dazu werden die Substanzen zunächst in der 400fachen der maximalen Testkonzentration in Dimethylsulfoxid gelöst und anschließend mit frischem Medium und 0.1% Gentamicinsulfat verdünnt. Die Testkonzentration ist 100 µM. Außerdem werden mit 5-Fluorouracil und Doxorubicin zwei Standardwirkstoffe aufgebracht, deren Testergebnisse gegen die Zelllinien gut dokumentiert sind.

Zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der Substanzen muß die Änderung der Zellmenge im Bezug zur Ausgangszellmenge bestimmt werden. Daher werden zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Zellkulturen, denen nur das Lösungsmittel zum Medium zugesetzt wird, auf jeder 96-Well-Platte Kontrollkulturen mitgeführt.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Anfärben der Zellen mit Alamar Blue, das mit der mitochondrialen Dehydrogenase in stoffwechselaktiven Zellen reagiert und Farbkristalle bildet. Nach einer Inkubation unter Kulturbedingungen für weitere 4 h wird eine Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm durchgeführt.

Als Maß für die Zytotoxizität werden T/C-Werte in Prozent berechnet. Dabei handelt es sich um die prozentuale Beziehung zwischen dem Zellwachstum bei der Testsubstanz und dem Wachstum von Kontrollzellen. Zur Berechnung wird das prozentuale Verhältnis der Fluoreszenz der Testwells zu der durchschnittlichen Fluoreszenz der Kontrollwells herangezogen.

Die zytotoxische Aktivität der Testsubstanz wird wie folgt berechnet:

$$T/C [\%] = T^* / C^* \times 100$$

T\* = Mittelwert der Fluoreszenz der mit Testsubstanz behandelten Kulturen

C\* = Mittelwert der Fluoreszenz der Kontrollkulturen

## 4.4.2 Bestimmung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität

Die inhibitorischen Aktivitäten wurden durch die Firma MDS Pharma Services-Discovery, Taiwan (R.O.C.), ermittelt. Es handelt sich bei dem durchgeführten Test um einen Enzymassay<sup>150,151,152</sup>.

### 4.4.2.1 Gewinnung des Enzyms

#### Methode A:

Als Quelle des Enzyms (aktive Tyrosinkinasedomäne des EGFR's) werden humanrekombinante Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*-Zellen: Sf9-Zellen) verwendet. Die Gewinnung erfolgt mittels gentechnischer Methoden [Einbau des cDNS-Fragments der zytoplasmatischen EGFR-Domäne in Baculovirus, Einbringen dieses rekombinanten Virus in Sf9 (= *Spodoptera*)-Zellen → Expressierung einer aktiven EGFR-TK-Domäne, Isolierung und Reinigung mittels Immunaффinitätschromatographie].

#### Methode B:

Extrakt aus A431-Zellmembranen. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine Überexpressierung des EGFR's (HER1) aus.

### 4.4.2.2 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität wird das Enzym zusammen mit dem Substrat, der zu testenden Substanz und ATP in einem Puffer (50 mM HEPES, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7.4) 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Als Substrat wird ein Copolymer aus Glutaminsäure und Tyrosin (4:1) eingesetzt. Substanz, ATP und Substrat werden zuvor in DMSO gelöst und mit dem Inkubationspuffer so verdünnt, dass die DMSO-Konzentration ein Prozent beträgt<sup>162</sup>.

Zur Berechnung der inhibitorischen Aktivität wird der Test unter gleichen Bedingungen ohne Inhibitor (→ Bestimmung der maximalen Phosphorylierungsrate

$PT_{MAX}$ ) und ebenfalls ohne Enzym ( $\rightarrow$  Bestimmung der minimalen Phosphorylierungsrate  $PT_{MIN}$ ) durchgeführt.

Zusätzlich wird unter gleichen Bedingungen die inhibitorische Aktivität von Tyrphostin 47 ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ) bestimmt. Die für Tyrphostin 47 jeweils ermittelte inhibitorische Aktivität geht nicht in die Berechnung ein, sondern dient lediglich der Positivkontrolle. Alle Bestimmungen erfolgen jeweils zweimal.

Die Quantifizierung des jeweils gebildeten Phosphotyrosins erfolgt mittels der ELISA-Methode.

Die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Testsubstanz wird wie folgt berechnet:

$$\text{Inhibition [\%]} = 100\% - 100\% \times (PT_{TEST} - PT_{MIN}) / (PT_{MAX} - PT_{MIN})$$

$PT_{TEST}$  = gebildetes Phosphotyrosin bei Anwesenheit von Inhibitor

$PT_{MAX}$  = gebildetes Phosphotyrosin bei Abwesenheit von Inhibitor

$PT_{MIN}$  = gebildetes Phosphotyrosin bei Abwesenheit von Enzym