

**Paullonderivate
mit veränderter heterozyklischer Grundstruktur
als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fachbereich Chemie

vorgelegt von
Kathrin Lauenroth
aus Hamburg

Hamburg 2001

Gutachter: Priv. Doz. Dr. C. Kunick
Prof. Dr. D. Geffken

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2001

Für Stefan und meine Familie

In Christus liegen verborgen alle Schätze der Weisheit und der Erkenntnis.

Kolosser 2, 3

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2001 im Institut für Pharmazie der Universität Hamburg auf Anregung und unter Leitung von **Professor Dr. D. Geffken** und **Priv. Doz. Dr. C. Kunick**, denen ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die engagierte Betreuung herzlich danke.

Insbesondere danke ich **Priv. Doz. Dr. C. Kunick** für die Überlassung des Themas und vielzählige, wertvolle Impulse.

Ferner gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von **Dr. L. Meijer** (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) sowie **Herrn Dr. D. Zaharevitz** und dem National Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA) für die Durchführung der biologischen Testungen.

Herrn Dr. Th. Lemcke danke ich für die Durchführung der Molecular Modelling-Untersuchungen und die Hilfe bei Erstellung der Abbildungen.

Herrn Dr. V. Sinnwell und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die Aufnahme der NMR-Spektren und die engagierte Beratung bei besonderen Problemstellungen. Für die Aufnahme der MS-Spektren gilt mein Dank **Frau A. Meiners** und **Herrn M. Preuße**.

Weiterhin danke ich **Frau Dr. C. Schultz**, **Frau Dr. C. Bleeker**, **Herrn Dr. A. Link**, **Frau K. Wieking**, **Frau T. Pies**, **Herrn A. Golisade**, **Frau Dr. X. Xie** und **Herrn Dr. Z. Zeng** für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit sowie **allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie**, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| abs. | absolutiert |
| Ala | Alanin |
| aliph. | aliphatisch |
| ALL | acute lymphoblastic/lymphocytic leukaemia |
| arom. | aromatisch |
| AS | Aminosäure |
| Asp | Asparaginsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ber. | berechnet |
| br | breit |
| bzw. | beziehungsweise |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CDK | Cyclin Dependent Kinase; Cyclin-abhängige Kinase |
| CIP | CDK Interacting Proteins |
| CK1 | Casein Kinase 1 |
| CNRS | Centre National de la Recherche Scientifique |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| Δ | Rückfluss, Erwärmen |
| δ | chemische Verschiebung |
| d | Dublett |
| DARPP 32 | Dopamine and cyclic AMP-regulated Phosphoprotein, relative molecular mass 32 000 |
| DC | Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| EGFR-Kinase | Epidermal Growth Factor Receptor Kinase |
| EI | Electron Impact; Elektronenstoß- (Massenspektrometrie) |
| erk | extracellular signal regulated kinase |
| et al. | et alii |
| FGFr | Fibroblast Growth Factor receptor (Tyrosinkinase) |
| gef. | gefunden |
| GI ₅₀ | Growth Inhibition of 50 % |

| | |
|-------------------|--|
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutaminsäure |
| GSK-3 β | Glycogen Synthase Kinase-3 β |
| His | Histidin |
| HMBC | Hetero Multiple Bond Correlated Spectroscopy |
| HMQC | Hetero Multiple Quantum Correlated Spectroscopy |
| HRMS | High Resolution Mass Spectrum/Spectrometry; Hochauflösungsspektrum/-spektrometrie |
| Hrsg. | Herausgeber |
| IC ₅₀ | Concentration for 50 % Inhibition |
| Ile | Isoleucin |
| INK | CDK4 Inhibitor |
| IR | Infrarot |
| konz. | konzentriert |
| KSHV | Kaposi-Sarkom-Herpes Virus |
| LC ₅₀ | Lethal Concentration for 50 % |
| Leu | Leucin |
| log ₁₀ | dekadischer Logarithmus |
| Lys | Lysin |
| m | Multipllett |
| MAP-Kinase | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MAT1 | Ménage A Trois |
| MG_MID | Meangraph Midpoint |
| n.a. | nicht angegeben |
| NCI | National Cancer Institute |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| NOE | Nuclear Overhauser Enhancement |
| NOESY | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| p. A. | pro Analysi |
| PAK1 | p21-Cdc42/Rac-activated Kinase |
| PEG | Polyethylenglycol |
| Phe | Phenylalanin |
| PKA | cAMP-abhängige Proteinkinase |
| PKG | cGMP-abhängige Proteinkinase |
| ppm | parts per million |
| pRb | Retinoblastoma-Protein |

| | |
|--------|--|
| PTCA | perkutane transluminale koronare Angioplastie; percutaneous transluminal coronary angioplasty |
| P-TEFb | Positive Transcription Elongation Factor b |
| q | Quartett |
| quart. | quartär |
| RNS | Ribonucleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett |
| Schmp. | Schmelzpunkt |
| Ser | Serin |
| Src | „sarcoma it caused in chicken“, Onkogen-kodierte Kinase |
| t | Triplett |
| tert. | tertiär |
| TFIIH | Transcription Initiation Factor IIH |
| TGFβ | Transforming Growth Factor β |
| TGI | Total Growth Inhibition |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| Val | Valin |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Einleitung und Problemstellung | 1 |
| 1.1 | Cyclin-abhängige Kinasen..... | 1 |
| 1.2 | Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen..... | 1 |
| 1.3 | Paullone und Paullonderivate | 2 |
| 2 | Cyclin-abhängige Kinasen | 3 |
| 2.1 | Der Zellzyklus | 3 |
| 2.2 | Bisher bekannte CDK und Cycline | 5 |
| 2.2.1 | CDK mit neuronalen Funktionen | 6 |
| 2.2.2 | CDK mit direkter Wirkung auf die Transkription | 6 |
| 2.2.3 | Bisher nicht zugeordnete Cycline..... | 7 |
| 2.3 | Aufbau, Aktivierung und Inaktivierung der CDK | 8 |
| 2.3.1 | Aufbau einer CDK | 9 |
| 2.3.2 | Positive regulatorische Mechanismen, Aktivierung | 10 |
| 2.3.3 | Negative regulatorische Mechanismen, Inaktivierung | 13 |
| 2.4 | Substrate der CDK im Zellzyklus | 15 |
| 2.5 | Regulation des Zellzyklus durch CDK | 18 |
| 2.5.1 | CDK und Cycline im Zellzyklus, ein kurzer Überblick..... | 18 |
| 2.5.2 | Zusammenhang zwischen Kontrollpunkten und CDK-Funktion..... | 19 |
| 2.6 | Fehler im CDK-System und ihre pathogenetische Relevanz..... | 24 |
| 2.6.1 | Störungen bei Cyclin-abhängigen Kinasen, Cyclinen, ihren Modulatoren und Substraten | 24 |
| 2.6.2 | Zusammenhang möglicher Defekte mit dem Ablauf des Zellzyklus..... | 29 |
| 2.7 | Angriffspunkte für die Wiederherstellung eines funktionierenden CDK- Systems | 31 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.8 | Mögliche Anwendungsgebiete für CDK-Inhibitoren..... | 33 |
| 3 | Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen..... | 41 |
| 3.1 | Anwendung von natürlichen und synthetischen CDK-Inhibitoren und CDK-Modulatoren auf Proteinbasis | 41 |
| 3.2 | Synthetische CDK-Inhibitoren mit geringem Molekulargewicht | 44 |
| 3.2.1 | Inhibitoren mit Puringrundgerüst | 47 |
| 3.2.2 | CDK-Inhibitoren ohne Puringrundgerüst..... | 68 |
| 4 | Modifikationen am heterozyklischen Grundgerüst der Paullone..... | 111 |
| 4.1 | In Position 8 substituierte 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]-azepino[4,5- <i>b</i>]indol-5(4 <i>H</i>)-one | 112 |
| 4.1.1 | 8-Phenylhydrazono-5,6,7,8-tetrahydro-4 <i>H</i> -thieno[3,2- <i>b</i>]azepin-5-one | 114 |
| 4.1.2 | Darstellung der 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol- 5(4 <i>H</i>)-one | 115 |
| 4.1.3 | Synthese von 5-Oxo-4,5,6,11-tetrahydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol-8-carbonitril..... | 117 |
| 4.1.4 | Darstellung von 6-(3-Amino-2-thienyl)-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro- pyridazin-3-onen..... | 119 |
| 4.2 | 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol-6(5 <i>H</i>)-one | 125 |
| 4.2.1 | Darstellung des 6,7,8,9-Tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]azepin-5,8-dions | 125 |
| 4.2.2 | 5-Phenylhydrazono-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]azepin-8-one | 130 |
| 4.2.3 | 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol-6(5 <i>H</i>)-one und 6-(2-Amino-3-pyridyl)-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-one . | 131 |
| 4.3 | 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol-6(5 <i>H</i>)-one | 135 |
| 4.3.1 | Synthese des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters | 135 |
| 4.3.2 | Synthese von 5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]azepin-6,9(7 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-dion..... | 137 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.3.3 | Synthese von 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i>]indol-6(5 <i>H</i>)- onen | 140 |
| 4.4 | Synthese des 3-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2- carbonsäure-methylesters | 142 |
| 5 | Modifikationen an der Lactamgruppierung und der Substitution der Paullone | 144 |
| 5.1 | Thiolactam und Thiolactimether von Alsterpaullon | 144 |
| 5.2 | Nitrierung von 7,12-Dihydro-indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on ... | 147 |
| 5.2.1 | Synthese von 10-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)- on..... | 147 |
| 5.2.2 | Strukturaufklärung von 10-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on | 149 |
| 5.3 | Versuche zu Mannich-Reaktionen mit 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9- trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on | 155 |
| 5.4 | Reduktion von 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro- indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on | 162 |
| 5.4.1 | ¹ H ¹ H-COSY- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 2-(3-Hydroxybutyl)-9- trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on | 165 |
| 6 | Biologische Aktivität der Paullonanaloga..... | 169 |
| 6.1 | CDK- und GSK-3β-inhibitorische Aktivität | 169 |
| 6.2 | In vitro Antitumoraktivität..... | 178 |
| 7 | Molecular Modelling | 185 |
| 8 | Zusammenfassung | 192 |
| 9 | Summary | 194 |
| 10 | Experimenteller Teil..... | 196 |

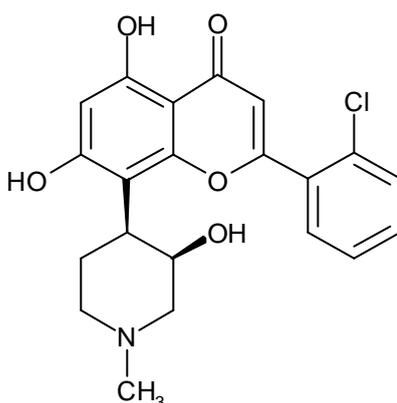
| | | |
|-----------|---|------------|
| 10.1 | Allgemeines..... | 196 |
| 10.2 | Synthesen/Analytische Daten | 198 |
| 10.3 | Pharmakologische Testung..... | 241 |
| 10.3.1 | CDK-Testsysteme..... | 241 |
| 10.3.2 | GSK-3 β -Testsystem..... | 243 |
| 10.3.3 | In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI (NCI Human Tumor Cell Line Anti-Cancer Drug Screen) | 244 |
| 11 | Literaturverzeichnis | 247 |
| 12 | Gefahrstoffe | 259 |

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Cyclin-abhängige Kinasen

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Regulation des Zellzyklus sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) als mögliche Ziele bei der Behandlung von Krankheiten, die mit einer gestörten Zellproliferation einhergehen, von Interesse. In der vorliegenden Arbeit wird zunächst ein Überblick über Funktionen und Aufgaben der bisher entdeckten CDK gegeben. Weiterhin werden Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit CDK beschrieben, wobei auch auf pathologische Vorgänge eingegangen wird, an denen CDK beteiligt sind.

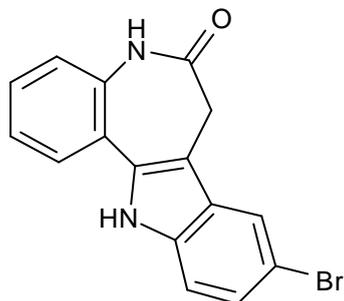
1.2 Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen



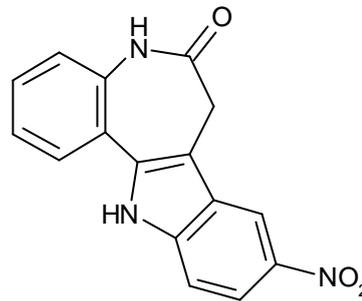
Flavopiridol(1)

Potentielle Anwendungsgebiete für CDK-Inhibitoren findet man vor allem im Bereich der Tumorerkrankungen, aber auch bei der Alzheimer-, Parkinson- und kardiovaskulären Erkrankungen. Zahlreiche CDK-inhibitorische Verbindungen wurden bisher synthetisiert und im Hinblick auf verschiedene Anwendungsmöglichkeiten untersucht. Am weitesten ist die pharmazeutische Entwicklung des CDK-Inhibitors Flavopiridol (1) fortgeschritten, welcher sich in der 2. Phase der klinischen Prüfung für eine Monotherapie von Tumorerkrankungen befindet.¹⁻⁴ In der vorliegenden Arbeit wird eine Übersicht über die derzeit literaturbekannten CDK-Inhibitoren gegeben.

1.3 Paullone und Paullonderivate



Kenpaullon (2)



Alsterpaullon (3)

Paullone sind 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-one, die zuerst von C. Kunick synthetisiert wurden.⁵ Die Leitstruktur Kenpaullon (2) zeigte in entsprechenden Untersuchungen eine Aktivität an CDK1, CDK5 und GSK-3 β und außerdem antiproliferative Eigenschaften im in vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA).^{6,7}

Zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden von C. Schultz systematische Strukturabwandlungen durchgeführt, welche zu Alsterpaullon (3) führten, dem Paullon mit der bisher höchsten Aktivität bei CDK1, CDK5 und GSK-3 β und einer ausgeprägten antiproliferativen Wirkung.⁷⁻⁹

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weitere Veränderungen an Paullonen durchgeführt werden, wodurch die Wirkung an CDK, GSK-3 β und Tumorzelllinien gesteigert und ein Beitrag zur weiteren Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen geleistet werden sollte. Außerdem sollten Paullone mit besseren Löslichkeitseigenschaften gefunden werden. Dabei wurden zuerst verschiedene Abwandlungen am heterozyklischen Grundgerüst der Paullone durchgeführt. Durch Molecular Modelling-Untersuchungen sollte eine Begründung für die unterschiedlichen inhibitorischen Aktivitäten der daraus erwachsenen Kenpaullonanaloga bei CDK1 gefunden werden.

Ein anderer Teil befasst sich mit der Weiterentwicklung von Paullonen, die von C. Schultz synthetisiert wurden. Hierbei sollten vor allem Substituenten und die Lactamgruppierung auf Basis der von C. Schultz gewonnenen Erkenntnisse modifiziert werden.

2 Cyclin-abhängige Kinasen

2.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung von eukaryontischen Zellen läuft nach einem Muster ab, welches wegen seiner rhythmischen Wiederholbarkeit als Zellzyklus bezeichnet wird. Einteilen läßt sich dieser neben einer Ruhephase G₀ in vier unterschiedliche Aktivitätsphasen, die G₁-, S-, G₂- und M-Phase. (Siehe Bild 2-1.)

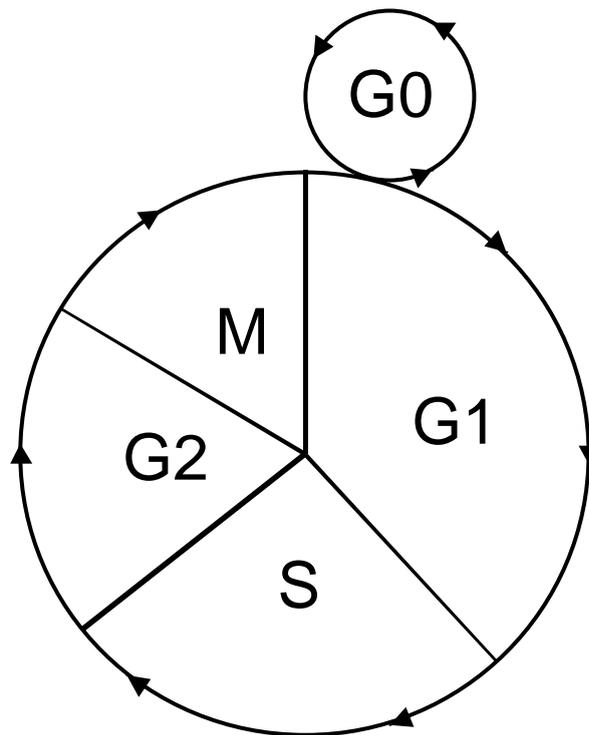


Bild 2-1: Ein typischer Zellzyklus einer eukaryontischen Zelle mit Ruhephase G₀, den Zwischenphasen G₁ und G₂, der Synthese-Phase (S) und der Mitose-Phase (M). Die Größe der Felder im größeren Kreis gibt einen groben Hinweis auf das Verhältnis der Phasen in Bezug auf ihre Dauer.¹⁰

Nach einer erfolgreichen Teilung einer Zelle beginnt der Zellzyklus der entstandenen Tochterzellen mit der G₁-Phase, aus welcher die jeweilige Zelle in einen Ruhezustand übergehen kann, die G₀-Phase. Die G₀-Phase mündet nach erneuter Aktivierung der Zelle wieder in die G₁-Phase, aus der die Zelle dann in die S-Phase übergeht. In der S-Phase werden nötige Vorbereitungen für eine Teilung in zwei Tochterzellen getroffen, wie die Replikation der Erbsubstanz DNS (Desoxyribonucleinsäure). In der folgenden G₂-Phase liegt die genetische

Information deshalb in doppelter Ausführung vor. Erst nach dieser zweiten Zwischenphase beginnt die eigentliche Teilung der Zelle in der M-Phase. Ist die M-Phase abgeschlossen, liegen zwei Tochterzellen mit jeweils einfacher genetischer Information vor, die den Zellzyklus wieder mit der G1-Phase beginnen können.

Der korrekte Ablauf dieses Zellzyklus ist für einen Organismus lebenswichtig. Eine Zelle verfügt deshalb über ein komplexes Gebilde aus Kontrollmechanismen, die sicherstellen sollen, dass keine den Organismus schädigenden Vorgänge ablaufen können. Erst ein kleiner Teil dieses komplizierten Regelwerkes ist bisher wissenschaftlich untersucht und verstanden worden. Es ist aber schon jetzt sicher, dass die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen.

CDK sind Proteine mit einer Proteinkinaseaktivität, für die eine Assoziation mit einem weiteren Protein, einem Cyclin, essentiell für die Ausbildung einer katalytischen Aktivität ist. Die Phosphorylierung durch CDK mit Adenosintriphosphat (ATP) als Phosphatdonor findet an Serin- und Threoninresten statt und wird durch Prolinreste dirigiert.^{11,12}

Der katalytische Kern besteht bei den CDK aus ca. 300 Aminosäuren, die bei den verschiedenen Mitgliedern der CDK-Familie eine hohe Homologie aufweisen. Ein besonderes Merkmal ist hierbei eine konservierte Sequenz, die als PSTAIRE-Region bezeichnet wird und für die Bindung der entsprechenden Cycline sowie für die Spezifität dieser Bindung mitverantwortlich ist.^{13,14}

Cycline sind Proteine mit zyklischen Konzentrationsschwankungen im Zellzyklus. Es handelt sich um Proteine von 35-90 kDa mit einer Homologie in einem Bereich, der ca. 100 Aminosäuren beinhaltet und als Cyclin-Box bezeichnet wird. Die Cyclin-Box ist der Sequenzabschnitt, der für die Bindung an eine CDK verantwortlich ist.^{13,15} Die einzelnen Cycline haben eine unterschiedliche Präferenz für bestimmte CDK. Ihre Aufgabe ist es, die jeweils dazugehörige CDK durch Assoziation zu aktivieren.

Eine geordnete Progression durch den Zellzyklus wird durch sequentielle Aktivierung von CDK/Cyclin-Komplexen gesteuert. Dabei kann man ein Anfluten und Abnehmen der Cyclin-Konzentrationen in der Zelle je nach Phase der Zellteilung beobachten, während die Konzentration der meisten CDK relativ konstant bleibt.¹³

2.2 Bisher bekannte CDK und Cycline

Zur Zeit werden in der Literatur 9 Cyclin-abhängige Kinasen und 16 Cycline beschrieben.¹⁶ Die möglichen Kombinationen der CDK mit Cyclinen sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.¹⁷

Cyclin D1 ist in allen Zellen sehr wichtig, während die Cycline D2 und D3 nur in einigen Zelltypen vorkommen.¹³ Cyclin-abhängige Kinasen, die mit Cyclin F, G, I oder K assoziiert sind, wurden bisher nicht beschrieben, ebenso wie das zu CDK3 gehörige Cyclin.^{7,17,18} In Testsystemen wurde CDK3 im Komplex mit Cyclin E verwendet.¹⁹

Tabelle 2-1: CDK und ihre jeweils aktivierenden Cycline oder Proteine

| Cyclin-abhängige Kinase | Cyclin (oder Protein) |
|-------------------------|-----------------------|
| CDK1 | A, B |
| CDK2 | A, E |
| CDK3 | unbekannt |
| CDK4 | D (1-3) |
| CDK5 | D, p35 bzw. p25 |
| CDK6 | D |
| CDK7 | H |
| CDK8 | C |
| CDK9 | T |
| unbekannt | F, G, I, K |

In unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Organismus üben diese Enzyme sehr verschiedene, zum Teil wenig erforschte Funktionen aus.

Eine grobe Einteilung nach Funktionen ergibt drei Gruppen von CDK.^{17,18,20}

- CDK mit regulatorischen Aufgaben im Zellzyklus: CDK1, 2, 3, 4, 6 und 7.
- CDK mit neuronalen Funktionen: CDK5.
- CDK, die direkt an der Transkription beteiligt sind: CDK7, 8 und 9.

Da auf den Ablauf des Zellzyklus und die Funktionen der beteiligten CDK später ausführlich eingegangen wird, sollen hier kurz die anderen Bereiche, in denen CDK eine Rolle spielen, erläutert werden.

2.2.1 CDK mit neuronalen Funktionen

Die Aktivität von CDK5 ist im Gehirn am höchsten. Hier ist sie wichtig für das Wachstum von Neuriten und die neuronale Entwicklung.^{15,17,20}

Untypischerweise bildet CDK5 in der Regel keinen Komplex mit einem Cyclin, sondern mit dem Protein p35 oder mit p25, welches durch proteolytische Spaltung aus p35 entsteht.^{7,21} Eine Verwandtschaft zwischen p35 bzw. p25 und den Cyclinen besteht nicht, d.h. es findet sich hier nicht das typische Aminosäuremuster der Cyclin-Sequenz. Die Affinität zu einer CDK kann allerdings mit einer Cyclin-ähnlichen Faltung des Proteins begründet werden.^{17,22}

Ein Substrat von CDK5 ist DARPP-32 (Dopamine and cyclic AMP-regulated Phosphoprotein, relative molecular mass 32 000²¹), ein Striatum-Protein, welches je nach Phosphorylierungsgrad und Phosphorylierungsposition an bestimmten Aminosäuren unterschiedliche Wirkungen entfalten kann. Wird es von CDK5 (an Thr75) phosphoryliert, so hemmt es die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA).¹¹

Phosphorylierung von PAK1 (p21-Cdc42/Rac-activated Kinase²³), einer neuronalen Serin/Threonin-Kinase, durch CDK5/p35 führt zu deren Hemmung.¹⁹

2.2.2 CDK mit direkter Wirkung auf die Transkription

CDK7/Cyclin H wird eine duale Rolle zugeschrieben. Zum einen ist diese CDK an der Transkription beteiligt, zum anderen führt sie eine aktivierende Phosphorylierung an einer am Zellzyklus beteiligten CDK aus. (Siehe Kapitel 2.3.2.)

Bei der Regulation der Transkription ist CDK7/Cyclin H im Zusammenspiel mit einer dritten Untereinheit, MAT1 (Ménage A Trois²⁴), Teil eines größeren Komplexes TFIIF (Transcription Initiation Factor IIF). Dieser phosphoryliert eine Untereinheit der RNS-Polymerase II, welche wiederum im Elongationsablauf benötigt wird.

CDK8/Cyclin C ist ebenfalls im Bereich der RNS-Polymerase II gefunden worden und ist hier verantwortlich für die Phosphorylierung an einer anderen Stelle derselben RNS-Polymerase-Untereinheit, die auch von CDK7/Cyclin H/MAT1 verändert wird.¹⁷

Schließlich ist eine Phosphorylierung dieser Untereinheit der RNS-Polymerase auch durch den CDK9/Cyclin T-Komplex möglich,¹⁷ welcher in diesem Zusammenhang auch als P-TEFB (Positive Transcription Elongation Factor B) bezeichnet wird.²⁵

2.2.3 Bisher nicht zugeordnete Cycline

Von den Cyclinen, die bisher keiner CDK zugeordnet werden konnten, findet man zwei im Zellzyklus: Das Gen von Cyclin G wird bei DNS-Schädigung von p53 (s.u.) aktiviert, wobei die Funktion von Cyclin G noch nicht geklärt ist.^{13,15} Die Konzentration von Cyclin F hängt im Zellzyklus von Cyclin A ab und könnte deshalb an G2- oder M-Phase-Funktionen beteiligt sein.¹⁵

2.3 Aufbau, Aktivierung und Inaktivierung der CDK

Insgesamt existieren in einer Zelle vielfältige Möglichkeiten zur Kontrolle der CDK-Aktivität, so dass sich eine große regulatorische Flexibilität in Bezug auf den Zellzyklus ergibt.

Die CDK-Aktivität kann durch folgende Mechanismen gesteuert werden:^{12,26-29}

- Assoziation mit aktivierenden Cyclin-Untereinheiten
- Synthese und Abbau dieser Cyclin-Untereinheiten
- Posttranslationale Modifikationen durch Kinasen und Phosphatasen
- Interaktionen mit natürlichen Inhibitoren und Aktivatoren
- Subzellulärer Aufenthaltsort

(siehe Bild 2-2)

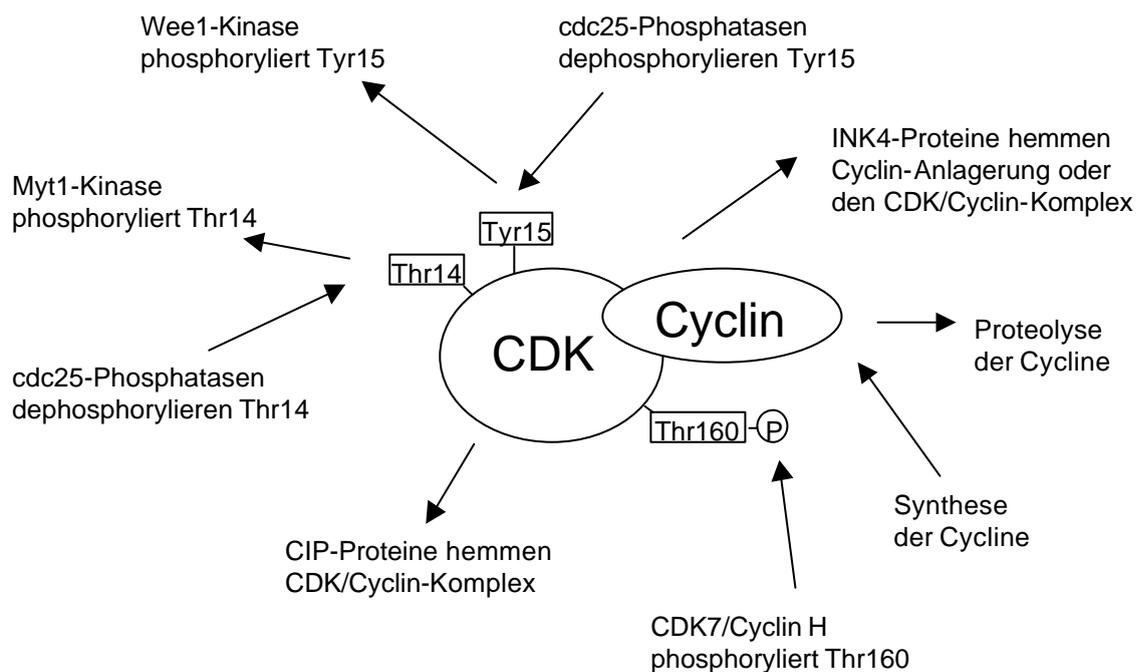


Bild 2-2: Regulation der CDK-Aktivität am Beispiel der CDK2. Der angegebene CDK/Cyclin-Komplex liegt in aktiver Form vor. Pfeile, die von der zentralen Darstellung des Komplexes wegführen, zeigen eine Inaktivierung an. Pfeile, die zum Komplex hindeuten, beschreiben Aktivierungsschritte.

2.3.1 Aufbau einer CDK

Im Prinzip findet man bei den CDK die gleiche Faltung wie bei anderen eukaryontischen Proteinkinasen (z.B. PKA),³⁰ ebenfalls allgemein konserviert sind katalytische Reste, die man in der aktiven Spalte der CDK findet.^{14,17}

Den folgenden Ausführungen zur Struktur der CDK liegen Untersuchungen an Kristallen von CDK2 zugrunde. Die Angaben einzelner Aminosäuren und deren Position kann deshalb bei anderen CDK variieren. Da in der Familie der CDK aber eine hohe Homologie zu finden ist, ist eine Vergleichbarkeit der dreidimensionalen Strukturen wahrscheinlich.¹⁷ Beispielsweise ist CDK5 zu 73 % identisch mit CDK1 und zu 75 % mit CDK2.¹¹

Die katalytische Einheit der CDK beinhaltet ca. 300 Aminosäuren.^{13,14} Sie lässt sich einteilen in eine N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-85), die zum größten Teil aus β -Faltblatt-Strukturen besteht, und eine größere, C-terminale Domäne, die wiederum reich an α -Helices ist.^{14,30} (Siehe Bild 2-3.)

Eine tiefe Spalte an der Verbindung der beiden Domänen bildet die katalytische Region mit der ATP-Bindungsstelle. Die Verbindung zwischen beiden Domänen ist einem Scharnier ähnlich, besteht nur aus wenigen Aminosäuren und wird Hinge-Region genannt (hinge: engl. Türangel, Scharnier).

Ein typisches Merkmal der CDK ist das Vorhandensein einer streng konservierten Sequenz im Bereich der N-terminalen Domäne, die PSTAIRE genannt wird (Aminosäuren 45-51). Diese Region gehört zur einzigen α -Helix (α 1-Helix) der N-terminalen Domäne, welche die Aminosäuren 44-58 beinhaltet,^{13-15,17,30} und ist an der Bindung zum Cyclin beteiligt.

In der inaktiven, monomeren Form der CDK wird der Zugang zur katalytischen Spalte durch eine Schleife blockiert, die man T-Schleife nennt (Aminosäuren 146-170 nach D.O. Morgan¹⁵, Aminosäuren 146-166 nach P.D. Jeffrey¹⁴). Die T-Schleife ist im Bild 2-3 sowie in Bild 2-4 und Bild 2-5 blau eingefärbt. In dieser Schleife ist das Thr160 zu finden, dessen Phosphorylierung zu einer drastischen Aktivitätssteigerung der CDK2 führt (Thr161 bei CDK1, Thr172 bei CDK4). Ein weiterer Grund für die Inaktivität der monomeren CDK ist, dass ohne Cyclin-Assoziation die Orientierung der ATP-Phosphatkette eine Phosphatbspaltung und Übertragung der Phosphatgruppe auf ein Substrat nicht erlaubt.¹⁵

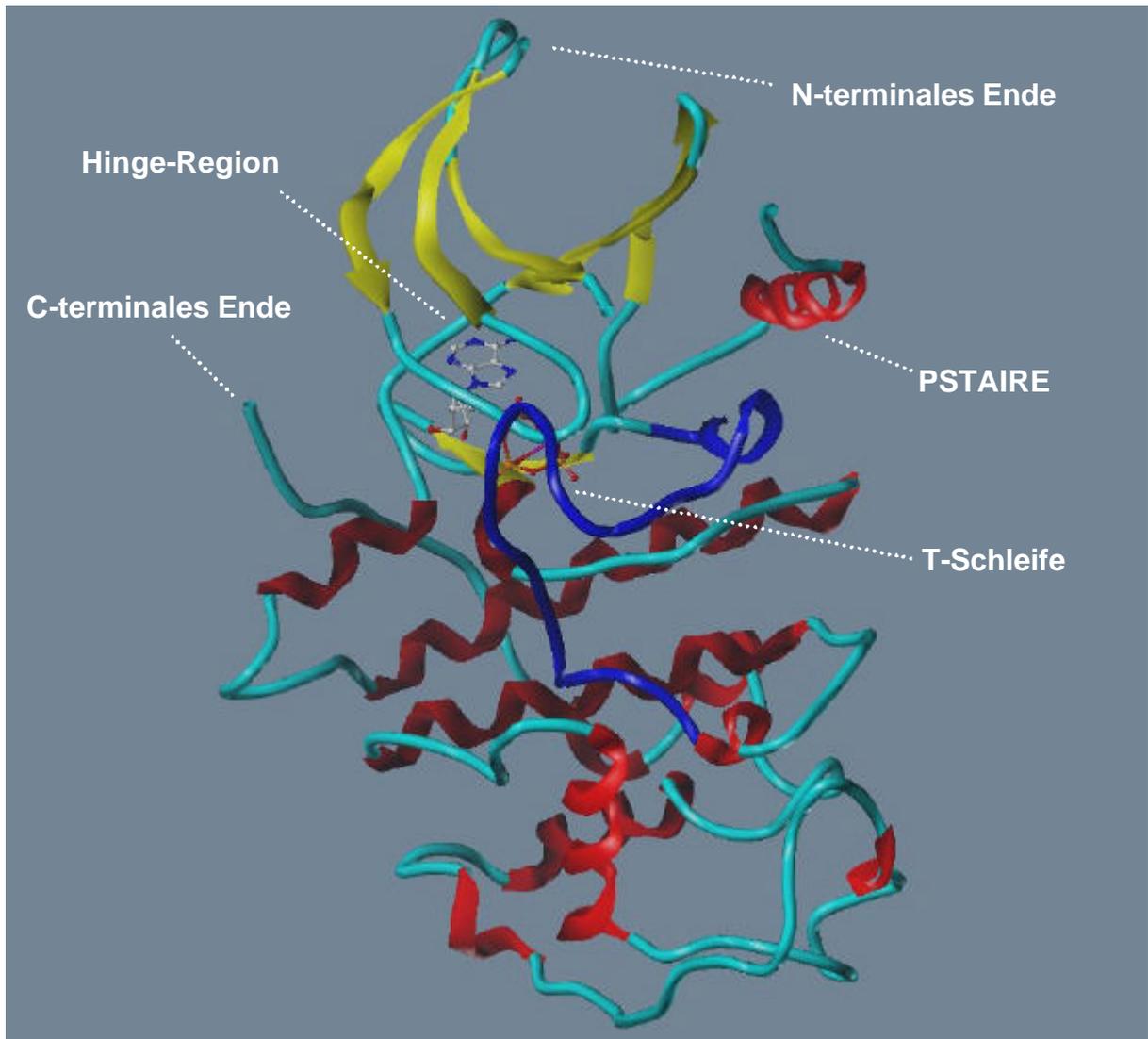


Bild 2-3: CDK2 mit gebundenem ATP. In der Darstellung sind α -helicale Bereiche durch rote Spiralen, β -Faltblattstrukturen als gelbe Bänder und die verbindenden Strukturen in cyan dargestellt. Die T-Schleife wurde blau eingefärbt (AS 146-170) und ATP ist in „Kugel und Stab-Darstellung“ zu sehen. Wegen der hohen Flexibilität fehlen Aminosäuren 37-40 im Anschluss an die PSTAIRE-Helix. Die Koordinaten wurden aus der Brookhaven-Proteindatenbank³¹ übernommen (PDB ID: 1HCK³²) und mit SYBYL³³ dargestellt.

2.3.2 Positive regulatorische Mechanismen, Aktivierung

An CDK2/Cyclin A-Kristallen wurden die konformativen Änderungen der CDK-Struktur durch eine Komplexbildung mit Cyclin A untersucht (siehe Bild 2-4). Die Cyclin-Box von Cyclin A bindet an die PSTAIRE-Helix der CDK2 mit Wechselwirkungen zu den beiden Domänen des aktiven Zentrums.^{14,30} Die

dadurch angestoßene Umkonfigurierung der CDK hat zur Folge, dass inhibitorische Teile aus dem katalytischen Zentrum entfernt werden und regulatorische Bereiche einer Phosphorylierung zugänglich gemacht werden. Die T-Schleife wird aus dem Eingangsbereich der katalytischen Spalte entfernt und dem umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt. Durch die Cyclin-Bindung wird außerdem die aktive Spalte aufgeweitet, die PSTAIRE-Helix in das katalytische Zentrum geschoben und dabei gedreht. Dadurch wird das für eukaryontische Proteinkinasen typische Glu51 der PSTAIRE-Region in eine Position gebracht, die es ihm erlaubt, die Phosphatreste des ATPs zusammen mit Lys33, Asp145 und einem Magnesiumion neu zu koordinieren und sie in die richtige Stellung für eine Phosphatübertragung zu bringen.^{13-15,30} Durch die Änderungen liegt jetzt auch das Thr160, welches zur T-Schleife gehört, frei, so dass es von anderen Kinasen phosphoryliert werden kann. Die Cyclin A-Bindung allein steigert die Aktivität von CDK2 um mehrere Größenordnungen, aber die Phosphorylierung bewirkt eine entscheidende Aktivitätssteigerung um das 80-300fache.^{14,15,22} Der Aufbau der katalytischen Spalte wird durch die Phosphorylierung nicht sehr stark verändert, das Phosphat an Thr160 hat vielmehr Einfluss auf ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen. Es wird angenommen, dass das Thr160-Phosphat dadurch einerseits die CDK/Cyclin-Bindung zur nötigen Festigkeit führt und zum anderen die CDK/Cyclin-Substrat-Bindung begünstigt.^{15,17} Die Proteinkinase, die die Phosphorylierung am Thr160 der CDK2 ausführt, ist ebenfalls eine CDK, nämlich CDK7, die außerdem noch an der Transkription beteiligt ist. Diese CDK7 entfaltet ihre Aktivität entweder nach Assoziation mit Cyclin H und Phosphorylierung oder nach Assoziation mit Cyclin H und einer dritten Untereinheit, MAT1. Der letztgenannte Komplex ist in dieser Zusammensetzung ungewöhnlicherweise aktiv, ohne selbst an einem Rest phosphoryliert zu werden, der dem Thr160 der CDK2 entspricht.^{13,15,17} Die Aktivität der CDK7 ist in den verschiedenen Zellzyklusphasen relativ konstant, während die Konzentrationen der Cycline im Verlauf des Zellzyklus starken Schwankungen unterliegen. Die Steigerung der CDK-Aktivität an bestimmten Punkten des Zellzyklus wird deshalb eher durch Cycline gesteuert, als durch CDK7/Cyclin H/MAT1.^{13,15} CDK4/Cyclin D wird am Thr172 ebenfalls phosphoryliert, bevor es an der Einleitung der S-Phase mitwirkt.¹³ Für CDK1/Cyclin B stellt die Phosphorylierung am entsprechenden Thr161 einen noch wichtigeren Faktor für die Ausbildung der Aktivität dar, während CDK5/p35 und CDK8/Cyclin C sowie

CDK7/Cyclin D/MAT1 keiner Phosphorylierung bedürfen. CDK8 besitzt noch nicht einmal eine Phosphorylierungsstelle in der T-Schleife.¹⁵

Die Aktivierung durch Dephosphorylierung an Thr14 und Tyr15 erfolgt durch cdc25-Phosphatasen. Für CDK1/Cyclin B ist ein vorheriger Transport in den Nukleus wichtig.³⁴ (Siehe Kapitel 2.5.2.)

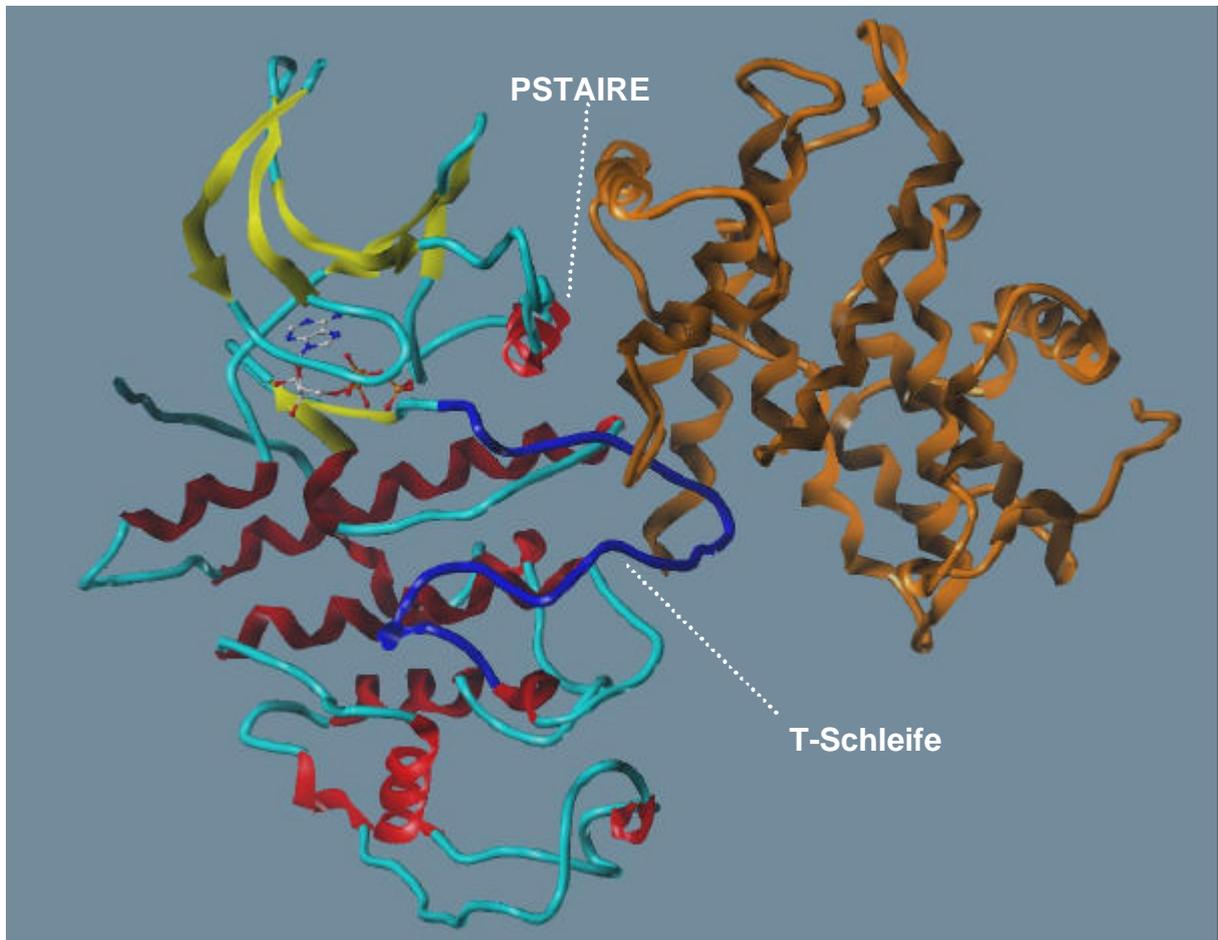


Bild 2-4: CDK2/Cyclin A-Komplex mit ATP, phosphoryliert an Thr160 (Phosphat an Thr160 nicht abgebildet). Die Farbgebung der CDK2-Strukturen entspricht Bild 2-3. Cyclin A^{*14,35} (rechts) ist karamellfarben eingefärbt. Die Koordinaten wurden aus der Brookhaven-Proteindatenbank³¹ übernommen (PDB ID: 1JST³⁶) und mit SYBYL³³ dargestellt.

* Humanes Cyclin A aggregiert in hohen Konzentrationen. Deshalb nutzt man zu Kristalluntersuchungen ein Fragment mit den Resten 173-432, welches alle für die CDK-Bindung wichtigen Bereiche enthält.¹⁴ Ein Fragment mit den Aminosäuren 171-432 wird auch als Cyclin A3 bezeichnet und in Enzymassays verwendet.³⁵

2.3.3 Negative regulatorische Mechanismen, Inaktivierung

Der aktivierenden Phosphorylierung am Thr160 der CDK2 stehen inaktivierende Phosphorylierungen an Thr14 und Tyr15 gegenüber. Diese beiden Angriffspunkte liegen nach der Konformationsänderung der CDK2 durch Cyclin A-Anlagerung frei und können durch die Kinasen Myt1 (v.a. Thr14, weniger auch Tyr15) und Wee1 (Tyr15) phosphoryliert werden. Eine Abspaltung dieser hemmenden Phosphatreste wird durch cdc25-Proteinphosphatasen durchgeführt, so dass die Aktivität des CDK/Cyclin-Komplexes durch Anbringen oder Entfernen von verschiedenen Phosphatresten sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden kann.²⁷

Zur weiteren Regulation der CDK-Aktivität existieren relativ kleine, inhibitorische Proteine, die zwei verschiedenen Proteinfamilien angehören. Zum einen gibt es die INK4-Familie (CDK4-Inhibitoren) und zum anderen die CIP- bzw. KIP-Familie (CDK2 Interacting Proteins; Kinase Inhibiting Proteins).³⁷

Zur INK4-Familie werden zur Zeit vier Mitglieder gerechnet: das p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D} (im folgenden Text als p15, p16, p18 und p19 bezeichnet). Die INK4-Proteine gelten als spezifisch für die G1-Phase des Zellzyklus und inhibieren hier CDK4 und CDK6, indem sie an die freie CDK binden und mit den Cyclinen (D1-3) kompetieren.^{12,18,30,38} p16 bindet zwar nicht an die Cyclin-Bindungsstelle, verdreht aber bei seiner Anlagerung an die CDK die beiden Domänen des Enzyms, so dass auch die Cyclin-Bindungsstelle verändert wird. Ebenfalls von der Inhibition betroffen ist die ATP-Bindungsstelle, die durch p16-Annäherung verdreht wird, wodurch die Bindungsfähigkeit von ATP beeinträchtigt wird. Da die Affinität von p16 zur CDK höher ist als die des Cyclins zur CDK, wird die aktivierende Cyclin-Anlagerung verhindert. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die INK4-Familie auch bereits assoziierte CDK/Cyclin-Komplexe hemmen kann.³⁰

Zur CIP-Gruppe werden bisher drei verschiedene Proteine gezählt: p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} (im folgenden Text als p21, p27 und p57 bezeichnet), die eine breitere inhibitorische Aktivität aufweisen. CIP-Proteine hemmen vor allem CDK2/Cyclin-Komplexe und sind deshalb an der G1- und G1/S-Kontrolle beteiligt.³⁰ Die Inhibition verläuft hierbei über Wechselwirkungen mit CDK und Cyclin, indem das CIP-Protein sich wie eine Klammer über den Enzymkomplex legt (siehe Bild 2-5). Durch Untersuchungen von Kristallen aus CDK2/Cyclin A/p27 konnten strukturelle Veränderungen genauer festgestellt

werden. Einerseits wird die Form der katalytischen Spalte verändert, andererseits legt sich ein Teil des Inhibitors so in die ATP-Bindungsstelle, dass eine Einlagerung von ATP nachgeahmt wird.^{13,15,22,30}

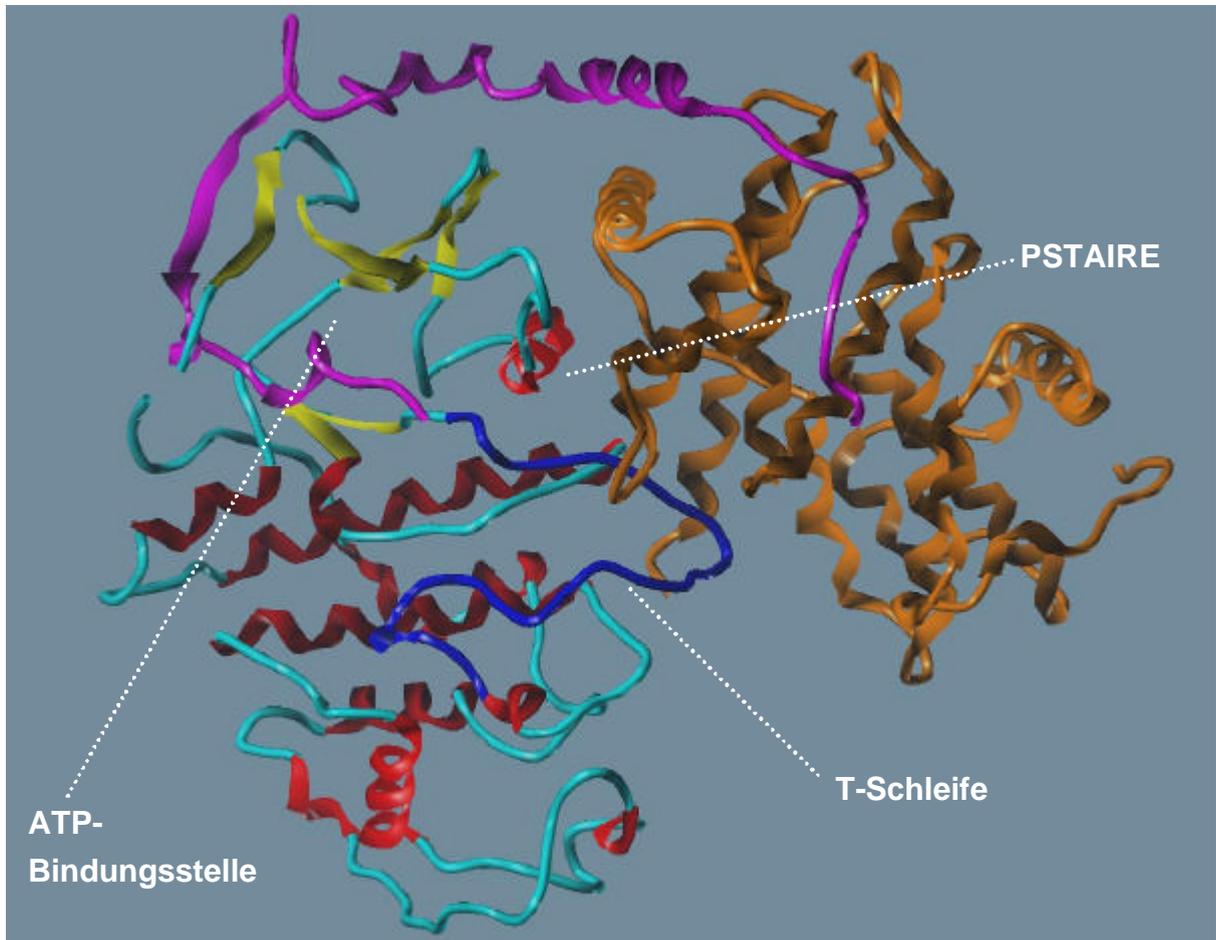


Bild 2-5: CDK2/Cyclin A/p27-Komplex, phosphoryliert an Thr160 (Phosphat nicht abgebildet). Cyclin A (AS 173-432, siehe Bild 2-4) (rechts) ist karamellfarben eingefärbt, der Inhibitor p27 erscheint magentafarben. Die Farbgebung der CDK2-Strukturen entspricht Bild 2-3. Die Koordinaten wurden aus der Brookhaven-Proteindatenbank³¹ übernommen (PDB ID: 1JSU³⁹) und mit SYBYL³³ dargestellt.

Interessanterweise wurde für p21 und p27 beobachtet, dass sie die Assoziation von CDK4 und Cyclin D fördern, während sie auf andere CDK hemmend wirken.^{12,15} Auf welche Weise und ob p27 inhibierende oder aktivierende Eigenschaften ausübt, wird von p16 moduliert, welches p27 von CDK4 verdrängen und freisetzen kann, so dass p27 CDK2/Cyclin E hemmen kann. Als Folge beobachtet man dann eine Blockade des Zellzyklus in der G1-Phase.¹⁶ Zu den IC50-Werten einiger natürlicher CDK-Inhibitoren siehe auch Tabelle 3-1.

2.4 Substrate der CDK im Zellzyklus

CDK phosphorylieren verschiedene Substrate an Threonin- oder Serin-Resten.²⁶ Da Substrate der CDK schwierig zu finden sind, liegen nur über einige von ihnen genauere Angaben vor.¹³ Mögliche Zielsubstanzen für eine CDK-Phosphorylierung findet man unter den Tumorsuppressoren bzw. Transkriptionsfaktoren und Replikationsfaktoren. Auch organisatorische Faktoren, die Chromatinstrukturen* und den strukturellen Aufbau der Zelle beeinflussen, gehören zu den Substraten der Cyclin-abhängigen Kinasen.²⁶

Retinoblastoma-Protein (pRb)/Transkriptionsfaktor E2F

Zu den am besten untersuchten Substraten einer CDK gehört der Tumorsuppressor pRb (Retinoblastoma-Protein**), welcher eine zentrale Rolle in der Verarbeitung externer Signale spielt. pRb besitzt vielfältige Serin- bzw. Threonin-Phosphorylierungsstellen, die v.a. durch CDK4/Cyclin D, CDK6/Cyclin D oder CDK2/Cyclin E phosphoryliert werden können. Verschiedene CDK bevorzugen hierbei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen.¹² Bei Durchführung von in vitro Tests wurde festgestellt, dass CDK4/Cyclin D oder CDK6/Cyclin D selektiv pRb phosphorylieren. Andere getestete Substrate wurden nicht verändert.²⁶ Am Retinoblastoma-Protein findet man auch noch Bindungsstellen, z.B. für DNS, virale Onkoproteine und für E2F. E2F ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch Bindung an pRb inaktiviert wird. Die Freisetzung von E2F hängt vom Phosphorylierungsstatus des pRb ab: Hypophosphoryliertes pRb bindet E2F und wirkt deshalb wachstumshemmend, während hyperphosphoryliertes pRb den Transkriptionsfaktor E2F freisetzt und dadurch das Zellwachstum fördert. Mit pRb verwandt sind die Proteine p107 und p130, welche ebenfalls von den CDK der G1-Phase, CDK4/Cyclin D und CDK6/Cyclin D, phosphoryliert werden. Über ihre Funktion ist wenig bekannt.^{12,13,17,38}

* Die DNS ist im Zellkern mit Proteinen und kleineren Mengen RNS assoziiert. Die Gesamtheit dieses Komplexes wird als Chromatin bezeichnet. Während der G1-, G2- und S-Phase erscheint es eher unstrukturiert. Besonders kompakt und durch Kondensation strukturiert liegt das Chromatin nur während der Mitose in Form von Chromosomen vor.⁴⁰

** Das Retinoblastoma-Protein wurde nach einem seltenen Augentumor, dem Retinoblastom, benannt, in welchem es grundsätzlich mutiert vorkommt.²⁶

Zur E2F-Gruppe zählt man bisher sechs Mitglieder (E2F1 bis E2F6), von denen auf jeden Fall E2F1-3 direkt von pRb kontrolliert werden. Wird E2F wie oben beschrieben freigesetzt, so bindet es an die DNS und aktiviert die Transkription von Genen, die im Zellzyklus für den G1/S-Übergang und die S-Phase wichtig sind. Dazu gehören Gene für E2F selbst, Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, CDK1, Cyclin E und Cyclin A.^{13,17,18} In einigen Zelltypen ist E2F zusätzlich an DP1 (DNS-Bindungsprotein) gebunden. Wird E2F/DP1 durch CDK2/Cyclin A gebunden und die Untereinheit DP1 phosphoryliert, so wird die Bindungsfähigkeit an die DNS herabgesetzt. Dies führt zu einer Hemmung der transkriptionsfördernden Eigenschaften und gehört zu den zellulären Kontrollelementen der S-Phase.¹³

Der Einfluss der CDK auf die Transkription durch Phosphorylierung der RNS Polymerase II wurde in Kapitel 2.2.2 erläutert.

Protein p53

Ebenfalls zu den Tumorsuppressoren gehört das Protein p53, ein Transkriptionsaktivator, der z.B. bei DNS-Schäden den zur CIP-Familie gehörenden CDK-Inhibitor p21 induziert oder zur Expression des Cyclin G-Gens führt. Als Teil eines Kontrollmechanismus kann p53 bei Zellschäden den Zellzyklus z.B. am G1/S-Übergang stoppen.¹³ Eine Akkumulierung von p53 wurde bei zellulärem Stress (z.B. durch ionisierende Strahlen oder chemische Substanzen) beobachtet und kann zu Stillstand des Zellzyklus oder Apoptose führen.²⁷

In der Zelle liegt p53 vermutlich als inaktiver Pool vor, aus dem es durch posttranslationale Mechanismen aktiviert werden kann. Es wird angenommen, dass die Bindungsfähigkeit an die DNS durch einzelsträngige DNS gesteigert wird. Außerdem wird vermutet, dass eine Aktivitätssteigerung von p53 durch Phosphorylierung erreicht wird. Eine Phosphorylierung durch die S- und G2/M-Phasen-CDK wurde sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet. Eine zusätzliche Regulation der p53-Aktivität erfolgt durch Hemmung des Ubiquitin-abhängigen Abbaus des p53-Proteins.^{13,27,38}

Verschiedene Substrate

Schließlich sollen noch die Substrate erwähnt werden, die in der M-Phase vor allem von CDK1/Cyclin B phosphoryliert werden. Dies sind größtenteils Proteine, die zur Reorganisation des Cytoskeletts, der Kernmembran und der Spindelausbildung nötig oder für den vesikulären Transport verantwortlich sind. Eine spezifische Phosphorylierung während des Zellzyklus findet z.B. bei

Laminen und Myosin statt.¹³ Lamine sind Proteine, die den Hauptbestandteil der Kernmembran darstellen.⁴¹ Das Myosin bildet den Hauptbestandteil des Muskelgewebes (60-70 %) und kommt praktisch in allen Wirbeltier-Zellen vor. Neben seinen strukturellen Aufgaben besitzt Myosin eine ATPase-Funktion. Diese überführt ATP (Adenosintriphosphat) unter Abspaltung von Phosphat in ADP (Adenosindiphosphat), wodurch Energie für die Muskelbewegung geliefert wird.¹⁰

Die Phosphatübertragung durch CDK auf den Transkriptionsfaktor TFIIB führt zur Inhibition der RNA Polymerase III-Transkription. Um während der Mitose eine Cyclin B- und Cyclin A-Proteolyse, einen Übergang in die Anaphase und den Abschluss der Mitose zu erreichen, muss der Anaphase Promoting Complex (APC) durch CDK1/Cyclin B phosphoryliert werden.¹³ Als weitere Substrate von CDK werden MAP4 (Microtubule-Associated Protein 4)²¹ und Histon H1 erwähnt.^{13,17} Histone sind Proteine mit vielen basischen Aminosäuren, die in der Lage sind, die DNS effektiv zu binden. Die dadurch erreichbare hohe Packungsdichte der DNS-Moleküle ermöglicht deren Unterbringung im Zellkern. Werden Histone phosphoryliert, erhöht sich die negative Ladung der Histon-Moleküle, wodurch es zu einer Abnahme der Wechselwirkungen zwischen DNS und Histon kommt. Die daraus resultierende Freisetzung der DNS aus der Histon-Bindung ist eine entscheidende Voraussetzung für die Einleitung der Transkription, welche durch eine enge Bindung der DNS an das Histon-Protein räumlich blockiert wird.⁴⁰

Durch mehrere Mechanismen kommt es zur Verstärkung der CDK1/Cyclin B-Aktivität mittels positiver Rückkopplung. Einerseits kann die Wee1-Kinase, welche CDK1/Cyclin B durch Phosphorylierung inaktiviert, umgekehrt durch aktive CDK1/Cyclin B phosphoryliert und damit selbst inaktiviert werden. Andererseits wird die CDK-aktivierende cdc25-Phosphatase durch Phosphorylierung mittels CDK1/Cyclin B in ihrer Aktivität gefördert.¹⁵

2.5 Regulation des Zellzyklus durch CDK

2.5.1 CDK und Cycline im Zellzyklus, ein kurzer Überblick

Zu Beginn des Zellzyklus in der G1-Phase findet man CDK4 und CDK6 im Zusammenspiel mit Cyclin D. Beiden Kinasen wird eine wichtige Rolle in der Verarbeitung externer Signale (Wachstumsfaktoren) zugeschrieben.

Der Übergang von der G1- zur S-Phase wird durch CDK2/Cyclin E im Zusammenspiel mit CDK4/Cyclin D vermittelt, anschließend übernimmt CDK2/Cyclin A die Regulation und fördert den Abschluss der S-Phase. Die Progression der folgenden G2-Phase wird durch CDK1/Cyclin A kontrolliert, bis die steigende Cyclin B-Konzentration zu einer vermehrten Bildung des CDK1/Cyclin B-Komplexes führt, der den G2/M-Übergang bewirkt und in der Mitose bis zur neuen G1-Phase zu finden ist.^{12,13,17,18}

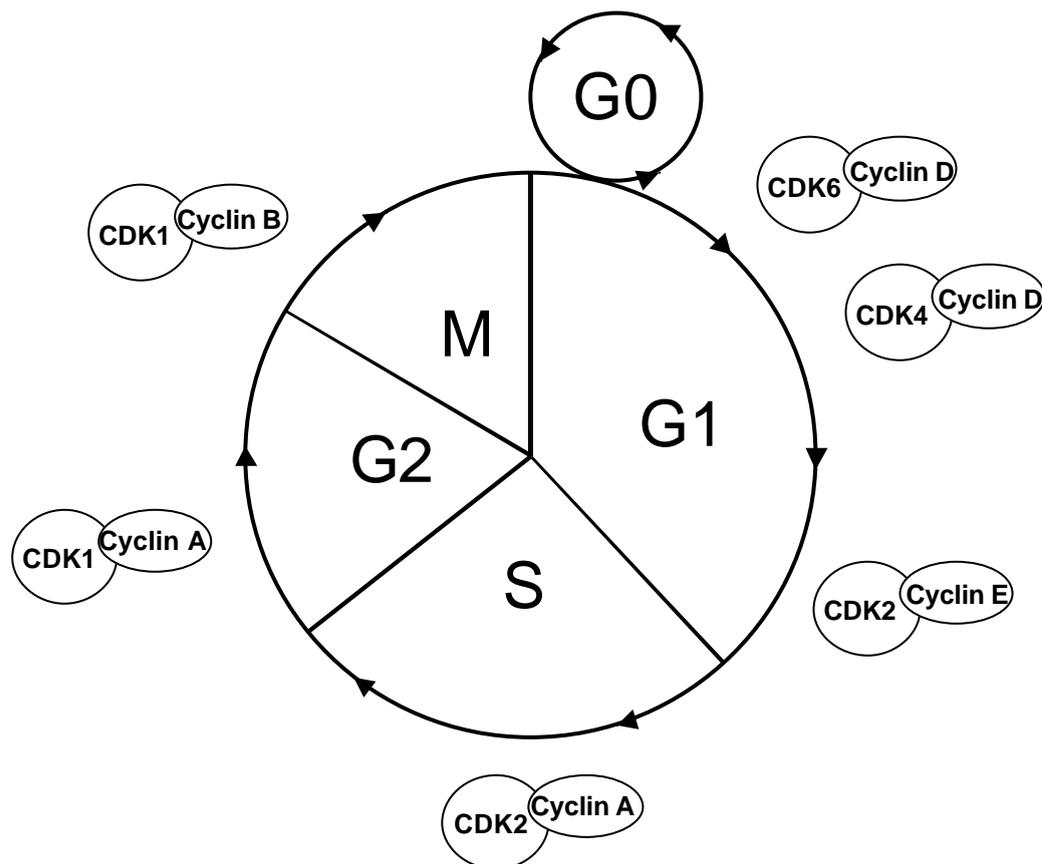


Bild 2-6: Vorkommen der CDK/Cyclin-Komplexe im Zellzyklus. Es wird schematisch dargestellt, an welcher Stelle des Zellzyklus die Aktivität der einzelnen Enzymkomplexe in etwa einsetzt.

2.5.2 Zusammenhang zwischen Kontrollpunkten und CDK-Funktion

Eine neue Phase des Zellzyklus darf erst begonnen werden, sobald vorher durchzuführende Prozesse komplett abgeschlossen sind. Der Zellzyklus wird entscheidend von den CDK gesteuert. Wichtig dabei sind die Übergänge von einer Phase des Zellzyklus in die nächste und das Überschreiten von Kontrollpunkten wie der Restriktionspunkt, den man in der G1-Phase des Zellzyklus findet. Außerdem wurden für die G1-Phase und nachfolgende Phasen mehrere DNS-Schädigungs-Kontrollpunkte, ein DNS-Replikations-Kontrollpunkt und ein Spindelbildungs-Kontrollpunkt definiert (siehe Bild 2-7).²⁶

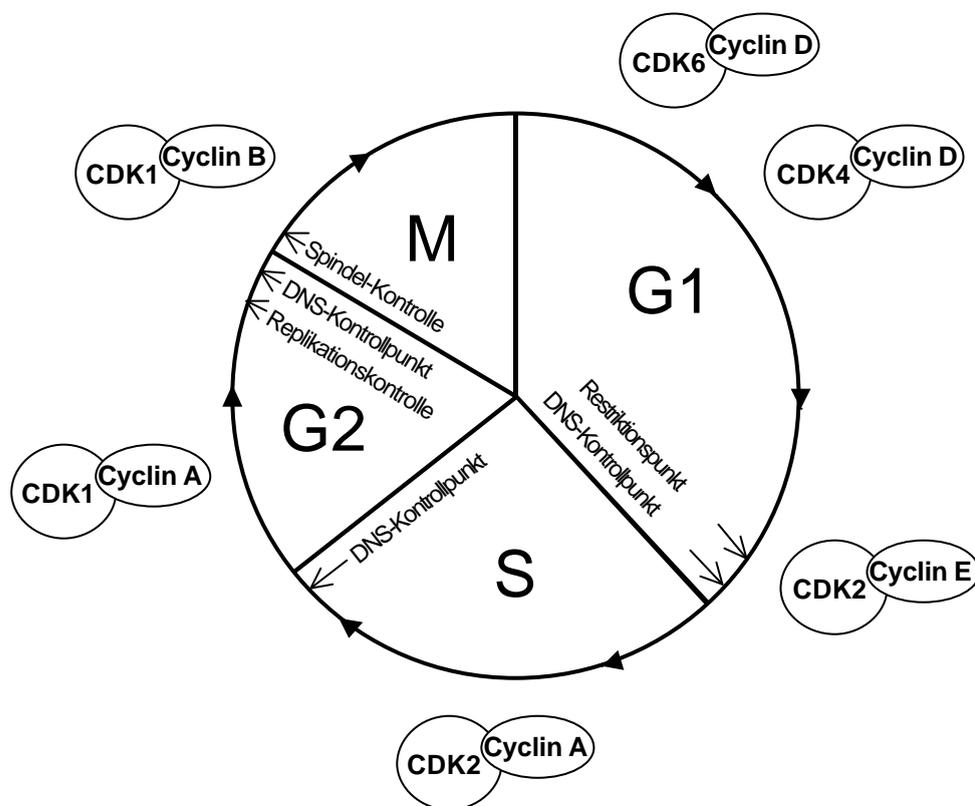


Bild 2-7: Kontrollpunkte im Zellzyklus. Die schematische Darstellung verdeutlicht die Bedeutung der Kontrollpunkte im Zusammenhang mit dem Beginn einer neuen Phase des Zellzyklus.

Häufig liegen die Kontrollpunkte direkt vor dem Übergang in die nächste Zellzyklusphase, an welchem Punkt unter anderem überprüft wird, ob die Vorgänge in der Zelle fehlerfrei abgelaufen sind. Die Reaktion der Zelle auf ungeeignete externe oder interne Bedingungen ist ein Einstellen der proliferativen Vorgänge, ein Stopp im Zellzyklus. Dies kann zu einer vorübergehenden

Wartestellung führen, in der Reparaturmechanismen zum Zuge kommen, die die korrekte Ausgangssituation für eine Progression des Zellzyklus wiederherstellen können. Gelingt dies nicht, so kann es zu einem permanenten Stopp oder zu einem programmierten Zelltod, der Apoptose, kommen.^{26,34}

Gleich zu Beginn der G1-Phase wird entschieden, ob die Zelle in einen natürlichen, reversiblen Ruhezustand, die G0-Phase, übergeht oder ob die G1-Phase durchlaufen wird. Den nächsten, entscheidenden Punkt bildet der Restriktionspunkt am Ende der G1-Phase, welcher als das Pendant zu START gesehen wird, einem Kontrollpunkt im Zellzyklus von Hefezellen. Sobald START überschritten ist, findet man eine von äußeren Faktoren unabhängige Teilung der Hefezellen.³⁸

Einen analogen Kontrollpunkt stellt der Restriktionspunkt der Säugetierzellen dar. Er soll sicherstellen, dass die DNS-Synthese nur begonnen wird, wenn die Zelle ausreichend ernährt werden kann und wenn sie korrekt mit anderen Zellen interagiert.¹² Extrazelluläre Wachstumsfaktoren können die Expression von Cyclin D induzieren,³⁰ wodurch CDK4 und CDK6 aktiviert werden. CDK4/Cyclin D und CDK6/Cyclin D phosphorylieren das Retinoblastoma-Protein, welches bis zur Mitose in diesem hyperphosphorylierten Status bleibt, bevor es wieder dephosphoryliert wird.²⁷ Vom Ende der Mitose bis zum Restriktionspunkt liegt das für die Verarbeitung extrazellulärer Signale wichtige pRb also in unterphosphorylierter Form vor, in der es den Transkriptionsfaktor E2F bindet und hemmt.¹³ Der Phosphorylierung von pRb folgt dann die Freisetzung von an pRb gebundenen E2Fs und eine Stimulierung der Transkription von Genen, die für den G1/S-Übergang und die S-Phase nötig sind, z.B. die Gene für CDK2, Cyclin A und Cyclin E.^{13,17,18} (Siehe Bild 2-8.) Extrazelluläre Wachstumsfaktoren sind also verantwortlich für die Synthese von Cyclin D, daneben auch für dessen Stabilität, Komplexbildung mit CDK4 und CDK6 und die CDK-Aktivierung.¹²

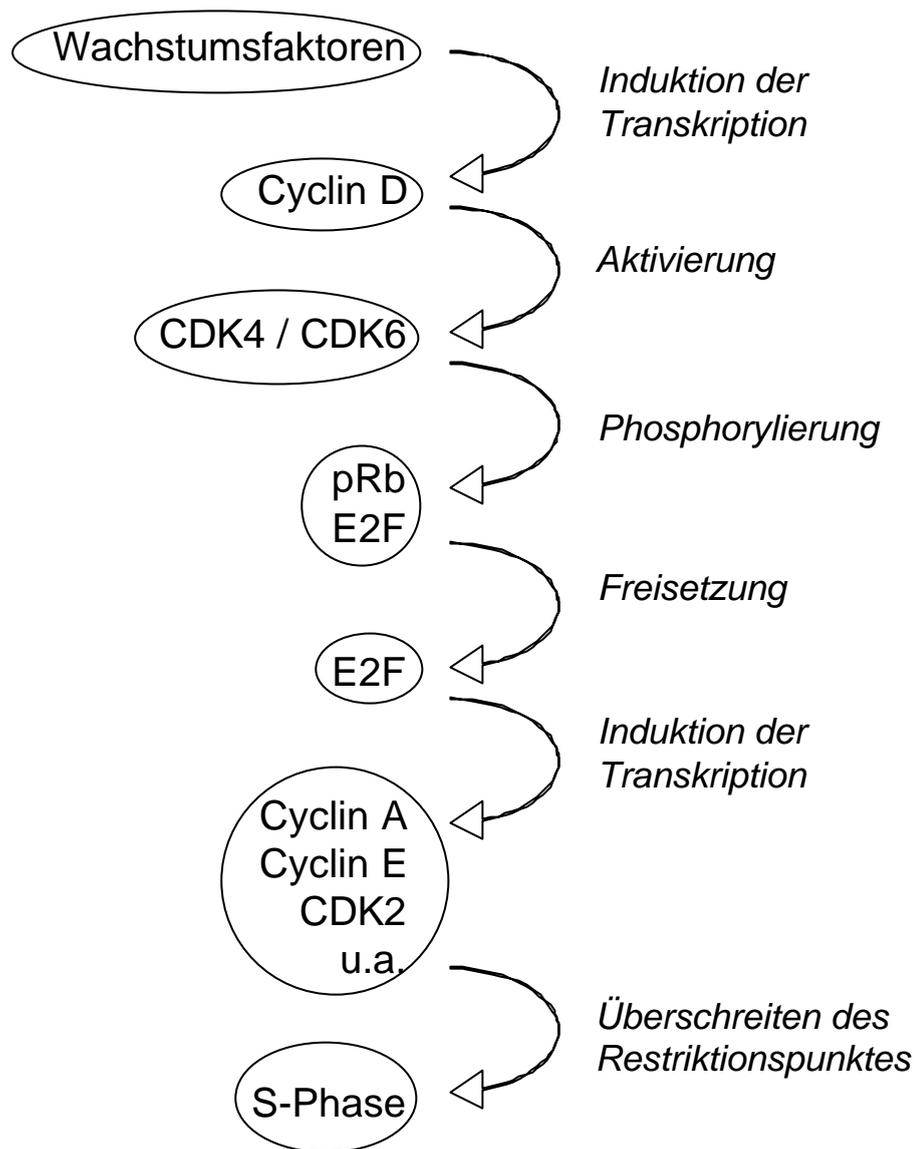


Bild 2-8: Auswirkung einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Extrazelluläre, mitogene Signale bewirken das Auslösen einer Kaskade, die bei erfolgreichem Ablauf den Übertritt von der G1- in die S-Phase ermöglicht.

Eine Zelle ist neben wachstumsfördernden Signalen auch wachstumshemmenden, antimitogenen Signalen ausgesetzt, wie z.B. cAMP, TGF β (Transforming growth factor β) und bestimmten Zell-Zell-Kontakten. Antimitogen wirkt auch das Fehlen mitogener Signale.¹³

TGF β induziert den CDK-Inhibitor p15, welcher mit Cyclin D kompetiert, wodurch die Phosphorylierung von pRb herabgesetzt und damit die E2F-stimulierte Transkription von progressionsfördernden Genen gehemmt wird. Eine weitere Wirkung von TGF β ist die Aktivitätssteigerung des CDK-Inhibitors p27 und die Inhibition der Transkription von CDK4-Genen. DNS-

Schäden führen zum Anfluten von p53, so dass die Transkription des CDK4- und CDK2-Inhibitors p21 angeregt wird. In letzter Konsequenz führen alle diese Wege zum selben Ergebnis, nämlich zum Mangel an Faktoren, die die Zelle benötigt, um den Restriktionspunkt zu überschreiten und mit der S-Phase zu beginnen.¹³

Sobald aber die internen und externen Gegebenheiten einer Zelle optimal sind, kann der Restriktionspunkt überschritten werden, und die Zelle wird damit unabhängig von extrazellulären Faktoren. Die folgenden Phasen, S-, G2- und M-Phase, können autonom durchgeführt werden.³⁸

Kann der nach dem Restriktionspunkt folgende Kontrollpunkt zur Überprüfung der DNS auf Schäden ebenfalls überschritten werden, geht die Zelle von der G1-Phase in die S-Phase über,²⁶ wofür besonders CDK2/Cyclin E im Zusammenspiel mit CDK4/Cyclin D verantwortlich ist.¹³ Durch die Phosphorylierung von pRb und die darauf folgenden Reaktionen (s.o.) kommt es auch zur vermehrten Bildung von Cyclin E, also einer positiven Rückkopplung. Die Konzentration von Cyclin E zeigt ein Maximum zu Beginn der S-Phase. Der CDK2/Cyclin E-Komplex fördert den Fortschritt der S-Phase und wird mit der Centrosomen-duplikation in Zusammenhang gebracht.¹² Bei abnehmender Cyclin E-Konzentration im Verlauf der S-Phase kann man ein Anfluten von Cyclin A beobachten, welches die Aktivierung von CDK2 übernimmt. CDK2/Cyclin A wird eine Inaktivierung von G1-Transkriptionsfaktoren und eine Aktivierung der DNS-Replikation zugeschrieben.^{17,18} Nach Überwindung eines zweiten Kontrollpunktes, an dem DNS-Schäden detektiert werden sollen, bewirkt CDK2/Cyclin A den Abschluss der S-Phase.¹²

In der nachfolgenden G2-Phase enthält die Zelle die doppelte Erbinformation (4n-DNS) und bereitet sich auf die M-Phase und die Trennung in zwei Zellen, die Cytokinese, vor. Hier findet man Cyclin A jetzt an die CDK1 gebunden, womit der für das Durchlaufen der G2-Phase entscheidende Regulator vorhanden ist. In einem späteren Abschnitt der G2-Phase wird nun zum dritten Mal die DNS auf Schäden überprüft und außerdem auf korrekte Replikation kontrolliert.^{12,26,34} Am G2/M-Übergang befindet sich noch ein weiterer Kontrollpunkt, der mit der Spindelbindung zusammenhängt.²⁶

Am Übergang zur M-Phase akkumuliert CDK1 assoziiert mit Cyclin B im Cytoplasma, allerdings in inaktiver Form, da die CDK1 am Thr14 und Tyr15 phosphoryliert wird. Dies geschieht am Thr14 durch die Myt1-Kinase, welche in geringerem Maße auch Tyr15 phosphoryliert. Die Phosphatübertragung auf Tyr15 wird in der Regel von der Wee1-Kinase durchgeführt. Es wird vermutet,

dass die Regulation der CDK1/Cyclin B-Aktivität durch Thr14- und Tyr15-Phosphorylierung eine essentielle Rolle am „DNS-Schädigungs-Kontrollpunkt“ zum Ende der G2-Phase spielt. An dieser Stelle kann ein Schaden in der DNS zur Erhöhung der p53-Konzentration führen, mit daraus folgender Induktion von p21. p21 inhibiert die CDK, welches einen Stillstand des Zellzyklus herbeiführt, der es ermöglicht, dass die Zelle Fehler in der DNS korrigiert, bevor die fehlerhafte Erbsubstanz auf die entstehenden Zellen verteilt wird. Sobald am Ende der G2-Phase der inaktive CDK1/Cyclin B-Komplex in den Nukleus transportiert wird, kann er durch die Phosphatasen cdc25B und cdc25C von den Phosphatresten am Thr14 und Tyr15 befreit und somit wieder aktiv werden.³⁴ Im Sinne einer positiven Rückkopplung kann CDK1/Cyclin B die Wee1-Kinase (und vermutlich auch die Myt1-Kinase) phosphorylieren und dadurch inaktivieren. Gleichmaßen kann CDK1/Cyclin B cdc25 phosphorylieren, was in diesem Fall allerdings zur gesteigerten Aktivität führt.¹⁵ CDK1 im Komplex mit Cyclin B wird auch als „Mitosis Promoting Factor“ (MPF) bezeichnet, der nach seiner Aktivierung zu einem Übergang des Zellzyklus in die Mitose-Phase führt. Es kommt zur CDK1-induzierten Phosphorylierung eines sogenannten Anaphasen-Promotions-Komplex (APC), welcher unter anderem für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von Cyclin A und Cyclin B verantwortlich ist.^{17,18} Proteolyse von Cyclin B ist eine Voraussetzung dafür, dass eine Zelle die Mitose beenden und in die folgende neue G1-Phase übergehen kann.³⁴ Am Übergang zwischen M- und G1-Phase wird das Cyclin-abbauende, proteolytische System wieder inaktiviert und Cyclin B beginnt erneut zu akkumulieren. Dieser Konzentrationsanstieg ist vermutlich von der Expression der G1-Phasen-Cycline abhängig.¹³

2.6 Fehler im CDK-System und ihre pathogenetische Relevanz

Die Komplexität der Regulation des Zellzyklus bietet eine Fülle von Fehlerquellen. Diesen Fehlermöglichkeiten setzt die Zelle Kontrollmechanismen entgegen, von denen einige im vorangegangenen Abschnitt näher beleuchtet wurden. Damit eine Zelle dauerhaft gestörte Funktionen aufweist, bedarf es häufig eines Zusammentreffens mehrerer negativer Faktoren. Die Folgen eines dauerhaften Schadens sind je nach Bedeutung der geschädigten Funktion sehr unterschiedlich. Im besten Falle wird nur die veränderte Zelle der Apoptose zugeführt und stirbt, im schlechtesten Fall schädigt eine mutierte Zelle durch unkontrollierte Vermehrung den ganzen Organismus.

Mit Störungen bei CDK, ihren Aktivatoren, Inhibitoren und Substraten hängen verschiedene, z.T. schwere und schwierig therapierbare Krankheiten zusammen. Informationen über die Bedeutung dieser einzelnen Regulatoren und die Folgen ihrer Verstärkung oder Stilllegung im Zellzyklus sind wichtige Voraussetzung für ein besseres Verständnis dieser Krankheiten und eine mögliche Bekämpfung mit neuen Mechanismen. Erkenntnisse kann man zum einen durch Beobachtungen bei Erkrankungen, durch Zelluntersuchungen und zum anderen mit Untersuchungen an Tieren, vor allem Mäusen erlangen. Hier besteht die Möglichkeit, entweder eine Überexprimierung bestimmter Gene zu induzieren oder sogenannte Knockout-Mäuse zu untersuchen, bei denen ein bestimmtes, endogenes Gen inaktiviert wurde.³⁸

2.6.1 Störungen bei Cyclin-abhängigen Kinasen, Cyclinen, ihren Modulatoren und Substraten

Für die meisten Regulatoren im Umfeld der CDK konnten Beispiele für Veränderungen mit pathogenen Konsequenzen gefunden werden. Prinzipiell beobachtet man bei hyperproliferativen Krankheitsbildern, wie z.B. Krebs, eine Aktivitätsminderung oder Inaktivierung von Regulatoren, die den Zellzyklus bremsen, während die Aktivität von Zellzyklus-fördernden Modulatoren verstärkt ist. Dies wird durch die folgenden Beispiele belegt.

p21

Es wurden Punktmutationen des CDK-Inhibitors p21 beobachtet³⁷ und eine verminderte Expression in Zellen mit einem p53-Defekt gefunden (s.u.).^{26,27,37}

p27

Ein Defekt im Bereich des p27 wurde bei colorektalen Karzinomen beobachtet, wobei die Mutation hier im posttranslationalen Bereich einsetzt, das heißt zu einem verstärkten, ubiquitinabhängigen Abbau des Proteins nach Phosphorylierung durch CDK2 führt. Für p27 konnte ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen seiner Konzentration in den Zellen und der Bösartigkeit des entsprechenden Tumors festgestellt werden. Eine geringe p27-Konzentration geht folgerichtig mit einer schlechten klinischen Prognose einher.^{26,27,30}

Im Tierversuch führt ein Mangel im p27-Gen zu unnormale großen Mäusen mit proportional vergrößerten Organen, während ein Knockout des p27-Gens zu vorgeburtlichen Tumoren und frühzeitigem Tod führt.³⁸

p21 und p27

Eine andere Beeinträchtigung kann durch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV 16E7) ausgelöst werden, welches p21 und p27 durch ein Onkoprotein inaktiviert. Dadurch wird CDK2 nicht mehr inhibiert, mit der Konsequenz, dass Differenzierung und Proliferation menschlicher Keratinocyten außer Kontrolle geraten.³⁸

Führt man bei Ratten eine Ballonierung durch, so kann man in den dadurch gestressten Zellen eine Herunterregulierung von p21 und p27 feststellen.³⁸

p57

Ein Defekt in Bezug auf p57 wurde mit Wilms-Tumoren assoziiert.³⁸

p15

Inaktivierung von p15 ist möglich durch Deletion und Methylierung, beobachtet z.B. in Leukämiezellen.³⁷ Eine fehlende Expression von p15 wurde bei Lungenkrebs festgestellt.^{13,27}

p16

p16 stellt einen wichtigen Tumorsuppressor dar, der in etwa einem Drittel aller daraufhin untersuchten Krebsarten mutiert ist.³⁰ In menschlichen Zellen kann der CDK-Inhibitor p16 durch Deletion, Punktmutation, Methylierung oder Stilllegung beeinträchtigt sein. Dies beobachtet man z.B. in Melanomen, Pankreas- oder Oesophagustumoren sowie bei Lungenkrebs, wobei die Mutationen im Bereich der Melanome von UV-Licht induziert werden können.

In nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen findet man bei etwa 25 % der primären Tumore eine Hypermethylierung des p16-Gens.^{13,26,37} Die Deletion von p16 führt bei Mäusen zwar nicht direkt zur Lebensunfähigkeit, aber es kommt schon in jungem Alter zu spontanen Tumoren.^{27,38}

p18

Veränderung von p18 durch Deletion oder Punktmutation wurde z.B. bei Brustkrebs festgestellt, weitere Inaktivierungen auch im Zusammenhang mit Leukämie und Lungentumoren.^{26,37}

p53

In ca. 50 % aller untersuchten menschlichen Tumore ist eine Mutation von p53 zu beobachten. Das p53-Gen ist häufig verändert oder deletiert. Anormale Funktion von p53 geht einher mit einer verstärkten Resistenz der Tumore gegen antiproliferative Arzneistoffe.^{26,27,38} Studien an Mäusen zeigen, dass p53-Knockout-Mäuse zwar normal erscheinen, aber zu spontaner Tumorbildung neigen.³⁸

Retinoblastoma-Protein

pRb-Veränderungen wurden im Zusammenhang mit Lungen-, Blasen-, Prostata- und anderen Karzinomen in Form von Punktmutation oder Deletion beobachtet. Grundsätzlich mutiert ist es im Retinoblastom, einem seltenen Augentumor, nach dem es auch benannt wurde.²⁶ Eine durch virale Infektionen ausgelöste Beeinträchtigung entsteht dadurch, dass virale Onkoproteine mit E2F um hypophosphoryliertes, also aktives pRb kompetieren, wodurch es zu vermehrter E2F-Freisetzung kommt.¹³

Mäuse mit einem pRb-Knockout sind nicht lebensfähig; es kommt zu Defekten in der Neurogenese und der Hämatogenese.³⁸

E2F

Die Überexpression von E2F in ruhenden Zellen führt zu einem Verlassen des Ruhezustandes (G0) und Eintritt in die S-Phase. Dem gegenüber stehen Untersuchungen an E2F-Knockout-Mäusen, die eine reduzierte Apoptoserate und in älteren Tieren vermehrte Tumorbildung ergaben, so dass E2F offensichtlich nicht nur Zellzyklus-fördernde Eigenschaften zugeschrieben werden können.³⁸

p53, pRb, E2F

Zellen mit verminderter pRb- oder verstärkter E2F-Funktion sind besonders sensibel für eine Apoptose-Induktion in Anwesenheit von p53.²⁷

Ein Onkoprotein (MDM2) kann durch Bindung an p53 und pRb deren Fähigkeit zur Wachstumskontrolle aufheben. Zusätzlich stimuliert es nach Bindung an E2F dessen Eigenschaft, die Transkription zu aktivieren.¹³

Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV 16E7) löst einen gesteigerten Ubiquitin-abhängigen p53-Abbau aus und verursacht eine Auflösung des Komplexes aus pRb und E2F; zusätzlich können p21 und p27 inaktiviert werden (s.o.). Die Infektion durch dieses Virus wird mit Gebärmutterhalskrebs assoziiert.^{27,38}

Cyclin A

In hepatozellulären Karzinomen findet man eine unnatürliche Stabilisierung von Cyclin A.²⁶

Cyclin B

In 88 % der untersuchten kolorektalen Karzinome wurde eine Überexpression von Cyclin B1 gefunden.²⁶ Im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten findet man eine erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentration.²⁰

Cyclin D

Von den D-Cyclinen wurde besonders Cyclin D1 untersucht, welches in Tumorzellen überexprimiert oder amplifiziert vorkommt.²⁶ Diese Störung wurde bisher sehr häufig beobachtet, z.B. in B-Zell-Lymphomen, Brust-, Lungen-, Darm- und Hirntumoren.^{13,26,30} Die Tatsache, dass bis zu 50 % der untersuchten Brustkrebszellen eine erhöhte Expression von Cyclin D1 zeigen, stimmt mit entsprechenden Versuchen an Mäusen überein. Hier führt eine Überexpression zu Mammahyperplasie und Adenokarzinomen, während ein Knockout zu Entwicklungsstörungen des Brustepithels während der Schwangerschaft führt.^{26,27,38}

Im Zusammenhang mit einer gutartigen Wucherung der Nebenschilddrüse wurde beobachtet, dass die Translokation des Cyclin D1-Gens in die Nachbarschaft des Promotors für das Nebenschilddrüsenhormon Parathormon zu einer unkontrollierten Zellteilung führt.¹³ Die für die G1-Phase benötigte Zeit wird durch überexprimiertes Cyclin D verkürzt.²⁶

Bei Infektionen mit dem KSH-Virus (Kaposi-Sarkom-Herpes-Virus; auch: HHV 8, Humanes Herpes-Virus 8) wird die Information für virales Cyclin D übertragen, welches als ein möglicher Auslöser für die Erkrankung an einem Kaposi-Sarkom angesehen wird.²⁶

Cyclin E

Eine Überexprimierung oder Amplifikation von Cyclin E ist im Zusammenhang mit colorektalen Karzinomen, Brust-, Prostata-, Eierstock- und Magenkrebs beobachtet worden.^{26,27}

CDK1

In Brust-, Prostata-, colorektalen und Magentumoren konnte eine Überexpression von CDK1 entdeckt werden,^{26,42} ebenso wie eine erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentration im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten.²⁰

CDK2

Wiederum in colorektalen Tumoren wurde Überexpression von CDK2 festgestellt.^{26,42} Die CDK2-Funktion ist außerdem Voraussetzung für eine Replikation des humanen Cytomegalie-Virus.²⁰

CDK4

CDK4 kann einerseits durch Amplifikation oder Überexpression, andererseits durch Punktmutation verändert sein. Eine Punktmutation, die zu einem Austausch einer Aminosäure im Bindungsbereich von p16 führt und die inhibitorische Anlagerung dieses Proteins verhindert, wurde in vererbaren Melanomen gefunden, wobei die Assoziation mit Cyclin D1, p27 und p21 nicht gestört und die enzymatische Aktivität nicht gehemmt wird. Außerdem kommt veränderte CDK4 in Sarkomen und Gliomen vor.^{26,27,30}

CDK5/p35 und CDK5/p25

Das aktivierende Protein p35 ist ein in der Zellmembran verankertes, relativ kurzlebige Protein, wodurch die Aktivität von CDK5 lokal begrenzt und streng reguliert wird. Wird p35 allerdings proteolytisch in p25 und ein kleineres Fragment (p10) gespalten, so ist die Verankerung in der Membran nicht mehr möglich und die räumliche Einschränkung der CDK5-Aktivität wird aufgehoben. Der CDK5/p25-Komplex ist hochaktiv und langlebiger als das CDK5/p35-Dimer.

CDK5/p25 wird mit der Parkinson- und der Alzheimer-Erkrankung und amyotropher Lateralsklerose in Zusammenhang gebracht. Auf welche Weise die Proteolyse zu p25 abläuft und inwieweit dies in krankhaften Zuständen relevant ist, wurde bisher nicht vollständig geklärt.^{7,21}

cdc25

Die Überexpression der CDK-aktivierenden Phosphatase cdc25 wurde in vielen Magen-, Hirn-, Lungen- und Brusttumoren beobachtet,^{4,26,27} wobei tumorspezifische Expression von cdc25B in Brusttumoren mit einer schlechten Prognose und Überlebensrate korreliert.²⁷

2.6.2 Zusammenhang möglicher Defekte mit dem Ablauf des Zellzyklus

Betrachtet man die beobachteten Störungen der Proteine im Hinblick auf ihre Funktion im Zellzyklus, so ergibt sich folgendes Bild:

Wie schon im Kapitel 2.5 ausführlich erläutert, sollen extrazelluläre Wachstumsfaktoren in der G1-Phase zur Stimulierung von Cyclin D führen, welches CDK4 und CDK6 aktiviert. Diese phosphorylieren pRb, welches E2F freisetzt, und es kommt zur Aktivierung der Transkription von G1/S- und S-Genen (Cycline A und E, CDK2, u.a.) (siehe Bild 2-8). Sind die Bedingungen nicht optimal, so kann der Zellzyklus durch die CDK-Inhibitoren p15, p27 (induziert von TGF β), p16 oder p18 gebremst werden. DNS-Schäden führen zu einer Konzentrationserhöhung von aktivem p53, welches den Inhibitor p21 induziert.

Diese Kaskade ist in den meisten Tumoren gestört. Sowohl eine Überaktivität von Cyclin D, CDK4 oder E2F wurde beobachtet, als auch eine Beeinträchtigung der E2F-Bindungsfähigkeit von pRb, eine Inaktivierung von p53 und das Fehlen von p15, p16, p18, p21 oder p27. Diese Defekte können dazu führen, dass eine Zelle sich trotz Abwesenheit von Wachstumsfaktoren oder ähnlichen äußeren Stimulatoren teilt und sich auch nicht von externen oder internen antimitogenen Signalen stoppen lässt. Dies alles bewirkt eine gestörte Restriktionspunkt-Kontrolle. Bei Unterfunktion von p53 bzw. p21 kann es außerdem dazu kommen, dass ein Zellzyklus fortgeführt wird, obwohl DNS-Schäden vorliegen. Ist Cyclin D überexprimiert, so findet man eine insgesamt verkürzte G1-Phase.

Nach Überschreiten des Restriktionspunktes und des DNS-Kontrollpunktes tritt die Zelle durch Vermittlung von CDK4/Cyclin D und CDK2/Cyclin E in die S-Phase ein. Liegt eine Hyperaktivität von CDK4, CDK2, Cyclin D oder Cyclin E vor, z.B. auch durch E2F-Verstärkung, so kann ein vorzeitiger Eintritt in die S-Phase erfolgen.

Im Verlauf der S-Phase übernimmt CDK2/Cyclin A die Kontrolle. Wenn CDK2 überexprimiert ist oder Cyclin A anormal stabilisiert vorliegt, kann die S-Phase unnatürlich schnell ablaufen.

Nach einer erneuten Kontrolle der DNS auf Schäden geht der Zellzyklus in die G2-Phase über. An diesem Kontrollpunkt kommen besonders wieder Defekte im Umfeld von p53 zum Tragen, die zu einer Unempfindlichkeit gegenüber DNS-Schäden führen und die Vermehrung von Zellen mit unkorrektem Erbgut zulassen.

In der nun ablaufenden G2-Phase kann ein Defekt des CDK1/Cyclin A-Komplexes zu Fehlregulationen führen. In der G2-Phase befinden sich zwei Kontrollpunkte, an denen die DNS überprüft wird. Da Schäden an der DNS zur Aktivierung von p53 führen, welches zum Stoppen der Proliferation führt, können p53-Störungen an dieser Stelle zur unangemessenen Fortführung des Zellzyklus führen.

Die entscheidenden Regulatoren der M-Phase aus dem Bereich der CDK sind CDK1, Cyclin B und die CDK1/Cyclin B-aktivierenden cdc25-Phosphatasen. Jedes dieser drei Proteine kann Mutationen unterliegen, wodurch jeweils die Zellzykluskontrolle beeinträchtigt wird.

2.7 Angriffspunkte für die Wiederherstellung eines funktionierenden CDK-Systems

Die Deregulation des CDK-Cyclin-Systems kann zu vielfältigen Krankheitsbildern führen. Aus diesem Grund stellen die CDK und ihre Modulatoren eine wichtige Zielgruppe für neue Therapieansätze dar.

Um eine außer Kontrolle geratene Zellproliferation auf der Basis des CDK-Cyclin-Systems stoppen oder besser noch in den normalen Zustand zurückversetzen zu können, kann man theoretisch verschiedene Wege beschreiten.

Denkbar ist neben einer Hemmung der CDK-Aktivierung die Inaktivierung eines bereits aktiven CDK/Cyclin-Komplexes. Dies würde dem erwähnten Prinzip entgegenwirken, nach welchem die zellteilungsfördernden Regulatoren in proliferativen Krankheiten überaktiv sind, während die -bremsenden inaktiv sind. Eine Beeinflussung des CDK-Cyclin-Systems ist theoretisch möglich durch:^{4,18,26,29}

- Hemmung der cdc25-Phosphatasen, welche die inaktivierenden Phosphatreste an Thr14 und Tyr15 (CDK2) abspalten.
- Hemmung des CDK7/Cyclin H-Komplexes, welcher die aktivierende Phosphorylierung am Thr160 (CDK2) ausführt.
- Förderung des proteolytischen Systems, welches für den Abbau der Cycline verantwortlich ist.
- Negative Beeinflussung der Expression von CDK, Cyclinen oder oben genannter Aktivatoren, z.B. durch Einbringen von Antisense-RNS oder -DNS in die Zellen.
- Positive Beeinflussung der Expression natürlicher Inhibitoren aus der INK4- oder CIP-Familie oder von inaktivierenden Enzymen wie Wee1- und Myt1-Kinase.
- Veränderungen an der Cyclin-Bindungsstelle der CDK und eine daraus folgende Verhinderung der Cyclin-Anlagerung.
- Inhibitoren, die das aktive Zentrum verändern, ohne in diesem selbst gebunden zu sein.
- Synthetische oder gentechnisch induzierte Substrat-kompetitive Inhibitoren der CDK.
- Synthetische oder gentechnisch induzierte ATP-kompetitive Inhibitoren der CDK.

Mit dem Ziel, eine direkte Hemmung der CDK-Aktivität durch Inhibitoren zu erreichen, wurden bisher verschiedene Strategien entwickelt:

- Einsatz inaktivierender Antikörper, die beispielsweise durch Mikroinjektion appliziert werden können.²⁷
- Gentransfer und dadurch induzierte Expression von natürlichen CDK-Inhibitoren unter Vermittlung adenoviraler Vektoren oder anderer „Transportmittel“ (z.B. Liposomen).²⁹
- Entwicklung und direkte Anwendung von Peptiden oder Peptidanaloga, welche von den natürlichen CDK-Inhibitoren abstammen.^{4,29,38}
- Synthese „kleiner“ CDK-Inhibitoren mit unterschiedlichen chemischen Grundstrukturen.

Die letzten beiden Punkte werden in Kapitel 3 ausführlicher behandelt.

2.8 Mögliche Anwendungsgebiete für CDK-Inhibitoren

Der Einsatz von CDK-Inhibitoren eröffnet eine Reihe von Möglichkeiten bei Tumorerkrankungen, cardiovascularen Krankheiten, Infektionen mit Pilzen, Viren oder Parasiten sowie in der Neurologie und der Nephrologie; außerdem zur Behandlung von Psoriasis, rheumatoider Arthritis, insulinabhängigem Diabetes und Transplantatabstoßung sowie zur Anwendung als Herbizide.^{17,20,38,43}

Die Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung bleibt dabei die gezielte Hemmung von CDK in transformierten Zellen oder die Wiederherstellung einer kontrollierten Zellteilung ohne die Beeinträchtigung gesunder Zellen.

Die bisher dokumentierten, positiven Erfahrungen mit CDK-Inhibitoren in verschiedenen experimentellen Modellen und einige vielversprechende theoretische Ansätze sollen im folgenden Teil kurz charakterisiert werden:

Pilzinfektionen

Da die meisten Untersuchungen zur Erforschung des Zellzyklus an Hefepilzen stattgefunden haben, ist ein umfangreiches Wissen über den Stoffwechsel von Pilzen vorhanden. Dies könnte man sich zunutze machen, um pathogene Hefen, Dermatophyten oder Schimmelpilze zu bekämpfen. Da sich das CDK-Cyclin-System der Pilze von dem tierischer Organismen unterscheidet, bietet es sich als Zielstruktur für eine selektive Schädigung von Pilzzellen an.^{20,38}

Parasitäre Krankheiten

Von verschiedenen Protozoen (Plasmodium, Trypanosoma, Leishmania) konnten CDK-Analoga geklont werden, welche deutliche Unterschiede zu humanen CDK aufweisen. Wie auch auf dem Gebiet der Pilzinfektionen hofft man hier, Inhibitoren zu finden, die gezielt nur auf die CDK der Parasiten wirken, während sie auf die der Menschen keine Wirkung haben. Zur Zeit werden CDK-Inhibitoren gegen Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei und Toxoplasma gondii getestet.²⁰

Krankheiten durch vielzellige Parasiten

Auch Cyclin-abhängige Kinasen humanpathogener Würmer kommen als selektive Zielstrukturen für therapeutische Ansätze in Frage.²⁰

Virusinfektionen

Eine direkte Hemmung der Replikation des humanen Cytomegalie-Virus wurde mit Roscovitin (**8**) beobachtet, das die zelluläre CDK2 hemmt.^{20,44} Die mögliche Bekämpfung von Herpes-Virus-Infektionen, insbesondere durch das Cytomegalie-Virus verursachte, mit CDK2-Inhibitoren wie Olomoucine (**7**) und Roscovitin wurde bereits patentiert.⁴⁴

Beim HI-Virus wurde beobachtet, dass die Tat-aktivierte Kinase (Tat: Transcriptional Transactivator) identisch ist mit CDK9/Cyclin T. Eine Inhibition von CDK9, welche z.B. durch Olomoucine und Roscovitin möglich ist, bietet einen neuen, interessanten Therapieansatz.²⁰

Dermatologie

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine Krankheit, die sich durch eine Hyperproliferation der Epidermis mit starker Schuppenbildung auszeichnet. Zellzyklus-bremsende Arzneistoffe wie die CDK-Inhibitoren könnten zu einer neuen Therapiemöglichkeit führen.²⁰

Nephrologie

Die Glomerulonephritis zeichnet sich durch übermäßige Proliferation bestimmter Zellen der Nierenkörperchen aus und spielt als Auslöser für Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle. Sowohl in vitro als auch in vivo (im Tierversuch) wurde im Zusammenhang mit der Glomerulonephritis ein Anstieg der Expression und Aktivität von CDK2/Cyclin A und eine p27-Abnahme festgestellt. Der CDK-Inhibitor Roscovitin (**8**) hemmt die übermäßige Proliferation in vivo und stellt renale Funktionen wieder her (siehe Roscovitin).^{20,45}

Neurologie

Pathophysiologisch wird CDK5 eine wichtige Rolle in Bezug auf die Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten findet man extrazelluläre Amyloidplaques und intrazelluläre, neurofibrilläre Knäule als anormale Ablagerungen. Letztere bestehen unter anderem aus einem Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP), welches als Tau bezeichnet wird. Tau ist normalerweise an neuronale Mikrotubuli gebunden und hat sowohl Stabilisierungsfunktionen als auch Einfluss auf Vesikel- oder Organellentransport entlang der Mikrotubuli. Außerdem ist Tau an der Bildung von Axonen beteiligt und bindet Enzyme. Es wird angenommen, dass eine Hyperphosphorylierung von Tau die Bindung an die Mikrotubuli schwächt und

dazu führt, dass Tauproteine untereinander zu sogenannten gepaarten helicalen Filamenten aggregieren. Obwohl Tau durch diverse Kinasen phosphoryliert werden kann, sind als physiologisch entscheidende Kinasen Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), Caseinkinase 1 (CK1), cAMP-abhängige Kinase (PKA) und CDK5/p25 zu nennen. CK1 phosphoryliert Tau direkt oder wirkt indirekt durch aktivierende Phosphorylierung von CDK5.^{7,11,19,21} In den degenerierten, neuronalen Zellen von Alzheimer-Erkrankten wurden außerdem Kopräzipitate aus Tau und CDK5 identifiziert. In Zellen mit Ablagerungen aus gepaarten helicalen Filamenten wurde eine Deregulation von CDK5 beobachtet,⁴⁶ während in Kulturen aus neuronalen Zellen die apoptotischen Vorgänge durch CDK5/p25-Expression verstärkt wurden.^{7,21} CDK5 scheint auch an der Phosphorylierung eines weiteren neuronalen Proteins, MAP-1B, beteiligt zu sein.¹⁷ Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass der CDK5/p25-Komplex an den Veränderungen des Cytoskeletts und dem Absterben neuronaler Zellen im Gehirn von Alzheimer-Patienten beteiligt ist.^{7,21} Zusätzlich wurde eine erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentration im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten beobachtet.²⁰

CDK5 wurde als intrazelluläre Ablagerung mit phosphorylierten Neurofilamenten auch bei Morbus Parkinson und amyotropher Lateralsklerose gefunden.^{7,21}

Darüber hinaus wurde CDK5 in Lewy Bodies identifiziert, die typische Einschlüsse in Neuronen von Parkinson-Patienten darstellen. Es scheint auch einen Zusammenhang zwischen CDK5 und multipler Systematrophie beim Menschen zu bestehen. Bei Hunden wurde eine Verbindung zwischen CDK5 und vererbbarer spinaler Muskelatrophie entdeckt.¹⁹

CDK spielen, wie schon oben beschrieben, eine Rolle im Krankheitsgeschehen von Parkinson, Alzheimer und amyotropher Lateralsklerose. In diesem Zusammenhang wurde ein Effekt von Olomoucine (7) und Roscovitine (8) auf die Hyperphosphorylierung durch CDK5/p25 beobachtet.²⁰ Da z.B. Alzheimer-Patienten eine Langzeittherapie benötigen, wären hier CDK5-Inhibitoren mit hoher Selektivität wünschenswert, um toxische Nebenwirkungen zu mindern.

Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus schützen Inhibitoren von CDK neuronale Zellen vor Apoptose. Dies wurde berichtet über Olomoucine, Roscovitine, Butyrolacton und Flavopiridol.^{20,29,43}

Nach einem Schlaganfall können neuronale Zellen im Umfeld der ischämischen Verletzung mit einer Verzögerung von mehreren Tagen absterben. Dieser

Zelltod trägt charakteristische Züge von apoptotischen Vorgängen. An einem Tiermodell mit Ratten wurde das Absterben der neuronalen Zellen genauer untersucht, mit der Hoffnung, die verzögert auftretenden Schädigungen nach einem Schlaganfall mit entsprechenden Eingriffen in die Signalwege verhindern zu können. Man beobachtete im eben beschriebenen Fall einen Anstieg von CDK4/Cyclin D1, eine verstärkte Phosphorylierung seines Substrates pRb und deregulierte E2F-Freisetzung. Die Anwendung eines CDK-Inhibitors (Flavopiridol (**1**)) hemmte die pRb-Phosphorylierung und den Anstieg der Konzentration an freiem E2F und führte zu einer 80-prozentigen Reduzierung des Absterbens neuronaler Zellen.⁴⁷

Cardiovaskulärer Bereich

Eine Hyperproliferation der Zellen im cardiovaskulären System kann zu Verengungen und Behinderung des Blutflusses bis zum Verschluss der Blutbahn führen. Dies beobachtet man vor allem bei Artherosklerose und Restenose, welche zusammen ca. 50 % der Todesfälle der westlichen Welt ausmachen. Während sich eine Artherosklerose über mehrere Jahre entwickelt, ist eine Restenose eine Komplikation, die mit 30- bis 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit ca. 1-6 Monate nach einer PTCA (perkutane, transluminale, koronare Angioplastie) auftritt und durch Hyperproliferation des bei dem Eingriff verletzen Gewebes verursacht wird. Anstelle der klassischen PTCA wird inzwischen häufig ein sogenannter Stent eingesetzt. Bei diesem kann es in 20 % der Fälle ebenfalls innerhalb von 3-6 Monaten zu Stenosen, den In-Stent-Stenosen kommen, welche zur Verstopfung des eingesetzten Röhrchens führen. Bei Verletzung durch eine Ballonierung findet man in den entsprechenden Zellen bei Ratten eine Herunterregulierung von p21 und p27.³⁸

In einem Tiermodell an Ratten wurde festgestellt, dass der CDK-Inhibitor CVT 313 (**9**) die Proliferation neointimaler Zellen hemmt.²⁰ CDK-Inhibitoren bieten eine neuartige Möglichkeit, das unerwünschte Wachstum von verletztem Gewebe nach erwähnten Eingriffen zu bremsen, beispielsweise lokal durch Vorbehandlung der Stents mit einem entsprechenden Wirkstoff.

Tumorerkrankungen

Die während der Erstellung dieser Arbeit synthetisierten Substanzen wurden im Hinblick auf ihre Antitumoraktivität entwickelt. Aus diesem Grunde sollen mögliche Anwendungen von CDK-Inhibitoren in der Tumorbekämpfung ausführlicher beschrieben werden.

Eines der Grundprinzipien eines gesunden Gewebes und daraus folgend eines gesunden Organismus in Bezug auf die Zellvermehrung ist Homöostase. Das bedeutet, dass ein Gewebe so organisiert sein muss, dass die Balance zwischen sterbenden, ruhenden und sich teilenden Zellen gewährleistet ist, damit es nicht zu einem Schrumpfen oder einem übermäßigen Wachstum eines Gewebes oder eines Organs kommt. Außerdem ist es wichtig, dass eine Zelle nicht in andersartige Gewebe oder Organe hineinwachsen kann. Merkmale defekter Zellen sind häufig deren Immortalisierung, ein geringerer oder fehlender Bedarf an externen Wachstumsfaktoren, eine veränderte Morphologie, der Verlust der Kontaktinhibition und die Fähigkeit, in Kultur Zellhaufen (Foci) zu bilden.¹³

Als Ursache für eine bleibende Schädigung einer Zelle kommen verschiedene Auslöser in Frage. Zu den im Organismus zu suchenden Mechanismen gehören beispielsweise Fehler bei der Replikation des Erbgutes, spontane DNS-Schäden und stoffwechselbedingte DNS-Schäden.

Von außerhalb angreifende Faktoren sind unter anderem cancerogene Stoffe sowie UV-, Röntgen- und radioaktive Strahlen.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass auch Viren verschiedene krebsauslösende Faktoren mit sich bringen. So können zum einen virusspezifische Proteine mit Signalproteinen des Wirts interagieren und so normalen Zellfunktionen beträchtlichen Schaden zufügen. Zum anderen können virale Onkogene ins Wirtsgenom eingebaut werden und dadurch auf sehr unterschiedliche Weise Abläufe verändern, die im Endeffekt zu einem Tumorwachstum führen können.

Solche Mechanismen sind bei Infektionen mit Papillomaviren, Polyomaviren und Adenoviren beobachtet worden, deren Onkoproteine beispielsweise an pRb binden und dieses dadurch hemmen können.¹³

Bei mehr als 90 % aller daraufhin untersuchten menschlichen Tumore wurde eine gestörte Regulation des CDK4/pRb-Systems im Sinne einer Verstärkung der CDK4-Wirkung gefunden, wie Überexpression von Cyclin D1, Mutation von CDK4, Mutation von pRb oder Deletion von p16.^{1,16} Die meisten Störungen, die im vorangegangenen Teil dieses Kapitels aufgeführt waren, wurden in Tumorzellen entdeckt.

Über den möglichen Nutzen von CDK-Inhibitoren und die potentiellen therapeutischen Anwendungen gibt es verschiedene Theorien. Die Auswahl einer Strategie wird von den tatsächlichen Wirkungen eines Arzneistoffes im

lebenden Organismus, insbesondere von den Wirkungen im menschlichen Körper abhängen.

Einige wissenschaftliche Untersuchungen weisen auf ein Antitumorpotential von CDK-Inhibitoren in der Monotherapie hin, wobei sie sowohl als Zytostatika als auch als zytotoxische Agentien wirken können.⁴

In der Krebstherapie ist die zytotoxische Wirkung von Arzneistoffen ein wichtiges Ziel, sofern es sich um spezifische Induktion von Apoptose in Tumorzellen handelt. Im Bereich der CDK-Inhibitoren wurden scheinbar widersprüchliche Beobachtungen in Bezug auf eine apoptotische Reaktion gemacht, die in drei Thesen formuliert werden können: 1. CDK-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf Apoptose. 2. CDK-Inhibitoren schützen Zellen vor Apoptose. 3. CDK-Inhibitoren lösen Apoptose aus.

1. Auf c-Myc-induzierte Apoptose haben CDK-Inhibitoren keinen Einfluss. Ein apoptotisches Signal in bestimmten Fibroblasten ist die Überexpression des Transkriptionsfaktors und Onkoproteins c-Myc, welche mit einer erhöhten CDK-Aktivität einhergeht. Durch Versuche sowohl mit natürlichen CDK-Inhibitoren (p16, p21 und p27), als auch mit einem synthetischen (Roscovitin (8)) wurde festgestellt, dass die c-Myc-induzierte Apoptose nicht durch CDK-Inhibitoren beeinflussbar ist.^{4,43}

2. CDK-Inhibitoren können in neuronalen Zellen Apoptose verhindern. Mehrere neuronale Zelltypen sterben in Gegenwart von DNS-schädigenden Substanzen oder als Folge von Mangelernährung durch Apoptose ab. Die Gegenwart von Olomoucine (7) oder Flavopiridol (1) konnte solche Zellen wirkungsvoll vor dem Zelltod schützen, weshalb eine Regulation der Apoptose über CDK vermutet werden kann. Bei weiteren Untersuchungen ist ebenfalls der Eindruck entstanden, dass CDK Apoptose induzieren können, wenn eine bereits differenzierte, neuronale Zelle einen unangebrachten Wiedereintritt in den Zellzyklus aufweist.^{1,29,43}

3. Eine signifikante Stimulierung von Apoptose wird durch synthetische CDK-Inhibitoren in geschädigten Zellen verursacht. Beispielsweise lösen Olomoucine (7) und Butyrolacton (49) Apoptose in Zellen aus, die durch DNS-schädigende Substanzen (z.B.: Mitoxantron, Cisplatin) in der G2-Phase gestoppt wurden, und zwar unabhängig von der p53-Funktion. Dies weist auf eine wichtige Beteiligung von CDK1 bei der Verhinderung von Apoptose hin. Zusätzlich wurde Auslösung von Apoptose in sich aktiv teilenden Tumorzelllinien durch Behandlung mit Flavopiridol beobachtet. Die Auslösung von Apoptose in Tumorzellen scheint abhängig vom Zelltyp und von genetischen Faktoren zu

sein.^{1,20,43} Es wird angenommen, dass CDK1 die Zellen aktiv vor Apoptose schützt, während die Inhibition dieser CDK zu verstärktem programmierten Zelltod führt. Die Behandlung proliferierender Zellen mit Butyrolacton, Flavopiridol, Olomoucine oder Roscovitine stoppt deren Zellzyklus an den G1/S- und G2/M-Grenzen und induziert z.T. bei höherer Dosierung Apoptose.^{1,20,29,43}

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die spezifische Inhibition von CDK1 die Zytotoxizität einiger Chemotherapeutika gegen Tumorzellen auf andere Art als oben beschrieben synergistisch unterstützt. Eine Erklärung hierfür könnte ein Stoppen oder Bremsen der Zellproliferation von Tumorzellen in bestimmten Zellzyklusphasen durch CDK-Inhibitoren sein, in denen die Zellen sensibler für zytotoxische Agenzien aus anderen Wirkstoffgruppen sind.

Eine andere Theorie hinter der Entwicklung von CDK-Inhibitoren ist die, dass diese selektiv und temporär gesunde Zellen stoppen sollen, um sie vor zytotoxischen Wirkstoffen zu schützen, wie z.B. vor Paclitaxel, welches zur Entfaltung seiner Wirksamkeit einer Progression des Zellzyklus bedarf. Entsprechendes wurde mithilfe von CDK-Inhibitoren demonstriert. CDK1-Antisense Moleküle waren z.B. in der Lage, den Zellzyklus in der G2-Phase zu stoppen, und zwar in normalen, nicht aber in Tumorzellen. Diese unterschiedliche Reaktion von normalen Zellen im Vergleich zu Tumorzellen ist eine wichtige Voraussetzung, um normale Zellen vor Wirkstoffen zu schützen, die bei Tumorzellen in anderen Zellzyklusphasen ihre Aktivität entfalten.^{4,37}

Eine lokale Applikation eines CDK-Inhibitors in einem Rattenmodell zeigte, dass auf diese Weise der Zytostatika-induzierte Haarausfall vermindert werden kann.⁴⁸

Bei Bewertung der vielen durchgeführten Untersuchungen muss bedacht werden, dass Ergebnisse aus Enzymassays oder Tests an Zelllinien nur begrenzt auf eine in vivo Situation übertragbar sind. In vivo spielen Faktoren wie Zellpermeabilität, Verteilung zwischen oder Akkumulierung in bestimmten Kompartimenten, inaktivierende Metabolisierung, hohe ATP-Konzentration, Konkurrenz mit anderen bindenden Substanzen, bisher nicht identifizierte enzymatische Ziele und einige andere eine große Rolle. Ein wichtiges Kriterium für die Bewertung der CDK-Inhibition ist, ob der Zellzyklus zum Stillstand kommt und ob die Phosphorylierung der CDK-Substrate wie pRb oder Histon H1 in vivo durch Anwesenheit eines CDK-Inhibitors gehemmt wird.

Häufig muss man in vivo aber auch mit zusätzlichen Wirkungen auf bisher nicht identifizierte Ziele rechnen, wie es vor allem bei weniger spezifischen Inhibitoren vorkommen kann und z.B. für Flavopiridol in Betracht gezogen werden muss.⁴³ Ob diese zusätzlichen Effekte dabei die erwünschte Wirkung unterstützen oder ihr entgegenwirken, bleibt zu klären.

CDK-Inhibitoren stellen eine interessante Substanzgruppe dar, die auf vielfältige Weise dazu dienen kann, die Ursachen krankhafter Zustände aufzuklären oder neue Strategien für ihre Therapie zu entwickeln.

3 Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

3.1 Anwendung von natürlichen und synthetischen CDK-Inhibitoren und CDK-Modulatoren auf Proteinbasis

In den Zellen normalerweise vorkommende CDK-inhibitorische Proteine wurden in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Bei hyperproliferativen Krankheiten fehlen sie häufig oder sind nicht in der Lage, die dort überaktiven Zielenzyme unter Kontrolle zu bringen.

Die Tatsache, dass CDK-inhibitorische Proteine ein vielversprechendes therapeutisches und diagnostisches Potential beinhalten, hat dazu geführt, dass einige dieser Proteine bereits unter Patentschutz stehen. Der Inhibitor p27 wurde durch das Sloan Kettering Institute of Cancer Research und das Fred Hutchinson Cancer Research Center patentiert, p19 von Cold Spring Harbor Laboratories und die Universität von Kalifornien und das Protein p18 durch die Universität von North Carolina.¹⁸

Die folgende Tabelle gibt die IC₅₀-Werte einiger CDK-inhibitorischer Proteine und einer Chimären aus p27 und p16 bei verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexen wieder.¹⁸

Tabelle 3-1: Inhibitorische Aktivität der natürlichen CDK-Inhibitoren und einer Chimären aus p27 und p16, angegeben durch die jeweilige IC₅₀ [nM]¹⁸

| | CDK1/Cyclin B | CDK2/Cyclin E | CDK2/Cyclin A | CDK4/Cyclin D1 |
|---------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| p27 | 20 | 52 | 65 | 63 |
| p16 | > 500 | > 500 | > 500 | 250 |
| p27-p16 | 15 | 30 | 25 | 25 |
| p21 | n.a. | n.a. | n.a. | 11 |

IC₅₀ [nM], n.a. = nicht angegeben

Die Einschleusung von Proteinen in Zellen ist durch Kombination mit adenoviralen Vektoren möglich, wodurch z.B. p16 in Krebszelllinien eingebracht werden konnte. Die Übertragung von p16 führte zur Wachstumsverzögerung der Zellen, ein Effekt, der auch durch in vivo Versuche bestätigt werden konnte. Zelllinien mit Mutationen des pRb-Gens konnten von

p16 allerdings nicht beeinflusst werden, da die wachstumshemmende Wirkung von p16 von einem intakten pRb-Status der Zellen abhängt. Adenovirus-vermittelte Expression von p16 und p53 gleichzeitig führte zu signifikanter Häufung von apoptotischen Vorgängen in Tumorzelllinien, die bei Einwirken von p16 allein nicht beobachtet wurden.²⁹

Um potentielle Anwendungen im kardiovaskulären Bereich zu untersuchen, wurde p16 nach Ballonierungen an Schweinen oder Ratten lokal angewendet, wobei der CDK-Inhibitor eine Hyperproliferation der verletzten Arterienwände verhindern bzw. verzögern konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach systemischer Applikation von p16 an einem analogen Rattenmodell erhalten.³⁸

Studien mit Adenoviren, die Expression von p21 oder p27 in Krebszelllinien bewirken, führten zu Wachstumshemmung *in vitro* und *in vivo*.²⁹

Neben der chemischen Synthese oder dem Exprimieren von kompletten, natürlichen Inhibitoren bietet sich auch die gezielte synthetische Abwandlung der Proteine an. Dadurch kann beispielsweise eine Voraussetzung für eine geplante Applikation erfüllt werden, wie die Anknüpfung einer internalisierenden Sequenz, die ein Durchdringen der Plasmamembran ermöglicht.

So hat die Universität von Dundee Fragmente von p16 patentiert, welche die Aminosäuren 84 bis 103 enthalten und CDK4/Cyclin D *in vitro* mit einem IC_{50} -Wert von 15 μM hemmen.¹⁸

Durch die Konstruktion einer Chimären aus p16 und p27 gelang es Mitotix, die jeweilige Aktivität der einzelnen Inhibitoren zu übertreffen, allerdings auf Kosten der Selektivität (siehe Tabelle 3-1). Eine Verbindung mit einer internalisierenden Sequenz für eine CDK-Hemmung *in vivo* wurde bereits patentiert. Verschiedene Verknüpfungen von p16, p27 und der Chimären p16-p27 mit internalisierenden Sequenzen ergaben *in vitro* IC_{50} -Werte im nanomolaren und subnanomolaren Bereich.¹⁸

Cyclacel hat Derivate von p21 patentiert, welche Fragmente des natürlichen Inhibitors darstellen. Eine Teilstruktur des Proteins mit den Aminosäuren 16-35 ergibt einen Inhibitor mit einer IC_{50} von 2.0 μM bei CDK4/Cyclin D, während der Abschnitt mit den Aminosäuren 141-165 mit einer IC_{50} von 0.1 μM bei CDK4/Cyclin D noch aktiver ist. Die inhibitorische Aktivität bei CDK2/Cyclin E wurde als vergleichbar beschrieben, während die bei CDK1/Cyclin B mit einer IC_{50} von 20 μM deutlich schwächer war. Durch einen Aminosäureaustausch im letztgenannten inhibitorischen Protein (mit den Aminosäuren 141-165 von p21) gelang es, die Aktivität bis in den Bereich des

kompletten Proteins zu steigern ($IC_{50} = 46 \text{ nM}$; komplettes p21: $IC_{50} = 11 \text{ nM}$; jeweils CDK4/Cyclin D).¹⁸

Durch kombinatorische Chemie wurde eine große Bibliothek von Peptid-Aptameren mit je 20 Aminosäuren angelegt, aus der mehrere Substanzen bei CDK2/Cyclin E aktiv waren. Es wird von 14 verschiedenen Inhibitoren berichtet, die IC_{50} -Werten zwischen 1.5 und 100 nM aufweisen, wobei der Wirkung vermutlich ein Substrat-kompetitiver Wirkmechanismus zugrunde liegt (Testsystem: CDK2/Cyclin E; 25 μM ATP).⁴⁹

Desweiteren gibt es auch noch Entwicklungen von Proteinen, die die Cyclin-Proteolyse fördern und andere, die antagonistisch auf CDK/Cyclin-Komplex-vermittelnde Proteine wirken. Von CIBA-Geigy und Novartis wird berichtet, dass sie MAT1, den Aktivator von CDK7/Cyclin H, patentiert haben.

Auch Derivate von E2F wurden dargestellt. E2F stellt einerseits ein Substrat von CDK dar, andererseits regt es die Transkription von CDK an, so dass E2F-Abwandlungen zu interessanten Inhibitorotypen führen könnten.¹⁸

Weitere Proteinabkömmlinge werden in nächster Zeit mit Sicherheit folgen. Ein vielversprechender Ansatz dabei ist, Kristallstrukturen von CDK/Cyclin-Komplexen und entsprechenden Inhibitoren als Grundlage zu verwenden und die für die Bindung entscheidenden Aminosäuren durch nichtpeptidische Strukturbestandteile nachzuahmen, wie dies auf dem Gebiet der ACE-Hemmer schon seit einiger Zeit etabliert ist.

3.2 Synthetische CDK-Inhibitoren mit geringem Molekulargewicht

Im menschlichen Körper gibt es schätzungsweise 2000 bis 3000 Proteinkinasen,¹ die alle ATP als Phosphatgruppendonator nutzen und signifikante Ähnlichkeit in der Sequenz ihrer jeweiligen ATP-Bindungstasche besitzen.²⁶ Aus diesen Gründen bestanden lange Zeit verständliche Zweifel, ob es überhaupt möglich sei, synthetische Inhibitoren zu entwickeln, die spezifisch nur auf eine bestimmte Kinase oder eine Familie von Kinasen wirken. Mit der Entdeckung von selektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. den selektiven Inhibitoren von EGFR-Kinase (Epidermal Growth Factor Receptor Kinase, z.B. A.M. Thompson 1995⁵⁰), wurde diese Möglichkeit erstmals greifbar. Inzwischen gibt es auch Substanzen, die eine hohe Selektivität für CDK gegenüber anderen Kinasen zeigen.

Um die Zellmembran durchdringen zu können, dürfen synthetische Inhibitoren eine bestimmte Größe nicht überschreiten ($M_r < 500$). Die günstigsten Bindungsbedingungen für solche relativ kleinen Moleküle findet man im Bereich der Enzyme in der Regel in kleinen Taschen mit definierten Eigenschaften. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Inhibitor mit geringer Molekülmasse in der Lage ist, eine große Protein-Protein Kontaktfläche zu besetzen und die Bindung der Proteine zu stören, ist als gering einzuschätzen.⁴ Die hieraus zu erzielende Schlussfolgerung, dass im Bereich der CDK die meisten synthetischen Inhibitoren in der ATP-Tasche binden und über diesen Mechanismus die Aktivität der Kinase hemmen, wurde bis jetzt bestätigt. Entsprechende Inhibitoren mit einem Wirkmechanismus, der nicht ATP-kompetitiv ist, bleiben die Ausnahme.

Beim Vergleich der *in vitro* Aktivitäten verschiedener Inhibitoren mit ATP-kompetitivem Wirkmechanismus muss bedacht werden, dass die in den Assays verwendete ATP-Konzentration einen wichtigen Einfluss auf den jeweiligen IC_{50} -Wert hat. Eine bessere Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen in den Testsystemen ist gewährleistet, wenn nicht IC_{50} -Werte, sondern K_i -Werte angegeben werden.⁴ Da sich dies bisher nicht durchgesetzt hat, müssen die im folgenden Teil aufgeführten IC_{50} -Werte mit Vorsicht verglichen werden. Die K_i -Werte sind im Text aufgeführt, sofern sie verfügbar waren. Waren die in den Enzymassays verwendeten ATP-Konzentrationen in

der Literatur angegeben, sind sie ebenfalls in den folgenden Ausführungen enthalten, wenn sie von der häufig verwendeten ATP-Konzentration (15 μM) abweichen.

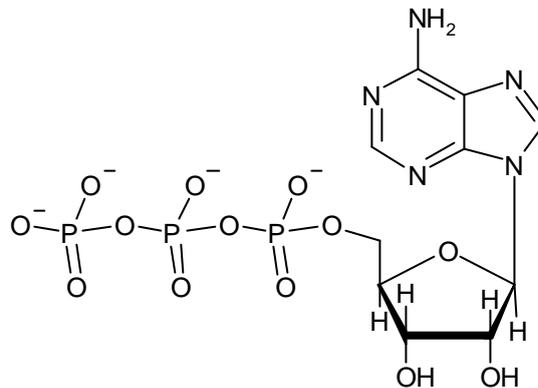
In der Regel werden für die Testung an CDK1/Cyclin B Enzymkomplexe aus den Oocyten des Seesterns *Marthasterias glacialis*⁵¹ verwendet, ebenfalls Anwendung fand *Pisaster ochraceus*.³ Der rekombinante CDK1/Cyclin B-Komplex enthält wahrscheinlich inaktive Monomere und Dimere, welche das CDK-Inhibitionsassay stören würden.⁵¹ Die Infektion von Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen mit einem Baculovirus, welches das Gen für humane CDK trägt, führt dagegen zu guten Ausbeuten an verwendbarer, rekombinanter CDK2 und CDK4/Cyclin D1.⁵² Für Testungen mit CDK5/p35 wird dieses aus Rinder-⁵³ oder Schweinehirn gewonnen. Ebenfalls beschrieben wurde rekombinante CDK5/p35 aus *Escherichia coli*.¹⁹ Eine gebräuchliche ATP-Konzentration ist 15 μM , wogegen die ATP-Konzentration in Zellen normalerweise größer als 500 μM ist, so dass hieraus schon ein Grund für die häufig niedrigeren IC_{50} -Werte in zellfreien Systemen verglichen mit den Ergebnissen der Testung an Zellen resultiert.⁴

Das Ziel, CDK durch ATP-kompetitive Inhibitoren zu hemmen, ist nicht ganz unproblematisch. Betrachtet man ATP (4) als eine Leitstruktur, so ist zu bedenken, dass der Adeninring eine gängige Struktur im Stoffwechsel darstellt und ein Arzneistoff mit einer ähnlichen Struktur ein hohes Potential für unerwünschte Wirkungen hat. Zusätzlich enthält ATP in seiner Phosphatkette Ladungen, welche als Bestandteil einer Wirkstruktur deren Aufnahme in die Zellen erschweren würden. Aus diesen Gründen kommt es darauf an, Inhibitoren zu entwickeln, welche, obwohl sie ATP nachahmen, in die Zellen aufgenommen werden können. Dort sollen die Inhibitoren vorzugsweise auch außerhalb der Reichweite von ATP in der Umgebung der ATP-Bindungsstelle Wechselwirkungen zum Enzym ausbilden können und somit für ein bestimmtes Enzym charakteristisch sein. Dabei ist es von Vorteil, dass die meisten der für CDK typischen Reste sich in der Nachbarschaft der ATP-Bindungsstelle befinden, weshalb in diesem Bereich für CDK selektive Wechselwirkungen möglich sind.²⁸

Kristallstrukturen existieren zur Zeit nur von CDK6 und CDK2.⁵⁴ Die Struktur von CDK1 konnte wegen der hohen Homologie zwischen CDK2 und CDK1 berechnet werden.⁵⁵ Im Bereich der für die Bindung der Inhibitoren wichtigen

ATP-Tasche gehören His84 und Glu85 der CDK2 zu den in CDK nicht konservierten Aminosäuren. Ihre Position nehmen in der CDK1 Ser84 und Met85 ein.⁵⁶ Vergleiche der Kristallstruktur von monomerer CDK2 mit der von CDK2/CyclinA/ATP und CDK2/Cyclin A/p27 zeigen nur wenige Unterschiede im Bereich der ATP-Bindungsstelle.⁵⁴ Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass auch Komplexe von monomerer CDK2 mit Inhibitoren schon richtungsweisend für das Inhibitor-Design sein können.⁵⁶ Allerdings muss bei der Entwicklung von CDK2-Inhibitoren bedacht werden, dass die Reste Lys33, Glu51 und Asp145 durch Cyclin A-Anlagerung strukturellen Veränderungen unterworfen sind.⁵⁷

Adenosintriphosphat (ATP)



ATP (4)

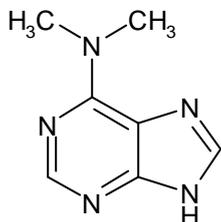
Die Bindung von ATP (4) in der entsprechenden Bindungstasche wurde auf der Grundlage von Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen eines CDK2/ATP-Komplexes beschrieben (siehe auch Bild 2-3).

Die meisten Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen bestehen zwischen der Triphosphatgruppe des ATPs und der CDK (Thr14, Tyr15 über H₂O, Lys33, Lys129, Asn132, Asp145, Mg²⁺). Das hexakoordinierte Magnesiumion der CDK wird gebunden durch je ein Sauerstoffatom der Phosphate, je eins von den Asn132- und Asp145-Seitenketten und ein Wassermolekül.³² Eine ähnliche Fülle von hydrophilen Wechselwirkungen ist von einem Arzneistoff aus eben erwähnten Gründen nur schwer nachzuahmen. Der Riboserest des ATPs bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen über Hydroxylgruppen aus, eine zu Gln131 und zwei zu Asp86. Interessant für die Bindung der

potentiellen Wirkstoffe ist auch der Bereich um den Adeninring. Die Adenin-Teilstruktur des ATPs wird über drei Wasserstoffbrückenbindungen im Enzym verankert, die zwischen N1 und Leu83, der Aminogruppe und Glu81 sowie N3 und einem Wassermolekül ausgebildet werden. Zusätzlich bestehen noch eine Vielzahl von van der Waals Interaktionen zwischen Ligand und Kinase.^{28,32}

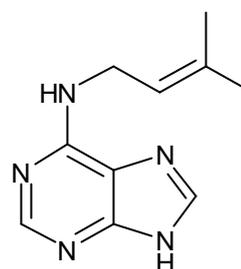
3.2.1 Inhibitoren mit Puringrundgerüst

Dimethylaminopurin und Isopentenyladenin



Dimethylaminopurin (**5**)

IC₅₀: 120 μM CDK1



Isopentenyladenin (**6**)

IC₅₀: 45 μM CDK1/Cyclin B
 50 μM CDK2/Cyclin A
 80 μM CDK5/p35
 60 μM GSK-3β

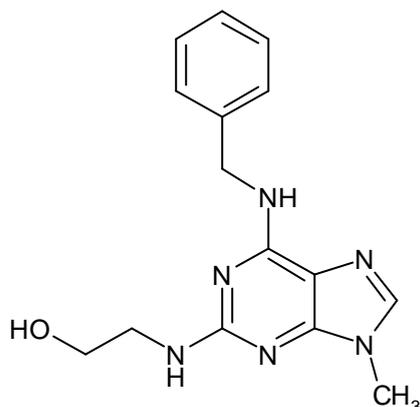
Eine der ersten als CDK-Inhibitoren identifizierten Verbindungen war 6-Dimethylaminopurin (**5**), welches ursprünglich als Puromycinderivat synthetisiert wurde und durch seine Eigenschaft auffiel, die Mitose von Seeigel-embryonen hemmen zu können, ohne dabei die Proteinsynthese zu vermindern. Dimethylaminopurin hemmt CDK1 mit einer IC₅₀ von 120 μM und zeichnet sich durch eine breite inhibitorische Aktivität bei Kinasen aus.^{43,52,53}

Als nächster Wirkstoff dieser Reihe folgte Isopentenyladenin (**6**) mit einer IC₅₀ von 45 μM bei CDK1/Cyclin B, 50 μM bei CDK2/Cyclin A und 80 μM bei CDK5/p35. Isopentenyladenin weist allerdings auch IC₅₀-Werte zwischen 50 und 100 μM bei einer Reihe von anderen Kinasen auf, wie PKA, ASK-γ (ein pflanzliches Homologes der menschlichen GSK-3)⁵³ und GSK-3β.¹¹

Untersuchungen der Kristallstruktur von CDK2 im Komplex mit Isopentenyladenin ergaben eine von ATP verschiedene Orientierung des Purins in der ATP-

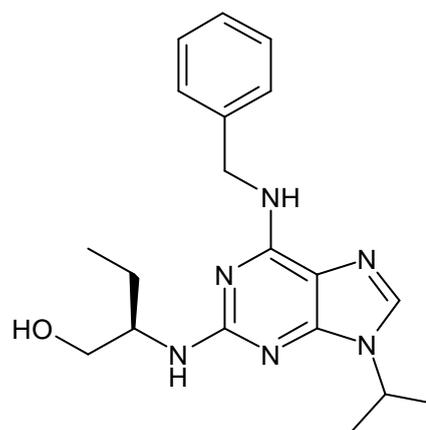
Tasche mit wichtigen Interaktionen zwischen N9 des Inhibitors und Glu81 der CDK, N7 und Lys33 sowie N3 und Leu83.^{17,28,52}

Olomoucín und Roscovitin



Olomoucín (7)

K_i : 5 μM CDK1
 IC_{50} : 7 μM CDK1/Cyclin B
 7 μM CDK2/Cyclin E
 7 μM CDK2/Cyclin A
 3 μM CDK5/p35
 30 μM erk1
 100 μM GSK-3 β



Roscovitin (8)

IC_{50} (R,S): 0.65 μM CDK1/Cyclin B
 0.70 μM CDK2/Cyclin E
 0.70 μM CDK2/Cyclin A
 0.16 μM CDK5/p35
 30 μM erk1
 130 μM GSK-3 β
 70 μM Insulin-Rezeptor Tyrosinkinase

Durch Screening einer Reihe für andere Zwecke synthetisierter Purine auf CDK-inhibitorische Aktivität wurde Olomoucín (7) entdeckt, welches im Vergleich zu den Purinen Dimethylaminopurin (5) und Isopentenyladenin (6) eine deutliche Selektivität aufweist. Die Inhibition beschränkt sich auf CDK1, CDK2 ($\text{IC}_{50} = 7 \mu\text{M}$), CDK5 ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$) und erk1-Kinase^{*58} (=GST-erk1, $\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$). Eine vergleichsweise schwache Inhibition wurde bei ASK- γ ^{52,53} und bei GSK-3 β ¹¹ beobachtet. CDK4/Cyclin D1 und CDK6/Cyclin D3 wurden nicht gehemmt.^{52,53} Olomoucín erwies sich in entsprechenden Untersuchungen als ATP-kompetitiv und unabhängig von der in den Testsystemen verwendeten Histon H1-

* Die Serin/Threonin-Kinase erk1 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1) gehört zur Unterfamilie der MAP-Kinasen (Mitogen-Activated Protein Kinase) und ist identisch mit MAP-Kinase 1.⁵⁸

Konzentration. Es hemmt den Zellzyklus dosisabhängig in der G1- oder G2-Phase bzw. am G2/M-Übergang in einer Reihe von Zellmodellen, von einzelligen Algen bis zu menschlichen Tumorzellen.^{12,53,59} Die Ergebnisse an Zellsystemen können allerdings auch durch eine Hemmung anderer Kinasen, wie z.B. erk1, beeinflusst werden.^{1,59}

Die Bindung von Olomoucine in der ATP-Tasche der CDK2 wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.^{28,53} Sie unterscheidet sich sowohl von der Bindung des ATPs (**4**) als auch von der des Isopentenyladenins (**5**), denn der Adeninring des Olomoucins ist zwar ungefähr in der gleichen Ebene wie der von ATP zu finden, allerdings um fast 160° verdreht. Dabei bestehen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N7 und C6-NH des Inhibitors und der Leu83-Peptidfunktion der CDK, außerdem zwischen C8 und Glu81.^{28,35,53} Bei Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde deutlich, dass das N7 frei bleiben muss, während die Substitution von N9 durch einen hydrophoben Rest ebenso wichtig ist wie die entsprechende Substitution am C6-Stickstoffatom.

Seit der Entdeckung der drei ersten CDK-inhibitorischen Purine und der ermutigenden Feststellung, dass ein Purin wie Olomoucine eine deutliche Selektivität für CDK aufweisen kann, wurden Tausende von 2,6,9-trisubstituierten Purinen synthetisiert und getestet.

Der nächste vielversprechende Inhibitor, der bei diesen Bemühungen entstand, war Roscovitin (**8**). Bei getrennter Testung der beiden Enantiomere erwies sich (R)-Roscovitin mit einer IC_{50} von 0.45 μ M als etwas aktiver im Vergleich zu (S)-Roscovitin mit 0.95 μ M bei CDK1/Cyclin B, während dieser Effekt an CDK2/Cyclin E kaum zu finden war. Die inhibitorische Aktivität des Racemats bei CDK2/Cyclin E oder Cyclin A (beide $IC_{50} = 0.7 \mu$ M) ist äquivalent zu der bei CDK1/Cyclin B, die bei CDK5/p35 ist etwas stärker ($IC_{50} = 0.16 \mu$ M).^{43,52,60}

Die ATP-kompetitive Wirkung wurde durch Enzymtests mit verschiedenen ATP-Konzentrationen bestätigt, bei denen die IC_{50} sich mit steigender ATP-Konzentration erhöht.⁶⁰

Roscovitin und Olomoucine wurden zu Untersuchungen im Bereich von Virusinfektionen herangezogen. Ihre CDK2-hemmenden Eigenschaften werden zur Behandlung von Infektionen mit Viren aus der Herpes-Familie, besonders dem Cytomegalie-Virus, als sehr vielversprechend angesehen, da die Herpes-Viren zelluläre CDK2 zur Vermehrung benötigen. Die Verwendung von CDK2-

Inhibitoren als Therapeutika gegen Virusinfektionen durch Herpes-Viren wurde bereits patentiert.^{20,44}

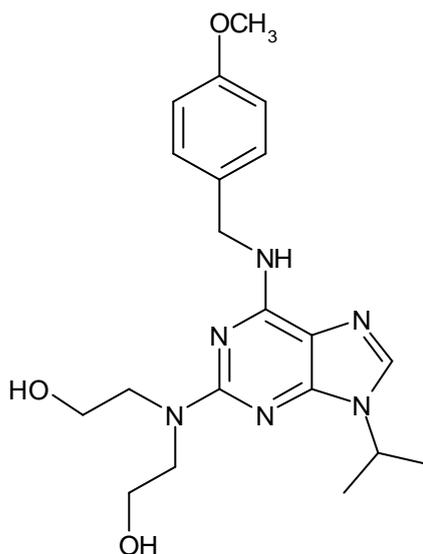
Einige interessante Untersuchungen wurden auf dem Gebiet der Glomerulonephritis durchgeführt. Glomerulonephritis zeichnet sich durch ein übermäßiges Wachstum bestimmter Zellen der Glomeruli aus. Diese Zellen weisen eine erhöhte Expression und Aktivität von CDK2/Cyclin A auf sowie verminderte Konzentrationen von p27. In vitro kann Roscovitin die Proliferation dieser mesangialen Zellen hemmen, ohne ihre Lebensfähigkeit zu beeinträchtigen. Die Konzentration von CDK2, Cyclin A oder Cyclin E wurde durch Roscovitin nicht verändert. Proliferationshemmende Effekte konnten anschließend auch durch in vivo Versuche an Ratten bestätigt werden, bei denen eine Glomerulonephritis künstlich ausgelöst wurde. Hierbei wurde eine signifikante Verbesserung einiger Krankheitssymptome beobachtet.⁴⁵

Roscovitin ist schließlich in der Lage, die CDK5/p25-vermittelte Phosphorylierung der neuronalen Kinase PAK1 sowohl in vivo als auch in vitro zu hemmen.¹⁹ Ergebnisse zu Olomoucine und Roscovitin sind auch in den Erläuterungen zu Verbindung **23** aufgeführt.

Die Röntgenstrukturanalyse eines CDK2/Roscovitin-Komplexes beleuchtet die Art der Bindung des Inhibitors in der ATP-Tasche des Enzyms. Der Purinring von Roscovitin bindet in der CDK ungefähr in der gleichen Region wie der von ATP und das planare, heterozyklische System liegt auch etwa in der gleichen Ebene. Allerdings ist wie bei Olomoucine der Purinring des Roscovitins im Vergleich zum ATP-Purinring verdreht. Roscovitin wird im Enzym vor allem mittels hydrophober und van der Waals Interaktionen gebunden, die auch die Bindung des Adeninrings von ATP ermöglichen. Fast 40 % der Wechselwirkungen zu Roscovitin werden durch die drei Reste Ile10, Leu83 und Leu134 bewirkt. Zwei wichtige Wasserstoffbrückenbindungen bestehen im Bereich des Adeninrings zu Resten des Proteins analog zu Olomoucine. Es handelt sich um Kontakte zwischen dem Leu83-NH und dem N7 des Inhibitors sowie der Carbonylgruppe des Leu83 und dem C6-NH von Roscovitin. Der Benzylring von Roscovitin ist außerhalb der ATP-Tasche angelagert und beansprucht hier Reste, die jenseits der Reichweite von ATP liegen. Die wichtigsten Wechselwirkungen bestehen hier zu Ile10, Phe82 und His84, wobei letzteres sich durch die Kontakte zum Inhibitor von der ATP-Bindungsspalte wegbewegt. Dem Benzylsubstituenten wird ein großer Einfluss auf die CDK-Selektivität zugeschrieben. Am N9 haben sich hydrophobe Reste bewährt, wobei sich bisher ein Isopropylrest als optimal erwies. Die Seitenkette am C2 wird von der CDK2

in einen Bereich der ATP-Bindungstasche eingelagert, der sonst den Ribosering von ATP bindet. Neben der Hydroxylgruppe des Inhibitors, welche eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül im Enzym bildet, scheint ein hydrophober Anteil an dieser Stelle wichtig zu sein.⁶⁰

CVT-313



CVT-313 (**9**)

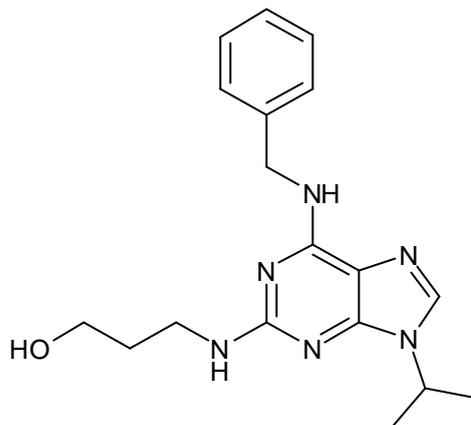
IC₅₀: 4.2 μM CDK1/Cyclin B
0.5 μM CDK2/Cyclin A
215 μM CDK4/Cyclin D

CV Therapeutic Systems testete hunderte von 2,6,9-trisubstituierten Purinen an CDK2, wobei sich auch hier die Isopropylsubstitution am N9 neben einer Diethanolaminstruktur am C2 als vorteilhaft erwies. Die Substanz CVT-313 (**9**) zeigt eine gewisse Selektivität für CDK2 gegenüber anderen CDK. Bei CDK2/Cyclin A besteht Aktivität mit einer IC₅₀ von 0.5 μM, die bei CDK2/Cyclin E wird als ähnlich bezeichnet. Die IC₅₀ bei CDK1/Cyclin B ist dagegen 8.5fach höher (4.2 μM), die bei CDK4/Cyclin D 430fach (215 μM). An Proteinkinase C (PKC) wird keine Hemmung beobachtet.

Es wurde über eine reversible Hemmung des Zellzyklus am G1/S- oder G2/M-Übergang berichtet sowie über eine Inhibition der pRb-Phosphorylierung in bestimmten Zellen (MRC-5 Zellen). Die Wirkung an Zellen wird zwar als nicht so gut bezeichnet, aber an einem Restenose-Tiermodell haben sich positive

Ergebnisse gezeigt, so dass CVT-313 in dieser Richtung weiter entwickelt werden soll.^{12,18}

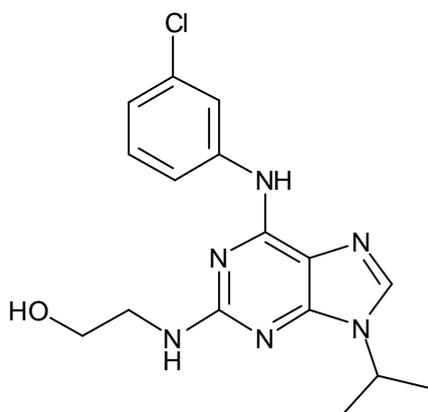
Bohemin



Bohemin (**10**)

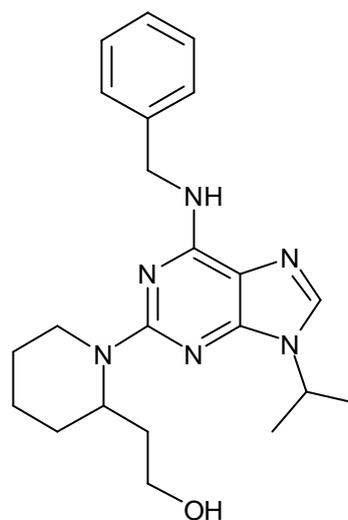
Bohemin (**10**), einem ähnlichen Purinderivat wie Olomoucine (**7**) und CVT-313 (**9**), wird CDK1-inhibitorische Aktivität zugeschrieben, ohne dass genauere Daten angegeben werden. In präklinischer Untersuchung wurden verlängerte Überlebenszeiten von Mäusen mit bestimmten Tumoren beobachtet (B16 Melanom, P388D Leukämie). Bei Behandlung einiger Mäuse mit transplantierten Tumoren wurde von einer Heilung berichtet.¹²

Purvalanole und Derivate



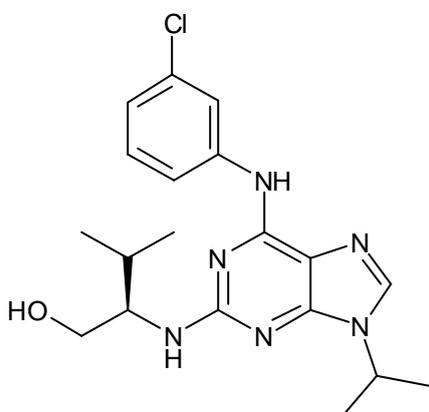
11

IC₅₀: 340 nM CDK1/Cyclin B
220 nM CDK2



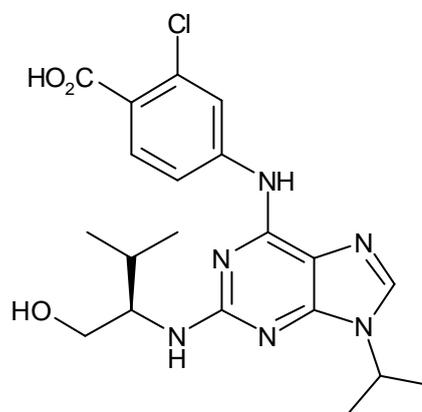
12

IC₅₀: 160 nM CDK2



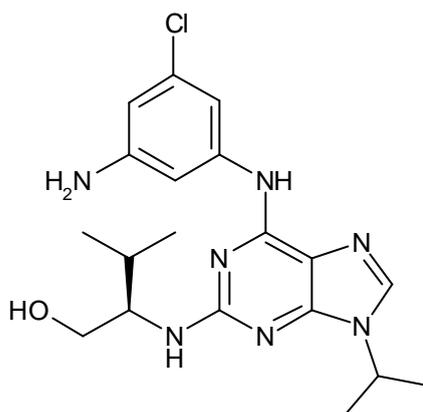
Purvalanol A (13)

IC₅₀: 4 nM CDK1/Cyclin B
40 nM CDK1/Cyclin B (150 μM ATP)
500 nM CDK1/Cyclin B (1.5 mM ATP)
35 nM CDK2/Cyclin E
70 nM CDK2/Cyclin A
850 nM CDK4/Cyclin D
75 nM CDK5/p35
13 000 nM GSK-3β



Purvalanol B (14)

IC₅₀: 6 nM CDK1/Cyclin B
50 nM CDK1/Cyclin B (150 μM ATP)
250 nM CDK1/Cyclin B (1.5 mM ATP)
9 nM CDK2/Cyclin E
6 nM CDK2/Cyclin A
> 10 000 nM CDK4/Cyclin D
6 nM CDK5/p35



Aminopurvalanol (**15**)

| | | |
|--------------------|-----------|---------------|
| IC ₅₀ : | 33 nM | CDK1/Cyclin B |
| | 28 nM | CDK2/Cyclin E |
| | 33 nM | CDK2/Cyclin A |
| | 20 nM | CDK5/p35 |
| | 13 000 nM | GSK-3β |

An der Universität von Berkeley in Kalifornien in der Arbeitsgruppe von P.G. Schultz wurden mehrere Bibliotheken von 2,6,9-trisubstituierten Purinen durch kombinatorische Chemie synthetisiert. Positive Effekte ergaben sich für die 6-Position durch Anilinosubstituenten oder Benzylaminosubstitution. Derivate mit Hydroxyalkylamino-, Dihydroxyalkylamino- und Cycloalkylaminosubstituenten in Position 2 erwiesen sich als moderat aktiv. Bessere Ergebnisse wurden durch die Anknüpfung von Aminoalkoholen erreicht, die von Valin (R-Enantiomer) oder Isoleucin abstammen. Schließlich wurden oben genannte Beobachtungen auch hier gemacht: In Position 9 ergab eine Isopropylsubstitution höhere inhibitorische Aktivität als ein Ethyl- oder Hydroxyethylrest. Substanz **11** ergab IC₅₀-Werte von 340 nM bei CDK1/Cyclin B bzw. 220 nM bei CDK2, während für Substanz **12** nur der Wert für die CDK2-Hemmung mit einer IC₅₀ von 160 nM angegeben ist.^{51,61} Die positiven Einflüsse der Substituenten ergaben in Kombination additive Effekte, so dass schließlich einige CDK-Inhibitoren mit IC₅₀-Werten unter 100 nM entwickelt werden konnten. Purvalanol A (**13**) und Purvalanol B (**14**) zeigen eine deutliche Selektivität für CDK1, CDK2 und CDK5 im Vergleich zu CDK4 und einer Reihe anderer Kinasen,^{11,61} ebenso wie Aminopurvalanol (**15**).^{11,51} Purvalanol A wirkt mit einer IC₅₀ von 4 bis 75 nM bei CDK1, CDK2 und CDK5. Purvalanol B (**14**) ist noch aktiver mit IC₅₀-Werten von 6 bis 9 nM bei CDK1, CDK2 und CDK5. Purvalanol B zeigt zwar die höchste Aktivität in den in vitro Testsystemen an isolierten Enzymen,

allerdings war es in Zelltestsystemen nicht sehr aktiv, welches seiner schlechten Membrangängigkeit zugeschrieben wird. Aminopurvalanol zeigt eine Aktivität bei CDK1, CDK2 und CDK5 mit IC_{50} -Werten von 20 bis 33 nM. Die Assays wurden in Gegenwart einer ATP-Konzentration von 15 μ M durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.^{51,61}

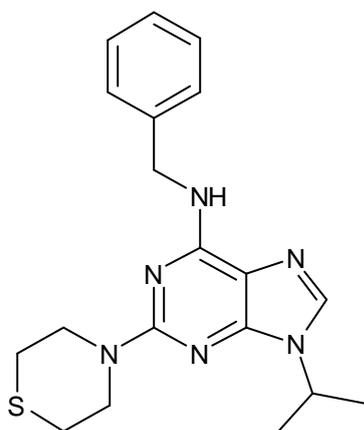
Der ATP-kompetitive Wirkmechanismus wurde einerseits durch steigende IC_{50} -Werte bei steigender ATP-Konzentration belegt, andererseits auch durch die Auswertung von Kristalluntersuchungen von Purvalanol B im Komplex mit CDK2.

Bei vier verschiedenen Wirkstoffen wurde durch Tests an Leukämiezellen (U937) die *in vitro* Aktivität bestätigt. An unsynchronisierten Zellen ergaben Purvalanol A und Aminopurvalanol in kleinerer Dosierung einen Stopp in der G2-Phase, während höhere Dosierungen Apoptose förderten. Aminopurvalanol bewirkte einen bemerkenswerten Differenzierungs-induzierenden Effekt bei U937-Zellen. Verbindung **11** ähnelt zwar strukturell Aminopurvalanol und Purvalanol A, verursachte aber in den U937-Zellen einen Stopp in der Metaphase der Mitose und keine Förderung der Apoptose. Der vierte Wirkstoff **12** in dieser Testreihe induzierte wiederum unspezifisch Apoptose unabhängig von der Phase des Zellzyklus. Als Kontrolle wurden die gleichen Versuche mit den am C6-NH methylierten Verbindungen (nicht abgebildet) durchgeführt, welche im Enzymassay keine inhibitorische Wirkung auf CDK zeigten. Da diese in den Zelllinien keinen Effekt auslösten, wurde gefolgert, dass die Effekte der vier genannten Inhibitoren (**13**), (**15**), **11** und **12**) eng mit ihrer chemischen Struktur und ihrer CDK-inhibitorischen Aktivität verbunden sind. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungen auf den Zellzyklus durch sehr ähnlich aufgebaute Inhibitoren ist die, dass *in vivo* unterschiedliche CDK gehemmt werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass es bei Assoziation einer CDK mit verschiedenen Cyclinen jeweils voneinander abweichende Substratspezifitäten gibt. Dadurch kann ein Inhibitor, je nachdem welcher CDK/Cyclin-Komplex bevorzugt gehemmt wird, unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellteilung haben.^{18,51}

Zur genaueren Untersuchung der Bindung der Purvalanole wurde eine Röntgenstrukturanalyse eines Purvalanol B/CDK2-Komplexes durchgeführt. Insgesamt ähnelt die Ausrichtung von Purvalanol B in der ATP-Bindungstasche von CDK2 der von Olomoucine (**7**) und Roscovitin (**8**). Der Purinring bildet hauptsächlich hydrophobe und van der Waals Kontakte aus, neben insgesamt drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen seinem N7 und dem NH von

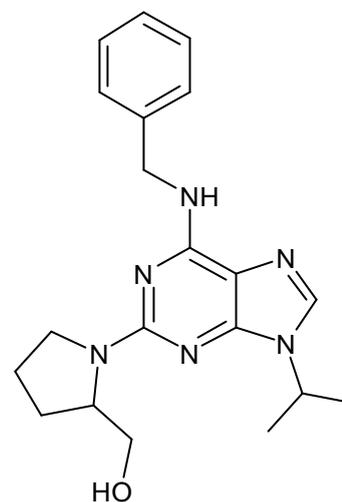
Leu83, seiner N6-Aminogruppe und der Carbonylfunktion von Leu83 und seinem C8 und dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81. Die C2-Seitenkette bindet in der Ribosebindungstasche, wobei die R-Isopropylgruppe der Seitenkette an eine glycinreiche Schleife der CDK gebunden ist und die Hydroxylgruppe eine vierte Wasserstoffbrückenbindung zu der Peptid-Carbonylfunktion von Gln131 ausbildet. Die 3-Chloranilinogruppe tritt in engen Kontakt mit den Seitenketten von Ile10 und Phe82. Schließlich befindet sich noch der N9-Isopropylrest in einer kleinen hydrophoben Tasche aus den Seitenketten von Val18, Ala31, Phe80, Leu134 und Ala144.⁶¹

2,6,9-trisubstituierte Purine mit gesättigten Heterozyklen in Position 2



16

IC₅₀: 0.9 μM CDK2/Cyclin A



17

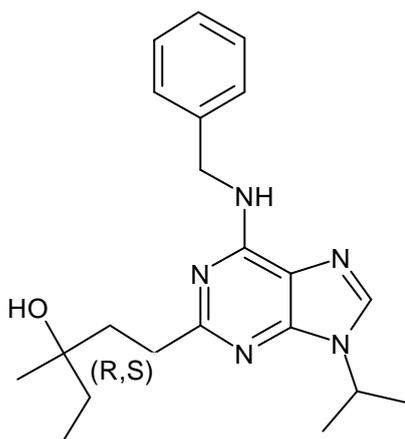
IC₅₀: 1.5 μM CDK2/Cyclin A

Eine Arbeitsgruppe aus Korea beschreibt 6-Benzylaminopurine mit Alkylsubstitution am N9 und gesättigten Heterozyklen am C2. Von diesen ermöglichte Substanz **16** die stärkste Hemmung von CDK2/Cyclin A (IC₅₀ = 0.9 μM), während **17** eine IC₅₀ von 1.5 μM aufwies. Es wurde rekombinante CDK2/Cyclin A aus Insektenzellen mit 100 μM ATP verwendet. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten Tests an verschiedenen Tumorzelllinien entsprachen der jeweiligen CDK-inhibitorischen Aktivität der Purinderivate, so dass eine stärkere CDK2/Cyclin A-Hemmung mit einer ebenfalls stärkeren Zytotoxizität für die Tumorzellen einherging. Insgesamt waren die Aktivitäten

bei Tumorzellen allerdings nur mäßig, wobei IC_{50} -Werte von 11 μ M für **16** und **17** hierbei als beste Ergebnisse angegeben wurden.⁶²

2,6,9-trisubstituierte Purine mit Hydroxyalkyl- oder Aminosubstituenten in Position 2

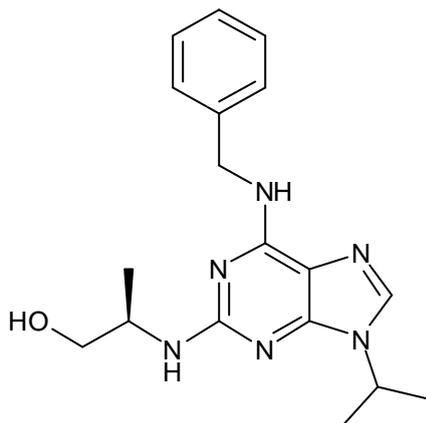
Ausgehend von Olomoucine (**7**) und Roscovitine (**8**) wurde im Institut Curie in Frankreich eine neue Reihe von Purinabkömmlingen dargestellt. Die Arbeitsgruppe um M. Legraverend entwickelte Strukturen, die sich anhand ihrer Substituenten in Position 2 des Grundgerüsts in mehrere Gruppen einteilen lassen: Purinderivate 1. mit Hydroxyalkyl-, 2. mit Amino-, 3. mit Iod-, 4. mit Pyrrolidino- und 5. mit Alkynylresten.⁵⁴



18

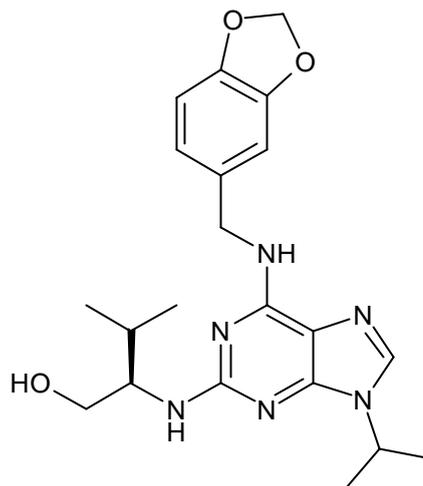
IC_{50} : 1.3 μ M CDK1

Die Substanzen der 1. Gruppe mit Hydroxyalkylsubstituenten zeigten IC_{50} -Werte bei CDK1 von 1.0 bis 4.5 μ M. Zu ihnen gehört z.B. die Verbindung **18** (Enantiomergemisch) mit einer IC_{50} von 1.3 μ M, welche strukturell den unten aufgeführten Alkynylverbindungen **25** und OL567 (**26**) sehr ähnlich ist.⁵⁴



19

IC₅₀: 0.85 μM CDK1
0.07 μM CDK5



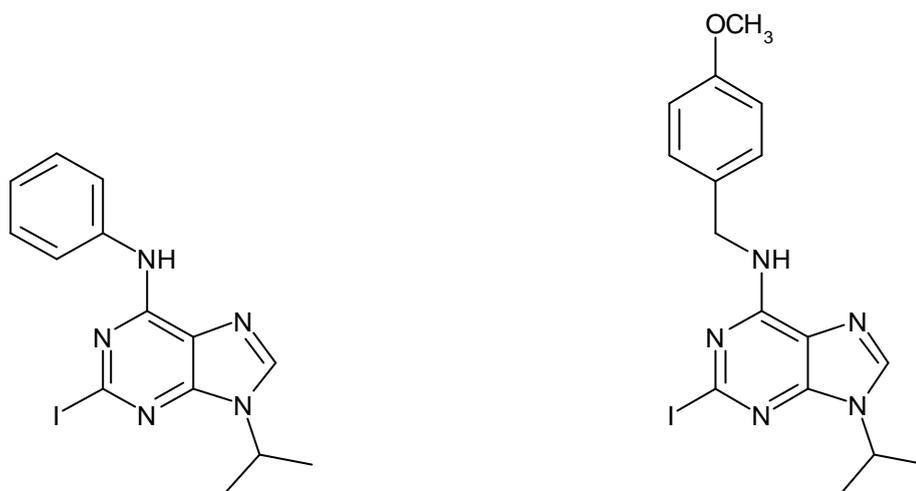
20

IC₅₀: 0.02 μM CDK1/Cyclin B

Etwas bessere CDK1-inhibitorische Eigenschaften wiesen einige Inhibitoren der 2. Kategorie auf, welche z.T. starke Ähnlichkeit mit Roscovitin (**8**) oder den Purvalanolen A (**13**) und B (**14**) und Aminopurvalanol (**15**) haben.

19 (R-Enantiomer) ist mit einer IC₅₀ bei CDK1 von 0.85 μM und einer von 0.70 μM bei CDK5 schon deutlich potenter als **18**. Die höchste inhibitorische Aktivität zeigte allerdings **20** (R-Enantiomer) bei CDK1 (IC₅₀ = 0.02 μM).⁵⁴

2,6,9-trisubstituierte Purine mit Iodsubstitution in Position 2



21

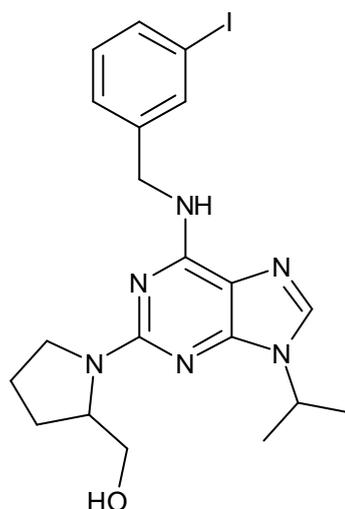
IC₅₀: 1.0 μM CDK1

22

IC₅₀: 0.85 μM CDK1

In der 3. Gruppe mit Iodsubstituenten in Position 2 erbrachten Verbindungen mit einem brom- oder einem unsubstituierten Aminophenylrest in Position 6 die besten Resultate, ebenfalls mit IC₅₀-Werten um 1 μM bei CDK1, wie z.B. **21**. Einen submikromolaren IC₅₀-Wert erreichte nur Substanz **22** (IC₅₀ = 0.85 μM). Aktivität bei CDK5 wurde hier nicht bestimmt.⁵⁴

2,6,9-trisubstituierte Purine mit N-Pyrrolidiny substituenten in Position 2



23

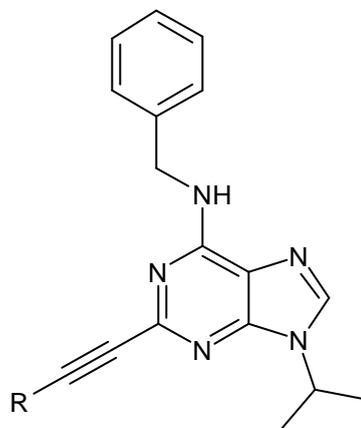
IC₅₀: 0.45 μ M CDK1/Cyclin B
0.65 μ M CDK2/Cyclin E
0.16 μ M CDK5/p35
0.76 μ M erk1
70 μ M Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase
130 μ M GSK-3 β

Von den pyrrolidiny substituierten Purinen (4. Gruppe) wurde **23** näher beschrieben und soll hier ebenfalls ausführlicher behandelt werden. Ein Austausch der N6-Benzylsubstitution durch eine N-Methylallylaminogruppe oder einen 1,2,3,6-Tetrahydropyridiny substituenten ließ die Aktivität der Purine deutlich sinken. Als ebenfalls sehr ungünstig erwies sich ein Austausch des Isopropylrestes durch voluminösere Reste wie Benzyl- und Cyclohexyl-, während Cyclopentylgruppen ohne große Verminderung der inhibitorischen Aktivität toleriert wurde. Am aktivsten war Substanz **23**, welche sich von Verbindung **17** nur durch den Iodsubstituenten am Benzylrest unterscheidet. In den in vitro Tests war **23** aktiver als Olomoucine (**7**) und etwa gleichwertig mit Roscovitin (**8**). Die IC₅₀-Werte betragen 0.16 μ M bis 0.76 μ M bei CDK1, CDK2 und CDK5 sowie erk1, während die Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase und die GSK-3 β deutlich schwächer inhibiert werden.⁶³

Substanz **23** wurde im Vergleich mit Olomoucine und (R)-Roscovitin zu verschiedenen Untersuchungen an Zellen herangezogen. Über Olomoucine und Roscovitin wurde zuvor berichtet, dass sie einen reversiblen Stopp des Zellzyklus in Pflanzenzellen verursachen, und zwar in der späten G1- und der

späten G2-Phase, ebenso wie eine Hemmung der Reifung von Seestern-Oocyten und des Wachstums von *Xenopus* Oocyten und Seeigeleiern. In Zervixkarzinom-Zellen (HeLa) wurde nun beobachtet, dass es zwar zum Zellzyklus-Stopp durch Olomoucine in hohen Konzentrationen oder Substanz **23** kommt, dieser jedoch nicht reversibel war und mit einer hohen Apoptoserate einherging. Die Beobachtung wurde so interpretiert, dass die substituierten Purine ihre zytotoxischen Eigenschaften nicht nur über CDK vermitteln. Weitere Untersuchungen führten zu der Schlussfolgerung, dass Olomoucine und (R)-Roscovitine an wachsenden Zellen schnell und effektiv die Aufnahme von Nucleosiden hemmen. Dabei scheinen die Purine als ATP-kompetitive Inhibitoren eines Proteins zu wirken, welches am aktiven Transport von Nucleosiden beteiligt ist. In bestimmten synchronisierten (HeLa-)Zellen verursacht Substanz **23** eine reversible Verlängerung der S-Phase, welches darauf hindeutet, dass CDK2/Cyclin E und CDK2/Cyclin A in diesem Beispiel die Hauptzielstrukturen sind.⁶³

Alkinylierte Purine

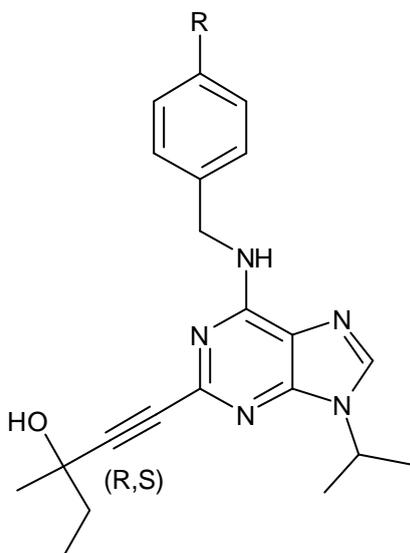


24

IC₅₀: 0.18-1.2 μM CDK1/Cyclin B

Eine vielversprechende Variation der 2,6,9-trisubstituierten Purine ergab die Anknüpfung eines Alkynylsubstituenten direkt an das Kohlenstoffatom in Position 2 (**24**, R = aliphatische Alkohole). Diese Verbindungen (5. Gruppe) zeigen inhibitorische Aktivität bei CDK1/Cyclin B von 0.18 bis 1.2 μM (IC₅₀)

und sind gleichermaßen aktiv bei CDK5/p35. Substanzen mit Einfach- statt Dreifachbindung erwiesen sich als ungefähr 4-10fach schwächer aktiv.⁶⁴



25

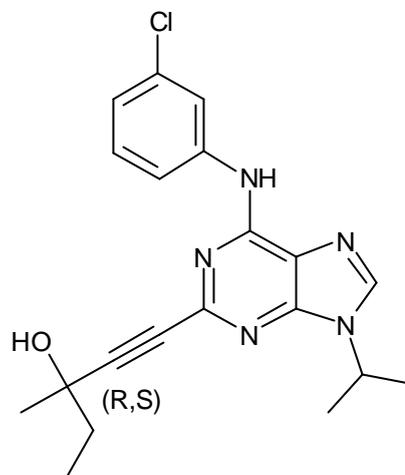
R = Cl

IC₅₀: 60 nM CDK1/Cyclin B
230 nM CDK5

OL567 (**26**)

R = OCH₃

IC₅₀: 230 nM CDK1/Cyclin B
400 nM CDK5



27

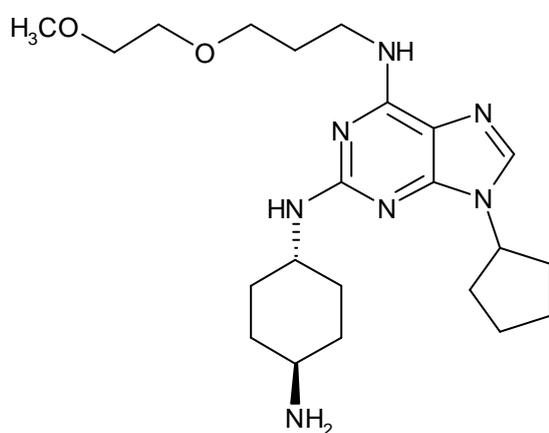
IC₅₀: 60 nM CDK1/Cyclin B
500 nM CDK5

Bei einer folgenden Weiterentwicklung wurde der Substituent in Position 2 optimiert und diese Struktur zur Evaluation der C6-Substitution verwendet. Diese neue Serie von CDK-Inhibitoren zeichnet sich durch einen hydroxyalkylierten Acetylen substituenten (Enantiomeren gemische) in Position 2 und einen Isopropylrest am N9 aus, während in Position 6 entweder ein substituierter Aminophenyl- oder ein substituierter Aminobenzylrest angeknüpft ist. Beste Ergebnisse wurden erzielt mit meta- oder para-Chlorsubstitution an der Aminophenyl- bzw. Aminobenzylgruppe. Alle Mitglieder dieser Reihe erwiesen sich als aktiver bei CDK1/Cyclin B als die Leitstruktur (R,S)-Roscovitin (**8**) (IC₅₀ = 650 nM, CDK1/Cyclin B). Die beiden aktivsten Derivate bei CDK1 sind **25** mit einem para-Chlorsubstituenten und **27** mit einem meta-Chlorsubstituenten, welche beide eine IC₅₀ von 60 nM bei CDK1/Cyclin B ergaben.⁵⁶ Verbindung **25** wirkt mit einer IC₅₀ von 230 nM bei CDK5, **27** mit 500 nM. Eine analoge Verbindung (**18**) mit gesättigtem C2-Substituenten und ohne Halogensubstitution zeigt deutlich schwächere CDK-Wirkung.^{54,56}

Die Orientierung von OL567 (**26**) im Komplex mit CDK2 wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die Einlagerung von OL567 ist analog zu

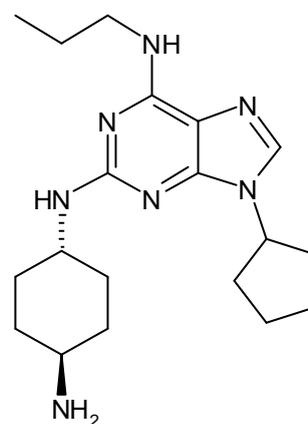
der von Olomoucine (**7**), Roscovitine (**8**) und Purvalanol B (**14**) und unterscheidet sich in entsprechendem Maße von der von ATP (**4**). OL567 bildet Wasserstoffbrücken aus zwischen seinem N7 und dem Peptidstickstoffatom von Leu83 sowie seinem C6-Stickstoffatom und dem Carbonylsauerstoffatom von Leu83. Der Adeninring wird sandwichartig zwischen Resten von Ile10 und Leu134 eingefügt und zeigt nur kleine Abweichungen im Vergleich zu Olomoucine, Roscovitine und Purvalanol. Die 3-Methylpent-1-yn-3-ol-Gruppe bindet in der Region, die sonst vom Riboserest des ATP ausgefüllt wird, während die Isopropylgruppe, wie auch die von Roscovitine, hydrophobe Wechselwirkungen zur Seitenkette von Phe80 entwickelt. Schließlich fällt noch der Aminobenzylsubstituent am C6 auf, welcher außerhalb des aktiven Zentrums mit Seitenketten der Hinge-Region und der N-terminalen Domäne Wechselwirkungen entfaltet (Phe82, Ile10, Lys89, Peptidcarbonylgruppe von His84). An dieser Stelle unterscheidet sich die Orientierung von OL567 von den für Olomoucine, Roscovitine und Purvalanol B gefundenen.⁵⁶

2,6,9-trisubstituierte Purine mit einem trans-Aminocyclohexylamino-Substituenten in Position 2



28

IC₅₀: 16 nM CDK2/Cyclin E
40 nM CDK4/Cyclin D1



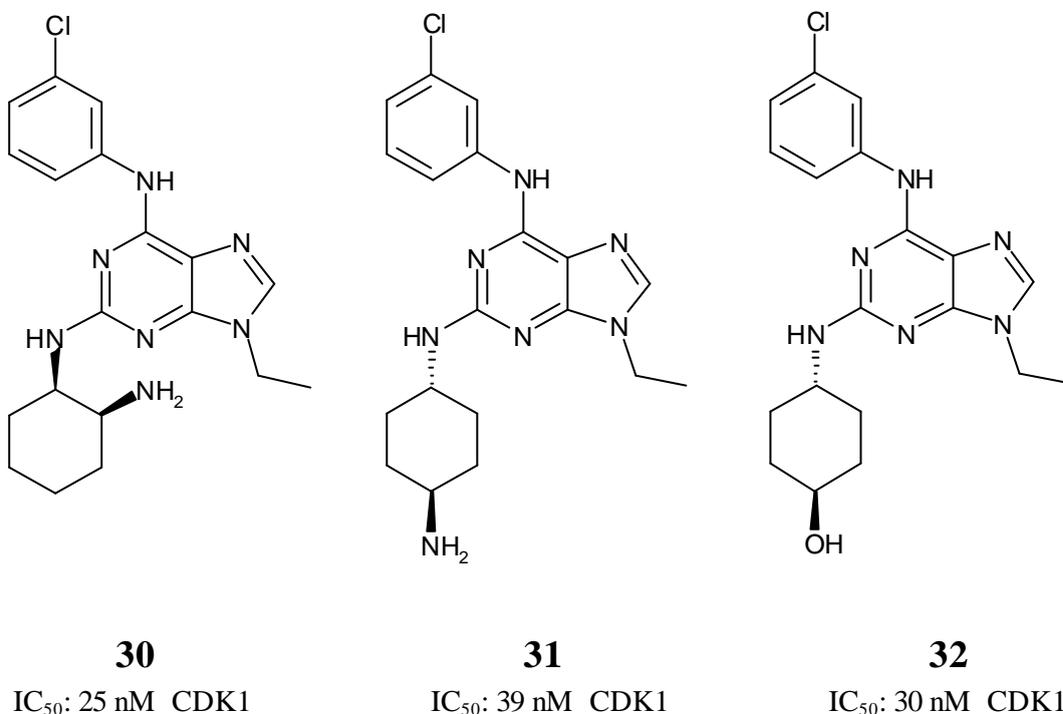
29

IC₅₀: 9-11 nM CDK2/Cyclin E
250 nM CDK4/Cyclin D1

Wissenschaftler der Firma Hoechst Marion Roussel entwickelten eine Gruppe von Purinen mit trans-(4-Amino-cyclohexylamino)-Substitution in Position 2, welche besonders positive Ergebnisse mit einem Cyclopentylrest am N9 zeigten.

An die Aminogruppe am C6 wurden verschiedene aliphatische Reste geknüpft, z.T. mit Hydroxyl- oder Etherfunktionen (**28**). Ein Propyl- (**29**) und ein Furfurylsubstituent (IC_{50} bei CDK2/Cyclin E = 19 nM, Strukturformel nicht abgebildet) waren ebenfalls sehr effektiv. Die IC_{50} -Werte bei CDK2/Cyclin E lagen im unteren nanomolaren Bereich (5-50 nM), während die Aktivität bei CDK4/Cyclin D1 von einigen Verbindungen als 5-100fach schlechter beschrieben wurde.¹⁸

2,6,9-trisubstituierte Purine mit einem substituierten Cyclohexylamino-Substituenten in Position 2



Eine Serie von Purinen mit ähnlicher bzw. identischer C2-Substitution (z.B. **31**) wurde bei Novartis synthetisiert, wobei erneut von Olomoucine (**7**) als Leitstruktur ausgegangen wurde. Es bestätigte sich wieder, dass ein Ethylsubstituent am N9 einer Methylgruppe und einem unsubstituiertem Stickstoffatom überlegen ist. Die Eigenschaften eines Isopropylrestes erschienen hier etwa gleich positiv.

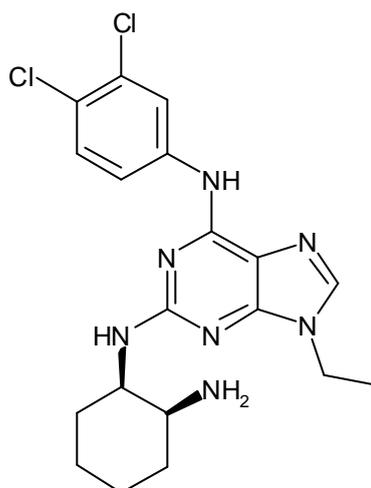
Eine zusätzliche Veränderung der Olomoucine-Grundstruktur wurde am C6 vorgenommen. Anknüpfung eines Anilinosubstituenten führte zur deutlichen Verbesserung der Aktivität bei CDK1, und unter Beibehaltung der bisher entwickelten Strukturelemente wurde die inhibitorische Wirkung durch

Optimierung der Substitution an diesem Anilinorest weiter verbessert. Hierbei wurde das beste Ergebnis durch einen 3-Chlor-anilinorest erzielt.

Austausch des alkoholischen C2-Substituenten von Olomoucine durch eine Aminogruppe, vorzugsweise mit einem Amino-cyclohexylrest verknüpft, führte schließlich zu sehr aktiven Verbindungen mit IC_{50} -Werten bei CDK1 von 25 bis 40 nM (z.B. Verbindungen **30** und **31**). Ein (trans)-4-Hydroxy-cyclohexylaminorest am C2 (**32**) war mit einer IC_{50} von 30 nM ähnlich aktiv. Mit diesem Strukturelement waren mehr Variationen am C6-Anilining möglich als bei anderen C2-Substituenten, ohne dass die Potenz dieser Verbindungen deutlich geringer wurde (Derivate mit IC_{50} von 28 - 40 nM bei CDK1).

Die drei Verbindungen **30**, **31** und **32** erwiesen sich als sehr vielversprechend bei Testung an Blasenkarzinomzellen (T₂₄-Zellen) mit einer $IC_{50} < 1 \mu M$.

Selektivitätstests ergaben schließlich noch eine Bevorzugung von CDK1 gegenüber anderen Kinasen (PKC- α , PKA) um den Faktor 135 bis 200 für **30** und **31**.⁶⁵



CGP 74514 (**33**)

IC_{50} : 16 nM CDK1

9 nM CDK2

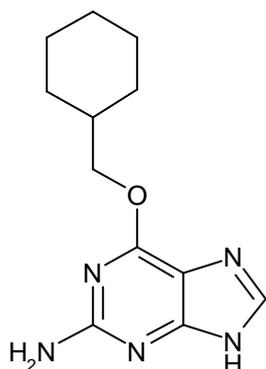
6 100 nM PKC

9 300 nM EGFR-Kinase

125 000 nM PKA

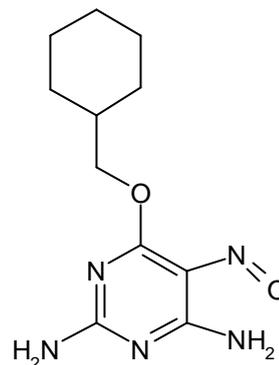
Eine Weiterentwicklung, CGP 74514 (**33**), befindet sich bereits in präklinischer Untersuchung. Die bisher bekannten IC_{50} -Werte weisen es als potenten Inhibitor bei CDK1 (16 nM) und CDK2 (9 nM) aus, während z.B. PKC, EGFR-Kinase und PKA weit weniger gehemmt werden.¹²

6-Alkylguanine und Derivate



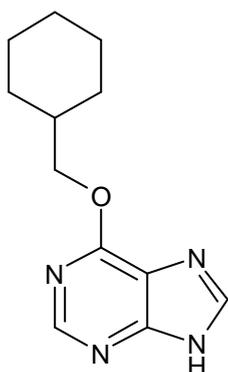
NU2058 (**34**)

K_i : $5 \pm 1 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $12 \pm 3 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A3



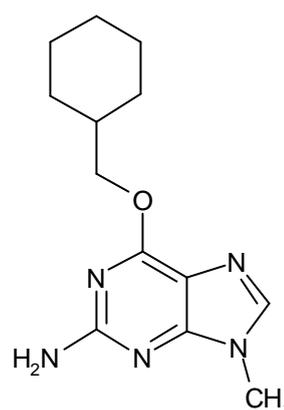
NU6027 (**35**)

K_i : $2.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A3



NU2017 (**36**)

IC_{50} : $18 \pm 7 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $13 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A3



NU6052 (**37**)

IC_{50} : $> 100 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $> 100 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A3

Die bei Newcastle Ventures/Astra Zeneca entwickelten Guaninderivate bilden einen Übergang von CDK-Inhibitoren mit Puringrundgerüst zu anderen heterozyklischen Wirkstoffen.^{35,66}

Die Leitstruktur für CDK-Inhibitoren mit Guaninstruktur NU2058 (**34**) ist sowohl bei CDK1 als auch bei CDK2 aktiv. Der Abbau des Ringsystems führt zu NU6027 (**35**) und niedrigeren K_i -Werten bei CDK1 und CDK2. Sofern die IC_{50} -Werte angegeben sind, beziehen sie sich auf Testsysteme mit $12,5 \mu\text{M}$ ATP bei beiden CDK. Im Zelllinienscreening des NCI wurden die Ergebnisse der Tests an isolierten Enzymen bestätigt. Untersuchungen an MCF7-Zellen ergaben

für Behandlung mit NU2058 oder NU6027 eine verminderte Anzahl von Zellen in der S-Phase, nicht aber in der G1-Phase oder am G2/M-Übergang.³⁵

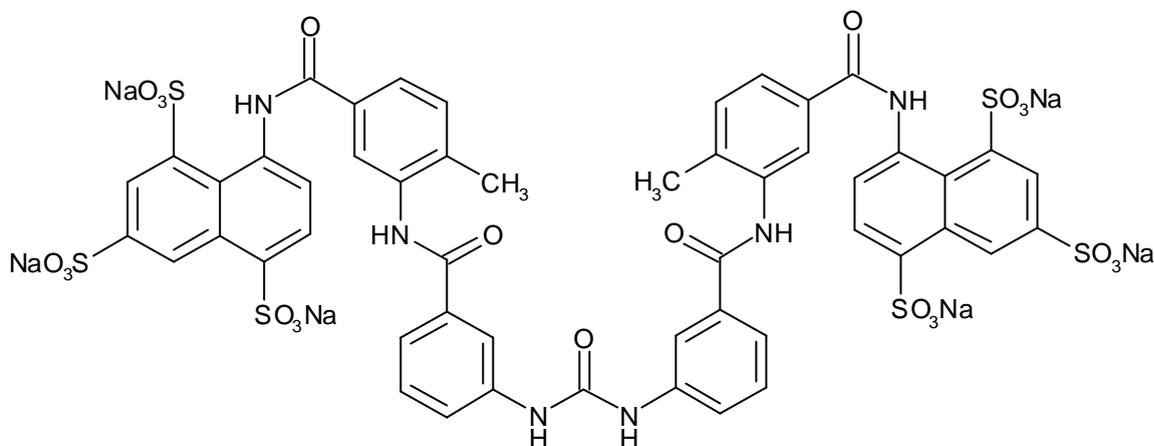
Anhand der Kristallstruktur von NU2058 im Komplex mit CDK2 konnten folgende Wechselwirkungen festgestellt werden: N9 von NU2058 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidcarbonylsauerstoffatom von Glu81 aus. Zwei weitere findet man zwischen der NH-Gruppe von Leu83 und N3 sowie zwischen der Leu83-Carbonylfunktion und dem C2-NH₂ von NU2058. Die Guaninderivate binden in einer anderen Orientierung als Olomoucine (**7**), Roscovitine (**8**) oder Purvalanol B (**14**). Die Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoffatom von Glu81 und NH von Leu83 findet man auch bei ATP (**4**) und Isopentenyladenin (**6**), die Leu83-Carbonyl-Interaktion ist auch bei anderen Inhibitoren wie z.B. Indirubin-3'-monoxim (**100**) oder Indirubin-5-sulfonsäure (**101**) zu sehen. Insgesamt findet man bei den Guaninderivaten eine von ATP verschiedene Orientierung des Heterozyklus, die durch unterschiedliche Substitution noch weiter verschoben werden kann.

Der Einfluss der C2-NH₂-Gruppe und des unsubstituierten N9 von NU2058 wird deutlich bei dem Vergleich mit NU2017 (**36**) ohne C2-Substitution und NU6052 (**37**), bei dem das Stickstoffatom in 9-Position methyliert ist. Durch diese Veränderungen kann man eine Abnahme der Aktivität bei CDK feststellen. NU2017 wirkt noch mit IC₅₀-Werten von 18 und 13 µM bei CDK1 und CDK2, während NU6052 IC₅₀-Werte von über 100 µM bei beiden CDK aufweist.

Die Darstellung des Pyrimidinderivates NU6027 wurde durchgeführt, um die drei für NU2058 entdeckten Wasserstoffbrückenbindungen zu imitieren, und zwar ohne Vorhandensein eines Puringrundgerüsts. Diese Versuche waren insofern erfolgreich, als dass ein potenter CDK1- und CDK2-Inhibitor entstand, der eine zu NU2058 analoge Art der Wasserstoffbrückenbindung zu CDK2 zeigte: die C6-NH₂-Gruppe bindet zum Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81, die Leu83-NH-Gruppe zum N1, während die Carbonylfunktion von Leu83 mit der C2-NH₂-Gruppe interagiert. Die Nitrosogruppe am C5 bildete erwartungsgemäß eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zur C6-NH₂-Gruppe aus, welche die Geometrie von NU2058 imitieren sollte. Eine Entfernung dieser Nitrosogruppe führte zu Wirkungsverlust bei CDK1 und CDK2.³⁵ 1999 wurde ein Patent veröffentlicht, welches die Grundstruktur des in dieser Serie synthetisierten CDK-Inhibitors NU6027 enthält.⁶⁶

3.2.2 CDK-Inhibitoren ohne Puringrundgerüst

Suramin

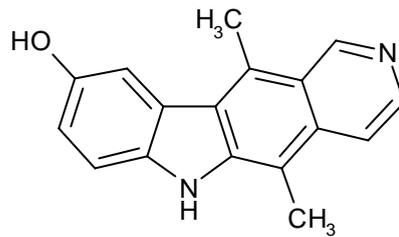


Suramin (**38**)

IC₅₀: 4 µM CDK1

Das hexasulfonierte Harnstoffderivat Suramin (**38**) wurde bereits 1916 bei den Farbenfabriken Bayer AG synthetisiert und ist seit fast 70 Jahren zur Behandlung der Schlafkrankheit und anderer parasitärer Krankheiten im Einsatz. Bei CDK1 wurde eine IC₅₀ von 4 µM gefunden. Da Suramin zu den nicht selektiven Wirkstoffen gehört, kann man eine inhibitorische Aktivität bei verschiedenen Enzymen wie beispielsweise der Reversen Transkriptase beobachten. Aus diesem Grund kann die CDK-inhibitorische Aktivität nicht mit Sicherheit als entscheidende Ursache für die Wirkung an Tumorzellen bezeichnet werden. Suramin hemmt die Zellteilung an verschiedenen Stellen des Zellzyklus, abhängig vom Zelltyp.^{1,3,43}

9-Hydroxyellipticin

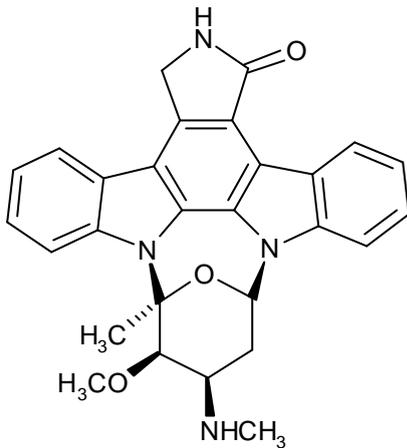


9-Hydroxyellipticin (**39**)

IC₅₀: 1 μM CDK1

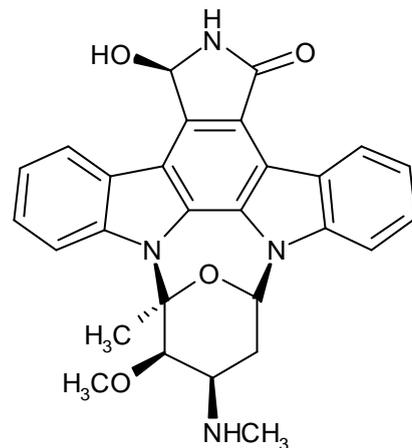
Bei 9-Hydroxyellipticin (**39**) handelt es sich um ein Derivat des Alkaloids Ellipticin (aus *Ochrosia elliptica* und *Ochrosia acuminata*). Im Enzymtest wird CDK1 mit einer IC₅₀ von 1 μM gehemmt. Die Hemmung der Phosphorylierung von p53 wurde sowohl in Zelllysaten sowie in ganzen Zellen beobachtet. 9-Hydroxyellipticin besitzt eine deutliche Antitumoraktivität in vitro und in vivo, allerdings ist es hier wiederum schwierig, die entscheidenden in vivo Wirkmechanismen zu definieren, da auch eine Wirkung durch DNS-Interkalation und auf die Funktion von Topoisomerase II gefunden wurde.^{1,43}

Staurosporin und das Staurosporin-Derivat UCN-01



Staurosporin (40)

IC₅₀: 3-9 nM CDK1/Cyclin B
7 nM CDK2/Cyclin A
3 000-10 000 nM CDK4/Cyclin D
20 nM MAP-Kinase
8 nM PKA
5 nM PKC
9 nM PKG
6 nM Src-Kinase
15 nM GSK-3β



UCN-01 (41)

IC₅₀: 31 nM CDK1
30 nM CDK2
32 nM CDK4
910 nM MAP-Kinase
7 nM PKC
70 nM GSK-3β

Ein Naturstoff aus *Streptomyces* sp. (*Streptomyces staurosporeus*) gehört ebenfalls in die Reihe der CDK-Inhibitoren. Staurosporin (**40**) wirkt zwar sehr effektiv mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich bei CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin A, allerdings wird auch eine ganze Reihe anderer Kinasen gehemmt. Bei CDK1/Cyclin B wirkt Staurosporin mit einer IC₅₀ von 3 bis 9 nM, bei CDK2/Cyclin A mit 7 nM, allerdings auch bei PKA, Proteinkinase G (PKG), PKC und Src-Kinase^{*67} mit IC₅₀-Werten zwischen 5 und 9 nM,^{12,17,43} bei GSK-3β mit 15 nM¹¹ und bei MAP-Kinase mit 20 nM. Bei CDK4/Cyclin D wurde nur eine IC₅₀ von 3-10 μM gefunden.^{12,17,43} Staurosporin bewirkt in niedrigen Konzentrationen (2-22 nM) eine Zellzyklusblockade in der G1-Phase in normalen Zellen, während die Zellteilung mutierter Zellen nicht gehemmt wird und die S-Phase durchlaufen werden kann. In höheren Konzentrationen

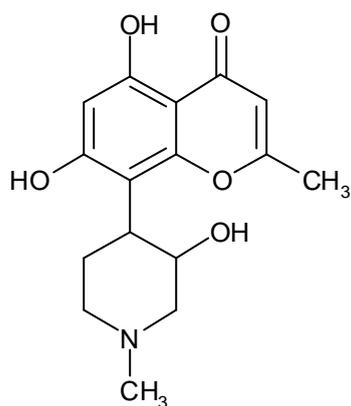
* Src: „sarcoma it caused in chicken“ Das Rous-Sarkom-Virus verursacht bei Hühnern einen Bindegewebstumour, indem es ein Onkogen überträgt (v-Src), welches für die virale Src-Kinase kodiert. Normale Zellen besitzen das zelluläre c-Src-Gen, welches für die cSrc-Kinase kodiert.⁶⁷

(100-200 nM) wird sowohl bei normalen als auch bei transformierten Zellen der Zellzyklus in der G2-Phase blockiert.³

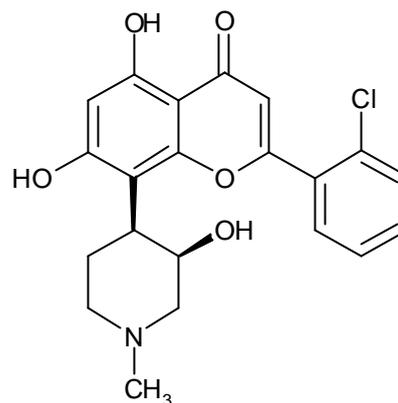
Durch Röntgenstrukturanalyse konnte die Lage des Inhibitors in der CDK bestimmt werden. Das Indolocarbazol-Ringsystem liegt demnach in der hydrophoben Spalte, die auch von den heterozyklischen Systemen der anderen Inhibitoren eingenommen wird. Neben den überwiegend hydrophoben Wechselwirkungen existieren zusätzlich vier wichtige Wasserstoffbrückenbindungen, und zwar zwischen dem Lactam-NH und dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81 sowie zwischen dem Lactam-Carbonylsauerstoffatom und der NH-Gruppe von Leu83. Die protoniert vorliegende Methylaminofunktion bildet zwei Wasserstoffbrücken aus, eine zum Carboxylat von Asp86 und eine weitere zum Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Gln131.¹⁷

Ein in den gleichen Mikroorganismen wie Staurosporin natürlich vorkommendes Staurosporinderivat ist das 7-Hydroxystaurosporin UCN-01 (**41**). UCN-01 ist etwas weniger aktiv als Staurosporin, zeigt jedoch eine etwas höhere Selektivität für CDK und PKC verglichen mit anderen Kinasen. Die Substanz ist im Enzymtest gleichermaßen aktiv bei CDK1, 2 und 4 mit IC_{50} -Werten um 30 nM. PKC wird mit einer IC_{50} von 7 nM am stärksten gehemmt,^{12,43} während UCN-01 bei GSK-3 β mit einer IC_{50} von 70 nM wirkt.¹¹ In bestimmten Zelllinien (A549) kann man eine dosisabhängige Abnahme von phosphoryliertem pRb beobachten, in malignen Glioma-, Magen- und Brustkrebszellen wird Apoptose induziert und in Zellzyklusanalysen wurde eine Hemmung des G1/S-Übergangs gefunden.¹² Insgesamt besitzt UCN-01 Antitumoreigenschaften bei einer Reihe von Nagetier- und humanen Tumoren in vitro und in vivo. Aufgrund des interessanten Grundgerüsts wurden verschiedene synthetische Abwandlungen durchgeführt, aber wegen der immer noch relativ geringen Selektivität ist es bei den daraus erwachsenen Derivaten wie auch bei Staurosporin und UCN-01 sehr schwierig, die Ziele auszumachen, die in vivo getroffen werden.^{1,12} Zur Zeit befindet sich UCN-01 in Phase II der klinischen Prüfung als Antitumor-Wirkstoff.¹¹

Flavopiridol und Derivate



Rohitukin (**42**)



Flavopiridol (**1**)

| | | |
|-------------|------------|---------------|
| K_i : | 41 nM | CDK1 |
| | 65 nM | CDK4 |
| IC_{50} : | 100-400 nM | CDK2 |
| | 300 nM | CDK7 |
| | 21 000 nM | EGFR-Kinase |
| | 122 000 nM | PKA |
| | 6 000 nM | PKC |
| | 450 nM | GSK-3 β |

Flavopiridol (**1**) ist ein synthetisch gewonnenes Flavon, dargestellt bei Hoechst Marion Roussel als Derivat eines natürlich vorkommenden Alkaloids, welches aus der Stammrinde einer indischen Pflanze (*Dysoxylum binectariferum*) gewonnen wurde. Dieses Alkaloid kommt in der indischen Volksmedizin zur Anwendung und ist identisch mit Rohitukin (**42**) aus *Amoora rohituka*. Eine Reihe von synthetischen Abwandlungen von Rohitukin wurde auf die Aktivität bei EGFR-Kinase, bei PKA und die zytotoxische Wirkung auf humane und Mäuse-Krebszelllinien getestet, wobei Flavopiridol durch eine zytotoxische Potenz auffiel, die nicht mit der mäßigen Wirkung bei EGFR-Kinase ($IC_{50} = 21 \mu\text{M}$) und PKA ($IC_{50} = 122 \mu\text{M}$) zu vereinbaren war. Das NCI (National Cancer Institute, Bethesda USA) stellte eine deutliche Aktivität bei CDK fest, wobei keine nennenswerte Selektivität zwischen CDK1, CDK2, CDK4 und CDK7 zu finden war.³

Flavopiridol hemmt CDK durch ATP-Kompetition, wie durch Assays mit variierenden Substrat- oder ATP-Konzentrationen festgestellt werden konnte. Für die Enzymtests wurde immunpräzipitierte CDK1 oder gereinigte Seestern-CDK1/Cyclin B verwendet. Die Herkunft der CDK1 hatte auf die IC_{50} keinen

großen Einfluss.³ Die K_i für Seestern-CDK1 beträgt 41 nM und für rekombinante CDK4 65 nM.⁴

Bei Verwendung von Immunkomplex-Kinase-Assays wurde bei CDK7 eine IC_{50} von 300 nM gefunden, während die Werte bei CDK2 mit 100-400 nM angegeben werden.^{1,3} Die Ergebnisse in der Literatur stimmen nicht immer überein. Dies hängt mit den jeweils verwendeten CDK-Assays zusammen, die zum einen mit unterschiedlich gewonnenen Kinasen arbeiten, zum anderen mit verschiedenen ATP-Konzentrationen, wobei letzteres wegen des ATP-kompetitiven Wirkmechanismus von Flavopiridol der ausschlaggebende Faktor sein dürfte. Für die Testung mit CDK2 in einem Immunkomplex-Kinase-Assay wird ein IC_{50} -Wert von 100 nM bei einer ATP-Konzentration von 400 μ M angegeben.⁶⁸ Außerdem wurde eine IC_{50} von 6 μ M bei PKC³ und eine von 450 nM bei GSK-3 β ¹¹ beschrieben.

Flavopiridol verursacht weder DNS-Strangbrüche noch interkaliert es in den DNS-Doppelstrang.³ In relativ hohen Konzentrationen von 10-50 μ M, die über den pharmakologischen Konzentrationen liegen, wurde allerdings eine Bindung an Doppelstrang-DNS beobachtet.² Es existieren Theorien, welche Flavopiridol Wirkungen auf die DNS in vivo unterstellen. Diesen Überlegungen liegt unter anderem zugrunde, dass bei Durchführung einer NCI-COMPARE-Analyse (siehe Kapitel 10.3.3) eine Korrelation von Flavopiridol-Daten mit den Werten von DNS-interagierenden Substanzen wie Actinomycin D gefunden wurde.^{2,18} Ein direkter Effekt auf den Nukleosidtransport wurde nicht angenommen, da in bestimmten Zellen (MDA468) nach zweistündiger Exposition kein Effekt auf die Thymidin-Inkorporierung in die DNS festzustellen war.³

Bei Zellzyklusanalysen wurde ein Stopp in der G1-Phase oder am G2/M-Übergang sowie eine deutliche Verlängerung der S-Phase beobachtet.^{2,3} Nach Flavopiridol-Einwirkung kommt es bei verschiedenen Zelllinien zu einer Herabregulierung der Cyclin D1-Transkription, Abnahme der CDK4 und/oder CDK2-Aktivität und einer gehemmten pRb-Phosphorylierung in den Zellen.^{2,26,68}

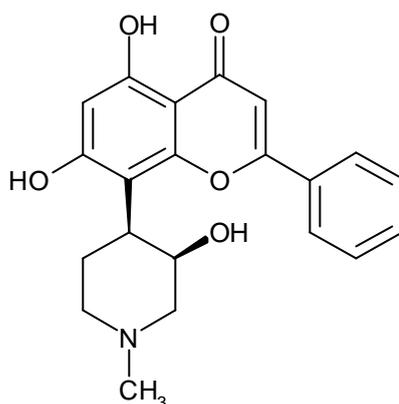
Nachdem in früheren Publikationen zu finden war, dass Flavopiridol die Proliferation aktiv wachsender Zellen abnehmen lässt, aber an ruhenden Zellen nicht zytotoxisch zu wirken scheint,³ lassen neuere Untersuchungen den Schluss zu, dass Flavopiridol eher zytotoxisch als zytostatisch wirkt, in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Apoptose induziert und sogar nicht proliferierende Zellen hemmen kann.^{2,26,68} Unklar ist, ob diese Wirkungen nur über eine CDK-Hemmung vermittelt werden. Beispielsweise wurde unabhängig vom Zellzyklus

Apoptose beobachtet, welches auf in vivo Wirkungen neben der beschriebenen CDK-inhibitorischen Wirkung hindeutet.²

In vitro und in vivo Experimente machen deutlich, dass Flavopiridol einen größeren Effekt auf Tumorzellen hat als auf normale Zellen. Bei Untersuchungen mit einem menschlichen Tumorexograft an Mäusen erbrachte Flavopiridol ebenso gute Ergebnisse wie Standardzytostatika. Verglichen mit diesen hat Flavopiridol eine moderat höhere Aktivität gegen bestimmte Melanome und eine deutlich stärkere Wirkung auf Prostatakarzinome. Diese Ergebnisse wurden in präklinischen in vivo Untersuchungen bestätigt.³

Zur Zeit befindet sich Flavopiridol in der 2. Phase der klinischen Prüfung für eine Monotherapie und in der 1. Phase der klinischen Prüfung für eine Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Cisplatin. Nach Infusionen über 72 Stunden war es möglich, in der Phase II (Monotherapie) Plasmaspiegel zu erreichen, welche die für eine CDK-Inhibition in zellfreien Assays benötigte Konzentration übersteigen. Die häufigsten toxischen Wirkungen sind Diarrhöe, Hypotension und Neutropenie. Aus den ersten Phase-II-Versuchen lässt sich schließen, dass Flavopiridol in Monotherapie eine begrenzte Antitumorwirkung hat, während die Kombinationstherapie vor allem mit Paclitaxel als sehr vielversprechend angesehen wird. Allerdings gibt es auch bereits Berichte über Flavopiridol-resistente Tumore.²

Ein völlig neues Einsatzgebiet für Flavopiridol ergibt sich aus einer kürzlich publizierten Untersuchung, die besagt, dass Flavopiridol in einem Tiermodell nach künstlich ausgelöstem Schlaganfall das verzögerte Absterben von neuronalen Zellen im Bereich des geschädigten Gewebes verhindern kann. Flavopiridol wurde den Tieren vor und während des ischämischen Verschlusses intracerebroventrikulär verabreicht und hatte vorerst keine Wirkung auf die physiologischen Parameter vor oder während des Verschlusses. Flavopiridol verursachte im Anschluss an den Schlaganfall allerdings eine drastische Verminderung des Absterbens neuronaler Zellen (43 % mit Placebo, 7% mit Flavopiridol). Hieraus lässt sich schließen, dass auf diesem Gebiet eine weitere Anwendungsmöglichkeit für CDK-Inhibitoren existieren könnte.⁴⁷



Deschloroflavopiridol (**43**)

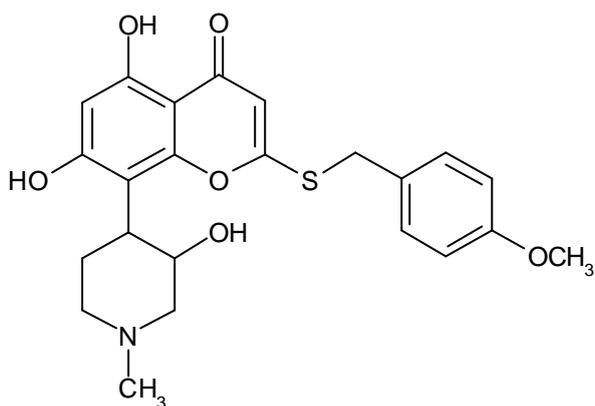
IC₅₀: 2.08 μM CDK2

Ein Flavopiridolabkömmling ohne Chlorsubstitution am Phenylrest ist das Deschloroflavopiridol (**43**), welches verglichen mit Flavopiridol (**1**) eine fast um den Faktor 10 verminderte Aktivität bei CDK2 aufweist.

Die Bindung der Flavopiridolderivate in der ATP-Bindungstasche wurde durch Kristallisation von Deschloroflavopiridol und Flavopiridol jeweils im Komplex mit CDK2 und Röntgenstrukturanalyse der Kristalle untersucht. Die Ausrichtung und Wechselwirkung dieser Inhibitorklasse soll anhand von Deschloroflavopiridol erläutert werden, welches auf gleiche Art und Weise an die CDK2 bindet wie Flavopiridol.²⁸ Beim Vergleich der monomeren CDK2 ohne ATP mit dem CDK2/ATP-Komplex und dem CDK2/Deschloroflavopiridol-Komplex wurden in der Struktur des Enzyms bzw. der Orientierung der Domänen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In der ATP-Tasche nimmt der Benzopyranring von Deschloroflavopiridol ungefähr die Region ein, die sonst vom Puringrundgerüst des ATP belegt wird. Dabei liegt der Heterozyklus des Inhibitors etwa in der gleichen Ebene, aber um ca. 60° gedreht bezogen auf die Bindung, die die beiden Ringe des jeweiligen Bicyklus verbindet. Die Interaktionen zwischen Deschloroflavopiridol und CDK2 sind vorwiegend hydrophober Natur, wobei hier mehr Kontakte zu finden sind als zwischen ATP und CDK2. 43 % der Wechselwirkungen werden durch Ile10, Leu83 und Leu134 unterstützt. Zwei CDK2-Reste, His84 und Lys89 sind für (deschloro)flavopiridolspezifische Kontakte zum Phenylsubstituenten verantwortlich, wobei Lys89 durch den Inhibitor von der ATP-Bindungstasche weg bewegt wird. Die höhere Aktivität von Flavopiridol verglichen mit seinem Deschloroderivat könnte durch die stärkeren Wechselwirkungen des Chlorsubstituenten zu Leu10, Phe82 und Leu83 begründet sein.³ Zwischen

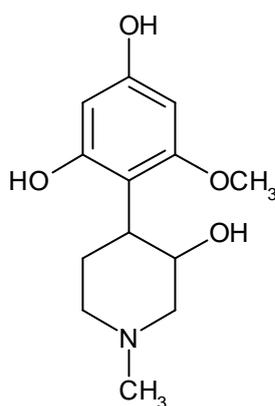
Aminosäuren der CDK2 und Deschloroflavopiridol bestehen zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Benzopyranring und drei zum Hydroxypiperidin-Substituenten. Zusätzlich kann noch je ein Wassermolekül eine Brücke zu den beiden Heterozyklen bilden. Das Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81 interagiert mit der Hydroxylgruppe am C5 des Benzopyran, eine Wechselwirkung, die ATP (4) durch seine Aminogruppe am C6 unterstützt, während die Inhibitoren aus der Purinreihe (z.B. Olomoucine (7), Roscovitin (8), Purvalanol B (14)) dies durch ihr C8 tun. Die zweite Wasserstoffbrücke zum Benzopyran besteht zwischen dem Leu83-NH und dem Carbonylsauerstoffatom in Position 6 des Inhibitors. Dieser Position entsprechen das N1 in ATP und das N7 der Inhibitoren mit Puringrundgerüst. Der N-Methylpiperidinring befindet sich im Enzym in einer Region, die von den Purinen nicht erreicht wird und einem Teil der α -Phosphatase des ATP entspricht. Die Carboxylgruppe von Asp145 entwickelt dabei ionische Wechselwirkungen zum protonierten Piperidinstickstoffatom und eine Wasserstoffbrückenbindung zum Hydroxylsubstituenten, welcher eine weitere zum Lys33 ausbildet.^{3,17}

Diese Untersuchungen erklären, warum bestimmte Strukturabwandlungen von Flavopiridol zu Aktivitätseinbußen führten. Ersetzt man den Chlorsubstituenten durch eine Fluor-, Brom-, Hydroxyl- oder Methylsubstitution, so gelangt man zu schwächeren Inhibitoren, welche im Falle eines Brom- oder Fluorsubstituenten eine halbierte inhibitorische Aktivität bei CDK4 und CDK7 verglichen mit der bei CDK2 aufweisen. Tauscht man den Phenyl- gegen einen 2-, 3- oder 4-Pyridylrest, so nimmt die Aktivität insgesamt ab, wobei ein 4-Pyridylrest die inhibitorische Wirkung bei CDK4 und CDK7 im Vergleich zu der bei CDK2 wesentlich drastischer senkt. Sobald man den N-Methylpiperidinyrning in Deschloroflavopiridol durch einen Pyridylring ersetzt, gelangt man zu einer bevorzugten Wirkung auf CDK4. Zusätzliche Chlorsubstituenten am Phenylring vermindern die Aktivität bei CDK2 (2,4-Chlor: IC_{50} bei CDK2 = 0.55 μ M; 2,5-Chlor: IC_{50} bei CDK2 = 4.87 μ M). Ein Ersetzen des Phenylrestes durch eine Ethyl- (IC_{50} bei CDK2 = 9.75 μ M) oder Propylgruppe (IC_{50} bei CDK2 = 4.5 μ M) hat einen entsprechenden Effekt. Ähnliche Werte erreicht man auch durch Austausch der 5- und 7-Hydroxylgruppierungen durch Methoxysubstituenten (IC_{50} bei CDK2 = 7 μ M).³



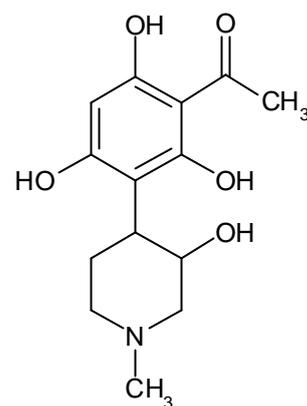
44

IC₅₀: < 10 μM CDK1
< 10 μM CDK2
< 100 μM CDK4



45

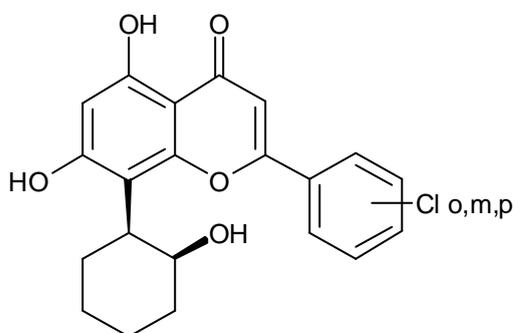
IC₅₀: < 10 μM CDK1
< 10 μM CDK2
< 100 μM CDK4



46

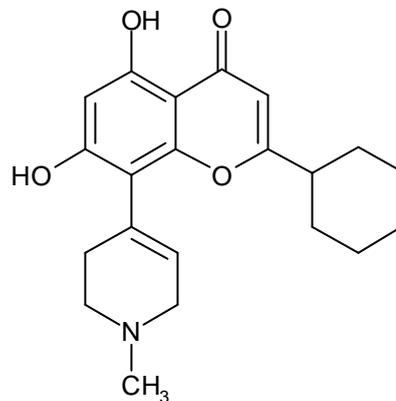
IC₅₀: < 10 μM CDK1
< 10 μM CDK2
< 100 μM CDK4

Insgesamt führten alle Strukturabwandlungen an Flavopiridol bisher zu weniger aktiven Verbindungen. So patentierte Bristol-Myers Squibb Thioflavone (z.B. **44**) und Substanzen, die Zwischenprodukte der Flavopiridolsynthese darstellen (z.B. **45** und **46**). Die IC₅₀ Werte für solche Derivate werden mit < 10 μM für CDK1 und CDK2 sowie < 100 μM für CDK4 angegeben.¹⁸



47

IC₅₀: < 50 μM CDK4

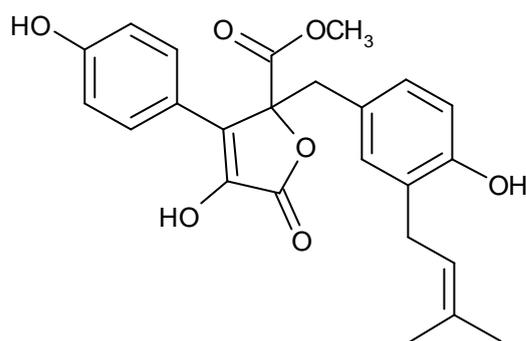


48

IC₅₀: < 50 μM CDK4

Andere Abwandlungen führte eine Arbeitsgruppe der Firma Mitotix vor allem am Phenyl- und am Piperidinyling durch (z.B. **47** und **48**). Beide Verbindungen weisen eine Aktivität an CDK4 mit IC₅₀-Werten unter 50 μM auf.¹⁸

Butyrolacton I



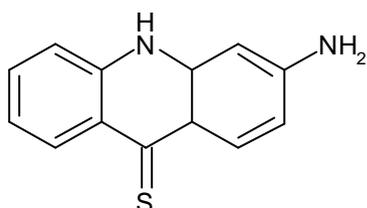
Butyrolacton I (49)

| | | |
|--------------------|----------|---------------|
| IC ₅₀ : | 0.68 μM | CDK1/Cyclin B |
| | 1.5 μM | CDK2/Cyclin A |
| | 1 000 μM | CDK4/Cyclin D |
| | 1.5 μM | CDK5/p35 |
| | 94 μM | MAP-Kinase |
| | 260 μM | PKA |
| | 160 μM | PKC |
| | 100 μM | GSK-3β |

Butyrolacton I (49) stellt einen weiteren Naturstoff dar, der zuerst in *Aspergillus terreus* var. *africanus* gefunden und anschließend aus *Aspergillus* F-25799 isoliert wurde. Butyrolacton I ist selektiv inhibitorisch aktiv bei CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK5/p35, während es keine vergleichbare Aktivität an anderen Kinasen wie CDK4, MAP-Kinase, PKA, PKC^{26,43,52} oder GSK-3β¹¹ aufweist. Es wurde festgestellt, dass pRb- und Histon H1-Phosphorylierung gehemmt werden können. Außerdem wird über einen antineoplastischen Effekt an verschiedenen Krebszelllinien mit IC₅₀-Werten um 50 μM berichtet. In Zellzyklusuntersuchungen wurde ein dosisabhängiger Stopp in der späten G1-Phase oder am G2/M-Übergang beobachtet, welcher zur beschriebenen CDK1- und CDK2-Hemmung passt.^{1,3,26,43,52}

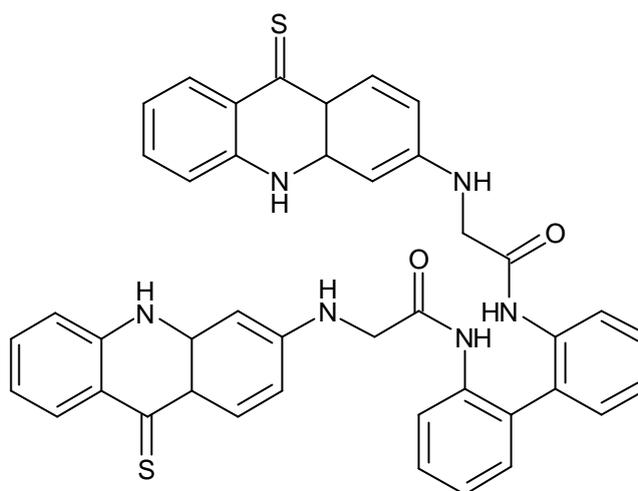
Bei der Behandlung von Colonkarzinom-Zelllinien mit Butyrolacton I wurde die Proliferation der Zellen gehemmt. In einer von vier Zelllinien wurde daneben eine Erhöhung von p53 und Apoptose durch den Inhibitor festgestellt.⁴²

Acridon-Derivate



50

IC₅₀: > 60 μM CDK1/Cyclin A
> 80 μM CDK2/Cyclin E
> 100 μM CDK2/Cyclin A
6.8 μM CDK4/Cyclin D



51

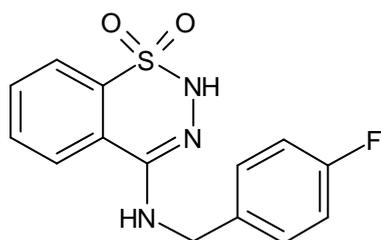
IC₅₀: 70 μM CDK1/Cyclin A
> 100 μM CDK2/Cyclin E
> 100 μM CDK2/Cyclin A
1.1 μM CDK4/Cyclin D

Ein Patent über zwei Gruppen von CDK-Inhibitoren, deren Aktivität bei CDK4 größer ist als die bei CDK1 und CDK2, wurde vom US Department of Health and Human Services angemeldet. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Acridin-9-thionderivate wie **50** und **51**. Beide Verbindungen wirken bei CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin A oder E mit IC₅₀-Werten zwischen 60 und 100 μM, während CDK4/Cyclin D mit IC₅₀-Werten von 1 bis 7 μM wesentlich stärker gehemmt wird.* Das Ziel der Untersuchung war, CDK4-selektive Wirkstoffe zu finden, die eine spezifische Wirkung auf Zelllinien mit p16-Veränderungen wie Deletion, Mutationen im Gen oder verminderter Transkription aufweisen. Dazu wurden die 60 Zelllinien des in vitro Tumorzelllinien-Screenings des National Cancer Institute (siehe Kapitel 10.3.3) auf solche Mutationen untersucht, die bei einer Vielzahl der Zelllinien zu finden waren. Bei der Messung der CDK4-Inhibition von **50** wurden ATP-Konzentrationen von 0 bis 600 μM zugesetzt. Überraschenderweise veränderte eine steigende ATP-Konzentration die Aktivität von **50** nicht, so dass hier keine ATP-Kompetition vorliegen konnte. Bei Untersuchungen der Wirkung von **50** auf die Bindung von normalem p16 an CDK4 wurde eine deutliche Reduzierung

* Die biologischen Daten waren durch die Angaben in der Literatur nicht zweifelsfrei zuzuordnen.

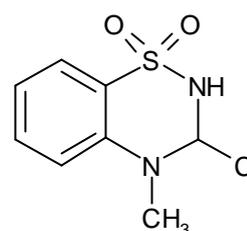
der gebildeten Komplexe (70 %) durch **50** (100 μ M) gefunden, welches die Autoren veranlasst, für **50** einen Wirkmechanismus analog zu p16 zu vermuten. Dies ist bisher die einzige Verbindungsklasse von kleinen synthetischen CDK-Inhibitoren, für die ein nicht ATP-kompetitiver Wirkmechanismus angenommen wird.^{18,69}

Thiadiazine



52

IC₅₀: > 100 μ M CDK1/Cyclin A
> 100 μ M CDK2/Cyclin E
> 100 μ M CDK2/Cyclin A
5.0 μ M CDK4/Cyclin D



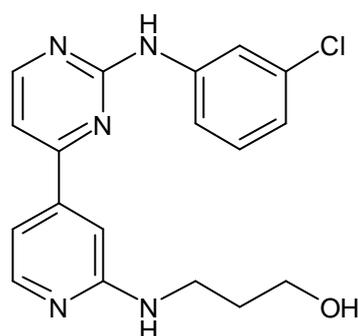
53

IC₅₀: > 100 μ M CDK1/Cyclin A
> 100 μ M CDK2/Cyclin E
> 100 μ M CDK2/Cyclin A
1.4 μ M CDK4/Cyclin D

Bei der Durchführung einer COMPARE-Analyse wurde **50** als Referenz verwendet und die GI₅₀-Muster des in vitro Tumorzelllinien-Screenings des NCI mit bereits vorliegenden Daten vom US Department of Health and Human Services verglichen. Dabei wurde eine zweite Gruppe von CDK-Inhibitoren gefunden, welche Übereinstimmungen mit **50** aufwiesen (Korrelationskoeffizienten > 0.6). Es handelt sich um Benzothiadiazine, in deren Grundkörper die Heteroatome unterschiedliche Positionen einnehmen können, Benzo[e][1,2,3]thiadiazin-1,1-dioxide, z.B. **52**, oder Benzo[e][1,2,4]thiadiazin-1,1-dioxide, z.B. **53**. Diese wirken wie die Acridonderivate stärker bei CDK4 als bei CDK1 und CDK2.* Allerdings wird ihnen ein etwas anderer Wirkmechanismus als Verbindung **50** zugeschrieben, da sie die Bindung zwischen p16 und CDK4 nicht lösen oder verhindern können.^{18,69}

* Die biologischen Daten waren durch die Angaben in der Literatur nicht zweifelsfrei zuzuordnen.

Phenylpyrimidin CGP 60474



CGP 60474 (**54**)

IC₅₀: 17 nM CDK1

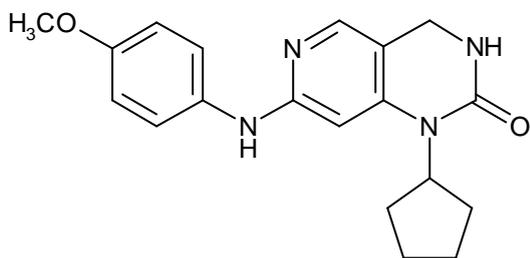
50 nM CDK2

600 nM erk1

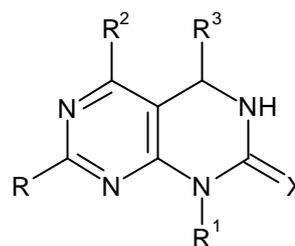
Neben Purinderivaten (**30**, **31** und **32**) entwickelten Wissenschaftler der Firma Novartis auch den CDK-Inhibitor CGP 60474 (**54**) mit neuer Grundstruktur.^{12,26} Ein Pyrimidin ist zwar auch bei Newcastle/Astra Zeneca als CDK-Hemmer identifiziert worden, aber bei diesem (NU6027 (**35**)) handelt es sich im Prinzip um ein ringgeöffnetes Guanosinderivat, bei welchem eine Nitrosogruppe als entscheidendes Strukturelement für die Aktivität angesehen wurde.³⁵ Das Phenylpyrimidin CGP 60474, welches keine Nitrosfunktion für die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke besitzt, erwies sich als aktiv bei CDK1 und CDK2, während es gegenüber Kinasen wie erk1,²⁶ PKC α , und CDK4 schwächer wirkte. Bei letzteren wurden IC₅₀-Werte im submikromolaren bis mikromolaren Bereich gefunden. Weitere Kinasen wurden nicht beeinflusst (z.B. p38,^{*70,71} andere PKC-Subtypen). Bei Untersuchungen an Zellen (U2-OS) wurde eine dosisabhängige, reversible G1/S-Blockade festgestellt, während andere Zellen (U2-OSTag) einen Stopp in der G2-Phase aufwiesen. Laut biochemischer Analyse störte die Anwesenheit von CGP 60474 die Komplexbildung von CDK und Cyclin, so dass keine funktionierenden CDK/Cyclin-Komplexe gebildet wurden. Dieses Phänomen könnte durch eine Wechselwirkung von CGP 60474 mit bisher nicht identifizierten Zielen zusammenhängen, die wiederum Einfluss auf die Komplexbildung von CDK und Cyclin besitzen.¹²

* p38 gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen und dabei zur Unterfamilie der MAP-Kinasen.^{70,71}

Pyrido[4,3-*d*]pyrimidine und Pyrimido[4,5-*d*]pyrimidine



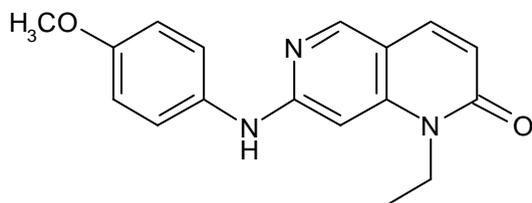
55



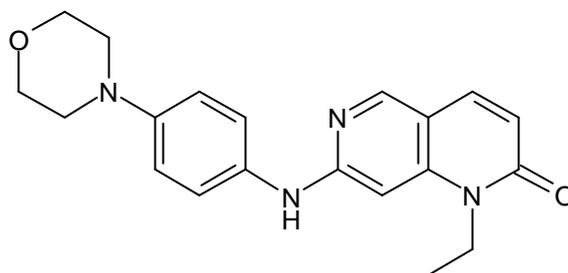
56

Vor kurzer Zeit wurden Pyridopyrimidine und verwandte stickstoffhaltige Bicyklen als selektive Inhibitoren von EGFR-Kinase entwickelt (z.B. A.M. Thompson⁷², G.W. Rewcastle⁷³). Durch Änderung der Substitutionsmuster wurde nun eine Verlagerung der Selektivität erreicht. Mitarbeiter der Firma Warner Lambert beschreiben in einem Patent die Synthese von Oxopyrido-pyrimidinen (z.B. **55**) und Oxopyrimido-pyrimidinen (z.B. **56**), welche als Inhibitoren für CDK und Tyrosinkinase entwickelt wurden. **56**: R: Amino-, Thioether-, Sulfoxid-, Sulfon-, jeweils mit Alkyl-, Aryl- oder Hetarylresten substituiert; R¹ = Alkyl-, Aryl-, Hetaryl-; R², R³ = Halogen- oder NH₂-; X = O, S, N).⁷⁴

Naphthyridone



57

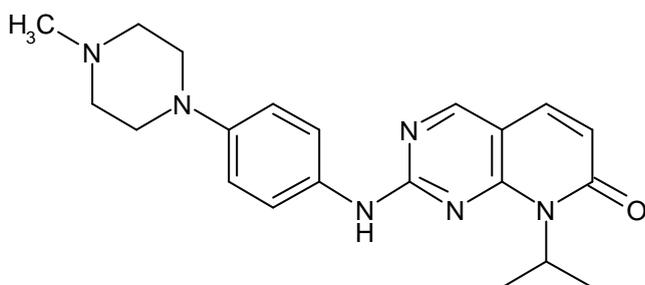


58

Ebenfalls zu den Substanzen der Firma Warner Lambert gehört eine Reihe von Naphthyridonen (**57**, **58**), welche sich mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich

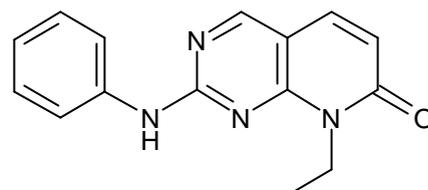
als CDK-inhibitorisch aktiv erwiesen, aber nur als mäßig selektiv innerhalb der CDK-Familie. (Bei der Testung wurden verschiedene ATP-Konzentrationen für unterschiedliche CDK verwendet.)¹⁸

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine



59

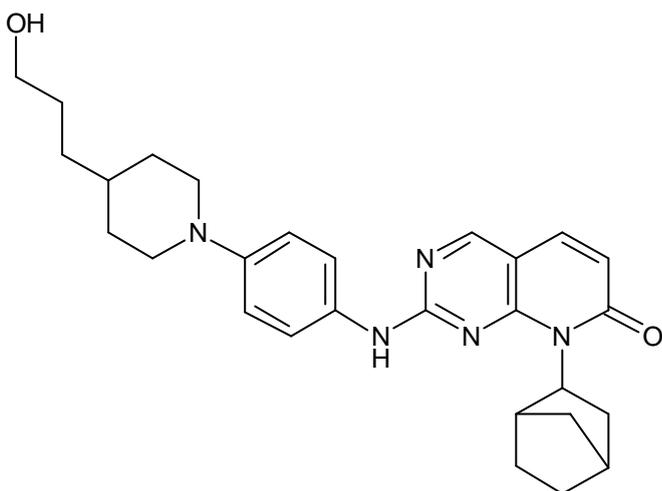
IC₅₀: 675 nM CDK1/Cyclin B
270 nM CDK2/Cyclin E
58 nM CDK2/Cyclin A
45 nM CDK4/Cyclin D



60

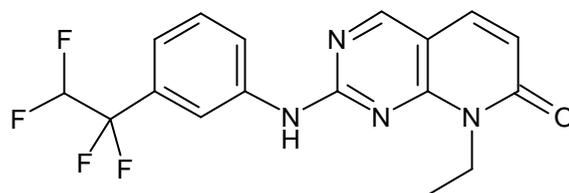
IC₅₀: 1 015 nM CDK1/Cyclin B
410 nM CDK2/Cyclin E
129 nM CDK2/Cyclin A
620 nM CDK4/Cyclin D
3 295 nM FGFr-Tyrosinkinase
21 000 nM cSrc-Kinase

Wissenschaftler der Firma Warner Lambert stellten außerdem Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine dar (**59**, **60**). Verbindung **59** hemmt CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E im submikromolaren Bereich und CDK2/Cyclin A mit 58 nM. Am aktivsten ist **59** aber bei CDK4/Cyclin D (IC₅₀ = 45 nM).^{12,16}



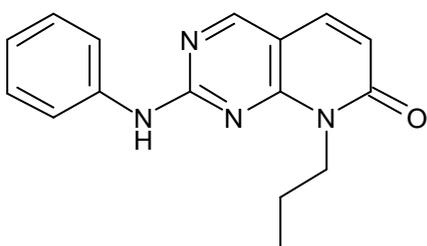
61

IC₅₀: > 40 000 nM CDK1/Cyclin B
 165 nM CDK2/Cyclin E
 209 nM CDK2/Cyclin A
 8 nM CDK4/Cyclin D
 8 620 nM FGFr-Tyrosinkinase



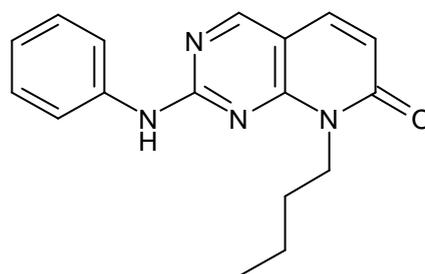
62

IC₅₀: 91 nM CDK1/Cyclin B
 1 200 nM CDK2/Cyclin E
 238 nM CDK2/Cyclin A
 7 833 nM CDK4/Cyclin D
 44 200 nM FGFr-Tyrosinkinase



63

IC₅₀: 299 nM CDK1/Cyclin B
 112 nM CDK2/Cyclin E
 50 nM CDK2/Cyclin A
 553 nM CDK4/Cyclin D
 6 600 nM FGFr-Tyrosinkinase



64

IC₅₀: 2 000 nM CDK1/Cyclin B
 58 nM CDK2/Cyclin E
 37 nM CDK2/Cyclin A
 1 495 nM CDK4/Cyclin D
 5 290 nM FGFr-Tyrosinkinase

Vor kurzem wurde über die Weiterentwicklung der Pyridopyrimidine berichtet, welche bei Parke Davis bzw. Warner Lambert durchgeführt wurde.

Die Leitstruktur **60** hemmt CDK4/Cyclin D mit einer IC₅₀ von 620 nM und zeigt eine gewisse Selektivität für CDK gegenüber anderen Kinasen mit IC₅₀-Werten von 0.129 bis 1.015 µM. Hierbei findet man für cSrc-Kinase eine IC₅₀ von

21 μM und für die FGFr-Tyrosinkinase (Fibroblast Growth Factor Receptor Tyrosinkinase) eine IC_{50} von 3.7 μM .

Nach Synthese einer Vielzahl von Derivaten konnte beobachtet werden, dass sich Alkylamine als Substituenten an der C2-Position negativ auswirken, während Anilinoester, noch besser aminosubstituierte Anilinoester einen positiven Einfluss haben. Dabei war es besonders günstig, den Aminosubstituenten des Anilinosubstituenten in einen aliphatischen Heterozyklus einzubinden.

Bei der Veränderung des N8-Substituenten ergab sich, dass Cycloalkylgruppierungen einen positiveren Einfluss hatten als Arylsubstituenten oder Alkylketten. Bei der Kombination dieser Erkenntnisse entstand eine Reihe von ca. 20 Substanzen, die eine hohe Aktivität bei CDK4/Cyclin D aufwiesen, mit IC_{50} -Werten von 4 nM bis 2.1 μM . Um die Selektivität zwischen verschiedenen Kinasen zu überprüfen, wurden Tests an CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D und an repräsentativen Tyrosinkinasen wie z.B. FGFr-Tyrosinkinase durchgeführt.

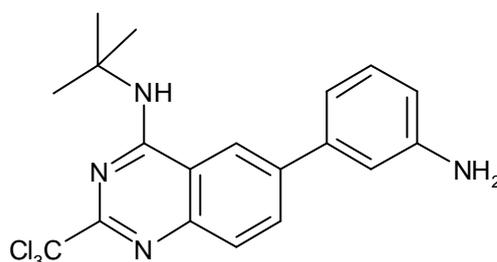
Die Gruppe der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine weist verschiedene Selektivitätsmuster auf, die von der Substitution am C2 und N8 abhängen. Die interessantesten Ergebnisse in Bezug auf eine CDK4-Selektivität zeigt Substanz **61** mit 15fach höherer IC_{50} bei CDK4/Cyclin D (8 nM) verglichen mit der von CDK2/Cyclin A oder CDK2/Cyclin E (209 nM, 165 nM), 1000fach schwächerer Wirkung auf FGFr-Tyrosinkinase ($\text{IC}_{50} = 8.62 \mu\text{M}$) und praktisch ohne Wirkung auf CDK1/Cyclin B. Zwei weitere Derivate, **63** und **64**, waren wiederum 10-40fach aktiver bei CDK2/Cyclin A im Vergleich zur Wirkung bei CDK4/Cyclin D. Ein drittes Profil ergab Substanz **62**, welche aktiver bei CDK1/Cyclin B war als bei anderen CDK oder Tyrosinkinasen. Für die Bestimmung der Inhibition von CDK4/Cyclin D wurde eine Konzentration von 25 μM ATP, für CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK2/Cyclin E wurde 12 μM ATP eingesetzt.

Mit diesen Verbindungen wurden anschließend Untersuchungen an pRb-positiven Zelllinien durchgeführt, welche ergaben, dass schon Substanzen mit nur leichter Selektivität für CDK4/Cyclin D einen Stopp in der G1-Phase bewirken, während speziell für den Inhibitor **61** berichtet wurde, dass er menschliche Darmkrebszellen (HCT116) mit einer IC_{50} von 0.21 μM hemmt.

Durch Kristallisation von **59** im Komplex mit CDK2 wurde die Bindung der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine in der ATP-Tasche untersucht. Das Leu83-NH bildet demnach eine Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoffatom in Position 3 des

heterozyklischen Grundgerüsts von **59**, während das C2-NH von **59** eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoffatom von Leu83 ausbildet. Obwohl der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on-Ring ähnlich in der ATP-Tasche ausgerichtet ist wie der Purinring von ATP, bildet der Inhibitor nicht die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bei **59** fehlt die für ATP und eine Reihe von Inhibitoren typische Brückenbindung zum Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81.¹⁶

4-Amino-chinazoline

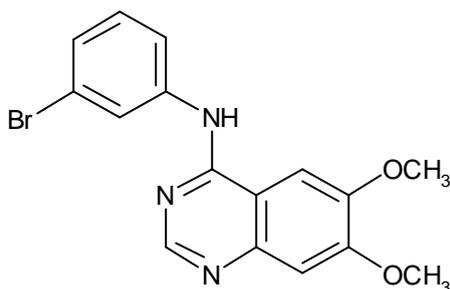


65

IC₅₀: 0.65 µM CDK2/Cyclin E
2.10 µM CDK4/Cyclin D

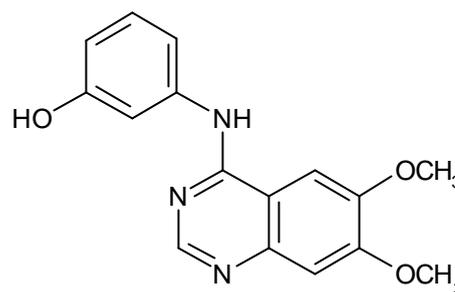
Chinazoline bieten eine gute Grundstruktur für Wirkstoffe, die in der ATP-Tasche von Enzymen binden sollen. Deshalb haben Wissenschaftler der Firma Du Pont ebenfalls Chinazoline mit Tyrosinkinase-inhibitorischer Aktivität so abgewandelt, dass die Selektivität sich zugunsten einer CDK-Inhibition verlagert. Hierbei wurden Aminochinazoline mit unterschiedlichen Substitutionsmustern in 2-, 4- und 6-Position untersucht. In Position 4 werden einige Alkylaminogruppen toleriert, während die 2-Position sensitiver ist. In Position 6 haben Arylsubstituenten positive Auswirkung gezeigt. Ein Ergebnis dieser Entwicklung ist **65**, welches CDK2/Cyclin E mit einer IC₅₀ von 0.65 µM und CDK4/Cyclin D mit einer IC₅₀ von 2.10 µM hemmt.¹²

4-Amino-chinazoline, Kristallstruktur mit CDK2



66

IC₅₀: 250 μM CDK2
29 pM EGFR-Kinase

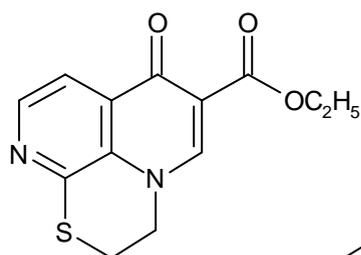


67

IC₅₀: 1 μM CDK1/Cyclin B

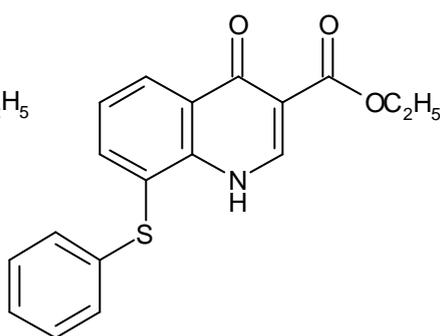
Eine Arbeitsgruppe von Glaxo Wellcome untersuchte Kristalle eines 4-Anilinochinazolins im Komplex mit CDK2, um die Ausrichtung von Inhibitoren mit Anilinochinazolinstruktur in der ATP-Tasche von Kinasen zu untersuchen. Die verwendete Verbindung **67** stellt ein Derivat eines bei Warner Lambert synthetisierten Kinase-Inhibitors (**66**) dar. Substanz **66** hemmt EGFR-Kinase mit einer IC₅₀ von 29 pM, während CDK2 nur mit einer IC₅₀ von 250 μM inhibiert wird. Für die Röntgenstrukturanalyse verwendeten die Autoren einen relativ schwachen CDK-Inhibitor (**67**) mit einer IC₅₀ von 1 μM bei CDK2. Der Chinazolinring interagiert mit den Resten 81-83 der Hinge-Region der CDK. Die 3'-Hydroxyanilinogruppe an der 4-Position des Grundgerüsts befindet sich dicht an Phe80. Der Phenylsubstituent des Anilinosubstituenten ist praktisch koplanar mit dem Bicyklus des Inhibitors, wobei Wechselwirkungen mit dem Phenylrest von Phe80 und eine sandwichartige Einlagerung zwischen den Seitenketten von Val18 und Ala144 zu beobachten sind. Wasserstoffbrückenbindungen befinden sich zwischen dem Chinazolin-N1 und dem Leu83-NH sowie zwischen der 3'-Hydroxygruppe und Asp145 und Lys33. Im Vergleich mit ATP war eine Koplanarität von ATP-Purin- und **67**-Chinazolinring zu beobachten, allerdings war der Chinazolinring im Vergleich zum Purin verdreht, wie es auch schon bei den meisten anderen Inhibitoren beobachtet wurde. **67** besitzt keinen mit dem ATP-Riboserest deckungsgleichen Bereich, allerdings nehmen sowohl Dimethoxybenzoanelland als auch der Hydroxyphenylrest Bereiche in der ATP-Tasche ein, die nicht von ATP belegt werden.⁵⁷

Chinolinone und Naphthyridin-4-one



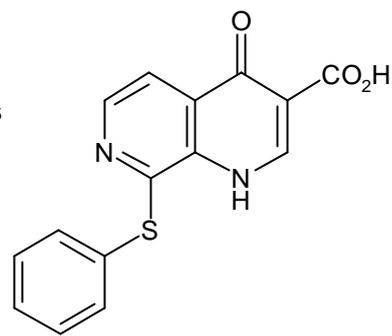
68

IC₅₀: 550 μM CDK1
30 μM cdc25



69

IC₅₀: 130 μM CDK1
11 μM cdc25

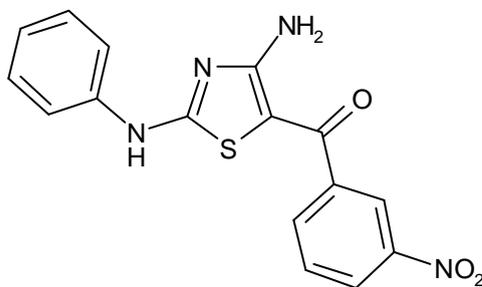


70

IC₅₀: > 1 000 μM CDK1
5 μM cdc25

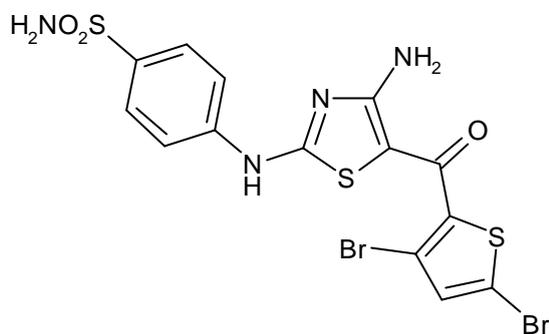
Aus Saudi-Arabien wird von der Synthese von Chinolin-4-onen und 1,7-Naphthyridin-4-onen, welche potentielle CDK1- oder cdc25-Phosphatase-Inhibitoren darstellen, berichtet. (Zu cdc25-Phosphatase siehe Kapitel 2.5.2.) Die Aktivität bei CDK1 lag bei keiner der getesteten Substanzen unter 130 μM (IC₅₀). Eine erwähnenswerte Aktivität bei cdc25-Phosphatase zeigte nur ein Pyrido[1,2,3-*d,e*][2,3-*b*]pyrido-1,4-thiazin (**68**), ein 8-Phenylthiochinazolin-3-carbonsäureester (**69**) und eine 8-Phenylthio-1,7-naphthyridin-3-carbonsäure (**70**). Im „NCI drug screening“ zeigten von den abgebildeten Verbindungen nur **68** und **70** an den 60 Tumorzelllinien GI₅₀-Werte unter 100 μM.⁷⁵

CDK4-selektive 2,4-Diamino-1,3-thiazole



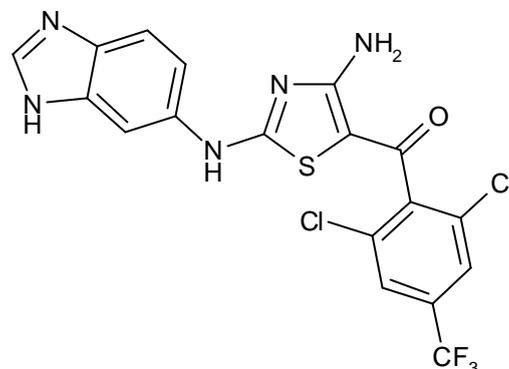
71

Von Agouron Pharmaceuticals wurden Diaminotiazole wie **71** patentiert, die Aktivität bei CDK1, 2, 4 und 6 aufwiesen.⁷⁶



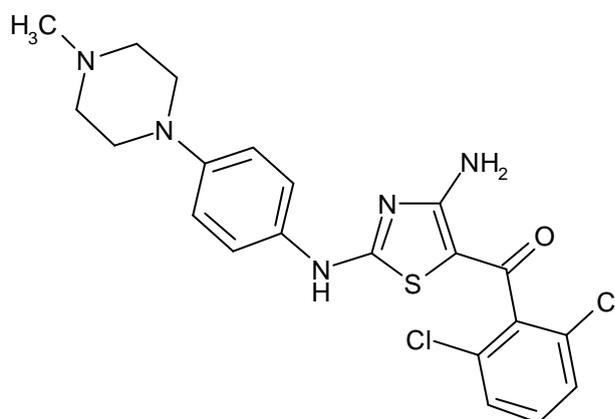
72

IC₅₀: 20 nM CDK1/Cyclin B
6.8 nM CDK2/Cyclin A
6.3 nM CDK4/Cyclin D



73

IC₅₀: 233 nM CDK1/Cyclin B
310 nM CDK2/Cyclin A
7 nM CDK4/Cyclin D



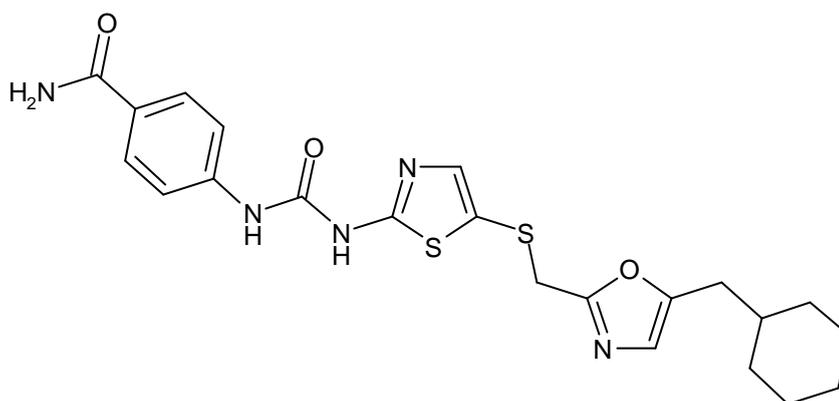
74

IC₅₀: 827 nM CDK1/Cyclin B
482 nM CDK2/Cyclin A
2 nM CDK4/Cyclin D

Ebenfalls bei Agouron wurden **72**, **73** und **74** synthetisiert, von denen vor allem **73** und **74** eine ausgeprägte Selektivität für CDK4/Cyclin D besitzen verglichen mit der Wirkung auf CDK1/Cyclin B oder CDK2/Cyclin A. Während **72** noch äquipotent auf CDK2/Cyclin A und CDK4/Cyclin D wirkt und nur einen dreifach höheren IC₅₀-Wert bei CDK1/Cyclin B zeigt, hemmt **73** CDK4/Cyclin D schon 30- bis 40fach stärker als CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin A. Am

ausgeprägtsten ist diese Selektivität bei **74** zu sehen, welches mit einer IC_{50} von 2 nM sehr aktiv bei CDK4/Cyclin D ist und um das 240- bzw. 410fache schwächer auf CDK2/Cyclin A und CDK1/Cyclin B wirkt.¹⁸

1,3-Thiazole



75

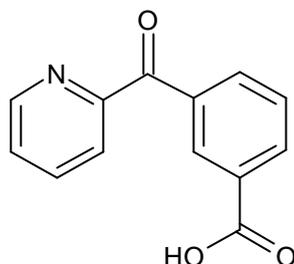
IC_{50} : < 50 μ M CDK1/Cyclin B
< 50 μ M CDK2/Cyclin E
< 50 μ M CDK4/Cyclin D

Eine andere Reihe von 1,3-Thiazolen (z.B. **75**) wurde von Bristol-Myers Squibb patentiert. Diese Verbindungen besitzen in 2-Position vorzugsweise eine Substitution durch eine Harnstofffunktion und haben an Position 4 einen lipophilen Bereich über eine Schwefelbrücke angeknüpft. Die Aktivität dieser Substanzen wird mit IC_{50} -Werten unter 50 μ M bei CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin E und CDK4/Cyclin D beschrieben.¹²

Benzoessäure I und Harnstoffderivate

Eine Arbeitsgruppe von Berlex Biosciences führte ein Screening mit kommerziell erhältlichen Substanzbibliotheken durch, um selektive CDK4/Cyclin D1-Inhibitoren zu finden. Die Substanzen wurden mit CDK4/Cyclin D1 in Anwesenheit von 400 μ M ATP sowie mit CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E in Gegenwart von 200 μ M ATP getestet. Anschließend erfolgten Tests an drei humanen Brustkrebszelllinien, von denen zwei pRb

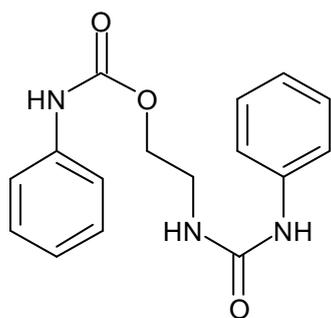
exprimieren können (MCF-7, ZR-75-1), während eine hierzu nicht in der Lage ist (BT-549). Aus ca. 100 000 Verbindungen wurden vier identifiziert, die doppelt bis 25fach stärker auf CDK4/Cyclin D1 wirkten, verglichen mit CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E.⁷⁷



Benzoessäure I (76)

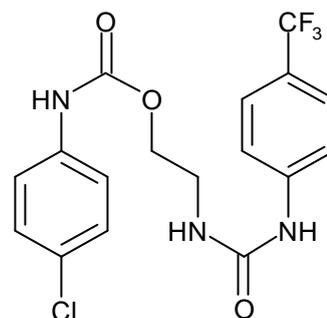
IC₅₀: > 30 µM CDK1/Cyclin B
> 30 µM CDK2/Cyclin E
6.7 µM CDK4/Cyclin D

Benzoessäure I (76) war mehr als fünffach aktiver bei CDK4/Cyclin D1 verglichen mit CDK1/Cyclin B oder CDK2/Cyclin E, zeigte aber praktisch keine Wirkung auf das Wachstum der verwendeten Zelllinien (IC₅₀ > 100 µM).⁷⁷



Harnstoffderivat I (77)

IC₅₀: > 30 µM CDK1/Cyclin B
> 30 µM CDK2/Cyclin E
1.9 µM CDK4/Cyclin D1



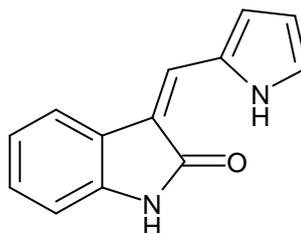
Harnstoffderivat II (78)

IC₅₀: > 30 µM CDK1/Cyclin B
> 30 µM CDK2/Cyclin E
1.2 µM CDK4/Cyclin D1

Harnstoffderivat I (77) zeigte bei 100 µM nur schwache Wirkung auf die Zelllinien.

Harnstoffderivat II (**78**) mit 25facher Selektivität für CDK4/Cyclin D1 gegenüber CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E hemmte das Wachstum der Zelllinien mit einer IC_{50} von 5.92 μ M bzw. 14.27 μ M (MCF-7, pRb⁺ bzw. BT-549, pRb⁻).⁷⁷

Oxindol



Oxindol (**79**)

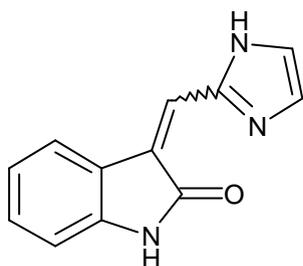
IC_{50} : 10.2 μ M CDK1/Cyclin B
10.0 μ M CDK2/Cyclin E
4.9 μ M CDK4/Cyclin D1
0.8 μ M VEGF-Tyrosinkinase

Im Zellinientest von Berlex Biosciences war Oxindol (**79**) am potentesten (IC_{50} -Werte: 0.42 μ M bei MCF-7; 0.1 μ M bei ZR-75-1; 13.93 μ M bei BT-549). Die stärkere Wirkung auf pRb⁺-Zelllinien lässt sich mit einer CDK-Hemmung vereinbaren. Oxindol zeigte allerdings nur geringe Selektivität zwischen den CDK.⁷⁷

Oxindol war schon vorher von Wissenschaftlern der Firma Sugen bei der Suche nach selektiven Inhibitoren von Rezeptor Tyrosinkinasen als Leitstruktur entdeckt worden. Das Z-Isomer der Struktur erwies sich in dieser Untersuchung als aktiver und selektiver Inhibitor der VEGF-Tyrosinkinase [(Vascular Endothelial Growth Factor) Flk-1 (Fetal liver kinase)] mit einer IC_{50} von 0.8 μ M.⁷⁸

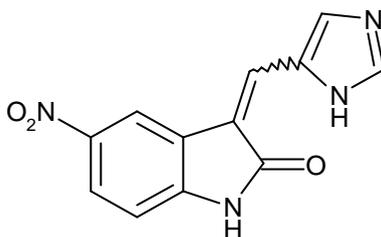
Die Werte für Oxindol lassen den Schluss zu, dass diese Substanz neben der CDK-inhibitorischen Potenz auch durch andere Wirkmechanismen eine wachstumshemmende Aktivität entfalten kann. Ein Beispiel ist die Inhibition der erwähnten Rezeptor-Tyrosinkinase. Dies muss bei der Auswertung von Testungen an Zelllinien berücksichtigt werden.

Derivate von Oxindol



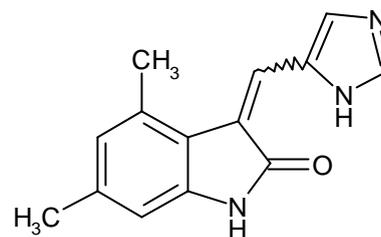
80

IC₅₀: < 0.78 μM CDK2



81

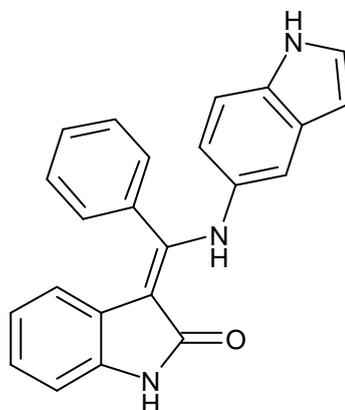
IC₅₀: < 0.78 μM CDK2



82

IC₅₀: < 0.78 μM CDK2

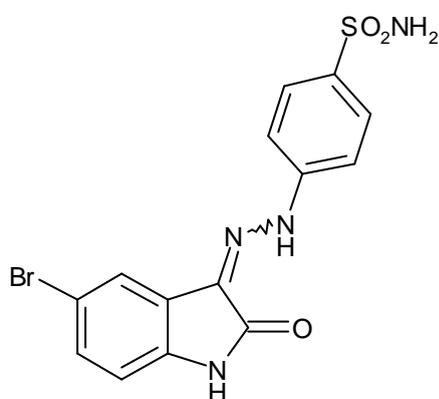
Aus der Reihe der Verbindungen, die bei Sugen als generelle Proteinkinase-Inhibitoren synthetisiert wurden, zeigten auch einige weitere noch höhere Aktivität bei CDK2 als das eben beschriebene Oxindol (**79**). Die Verbindungen (z.B. **80**, **81** und **82**) zeichnen sich dadurch aus, dass der Pyrrolring von Oxindol durch Imidazolylsubstituenten ersetzt und der Benzoanelland unterschiedlich substituiert wurde.¹⁸



83

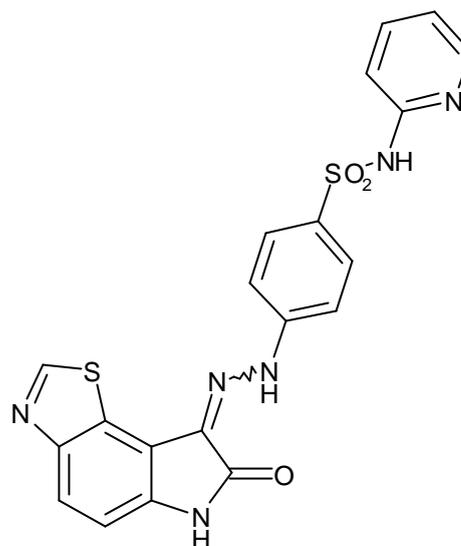
Bei Boehringer Ingelheim wurden 2-Indolinone wie **83** als CDK-inhibitorische Substanzen entwickelt. Dabei kann der Indolinonring Substitutionen mit einem Halogen, einer Nitrogruppe oder Aminen enthalten. Der Phenylrest kann ebenfalls substituiert sein, und über ein Amin sind Heteroaromaten angeknüpft. Biologische Daten waren nicht verfügbar.⁷⁹

Indolinone mit Hydrazonestruktur



84

IC₅₀: 60 nM CDK2



85

IC₅₀: 110 nM CDK1

10 nM CDK2

130 nM CDK2

Mitarbeiter der Firma Glaxo Wellcome verknüpften Indolinone über eine Phenylhydrazonofunktion mit Sulfonamidsubstituenten und patentierten diese als Protein-Tyrosinkinase- und Serin/Threonin-Kinase-Inhibitoren. Die Strukturabwandlungen führten unter anderem zu sehr aktiven Inhibitoren von CDK1 und CDK2 mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich. Aus diesen Untersuchungen ging Substanz **84** hervor, die im Komplex mit CDK2 zur Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse herangezogen wurde, um ein rationales Design potenterer Inhibitoren möglich zu machen.

Die Indolinon-Amidfunktion interagiert demnach mit der Hinge-Region der ATP-Bindungstasche und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81 und dem Leu83-NH aus. Das Sulfonamidsubstituierte Phenylhydrazon ragt aus der Bindungsspalte heraus, wobei die Sulfonamidgruppe mit Asp86 interagiert. Es bestehen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Asp86-NH und einem Sulfonamidsauerstoffatom sowie zwischen der Carboxylgruppe der Asp86-Seitenkette und dem Sulfonamid-NH₂. Die Aufklärung der Kristallstruktur war die Grundlage für die Entwicklung von Substanz **85**. Da Lys33 im Umfeld der Position 5 des Oxindols gefunden wurde, sollte hier ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor platziert werden. Zusätzlich

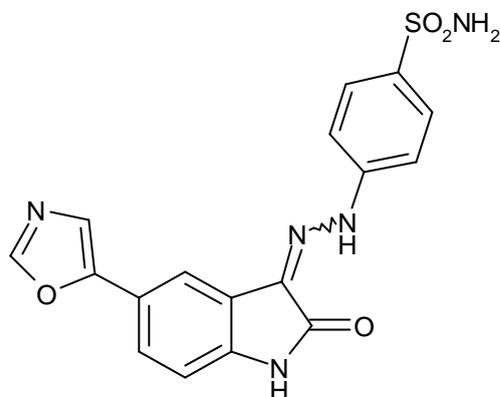
versprach die Nähe von Val18 zu Position 4 des gleichen Körpers einen möglichen Aktivitätsanstieg, sobald ein lipophiler Rest an dieser Stelle angeknüpft würde. Da die Sulfonamidgruppe aus der ATP-Tasche herausragt, wurde angenommen, dass es an dieser Stelle möglich sei, Substituenten anzufügen, welche für pharmakokinetische oder Löslichkeitseigenschaften günstig sind.

Die aus diesen Überlegungen entstandene Verbindung **85** erwies sich tatsächlich als noch aktiverer CDK2-Inhibitor ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$), während die Wirkung auf CDK1 und CDK4 deutlich schwächer war. Die Kristallstruktur von **85** im Komplex mit CDK2 wurde ebenfalls aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass wie erhofft zwischen dem Stickstoffatom des Thiazolanellanden (an Position 5 des Indolinons) und Lys33 eine Wasserstoffbrückenbindung und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Schwefel des Thiazols (an Position 4 des Indolinons) und Val18 bestehen. Der Pyridylsubstituent an der Sulfonamidgruppe ist wie erwartet dem umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt.

In Zellzyklusanalysen konnte mit **85** eine reversible Blockade in der späten G1-Phase und Hemmung der pRb-Phosphorylierung erreicht werden. Während die Konzentration von CDK2 oder Cyclin E nicht beeinflusst wurde, konnte in den Zellen eine verminderte Expression von Cyclin A festgestellt werden, die von aktiver CDK2/Cyclin E positiv reguliert wird. Es wurden in diesen Untersuchungen keine Hinweise auf Apoptose gefunden. Eine Vorbehandlung von Zellen mit **85** konnte diese sogar vor künstlich durch Etoposid ausgelöster Apoptose schützen. Ähnliche Effekte bewirkt auch Olomoucine (**7**), allerdings wegen seiner geringeren Aktivität in wesentlich höherer Konzentration. Substanz **85** bewirkte diesen Schutz auch vor zytotoxischen Agentien, die einen anderen Wirkmechanismus besitzen.

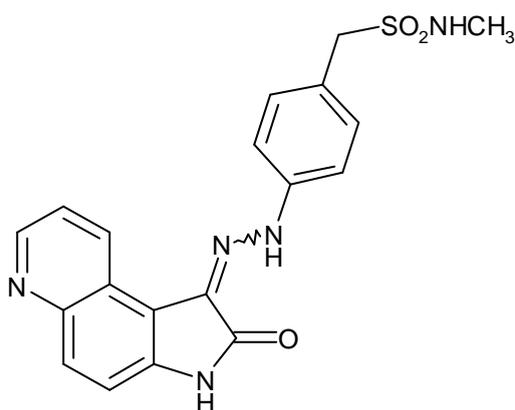
Versuche an einem Tiermodell sollten im Folgenden Aufschluss darüber geben, ob eine topische Applikation von **85** während einer Chemotherapie dem durch Zytostatika verursachten Haarausfall vorbeugt. Nach ersten Tests, die die Aufnahme des CDK2-Inhibitors in die Haut- und Haarfollikelzellen nach lokaler Applikation sicherten, wurde an einem Rattenmodell gezeigt, dass Verbindung **85** in der Lage ist, den Haarverlust nach Behandlung der Tiere mit Etoposid (50 % totaler Schutz, 20 % teilweise geschützt) oder Cyclophosphamid/Doxorubicin (33 % geschützt) zu vermindern. Da die Ratten nur auf dem Kopf mit **85** behandelt waren, fielen ihnen die Haare zwar am ganzen Körper aus, nicht aber an der lokal vorbehandelten Kopfhaut. Ähnliche Ergebnisse wurden mit **29**

weiteren Derivaten dieser Substanz erzielt. Inwieweit diese Methode auf den Menschen übertragbar ist, bleibt noch zu untersuchen.⁴⁸



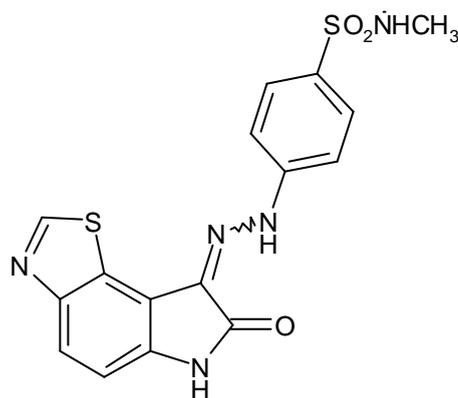
86

IC₅₀: 1-10 nM CDK1
1-10 nM CDK2



GW5181 (87)

IC₅₀: 51-100 nM CDK1
6.2 nM CDK2



GW9499 (88)

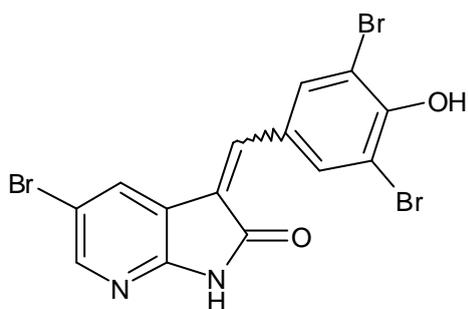
IC₅₀: 3.5 nM CDK2

Weitere Substanzen aus dieser Reihe sind **86**, GW5181 (**87**) und GW9499 (**88**). Verbindung **86** weist IC₅₀-Werte von 1-10 nM bei CDK1 und CDK2 auf.¹⁸ GW5181 und GW9499 wirken auf CDK1 und CDK2 ebenfalls mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich.^{12,18}

In Zelllinien erwies sich GW9499 als aktiver, wobei es bei einer Dosis von 5 µM über 7 Tage ein Absterben der Zellen ab dem 4. Tag (RKO-Zelllinie) bzw. ab dem 6. Tag (MD468-Zelllinie) bewirkte. Im RKO-Xenograft Modell zeigte

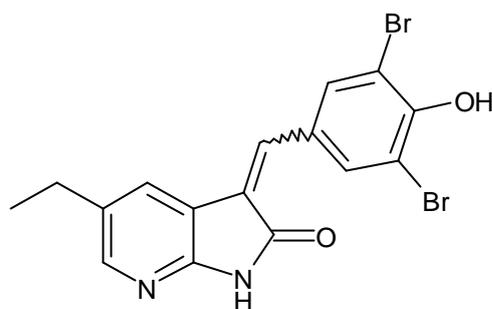
GW9499 wenig Hemmung des Tumorwachstums (30 mg/kg i.v., täglich über 6 Tage). GW5181 zeigte bei höherer Dosierung (100 mg/kg i.v., täglich über 10 Tage) ebenfalls nur moderate inhibitorische Aktivität.¹²

Pyrrolo[2,3-*b*]pyridine



89

IC₅₀: < 1 μM CDK2

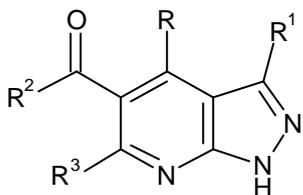


90

IC₅₀: < 1 μM CDK2

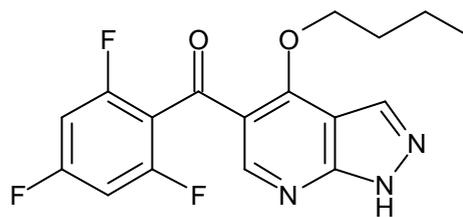
Derivate der Verbindungen mit 2-Indolinongrundkörper wurden von einer anderen Arbeitsgruppe synthetisiert. Die Substanzen zeichnen sich durch die Anellierung eines Pyrido- anstelle des Benzoanellanden aus. Der Pyridoanelland kann in 5-Position unterschiedlich substituiert sein, z.B. mit einem Brom-, Ethyl- oder Furylsubstituenten. Verschiedene mögliche Substituenten werden auch für den Phenylrest angegeben, wie z.B. Alkyl- oder Arylgruppen. Die zu dieser Substanzklasse gehörenden Verbindungen (z.B. **89** und **90**) zeigen eine CDK2-inhibitorische Aktivität mit IC₅₀-Werten von < 1 μM.¹²

Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine



91

IC₅₀: < 50 μM CDK1/Cyclin B
< 50 μM CDK2/Cyclin E
< 50 μM CDK4/Cyclin D

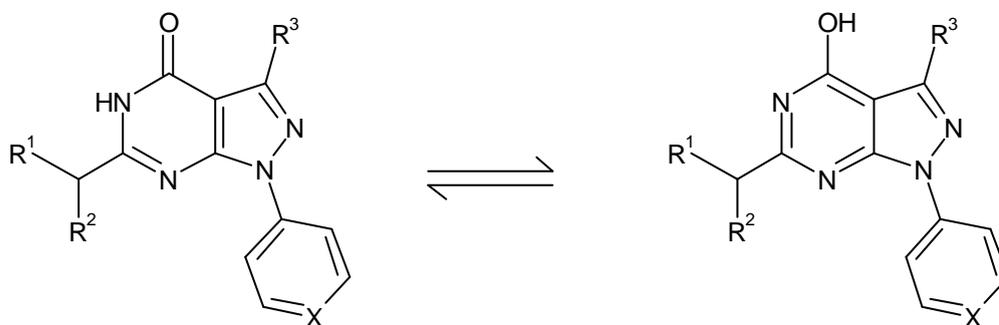


92

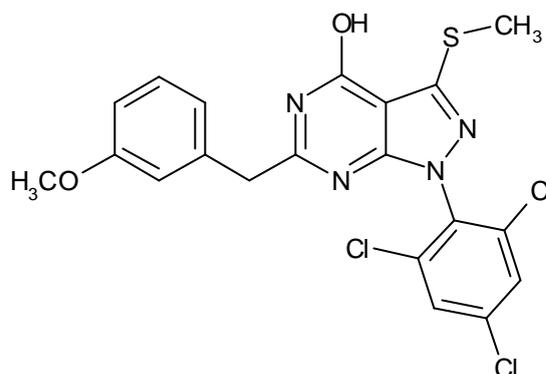
IC₅₀: < 50 μM CDK1/Cyclin B
< 50 μM CDK2/Cyclin E
< 50 μM CDK4/Cyclin D

Benzoylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine wie **91** und **92** wurden von Bristol-Myers Squibb als potentielle CDK-Inhibitoren patentiert. Die Substanzen weisen IC₅₀-Werte < 50 μM bei CDK1, CDK2 und CDK4 auf.^{12,80}

Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine



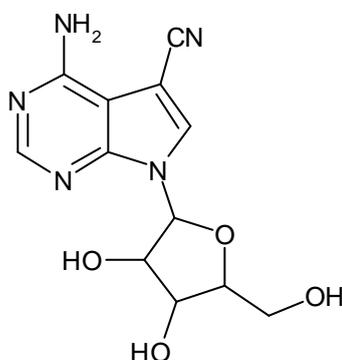
93



94

Verschiedene den Pyrazolopyridinen ähnliche Substanzen wurden von Du Pont als CDK-Inhibitoren patentiert. Durch formale Verschiebung des Stickstoffatoms von Position 7 zu Position 6 im GuaninGrundgerüst gelangt man zu den Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-onen wie **93** und **94**, die in den für **93** angegebenen tautomeren Formen vorliegen können. Biologische Daten wurden nicht angegeben.⁸¹

Toyocamycin

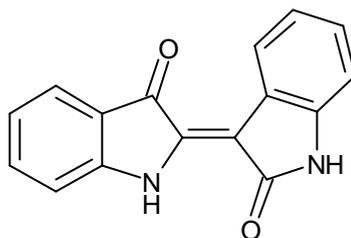


Toyocamycin (**95**)

IC₅₀: 0.88 μM CDK1
 5.1 μM CDK2
 2 520 μM PKA
 344 μM PKC
 300 μM EGFR-Kinase
 3.5 μM GSK-3β

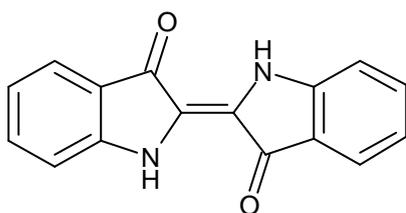
Toyocamycin (**95**) ist ein Adenosinderivat, bei dem der Purinring durch einen Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinring ersetzt wurde. Es hemmt CDK1 mit einer IC_{50} von $0.88 \mu\text{M}$ und CDK2 mit einer IC_{50} von $5.1 \mu\text{M}$,^{17,26} während bei GSK-3 β eine IC_{50} von $3.5 \mu\text{M}$ gefunden wurde.¹¹ IC_{50} -Werte bei anderen Kinasen liegen über $300 \mu\text{M}$.^{17,26}

Indirubine



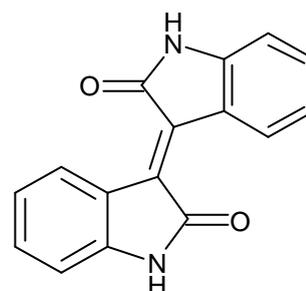
Indirubin (**96**)

IC_{50} : $10.0 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $7.5 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin E
 $2.2 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A
 $12.0 \mu\text{M}$ CDK4/Cyclin D1
 $5.5 \mu\text{M}$ CDK5/p35
 $8.5 \mu\text{M}$ CK1
 $18.0 \mu\text{M}$ cSrc-Kinase



Indigo (**97**)

IC_{50} : $> 1\,000 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B
 $70 \mu\text{M}$ CDK2/Cyclin A



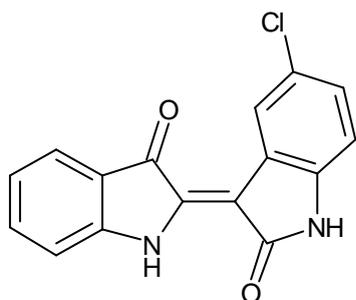
Isoindigo (**98**)

IC_{50} : $80 \mu\text{M}$ CDK1/Cyclin B

Die Indirubine wurden entdeckt, als die wirksamen Inhaltsstoffe eines Medikaments aus der traditionellen chinesischen Medizin gesucht wurden. Die Pflanzenmischung Danggui Longhui Wan wird in China schon seit langer Zeit gegen chronische myeloische Leukämie eingesetzt. Einen von elf Bestandteilen

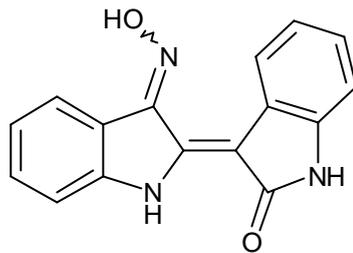
dieser Mischung gewinnt man aus verschiedenen Pflanzen: *Baphicacanthus cusia*, Acanthaceae; *Polygonum tinctorium*, Polygonaceae; *Isatis indigotica*, Brassicaceae; *Indigofera suffruticosa* und *Indigofera tinctoria*, Fabaceae. Es handelt sich hierbei um ein tiefblaues Pulver, Quing Dai oder Indigo naturalis, welches einen hohen Anteil des blauen Indigos (**97**) (auch: Indigotin) enthält. In den 60er Jahren wurde als eigentlich wirksame Substanz das rote Isomer Indirubin (**96**) (auch: Isoindigotin, Indigorot) identifiziert, welches in geringen Mengen in Quing Dai vorkommt.⁸² Sowohl Indigo als auch Indirubin gehören zur Gruppe der Indigoide und sind bis-Indole natürlichen Ursprungs, die von verschiedenen Pflanzen (s.o.) oder auch von Schnecken¹¹ synthetisiert werden. Von den Indigoiden erwies sich Indirubin als der aktivste CDK-Hemmer. Isoindigo (**98**) ist deutlich schwächer, Indigo zeigt praktisch keine Aktivität.^{11,82} Indirubin und seine Derivate wurden bereits als CDK-Inhibitoren zum Patent angemeldet.⁸³

In vitro zeigt Indirubin nur eine schwache Bindungsfähigkeit an die DNS, hemmt aber deren Synthese im zellfreien Assay, in verschiedenen Zelllinien und in vivo in Ratten. Die Toxizität ist begrenzt. Auch in Langzeitstudien wurden keine Effekte auf das Knochenmark und die Produktion von hämatopoietischen Stammzellen festgestellt. In einer klinischen Prüfung wurden Erfolge erzielt bei Behandlung von chronischer myeloischer und chronischer granulozytischer Leukämie, wobei die Nebenwirkungen mit schwachem, abdominalem Schmerz, Durchfall, Schwindel und Erbrechen mäßig waren.



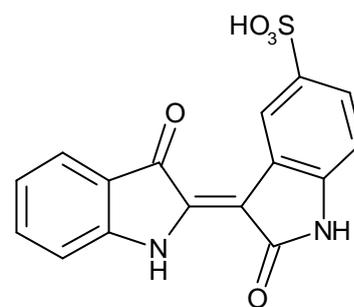
5-Chlor-indirubin
(99)

IC₅₀: 400 nM CDK1/Cyclin B
550 nM CDK2/Cyclin E
750 nM CDK2/Cyclin A
6 500 nM CDK4/Cyclin D
800 nM CDK5/p35



Indirubin-3'-monoxim
(100)

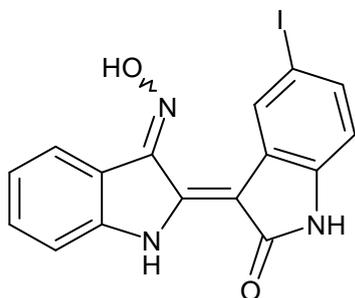
IC₅₀: 180 nM CDK1/Cyclin B
250 nM CDK2/Cyclin E
440 nM CDK2/Cyclin A
3 300 nM CDK4/Cyclin D
100 nM CDK5/p35



Indirubin-5-sulfonsäure
(101)

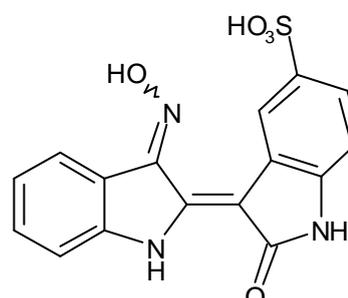
IC₅₀: 55 nM CDK1/Cyclin B
150 nM CDK2/Cyclin E
35 nM CDK2/Cyclin A
300 nM CDK4/Cyclin D
65 nM CDK5/p35
3 000 nM MAP Kinase
1 500 nM CK1

Wegen schlechter Löslichkeit und Absorption von Indirubin wurden synthetische Abwandlungen durchgeführt, die im ersten Schritt 5-Chlor-Indirubin (**99**), Indirubin-3'-monoxim (**100**) und Indirubin-5-sulfonsäure (**101**) hervorbrachten, welche eine deutlich erhöhte Wirkung auf CDK aufweisen. Der Halogensubstituent bewirkt einen Anstieg der CDK1/Cyclin B-inhibitorischen Aktivität auf 400 nM (IC₅₀) für 5-Chlor-Indirubin, die Bildung eines Monoxims (**100**) führt zu einer IC₅₀ von 180 nM und ein 5-Sulfonsäuresubstituent (**101**) zu einer von 55 nM.



5-Iod-indirubin-3'-monoxim (**102**) Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure (**103**)

IC₅₀: 25 nM CDK1/Cyclin B
20 nM CDK5/p25
9 nM GSK-3β



IC₅₀: 5 nM CDK1/Cyclin B
7 nM CDK5/p25
80 nM GSK-3β

Die Kombination von aktivitätsfördernden Molekülveränderungen führte zu 5-Iod-indirubin-3'-monoxim (**102**) und Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure (**103**). Bei Untersuchungen zur Kinaseselektivität der Indirubine wurde auch eine starke Wirkung auf GSK-3 β gefunden. Die Aktivität bei GSK-3 β und CDK1, CDK2 oder CDK5 entspricht sich in etwa, wobei der Iodsubstituent im 5-Iod-indirubin-3'-monoxim die Wirkung auf GSK-3 β im Vergleich zu den CDK erhöht. Der 5-Sulfonsäurerest von Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure begünstigt wiederum die Aktivität bei CDK1 und CDK5 gegenüber GSK-3 β um das 10fache. Indigo und andere Verwandte von Indirubin entwickeln keine Effekte auf CDK5/p25 oder GSK-3 β .¹¹

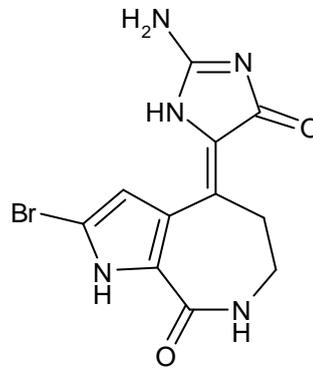
In Zellzyklusanalysen wurde in geringerer Dosierung von Indirubin-3'-monoxim eine Zellzyklusblockade in der G1-Phase mit reduzierter Phosphorylierung von pRb und in höherer Dosis eine Blockade des G2/M-Übergangs mit mäßiger Steigerung der Apoptose entdeckt. Die Art der Zellzyklusblockade hängt dabei vom Phänotyp ab. Diese Ergebnisse lassen sich mit einer Wirkung über CDK1- und CDK2-Inhibition vereinbaren.⁸²

In vivo konnte kürzlich die DARPP-32-Phosphorylierung, welche von CDK5/p25 ausgeführt wird, durch Indirubine gehemmt werden. Das neuronale Protein DARPP-32 stellt je nach Phosphorylierungsgrad und Lokalisation der jeweiligen Phosphorylierung einen Inhibitor für unterschiedliche Enzyme dar. Phosphorylierung von DARPP-32 durch CDK5/p25 führt zu einer inhibitorischen Aktivität bei PKA. Indirubin-3'-monoxim wurde außerdem als Inhibitor der Tau-Phosphorylierung in vitro und in vivo beschrieben.¹¹

Durch Röntgenstrukturanalyse konnte die Bindung von Indirubin-3'-monoxim und Indirubin-5-sulfonsäure in der ATP-Tasche von CDK2 aufgeklärt werden. Bei der Einlagerung kommt es zu diversen apolaren Kontakten zwischen Inhibitor und Enzym, wobei vor allem Phe80 beteiligt ist. Das Lactam-NH der Inhibitoren fungiert als Wasserstoffbrücken-Donator zum Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81 der CDK, während die Carbonylfunktion der Lactamgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung vom Leu83-NH akzeptiert. Wie bei Olomoucine (**7**) und Roscovitin (**8**) beobachtet, bildet das Leu83-Carbonylsauerstoffatom eine dritte Wasserstoffbrückenbindung aus, hier zum zyklisch gebundenen NH. Die Sulfonatgruppe von Indirubin-5-sulfonsäure befindet sich im gleichen Bereich wie ein Teil des Ringgerüsts von Staurosporin, ist diesem aber überlegen, da bei dem Indirubinderivat die Möglichkeit von ionischen Wechselwirkungen mit Lys33 besteht. Die Monoximgruppe des Inhibitors (**100**)

lagert sich in die Ribosetasche der ATP-Bindungsstelle ein. C6' und C7' ragen ins umgebende Lösungsmittel aus der ATP-Tasche heraus.^{11,82}

Hymenialdisin

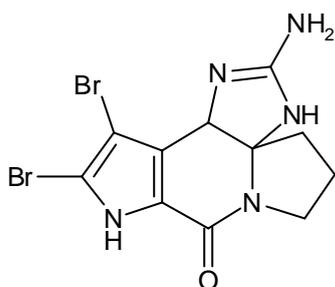


Hymenialdisin (**104**)

| | | |
|--------------------|--------|----------------|
| IC ₅₀ : | 22 nM | CDK1/Cyclin B |
| | 40 nM | CDK2/Cyclin E |
| | 70 nM | CDK2/Cyclin A |
| | 100 nM | CDK3/Cyclin E |
| | 600 nM | CDK4/Cyclin D1 |
| | 28 nM | CDK5/p25 |
| | 700 nM | CDK6/Cyclin D2 |
| | 10 nM | GSK-3β |
| | 35 nM | CK1 |

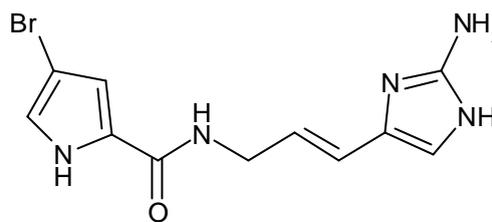
Bei Hymenialdisin (**104**) handelt es sich um einen Naturstoff, welcher aus verschiedenen Spezies mariner Schwämme gemeinsam mit einigen verwandten Metaboliten isoliert wurde.

Hymenialdisin bewirkt eine selektive Hemmung einer Gruppe von Kinasen. Die IC₅₀-Werte für Hymenialdisin bei CDK1, CDK2, CDK3, CDK5, GSK-3β und CK1 betragen zwischen 22 und 100 nM, wogegen CDK4 und CDK6 mit IC₅₀-Werten von 600 nM bzw. 700 nM deutlich schwächer gehemmt werden.¹⁹



Dibromocantharellin (**105**)

IC₅₀: > 100 μM CDK1/Cyclin B
> 100 μM CDK5/p25
3 μM GSK-3β



Hymenidin (**106**)

IC₅₀: > 100 μM CDK1/Cyclin B
4 μM CDK5/p25
12 μM GSK-3β

Bei Untersuchungen von natürlichen und synthetischen Derivaten des Hymenialdisins konnte bisher kein aktiverer Inhibitor identifiziert werden. Erwähnenswerte Ergebnisse wurden nur von Dibromocantharellin (**105**) und Hymenidin (**106**) berichtet. Dibromocantharellin hemmt GSK-3β mit einer IC₅₀ von 3 μM, während andere Kinasen praktisch nicht beeinflusst werden. Hymenidin wirkt auf CDK5/p25 mit einer IC₅₀ von 4 μM, auf GSK-3β mit einer IC₅₀ von 12 μM, während bei CDK1/Cyclin B praktisch keine Wirkung zu finden war.

Hymenialdisin bewirkt durch die Hemmung von CDK5/p35 eine verminderte Phosphorylierung der neuronalen Kinase PAK1. Die IC₅₀-Werte für die Hemmung von CDK5/p35 lagen zwischen 10 und 100 nM in vitro. Bei Experimenten an Kulturen von Neuronen aus Rattenembryonen wurden diese Beobachtungen bestätigt. Neben erhöhter PAK1-Aktivität durch die CDK5/p35-Hemmung kam es zu einem Anstieg von p35.

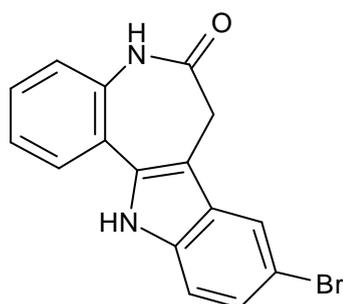
Eine Röntgenstrukturanalyse von Hymenialdisin im Komplex mit CDK2 ergab, dass das Pyrroloazepinsystem eine kleine, hydrophobe Tasche ausfüllt (aus Ile10, Val18, Ala31, Val64, Phe80 und Leu134) und die meisten van der Waals-Interaktionen mit dem Enzym von diesem Teil des Inhibitors ausgehen. Außerdem bildet das Pyrroloazepinsystem drei der vier direkten Wasserstoffbrückenbindungen, nämlich eine zwischen dem N1 des Pyrrols und dem Carbonylsauerstoffatom von Leu83, eine weitere zwischen dem Carbonylsauerstoffatom des Azepins und dem Leu83-NH, eine dritte zwischen dem Azepinstickstoffatom und dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Glu81. Weitere Wechselwirkungen geht der Bromsubstituent des Pyrroloanellanden ein. Zum Teil liegt er zwar außerhalb der Bindungsstelle und ist dem Lösungsmittel

ausgesetzt, aber andererseits findet man auch eine gewisse Nähe zu den Carbonylsauerstoffatomen von Ile10 und His84 sowie zu den Seitenketten von Ile10 und Leu134. Ein Hymenialdisinderivat ohne diesen Bromsubstituenten (nicht abgebildet) zeigt deutlichen Wirkungsverlust. Schließlich beinhaltet der Kontakt zum Enzym noch van der Waals Kräfte zwischen der zyklischen Guanidinstruktur und der Seitenkette von Val18. Wasserstoffbrückenbindungen findet man auch zwischen N5 derselben Struktur und einem Sauerstoffatom der Seitenkette von Asp145, neben zwei weiteren Wasserstoffbrückenbindungen über Wassermoleküle. Durch Vergleich von Kristallen von CDK2-Hymenialdisin-Komplexen mit CDK2-Kristallen mit oder ohne eingelagertem ATP konnte festgestellt werden, dass die Konformation der CDK2 sich durch Bindung von Hymenialdisin nicht stark verändert. Eine Ausnahme bildet hierbei nur die am Schluss genannte Aminosäure Asp145, welche durch den Inhibitor deutlich bewegt wird.

Einerseits ähnelt die Ausrichtung des bizyklischen Ringsystems mit zwei gemeinsamen Brückenbindungen zum Enzym (Carbonylsauerstoffatom von Glu81, Leu83-NH), die auch bei Flavopiridol (**1**) und Staurosporin (**40**) vorkommen, der von ATP (**4**), andererseits findet man bei Hymenialdisin aber noch eine dritte Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoffatom von Leu83. Olomoucine (**7**), Roscovitin (**8**) und Staurosporin weisen zwar auch diese dritte Wasserstoffbrückenbindungen auf, allerdings sind bei diesen Inhibitoren nicht alle drei Wasserstoffbrückenbindungen ebenso stark ausgeprägt wie es bei Hymenialdisin der Fall ist.

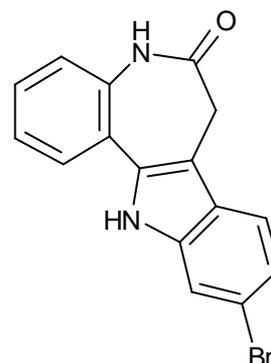
Von den bisher mit CDK2 kristallisierten Inhibitoren beanspruchen nur Flavopiridol und Staurosporin ebenfalls die Region, in der die zyklische Guanidinstruktur von Hymenialdisin bindet.¹⁹

Paullone



Kenpaullon (**2**)

| | | |
|--------------------|---------------------|----------------|
| K_i : | 2.5 μM | CDK1/Cyclin B |
| IC_{50} : | 0.40 μM | CDK1/Cyclin B |
| | 7.5 μM | CDK2/Cyclin E |
| | 0.68 μM | CDK2/Cyclin A |
| | > 100 μM | CDK4/Cyclin D1 |
| | 0.85 μM | CDK5/p25 |
| | 0.023 μM | GSK-3 β |
| | 20 μM | erk1 |
| | 9 μM | erk2 |
| | 20 μM | CK2 |
| | 15 μM | cSrc-Kinase |
| | > 100 μM | PKC β 2 |



10-Bromopaullon (**107**)

| | | |
|--------------------|--------------------|---------------|
| IC_{50} : | 1.3 μM | CDK1/Cyclin B |
| | 4.0 μM | CDK2/Cyclin E |
| | 3.0 μM | CDK2/Cyclin A |
| | 4 μM | CDK5/p25 |
| | 0.14 μM | GSK-3 β |
| | 88 μM | erk1 |
| | 100 μM | erk2 |
| | 0.8 μM | CK2 |
| | 0.8 μM | PKC β 2 |

Bei den Paullonen handelt es sich um 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-one, welche in unterschiedlichen Positionen substituiert sein können.

Die Leitstruktur der Paullone (**2**) wurde am Anfang der neunziger Jahre synthetisiert⁵ und später Kenpaullon genannt.⁶ Kenpaullon wurde vom NCI im Zelllinienscreening an 60 Tumorzelllinien getestet (NCI Human Tumor Cell Line Anti-Cancer Drug Screen, siehe Kapitel 10.3.3) und erbrachte eine durchschnittliche GI_{50} von 42 μM .⁸⁴ Bei der Durchführung einer COMPARE-Analyse mit Flavopiridol (**1**) als Referenzsubstanz sollten Verbindungen gefunden werden, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Flavopiridol aufweisen, also ebenfalls CDK-inhibitorische Aktivität haben. Unter den 6 Substanzen aus der Datenbank, die einen Korrelationskoeffizienten > 0.60 aufwiesen, war auch Kenpaullon, welches daraufhin an CDK getestet und weiterentwickelt wurde. Kenpaullon erwies sich als ein ATP-kompetitiver Inhibitor von CDK1/Cyclin B ($\text{IC}_{50} = 0.4 \mu\text{M}$, $K_i = 2.5 \mu\text{M}$). Bei weiteren Untersuchungen wurde eine Selektivität für CDK1, 2 und 5 sowie GSK-3 β

gefunden, welche Kenpaullon deutlich von Flavopiridol unterscheidet. Kenpaullon hemmt CDK1, CDK2 und CDK5 mit IC_{50} -Werten von 0.68 bis $7.5 \mu M^{84}$ und sogar noch stärker GSK-3 β mit einer IC_{50} von $0.023 \mu M^7$, während es bei CDK4 und einer Vielzahl anderer Kinasen eine IC_{50} von $100 \mu M$ oder mehr aufweist. In geringerem Umfang beobachtet man noch eine Hemmung von erk1, erk2, CK2 und cSrc-Kinase mit IC_{50} -Werten zwischen 9 und $20 \mu M^{84}$.

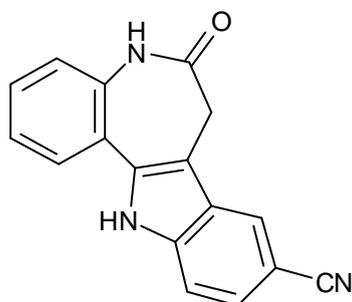
Um die Positionen im Paullonmolekül zu finden, an welchen strukturelle Veränderungen keine Wirkungseinbußen nach sich ziehen und gleichzeitig Substituenten oder Abwandlungen zu finden, die positive Einflüsse auf die Aktivität ausüben, wurden verschiedene Derivate synthetisiert. Dieser Prozess ist noch nicht abgeschlossen. Ein Teil der Modifikationen ist Grundlage dieser Arbeit und wird im späteren Abschnitt genauer behandelt.

Substitutionen in 4-, 5- oder 12-Position führten zu abnehmender Aktivität bei CDK1, ebenso wie die Änderung der Lactamfunktion in ein Thiolactam, einen Thiolactimether oder ein Hydroxyamidin.⁹ Die formale Verschiebung des Bromsubstituenten in die Position 10 (**107**) führt zu einer Abnahme der CDK1-inhibitorischen Aktivität ($IC_{50} = 1.3 \mu M$). Dabei unterscheidet sich das Selektivitätsmuster dieser Substanz deutlich von dem für Kenpaullon beschriebenen. Es ist charakterisiert durch eine schwächere Wirkung bei CDK1, 2 und 5 (IC_{50} zwischen 1.3 und $4.0 \mu M$) und z.B. einer IC_{50} von $0.8 \mu M$ bei CK2 und PKC $\beta 2^{9,84}$.

Substituenten mit +M- oder +I-Effekt in Position 9 schwächen die inhibitorische Aktivität ab. An dieser Stelle wirken sich hydrophile Reste mit elektronenziehendem -M-Effekt ähnlich positiv aus wie eine 2,3-Dimethoxysubstitution.⁹ Eine Kristallstruktur von einem Paullon im Komplex mit CDK2 existiert zur Zeit noch nicht. Allerdings wurde eine energieminierte Struktur von Kenpaullon in einer Docking-Studie in die ATP-Tasche von CDK2 eingepasst.⁸⁴ Daneben wurde anhand der Kristallstruktur von CDK2 ein Modell von CDK1 entwickelt, welches für die Untersuchung von quantitativen Strukturaktivitäts-Beziehungen (3D-QSAR) der Paullone verwendet wurde.⁵⁵

Nach diesem Modell liegt Kenpaullon sandwichartig zwischen den hydrophoben Seitenketten von Ile10 und Leu134, ähnlich wie Olomoucine (**7**), Roscovitine (**8**) und Purvalanol B (**14**). Der D-Ring befindet sich in einer hydrophoben Tasche aus Val18, Phe80, Ala144 und z.T. aus Lys33 und übernimmt damit den Platz, welcher vom N9-Isopropylsubstituenten einiger Purinderivate eingenommen wird. Zwei wichtige Wasserstoffbrückenbindungen bestehen zwischen dem

Carbonylsauerstoffatom sowie der NH-Gruppe von Leu83 und der Lactam-NH-Gruppe sowie dem Lactam-Carbonylsauerstoffatom von Kenpaullon. Das Lactam-Carbonylsauerstoffatom von Kenpaullon ist im Modell deckungsgleich mit dem N7 von Roscovitin. Das Lactam-NH von Kenpaullon entspricht dabei dem C6-NH von Roscovitin. Eine Wasserstoffbrückenbindung ist denkbar zwischen einem Wassermolekül (H₂O539) und dem Substituenten in 9-Position des Paullons, sofern dieser in der Lage ist, daran mitzuwirken. Da Kenpaullon nur einen geringen Anteil der Ribosetasche und der Phosphatbindungsstelle der ATP-Spalte der CDK einnimmt, wäre eine Ausdehnung der Paullonstruktur in diese Bereiche sicherlich von Vorteil.^{8,9,55,84}

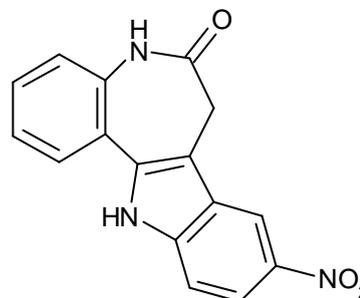


108 (9-Cyanopaullon)

IC₅₀: 0.024 μM CDK1/Cyclin B

0.044 μM CDK5/p25

0.010 μM GSK-3β



Alsterpaullon (3)

IC₅₀: 0.035 μM CDK1/Cyclin B

0.200 μM CDK2/Cyclin E

0.015 μM CDK2/Cyclin A

> 10.000 μM CDK4/Cyclin D1

0.040 μM CDK5/p25

0.004 μM GSK-3β

22.000 μM erk1

4.500 μM erk2

7.000 μM PKA

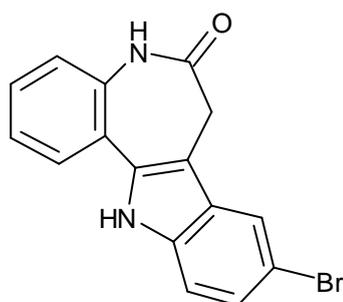
Eine Verbindung, welche aus den Ergebnissen der QSAR-Untersuchung erwachsen ist, ist das 9-Cyanopaullon **108**. Dieses erbrachte wie erhofft, eine deutliche Aktivitätssteigerung. Es weist IC₅₀-Werte von 10 bis 44 nM bei CDK1, CDK5 und GSK-3β auf. Interessanterweise fehlt diesem Derivat die in vitro Antitumoraktivität, welches durch einen MG_MID-Wert (Meangraph Midpoint*) von -4.1 deutlich wird.⁹ Aufgrund der ähnlichen elektronischen

* Zu MG_MID siehe Kapitel 10.3.3.

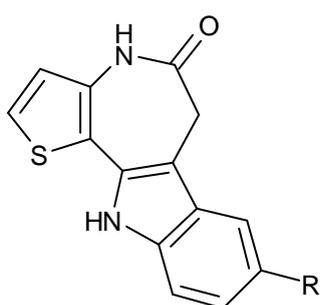
Eigenschaften wurde Alsterpaullon (**3**) (9-Nitropaullon) synthetisiert, welches sowohl einen Anstieg der CDK-inhibitorischen Aktivität verglichen mit Kenpaullon aufweist, als auch eine dementsprechende Wirkungssteigerung im Zellinientest. Die IC_{50} -Werte bei CDK1, CDK5 und GSK-3 β liegen zwischen 4 und 40 nM. Vergleichsweise schwach aktiv ist Alsterpaullon bei erk1, erk2 und PKA. Bei CDK4 und einer Reihe anderer Kinasen wurden nur IC_{50} -Werte $> 10 \mu\text{M}$ gefunden.^{7,9} Im NCI-Zellinienenscreening resultierte ein MG_MID-Wert von -6.4. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Alsterpaullon vom NCI für präklinische Untersuchungen als Antitumor-Wirkstoff ausgewählt.⁹

4 Modifikationen am heterozyklischen Grundgerüst der Paullone

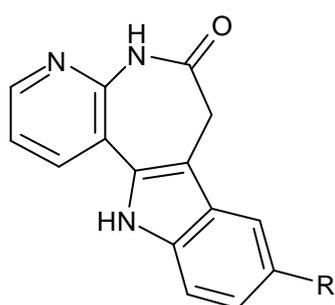
Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Abwandlung des heterozyklischen Grundgerüsts von Kenpaullon (**2**) zur weiteren Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Aus diesem Grund wurden die folgenden drei Heterozyklen synthetisiert, von denen das 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on (**109**) schon von C. Kunick beschrieben wurde.⁵ Bei dem 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**110**) und dem 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**111**) handelt es sich um Vertreter bisher nicht aus der Literatur bekannter heterozyklischer Ringsysteme.



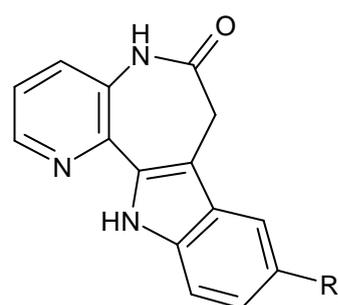
Kenpaullon (**2**)



109

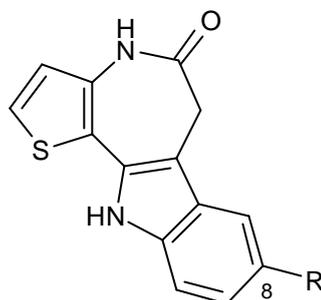


110



111

4.1 In Position 8 substituierte 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-one

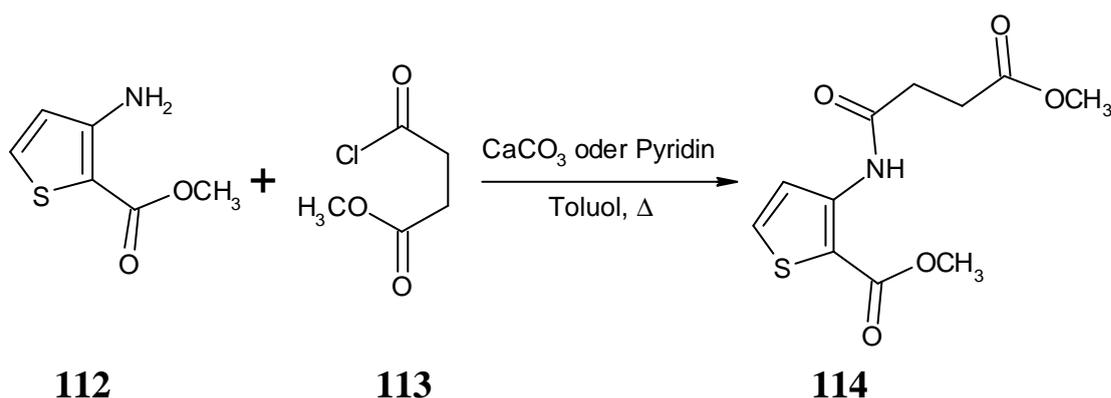


109

109a R = H

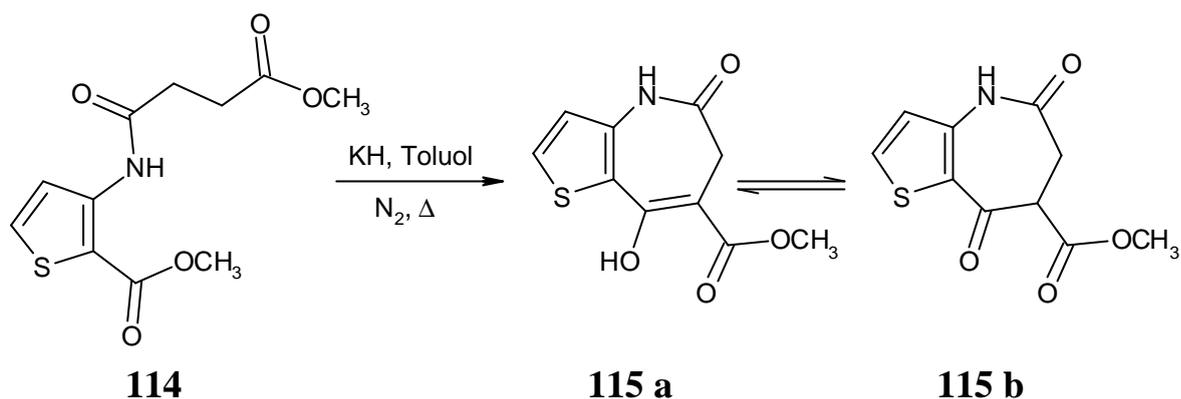
Die Synthese des unsubstituierten 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-ons (**109a**, R = H) wurde erstmals von C. Kunick beschrieben.^{5,85} Die Darstellung geht hierbei von 3-Aminothiophen-2-carbonsäuremethylester (**112**) aus, welcher kommerziell erhältlich ist. Dieser wird mit Bernsteinsäuremethylesterchlorid (**113**) zum 3-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]thiophen-2-carbonsäuremethylester (**114**) umgesetzt. Die Reaktion läuft in Toluol unter Zusatz von Calciumcarbonat⁸⁵ oder Pyridin ab.⁸⁶ (Schema 4-1)

Schema 4-1



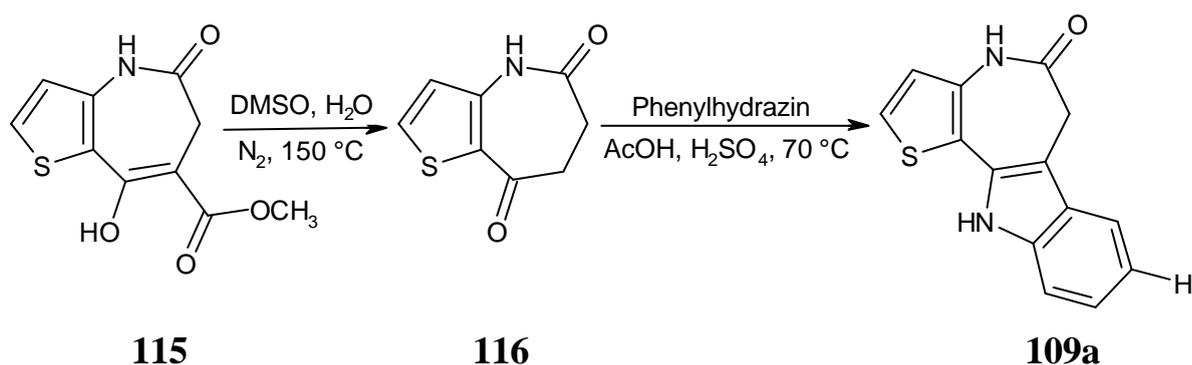
Durch eine Dieckmann-Reaktion mit Kaliumhydrid wird ein Ringschluss zum 5,8-Dioxo-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-7-carbonsäuremethylester (**115b**) erreicht, welcher zu einem Teil in der angegebenen tautomeren Enolform (**115a**) vorliegt.⁸⁵ (Schema 4-2)

Schema 4-2



Der Ester **115** reagiert in einer Dealkoxycarbonylierungsreaktion in wasserhaltigem Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**).⁸⁵ In einer Fischer-Indol-Reaktion wird letzteres mit Phenylhydrazin in Eisessig zu 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on (**109a**) umgesetzt.⁵ Die Bildung des Indols beginnt in der Regel, sobald eine katalytische Menge konzentrierte Schwefelsäure zu dem Reaktionsgemisch gegeben wird. (Schema 4-3) Für Paullonderivate hat sich diese Methode schon mehrfach bewährt, sowohl beim unsubstituierten thienoanellierten Paullon (**109a**) als auch bei zahlreichen 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen wie Kenpaullon (**2**).^{5,6,8,9}

Schema 4-3



4.1.1 8-Phenylhydrazone-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-one

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) mit verschiedenen in Position 4 substituierten Phenylhydrazinen (**117a-d**) zu Paullonderivaten umgesetzt. Dabei wurden nach Möglichkeit auch die intermediär entstehenden Hydrazone isoliert. Hierzu wurde nach vollständiger Umsetzung des Ausgangsmaterials (**116**) in Wasser gegossen, ohne dass Schwefelsäure zur Katalyse der Indolisierung zugesetzt wurde. (Schema 4-4) Diese Methode wurde schon erfolgreich von C. Schultz zur Isolierung einiger benzoanaloger Verbindungen angewandt.⁸ Die isolierten Phenylhydrazone **118a-d** sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Schema 4-4

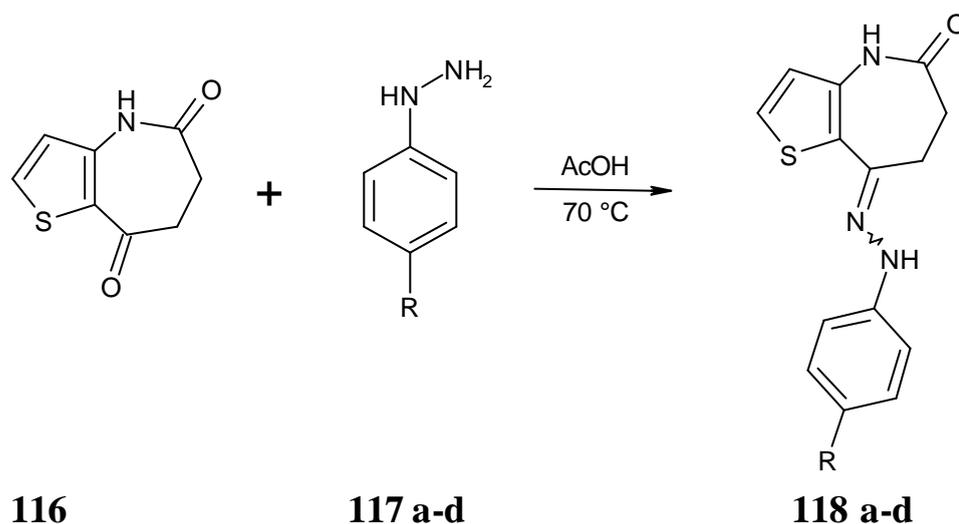


Tabelle 4-1: Synthetisierte 8-Phenylhydrazone-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-one (**118a-d**)

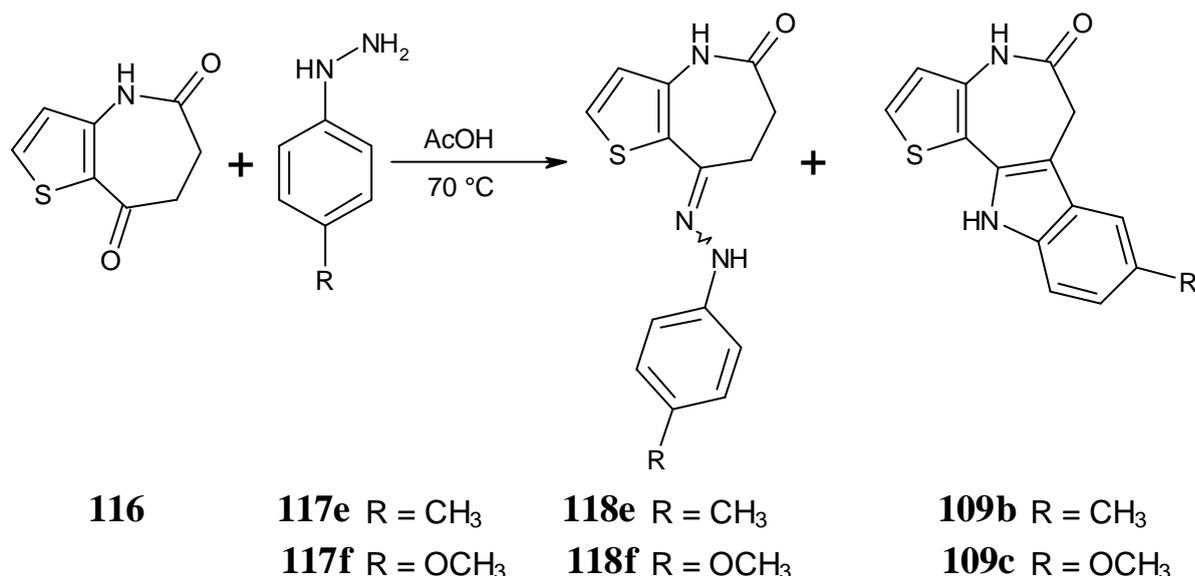
| 118 | R |
|------------|-----------------|
| a | CF ₃ |
| b | NO ₂ |
| c | Br |
| d | Cl |

Im Falle der trifluormethyl- (**118a**) und nitrosubstituierten (**118b**) Verbindungen wurden die entsprechenden Phenylhydrazine (**117a** und **b**) als freie Basen

zusammen mit der Zwischenstufe **116** umgesetzt. Bei den anderen hier genannten Verbindungen waren die entsprechend substituierten Phenylhydrazin-Hydrochloride das Ausgangsmaterial, wobei die entsprechenden Basen jeweils in situ durch Zugabe von Natriumacetat freigesetzt wurden.

Versuche zur Gewinnung eines am Phenylrest methoxy- bzw. methyl-substituierten Phenylhydrazons gelangen unter diesen Bedingungen nicht, da eine Umsetzung zu den entsprechenden Indolen **109b** und **109c** einsetzte, bevor das Edukt **116** verbraucht war, so dass nur jeweils ein Gemisch aus Phenylhydrazon und Indol gewonnen wurde. (Schema 4-5) Eine Trennung der Produkte zur Isolierung der Hydrazone **118e** und **118f** wurde nicht versucht, da letztere keine nennenswerte CDK-inhibitorische Aktivität erwarten ließen.

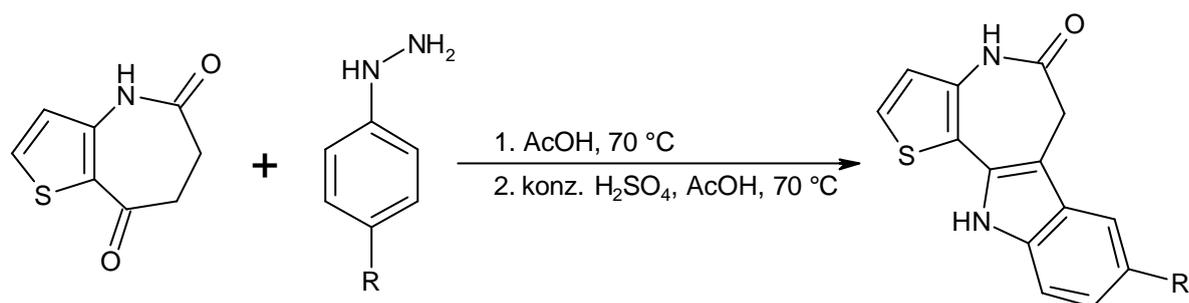
Schema 4-5



4.1.2 Darstellung der 6,11-Dihydro-thieno[3':2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-one

Entsprechend der genannten Fischer-Indol-Synthese in Eisessig unter Schwefelsäurezusatz wurden **109b**, **109d** und **109e** gewonnen, bei **109c** war keine Schwefelsäure zur vollständigen Indolisierung nötig. (Schema 4-6)

Schema 4-6



116

117e R = CH₃

117f R = OCH₃

117c R = Br

117d R = Cl

109b R = CH₃

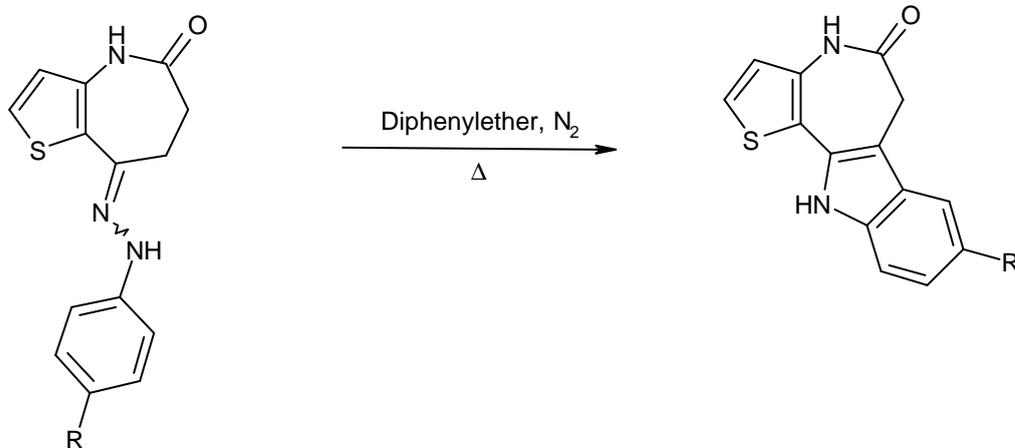
109c R = OCH₃

109d R = Br

109e R = Cl

Zielverbindungen mit einem Trifluormethyl- (**109f**) oder Nitrosubstituenten (**109g**) in Position 8 konnten durch die genannte säurekatalysierte Reaktion nicht dargestellt werden, da in diesen beiden Fällen nicht das gewünschte Indol, sondern bevorzugt ein Nebenprodukt entstand (siehe Kapitel 4.1.4). Zur Gewinnung der Paullonanaloga **109f** und **109g** wurde eine Methode gewählt, die ohne Säurekatalyse auskommt und schon von C. Schultz zur Darstellung von Paullonen verwendet wurde.^{8,9} Hierbei wird das entsprechende Phenylhydrazon (hier **118a** und **118b**) in siedendem Diphenylether zyklisiert. (Schema 4-7)

Schema 4-7



118a R = CF₃

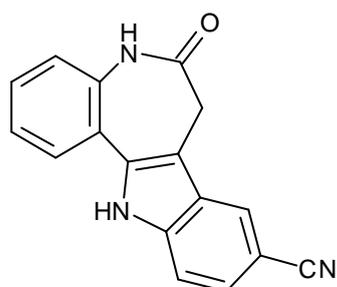
118b R = NO₂

109f R = CF₃

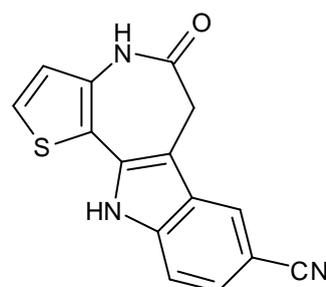
109g R = NO₂

4.1.3 Synthese von 5-Oxo-4,5,6,11-tetrahydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-8-carbonitril

6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonitril (**108**) weist mit einer IC_{50} von 24 nM eine starke inhibitorische Aktivität für CDK1/Cyclin B auf.^{8,9} Daher sollte auch das thienoanalogue Carbonitril **109h** dargestellt werden.



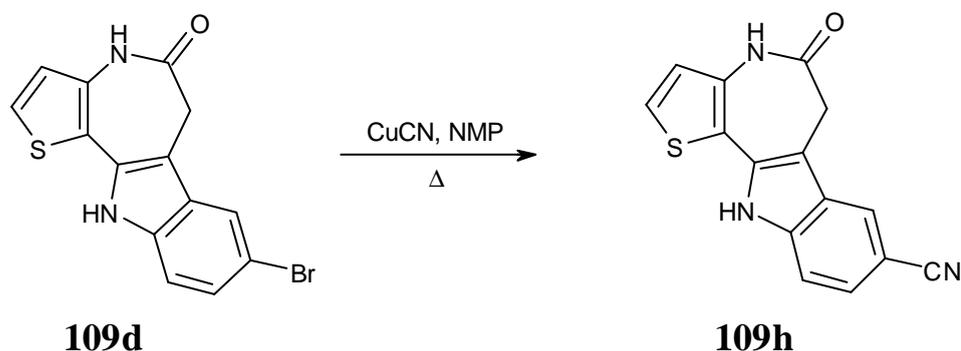
9-Cyanopauillon **108**



109h

C. Schultz beschreibt für die Synthese des Pauillons **108** eine modifizierte Rosenmund-von Braun-Reaktion, bei der ein Bromsubstituent mit Kupfercyanid in siedendem N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) durch eine Nitrilgruppe ausgetauscht wird.^{8,9} Diese Reaktion wurde von C. Schultz an unterschiedlichen Pauillonien durchgeführt und führte hier ausgehend von der Bromverbindung **109d** zum gewünschten 5-Oxo-4,5,6,11-tetrahydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-8-carbonitril (**109h**). (Schema 4-8)

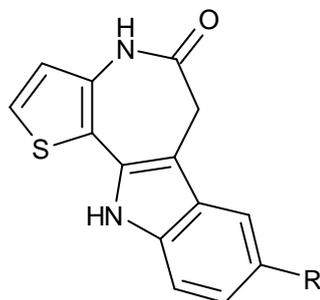
Schema 4-8



109d

109h

Tabelle 4-2 fasst die auf unterschiedliche Weise dargestellten thienoanellierten Paullonderivate (**109b-h**) zusammen.



109b-h

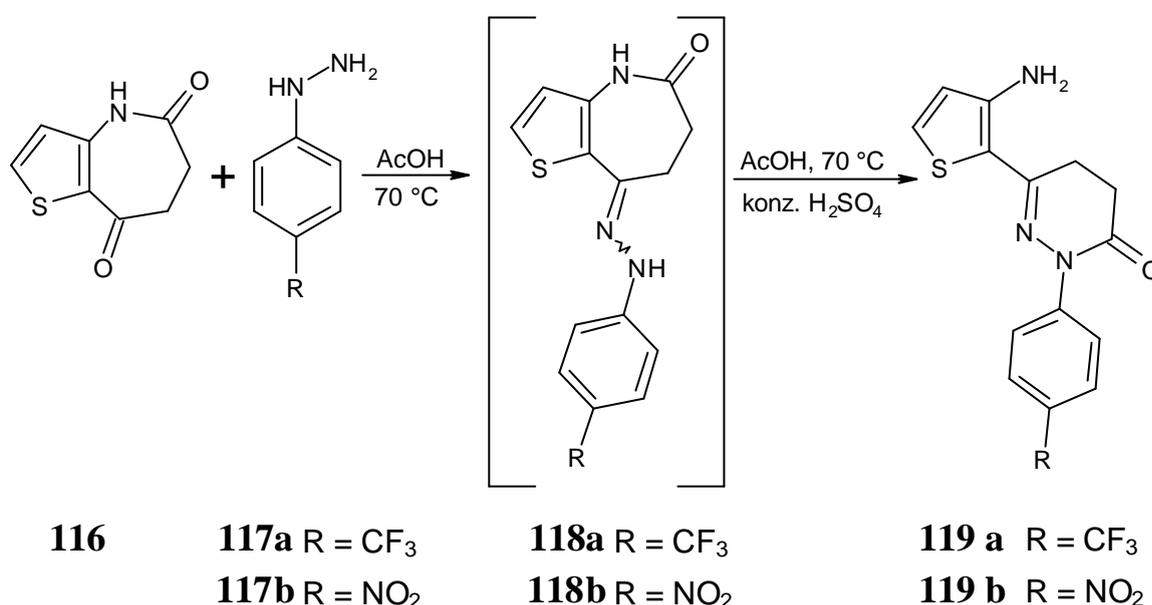
Tabelle 4-2: Synthetisierte 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-one **109b-h**

| 109 | R |
|------------|------------------|
| b | CH ₃ |
| c | OCH ₃ |
| d | Br |
| e | Cl |
| f | CF ₃ |
| g | NO ₂ |
| h | CN |

4.1.4 Darstellung von 6-(3-Amino-2-thienyl)-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-onen

Bei der Umsetzung von 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) mit 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**) oder 4-Nitro-phenylhydrazin (**117b**) in Eisessig unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure reagierten diese nicht zu den gewünschten Indolen, sondern unter Aufspaltung des Azepinrings zu den Pyridazinonderivaten **119a** und **119b**. (Schema 4-9)

Schema 4-9



Zur Beschreibung der Strukturaufklärung soll das ¹H-NMR-Spektrum des 6-(3-Amino-2-thienyl)-2-(4-nitrophenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-ons **119b** mit dem des Phenylhydrazons **118b** und dem des eigentlich gewünschten Paullonderivates **109g** verglichen werden.

Die beiden NH-Protonen des Hydrazons **118b** geben je ein Singulett bei 10.23 ppm und 10.26 ppm, während man nach Indolbildung eine Tieffeldverschiebung beider NH-Protonen beobachten kann. Das Lactam-NH von **109g** verursacht ein Singulett bei 10.48 ppm, das Indol-NH eins bei 12.32 ppm. (Bild 4-1) Im Spektrum des Pyridazinons **119b** ist dagegen bei ppm-Werten > 8.6 kein Signal zu finden (nicht abgebildet).

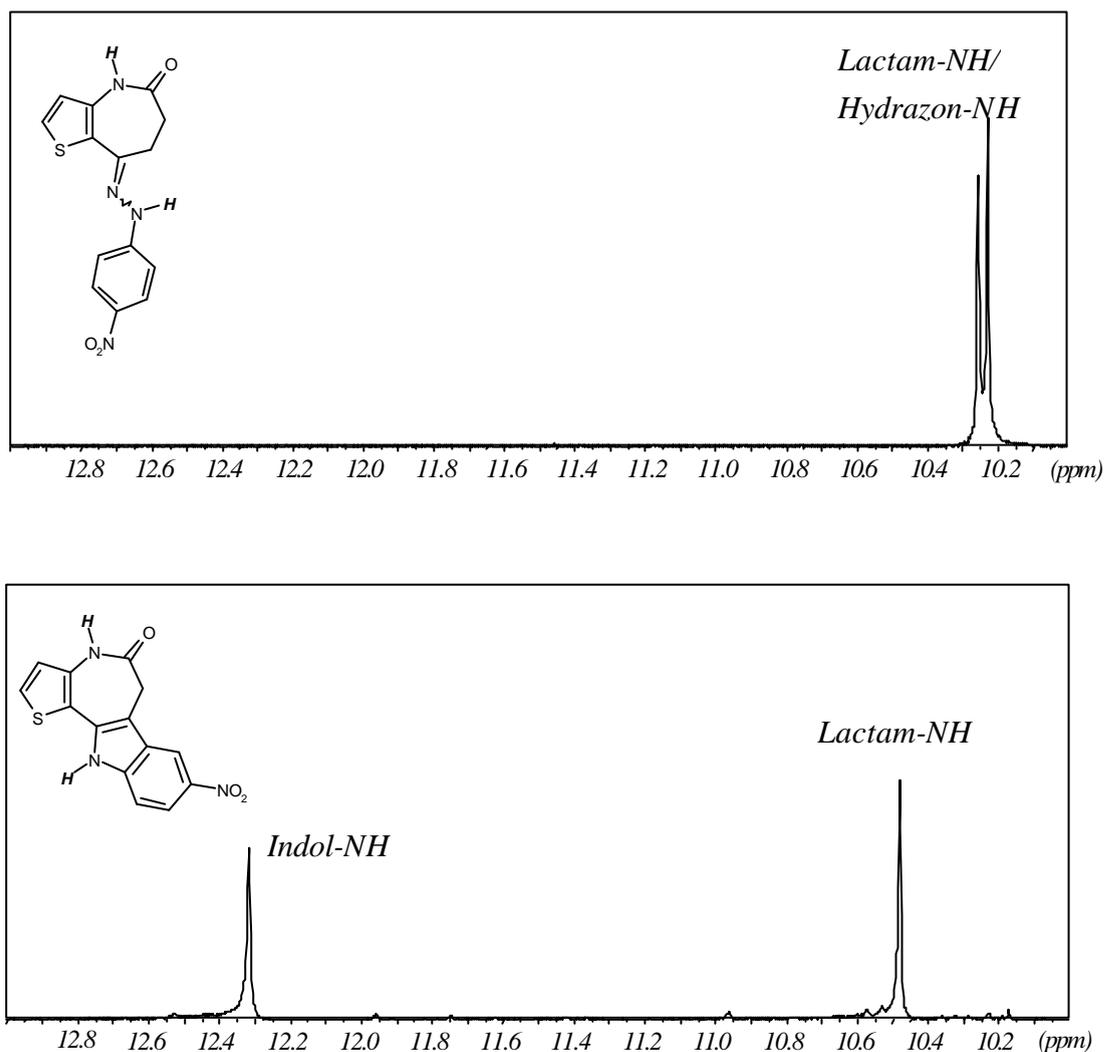


Bild 4-1: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (DMSO-d₆, 400 MHz) von den Verbindungen **118b** (oben) und **109g** (unten). Der abgebildete Ausschnitt beinhaltet den Bereich von 10.00 bis 13.00 ppm.

Typisch für das Hydrazon **118b** ist ein AA'XX'-Multiplett aus zwei symmetrischen Signalgruppen bei 2.63-2.66 ppm und 2.95-2.99 ppm für die CH₂-CH₂-Gruppierung des Lactamrings. Das Paullonderivat **109g** besitzt nur noch eine CH₂-Gruppe, zu welcher ein Singulett bei 3.67 ppm gehört. Das Pyridazinon **119b** weist wie das Hydrazon ein AA'XX'-Multiplett auf, allerdings mit anderer Peakform und Tieffeld-verschoben bei 2.73-2.77 ppm und 2.97-3.00 ppm. Das Signal bei ca. 3.3 ppm entspricht in allen drei Spektren dem im Lösungsmittel enthaltenen Wasser. (Bild 4-2)

Im aromatischen Bereich besitzt das Hydrazon **118b** zwei Dubletts für die Thienoprotonen (6.75 ppm; 7.46 ppm) und zwei dublett-ähnliche Multipletts für jeweils zwei Phenylprotonen bei 7.23 ppm und 8.14 ppm.

Die beiden Dubletts für die Thienoprotonen sind beim Paullon **109g** etwas Tieffeld-verschoben (6.97 ppm; 7.69 ppm). Die drei Protonen am Indolring ergeben je ein Signal. Ein Dublett mit einer größeren Kopplungskonstante bei 7.54 ppm entspricht dem Proton am C10, welches mit dem C9-Proton koppelt. Das Signal für das Proton am C9 ist ein doppeltes Dublett und liegt bei 8.04 ppm. Dieses weist neben der größeren Kopplungskonstante für die ortho-Kopplung mit dem C10-Proton noch eine kleinere Kopplungskonstante auf, die der meta-Kopplung zwischen C9- und C7-Proton entspricht. Für das C7-Proton beobachtet man folglich ein Dublett, welches bei 8.67 ppm liegt und eine Kopplungskonstante passend zur meta-Kopplung aufweist.

Das Spektrum des Pyridazinons **119b** enthält ebenfalls zwei Dubletts für die Thienylprotonen bei 6.73 ppm und 7.51 ppm. Ähnlich dem Hydrazon **118b** bilden die Phenylprotonen zwei Multipletts, welche hier eine Verschiebung ins tiefe Feld aufweisen (7.90 ppm; 8.30 ppm). Charakteristisch für das Pyridazinon ist vor allem ein breites Singulett bei 6.55 ppm für die aromatische NH₂-Gruppe, die aus der Aufspaltung der Lactamgruppierung des Ausgangsmaterials **116** bzw. **118b** resultiert. (Bild 4-3) Die Beweglichkeit der Aminoprotonen wird durch einen D₂O-Austausch deutlich, durch welchen das korrespondierende Signal im ¹H-NMR-Spektrum verschwindet (nicht abgebildet).

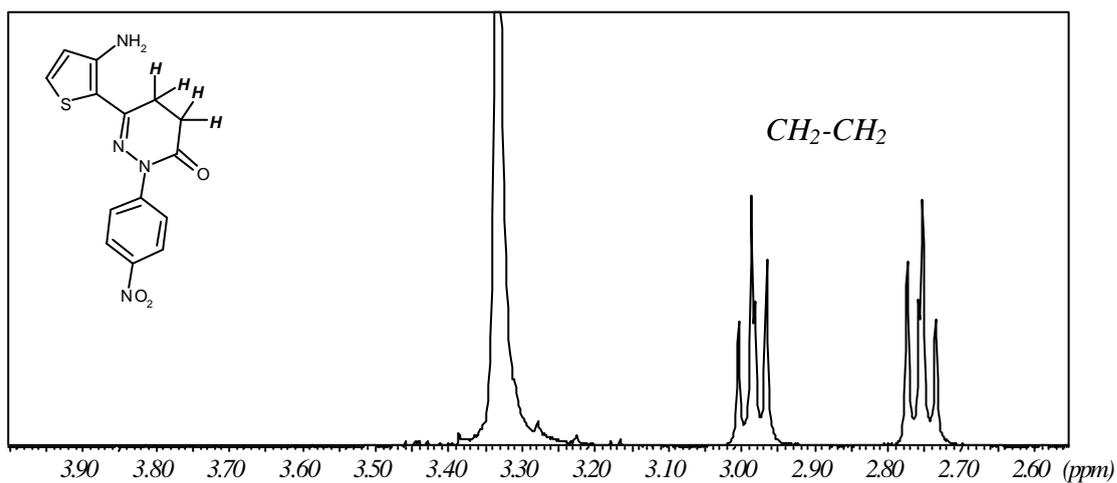
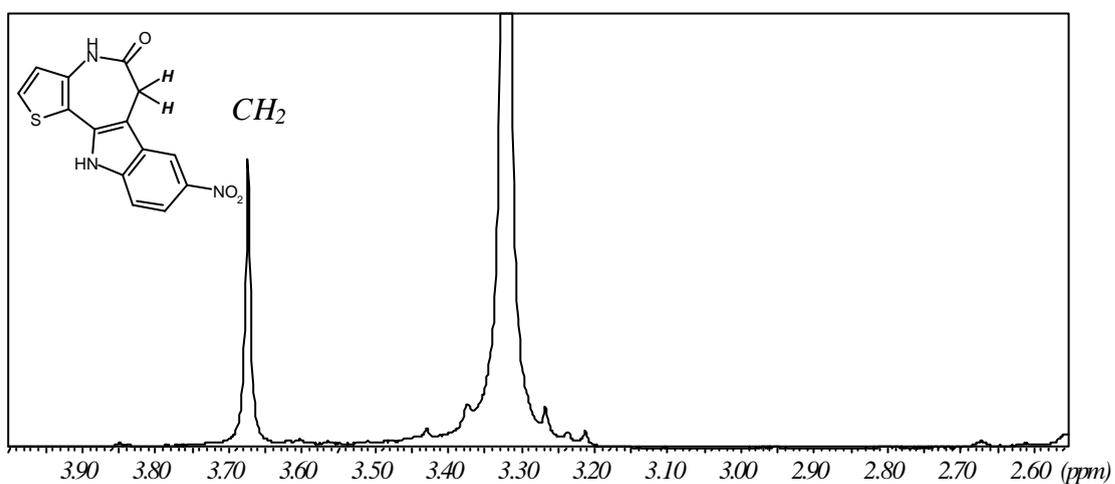
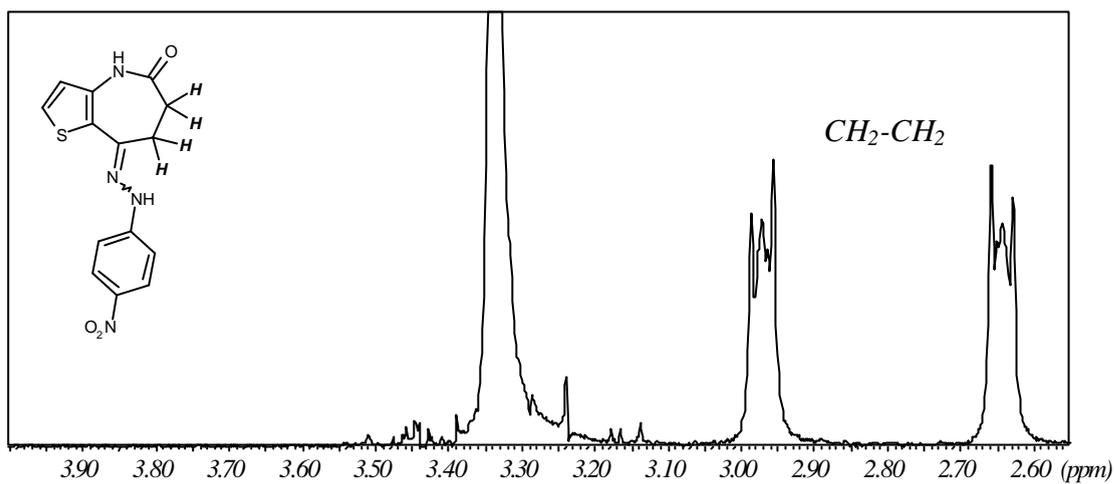


Bild 4-2: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (DMSO- d_6 , 400 MHz) von den Verbindungen **118b** (oben), **109g** (mitte) und **119b** (unten). Der abgebildete Ausschnitt beinhaltet den Bereich von 2.55 bis 4.00 ppm.

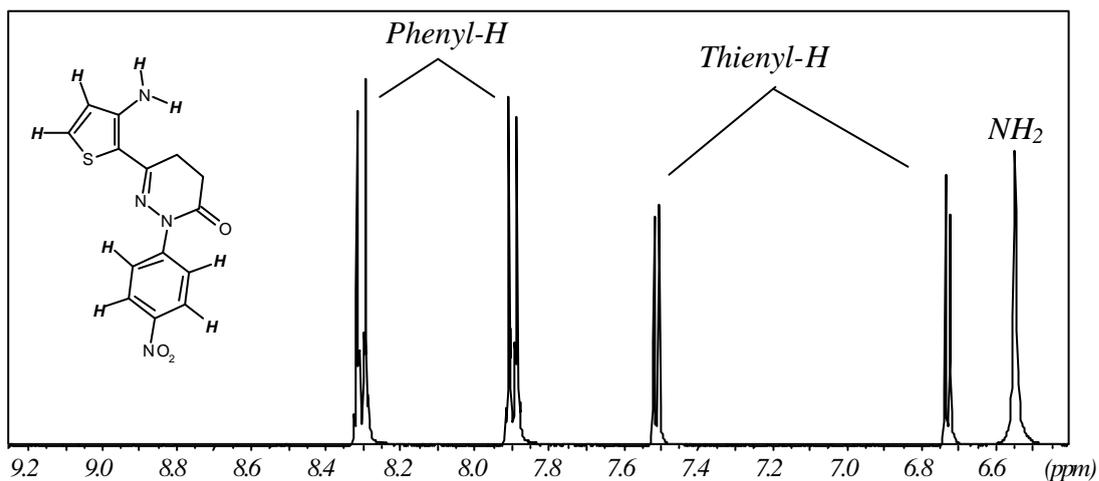
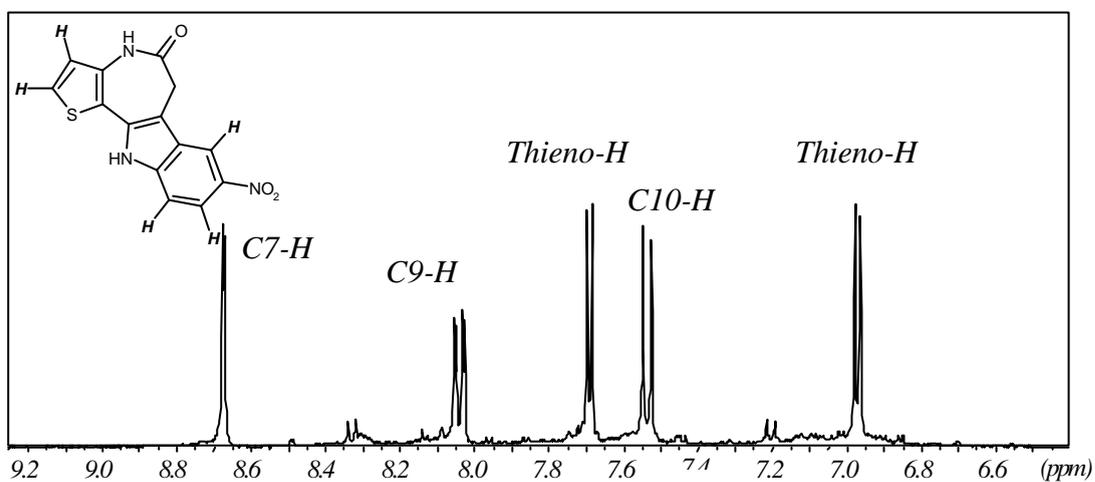
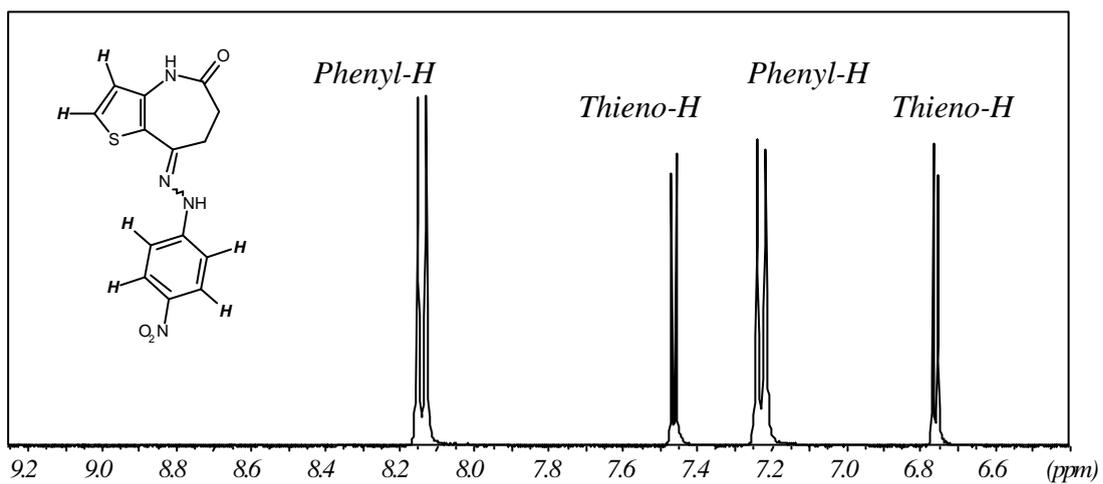
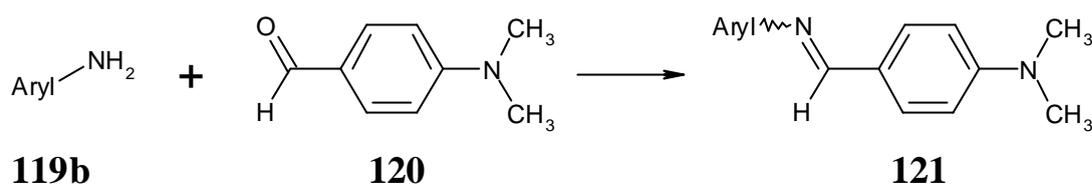


Bild 4-3: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (DMSO-d₆, 400 MHz) von den Verbindungen **118b** (oben), **109g** (mitte) und **119b** (unten). Der abgebildete Ausschnitt beinhaltet den Bereich von 6.40 bis 9.25 ppm.

Die in **119b** enthaltene aromatische Aminogruppe wurde zusätzlich durch Besprühen eines Dünnschichtchromatogramms (DCs) mit Ehrlichs Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd, **120**) nachgewiesen. Das entstehende Azomethin **121** ist leuchtend orange gefärbt. (Schema 4-10) Die Identität des Pyridazinons **119b** wurde außerdem durch ein ^{13}C -NMR- und ein IR-Spektrum sowie eine Elementaranalyse bestätigt.

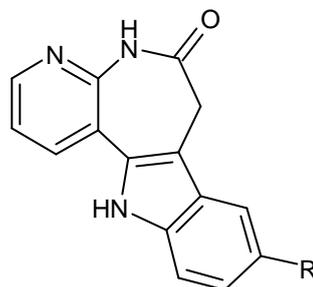
Schema 4-10



Die Ergebnisse der Versuche, die in diesem Kapitel beschrieben wurden, lassen den Schluss zu, dass die Eigenschaften der Substituenten in 4-Position der Phenylhydrazine bzw. in der entsprechenden Position der Phenylhydrazone von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der säurekatalysierten Fischer-Indol-Synthese sind. Dabei begünstigen Substituenten mit $-M$ -Effekt (NO_2 , **118b**) oder $-I$ -Effekt (CF_3 , **118a**) die Bildung eines Pyridazinonderivates, während ein Substituent mit $+M$ -Effekt (OCH_3 , **118f**; Cl , **118d**; Br , **118c**) oder $+I$ -Effekt (CH_3 , **118e**) eine Reaktion zum Indol positiv beeinflusst.

Der jeweilige Anelland des Azepins spielt dabei ebenfalls eine Rolle. Bei Phenylhydrazono-azepinonen mit unsubstituiertem Benzoanellanden ist eine säurekatalysierte Fischer-Indol-Synthese selbst bei Substitution durch eine Nitrogruppe in der entsprechenden Position möglich und führt auf diesem Weg beispielsweise zu Alsterpaullon (**3**).^{8,9} Bei Umsetzung der pyridoanellierten Paullonderivate **139** entstehen bei Trifluormethylsubstitution Pyridazinon und Indol nebeneinander, mit einem Nitrosubstituenten bildet sich nur das Pyridazinon (siehe Kapitel 4.2.3). Dagegen entstehen im Fall der thienoanellierten Derivate **118** sowohl mit einer Trifluormethyl- als auch mit einer Nitrogruppe in para-Position des Phenylrestes aus den entsprechenden Phenylhydrazonen die jeweiligen Pyridazinone. (Schema 4-9)

4.2 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-one



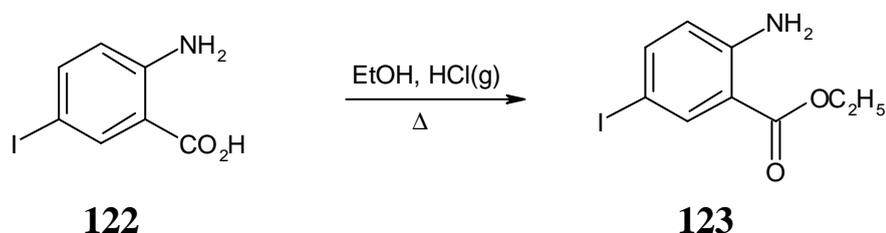
110

Der Heterozyklus **110** sollte ausgehend vom 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) nach dem gleichen Schema aufgebaut werden wie die oben beschriebenen Thienoanaloga **109b-h**.

4.2.1 Darstellung des 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dions

Da der 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) nicht kommerziell erhältlich war, musste er aus der entsprechenden 2-Aminopyridin-3-carbonsäure (**124**) synthetisiert werden. Hierzu sollte zuerst eine Veresterung unter Chlorwasserstoff-Katalyse durchgeführt werden, wie sie zum Beispiel auch von C. Schultz zur Gewinnung von 2-Amino-5-iod-benzoesäureethylester (**123**) angewandt wurde.⁸ (Schema 4-11)

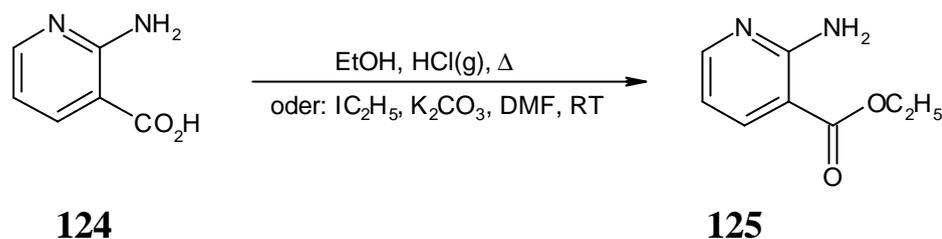
Schema 4-11



Im Falle des Pyridinderivates **125** war die benötigte Reaktionszeit mit 13 statt 7 Stunden deutlich länger. (Schema 4-12)

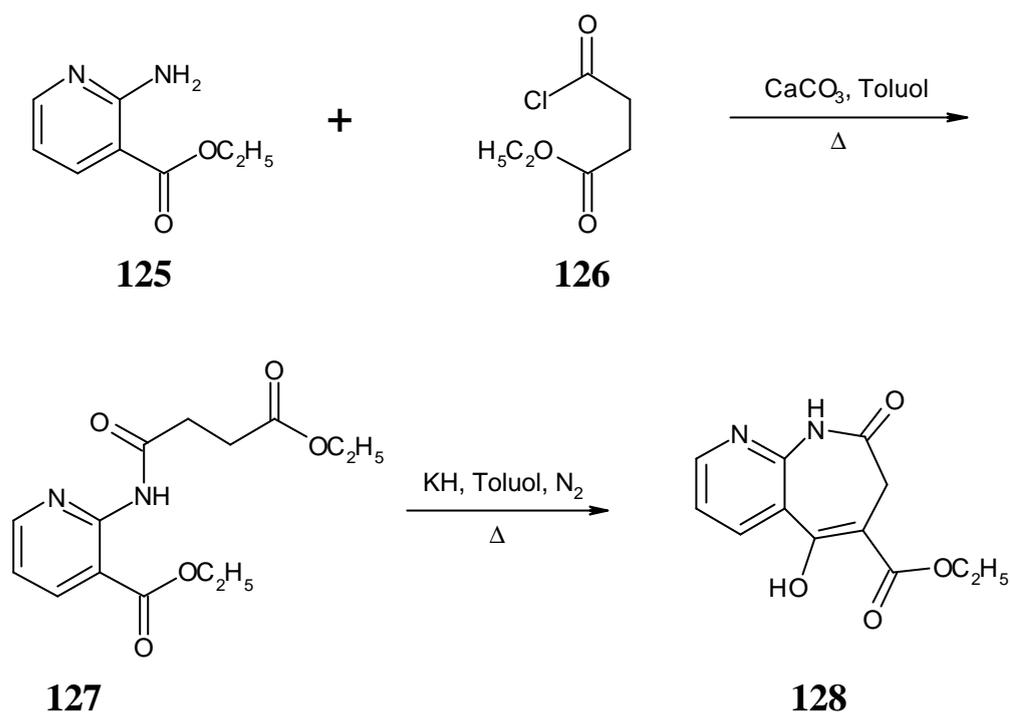
Eine weitere Methode wurde gefunden, mit der die Reaktionszeit bei gleichbleibender Ausbeute verkürzt werden konnte. Hierbei wird die entsprechende Säure (**124**) mit doppelter molarer Menge Kaliumcarbonat in N,N-Dimethylformamid (DMF) suspendiert und langsam eine äquimolare Menge Ethyliodid in DMF zugetropft. Eine denkbare Alkylierung des Pyridinstickstoffatoms wurde nicht beobachtet. (Schema 4-12)

Schema 4-12



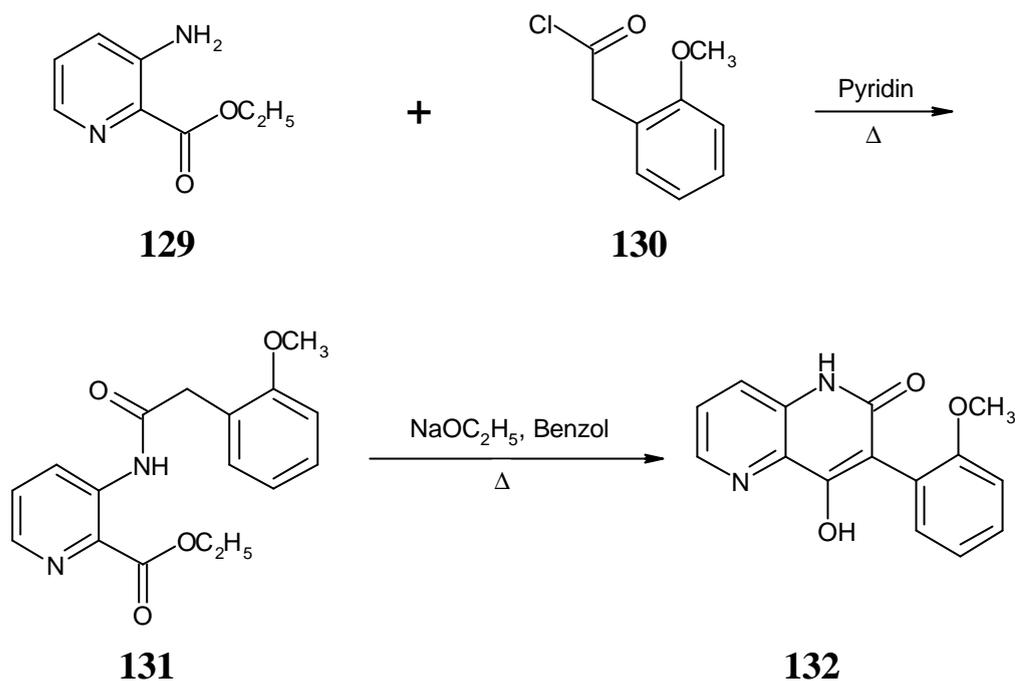
Um den 5-Hydroxy-8-oxo-8,9-dihydro-9*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-6-carbonsäureethylester (**128**) zu synthetisieren, sollte zuerst die Aminogruppe mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**126**) acyliert werden und anschließend ein bereits oben beschriebener Ringschluss mit Kaliumhydrid durchgeführt werden. Die Umsetzung mit Bernsteinsäureethylesterchlorid und Calciumcarbonat in Toluol führte zu einem Öl, welches aus mehreren Komponenten bestand. Hauptkomponente war der gewünschte 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**127**). Aus diesem ungereinigten rohen Öl konnte die angestrebte Zwischenstufe **128** durch Dieckmann-Zyklisierung in geringer Ausbeute (7 %) erhalten werden. (Schema 4-13) Als Teilschritt einer mehrstufigen Synthesesequenz erschien diese Methode ungeeignet.

Schema 4-13

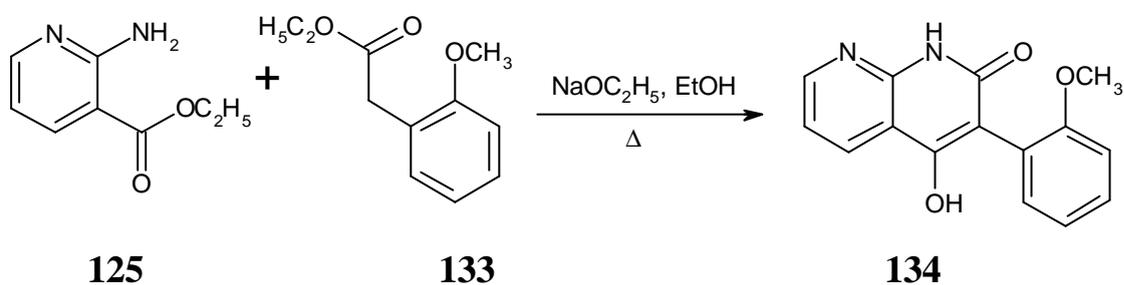


Ähnliche Schwierigkeiten bei der Acylierung der Verbindung **125** wurden schon zuvor von J. Chen und W. Steglich beobachtet.⁸⁷ In den von ihnen beschriebenen Versuchen geht es um die Bildung eines Amids aus 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) bzw. 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**129**) mit 2-Methoxyphenylethylsäurechlorid (**130**) und die anschließende Zyklisierung. Die Autoren stellten fest, dass 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester mit dem 2-Methoxyphenylethylsäurechlorid (**130**) acyliert werden kann und der gewünschte Ringschluss durch Einwirken von Natriumethanolat möglich ist. (Schema 4-14) Eine entsprechende Reaktion mit 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) lief dagegen nicht ab. Dagegen führte die direkte Umsetzung von **125** mit 2-Methoxyphenylethylsäureethylester (**133**) und Natriumethanolat in Ethanol zur Gewinnung der Zielsubstanz **134** in einem Syntheseschritt. (Schema 4-15)

Schema 4-14



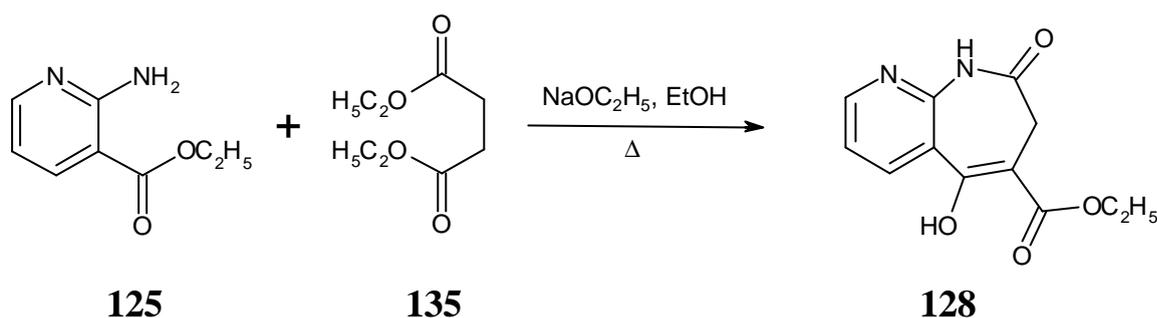
Schema 4-15



Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen, die während der Erstellung der vorliegenden Arbeit bei Umsetzung mit den hier verwendeten Acylkomponenten gemacht wurden. Anstelle der Phenyllessigsäureabkömmlinge **130** und **133** wurden hier die Bernsteinsäurederivate **126** und **135** verwendet. Die Umsetzung von 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**129**) wird in Kapitel 4.3.2 näher erläutert.

Mit dem 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) wurde entsprechend der von J. Chen und W. Steglich beschriebenen Methode⁸⁷ eine direkte Zyklisierung mit Bernsteinsäurediethylester (**135**) durchgeführt. (Schema 4-16)

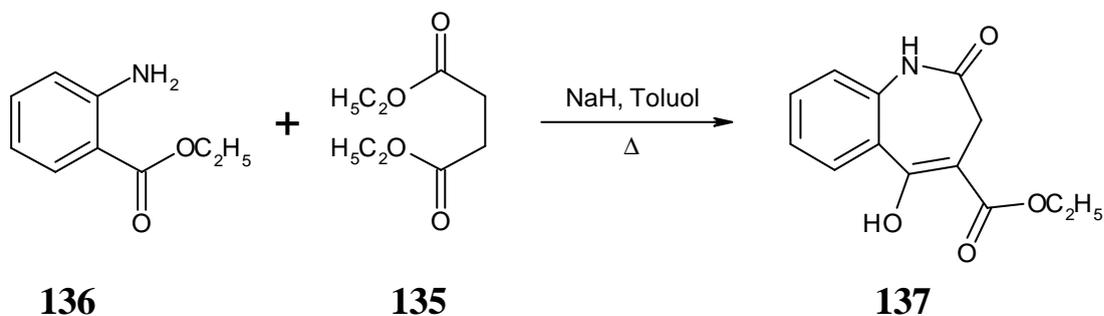
Schema 4-16



Die Verwendung von Natriumethanolat führte allerdings nicht zu den erhofften Ausbeuten an Verbindung **128**, so dass der Einsatz von Natriumhydrid vorgezogen wurde.

H.B. MacPhillamy et al. beschreiben eine direkte Zyklisierung von Anthranilsäureethylester (**136**) mit Bernsteinsäurediethylester in Gegenwart von Natriumhydrid in Toluol.⁸⁸ (Schema 4-17) Zur Umsetzung des Anthranilsäureesters wurden in der zitierten Vorschrift die angegebenen Komponenten zusammengegeben, refluxiert und nach dem Abkühlen mit Salzsäure angesäuert. Das Produkt **137** lag danach als Niederschlag vor.⁸⁸

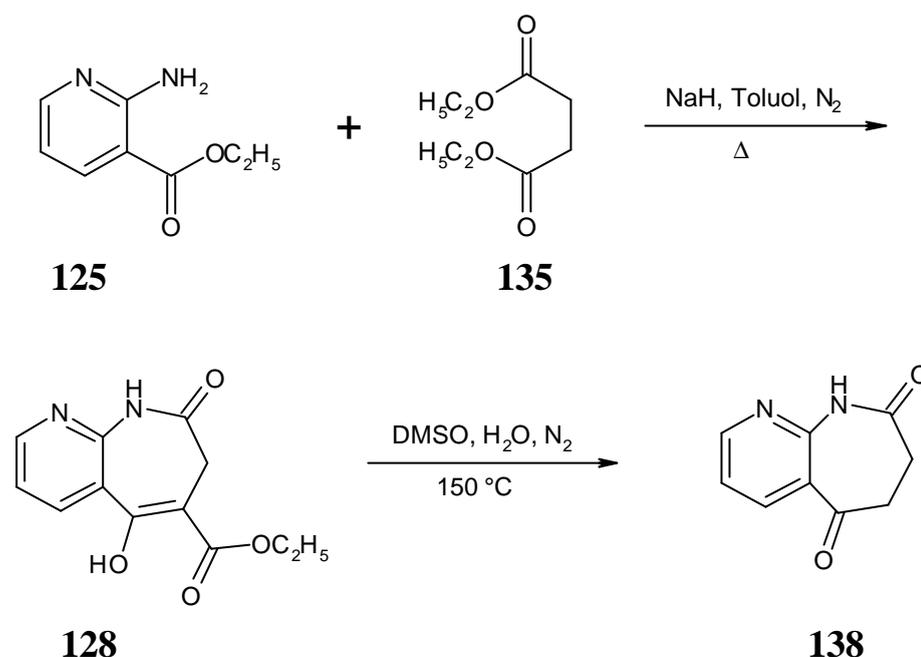
Schema 4-17



Diese Versuchsbeschreibung diente als Vorlage für die Methode, die zur Synthese der enolischen Verbindung **128** in ausreichender Menge führte. Im Falle des 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylesters (**125**) erwies es sich als vorteilhafter, eine Lösung der beiden Edukte in Toluol zu einer heißen Suspension von Natriumhydrid in Toluol zuzutropfen, um eine zweifache Acylierung an der Aminogruppe zu verhindern. Anschließend wurde mit Essigsäure angesäuert, um das Produkt als Niederschlag abtrennen zu können.

Die so gewonnene Substanz **128** wurde einer Dealkoxycarbonylierung unterzogen, indem in wasserhaltigem Dimethylsulfoxid erhitzt wurde. Dieser Schritt führte zum 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**). (Schema 4-18)

Schema 4-18



4.2.2 5-Phenylhydrazono-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-8-one

Im nächsten Syntheseschritt auf dem Weg zum Paullonderivat sollten verschiedene Phenylhydrazine mit 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) zu Hydrazonen umgesetzt werden. Dies gelang mit 4-Brom-, 4-Chlor-phenylhydrazin-Hydrochlorid sowie 4-Nitro- und 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin. (Schema 4-19)

Da die methyl- und methoxysubstituierten Derivate zu schnell einer Indolisierung unterlagen, ohne dass konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt wurde, wurden die korrespondierenden Hydrazone nicht isoliert. Entsprechendes wurde im Abschnitt über die thienoanellierten Substanzen **109b** und **109c** beschrieben. Die isolierten und charakterisierten Phenylhydrazone **139a-d** sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Schema 4-19

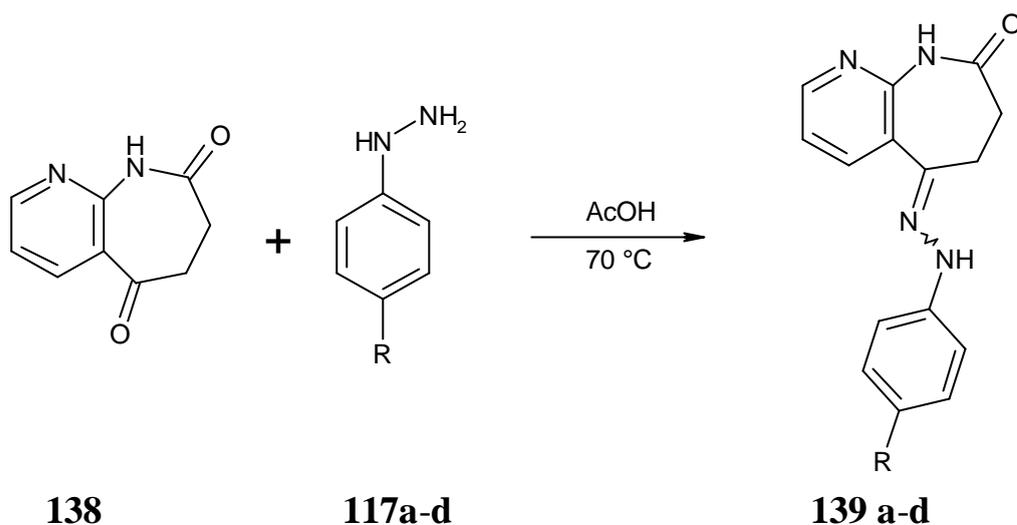


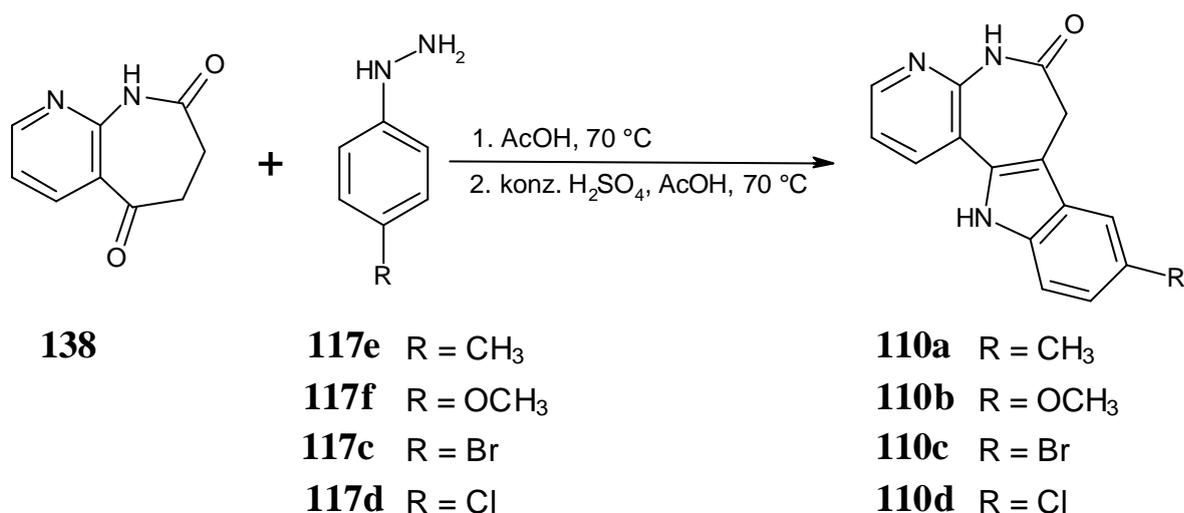
Tabelle 4-3: Synthetisierte 5-Phenylhydrazone-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido-
[2,3-*b*]azepin-8-one (**139a-d**)

| 139 | R |
|------------|-----------------|
| a | CF ₃ |
| b | NO ₂ |
| c | Br |
| d | Cl |

4.2.3 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5H)-one und 6-(2-Amino-3-pyridyl)-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-one

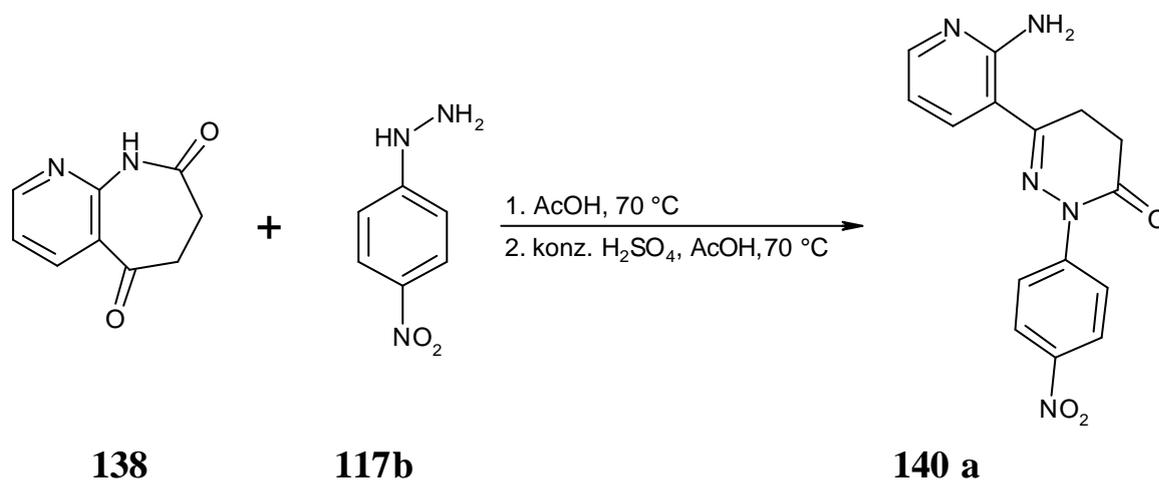
Eine Fischer-Indol-Synthese in Eisessig mit einer kleinen Menge konzentrierter Schwefelsäure war auch hier die Methode der Wahl, um die gewünschten Paullonderivate zu erhalten. Der Schwefelsäurezusatz war bei der Synthese der methoxysubstituierten Verbindung **110b** für die Reaktion zum Indol nicht erforderlich. Eine Isolierung der Hydrazone war bei der säurekatalysierten Prozedur nicht nötig, im Falle der methyl- bzw. methoxysubstituierten Derivate **110a** und **110b** auch nicht möglich. Es wurden Paullonanaloga mit Brom-, Chlor-, Methyl-, und Methoxysubstitution in Position 9 erhalten (**110a-d**). (Schema 4-20)

Schema 4-20



Die Reaktion des 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dions **138** mit 4-Nitrophenylhydrazin (**117b**) unter Säurekatalyse erbrachte nicht das gewünschte Indol, sondern analog zum Thiophenderivat das 6-(2-Amino-3-pyridyl)-2-(4-nitrophenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-on (**140a**). (Schema 4-21)

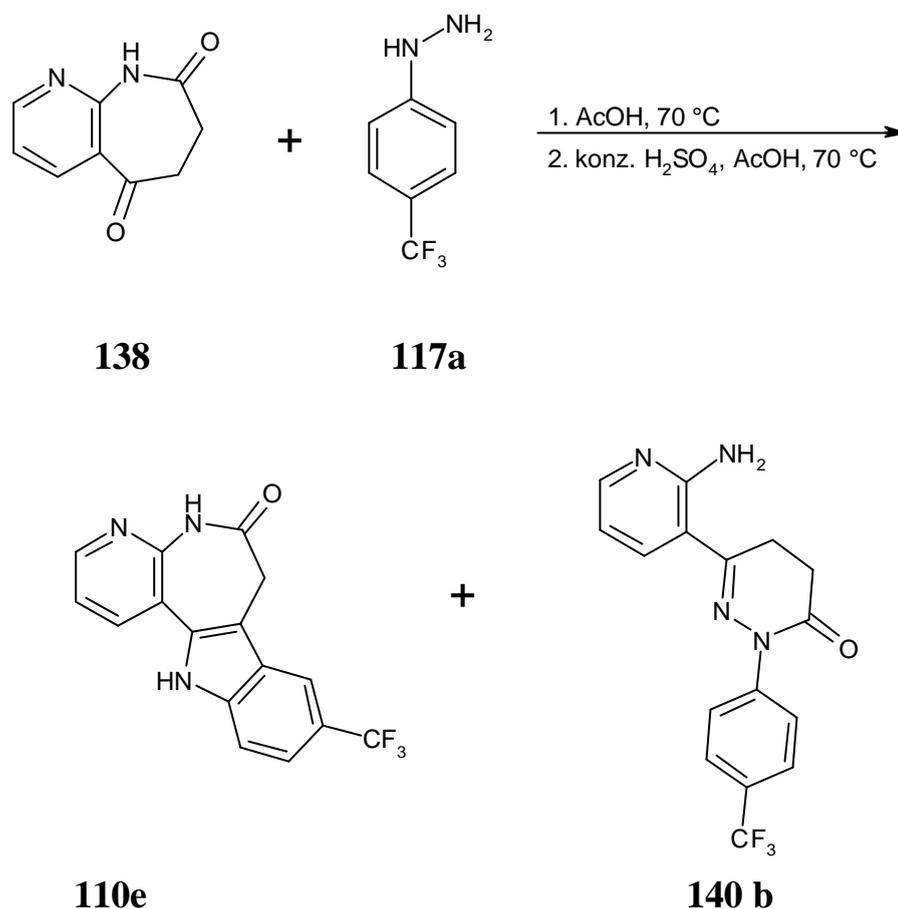
Schema 4-21



Auch hier konnte also festgestellt werden, dass der Nitrosubstituent des Phenylhydrazons **139b** durch einen –M-Effekt die Bildung des Pyridazinons auf Kosten der Indolbildung fördert. Der –I-Effekt der Trifluormethylgruppe hat aber offensichtlich einen schwächeren Einfluss. Hier konnte bei der säurekatalysierten Reaktion eine Bildung des Paullonderivates **110e** neben dem uner-

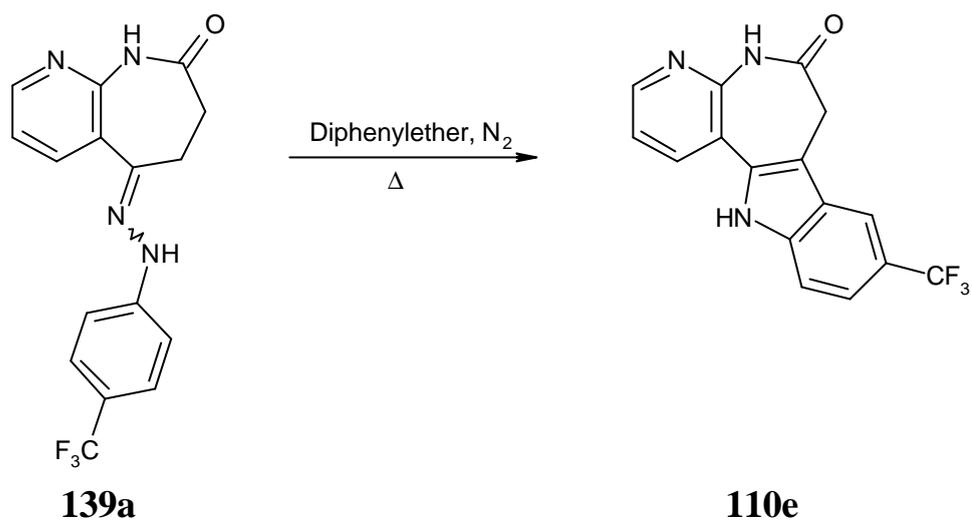
wünschten Pyridazinonderivat **140b** beobachtet werden. (Schema 4-22) Die Isolierung der einzelnen Produkte war durch Extraktion oder fraktionierende Kristallisation möglich.

Schema 4-22



Wird das 5-(4-Trifluormethyl-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido-[2,3-*b*]azepin-8-on (**139a**) in einer thermisch induzierten Fischer-Indol-Synthese eingesetzt, so gewinnt man das 9-Trifluormethyl-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-6(5H)-on (**110e**) in höherer Ausbeute. (Schema 4-23)

Schema 4-23



Die während der Erstellung dieser Arbeit synthetisierten 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **110a-e** sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

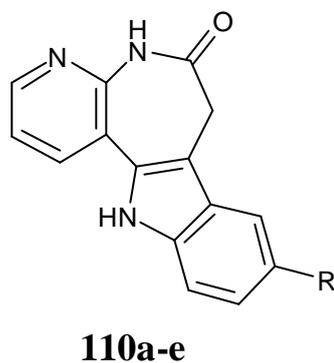
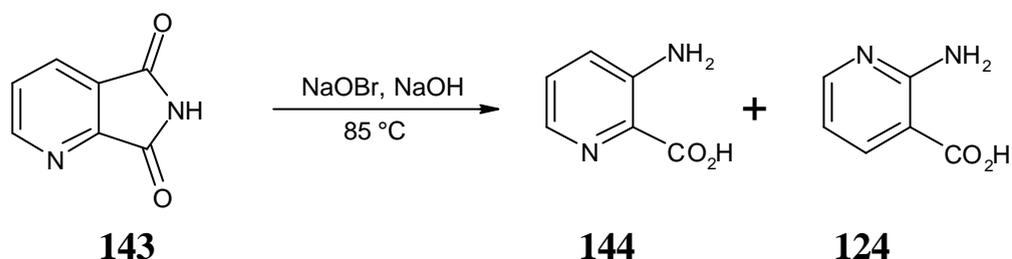


Tabelle 4-4: Synthetisierte 7,12-Dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one (**110a-e**)

| 110 | R |
|------------|------------------|
| a | CH ₃ |
| b | OCH ₃ |
| c | Br |
| d | Cl |
| e | CF ₃ |

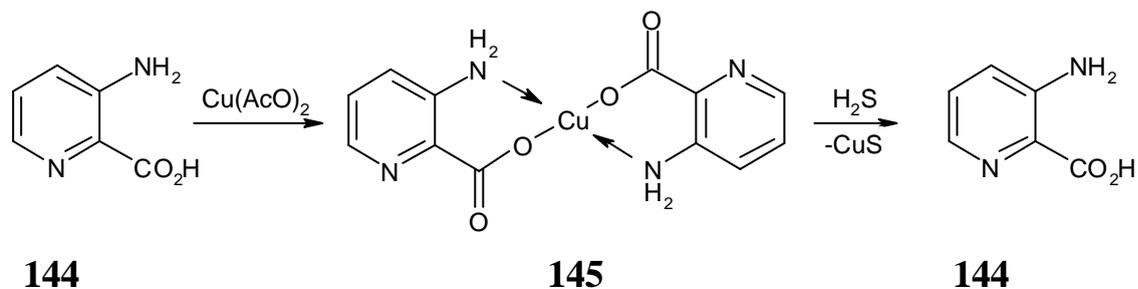
Das Imid **143** wird durch einen Carbonsäureamidabbau nach Hofmann mit einem Hypohalogenit in die gewünschte 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**144**) umgewandelt. E. Sucharda beschreibt erfolgreiche Versuche mit Natriumhypochlorit,⁸⁹ allerdings berichten V. Oakes, R. Pascoe und H.N. Rydon, dass Verwendung von Natriumhypobromit die Ausbeute an 3-Aminopyridin-2-carbonsäure auf Kosten der als Nebenprodukt entstehenden isomeren 2-Aminopyridin-3-carbonsäure (**124**) erhöht.⁹⁰ Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit Natriumhypobromit als Reagenz verwendet. (Schema 4-25) Die als Nebenprodukt anfallende 2-Aminopyridin-3-carbonsäure (**124**) konnte durch Ansäuern des Reaktionsgemisches ausgefällt und abgetrennt werden.

Schema 4-25



Zur Reinigung der gewünschten 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**144**) wurde diese zunächst in Form eines Kupfer(II)komplexes (**145**) ausgefällt, aus dem die Zielstruktur anschließend mit Schwefelwasserstoff wieder freigesetzt werden konnte. (Schema 4-26) Wird bei dieser Prozedur die von V. Oakes, R. Pascoe und H.N. Rydon angegebene Menge an Kupfer(II)acetat erhöht, so lassen sich die in der Literatur angegebenen Ausbeuten noch verbessern.

Schema 4-26

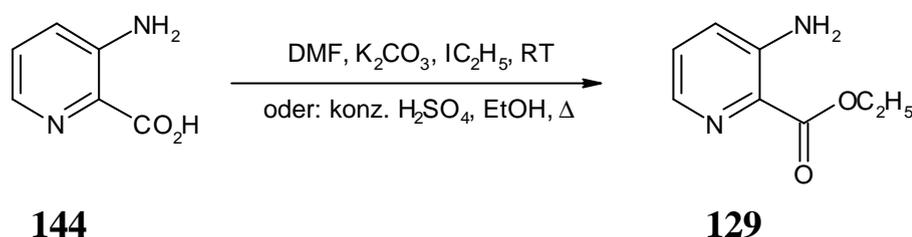


Zur Darstellung des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters (**129**) aus **144** wurden verschiedene Methoden experimentell verglichen. Die in Kapitel 4.2.1

beschriebene Veresterung in DMF mit Kaliumcarbonat und Ethyliodid ergab die Zielsubstanz in 44-prozentiger Ausbeute. (Schema 4-27)

Die Veresterung von **144** in einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und Ethanol beschreiben zuerst V. Oakes, R. Pascoe und H.N. Rydon,⁹⁰ allerdings geben Q. Chen und L.W. Deady an, dass eine Verlängerung der Reaktionszeiten zu einer höheren Ausbeute führt.⁹¹ (Schema 4-27) Diese Methode ermöglichte eine Verbesserung der Ausbeute auf 54 % und war außerdem unempfindlicher gegen Verunreinigungen in der eingesetzten Säure, so dass bei dieser Methode ein Reinigungsschritt eingespart werden konnte.

Schema 4-27

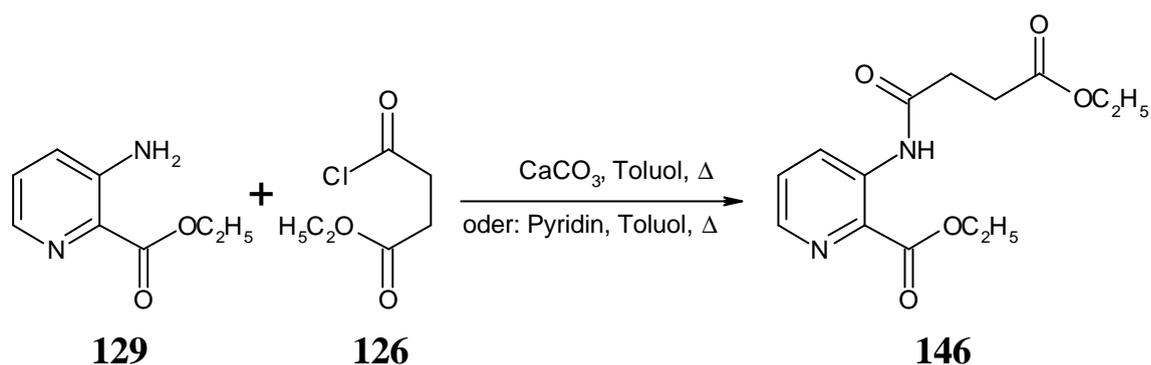


4.3.2 Synthese von 5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9(7H,8H)-dion

Um eine Acylierung der Verbindung **129** am Aminostickstoffatom zu erreichen, sollte mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**126**) umgesetzt werden. Dieses Verfahren erschien vielversprechend, da J. Chen und W. Steglich wie oben erwähnt eine entsprechende Umsetzung von 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**144**) mit 2-Methoxyphenylethylsäurechlorid (**130**) in Pyridin beschreiben.⁸⁷ (Schema 4-14)

Als Hilfsbase in den hier durchgeführten Versuchen kam Calciumcarbonat in Frage, welches schon bei der Synthese von Verbindung **114** Verwendung gefunden hatte. Mit Calciumcarbonat in siedendem Toluol konnte der 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**146**) hergestellt werden. Durch Austausch des Calciumcarbonats gegen Pyridin ließ sich die Reaktionszeit von 7 auf 2 Stunden verkürzen. (Schema 4-28)

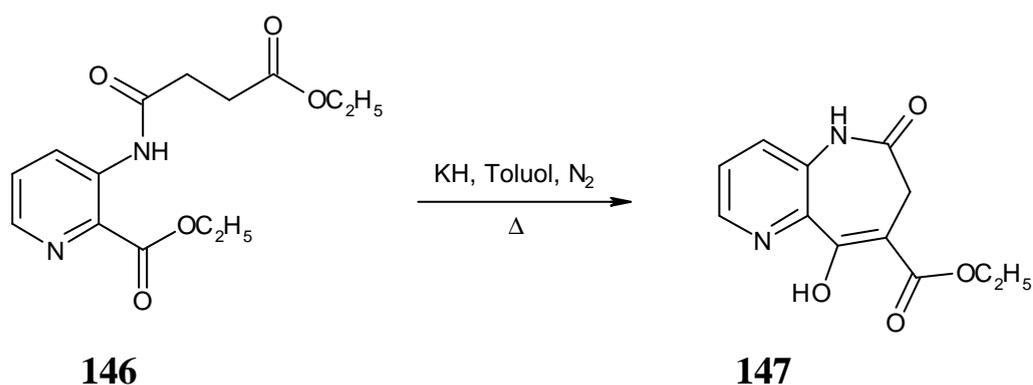
Schema 4-28



J. Chen und W. Steglich konnten das Acylierungsprodukt **131** in Gegenwart von Natriummethanolat in Benzol zyklisieren. (Schema 4-14)

Da sich bei den bisher beschriebenen Paullonsynthesen eine Umsetzung mit Kaliumhydrid als sehr erfolgreich erwiesen hatte,⁸ wurde die von C. Kunick entwickelte Methode⁸⁵ der von J. Chen und W. Steglich beschriebenen vorgezogen. Dazu wurde der Diester **146** mit Kaliumhydrid in Toluol zu 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**147**) ringgeschlossen. Wie die entsprechenden benzoanalogen Derivate liegt **147** vollständig enolisiert vor. (Schema 4-29)

Schema 4-29

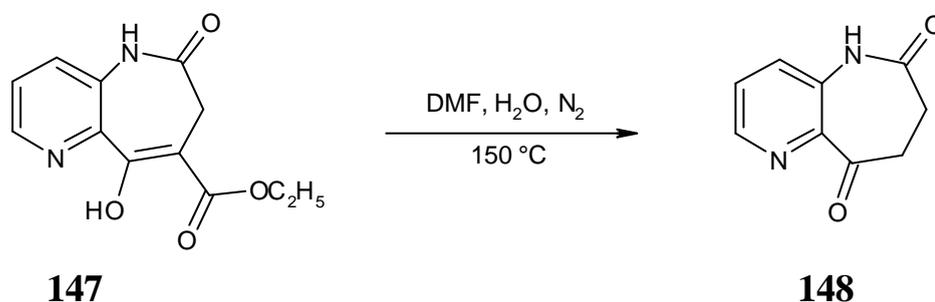


Die Dealkoxycarbonylierung von **147** stellte sich als problematisch dar. Nach C. Kunick⁸⁵ bzw. A. Link⁹² werden analoge Verbindungen in wasserhaltigem DMSO bei 150 °C dealkoxycarbonyliert. Bei der Aufarbeitung soll das entstehende Produkt nach Eingießen in Wasser auskristallisieren. Das 5*H*-Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9(7*H*,8*H*)-dion (**148**) erwies sich aber in der entstehenden DMSO/Wasser-Mischung als so gut löslich, dass eine Gewinnung adäquater

Ausbeuten weder durch Erhöhung der Wassermenge noch durch Extraktion möglich war. Eine Extraktion mit Dichlormethan ergab eine kleine Substanzmenge, die für die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ausreichend war, so dass die Identität des Produktes als 5*H*-Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9(7*H*,8*H*)-dion (**148**) gesichert werden konnte. Die Abtrennung des Dimethylsulfoxids wurde mithilfe von Mitteldruckchromatographie über eine RP-18-Säule versucht. Es konnte die gleiche Substanz wie nach Extraktion mit Dichlormethan gewonnen werden, allerdings waren die Ausbeuten wiederum so gering, dass ein weiterer Syntheseschritt mit den hier gewonnenen Mengen nicht denkbar war.

Insofern war es nötig, ein anderes Lösungsmittel zu finden, welches eine Reaktion bei 150 °C und eine Abtrennung des Produktes ermöglichte. Während N-Methyl-2-pyrrolidon zu ähnlichen Problemen wie DMSO führte, konnte die Reaktion in N,N-Dimethylformamid erfolgreich durchgeführt werden (Schema 4-30), wobei eine Entfernung des Lösungsmittels durch Abdestillieren bei vermindertem Druck möglich war.

Schema 4-30

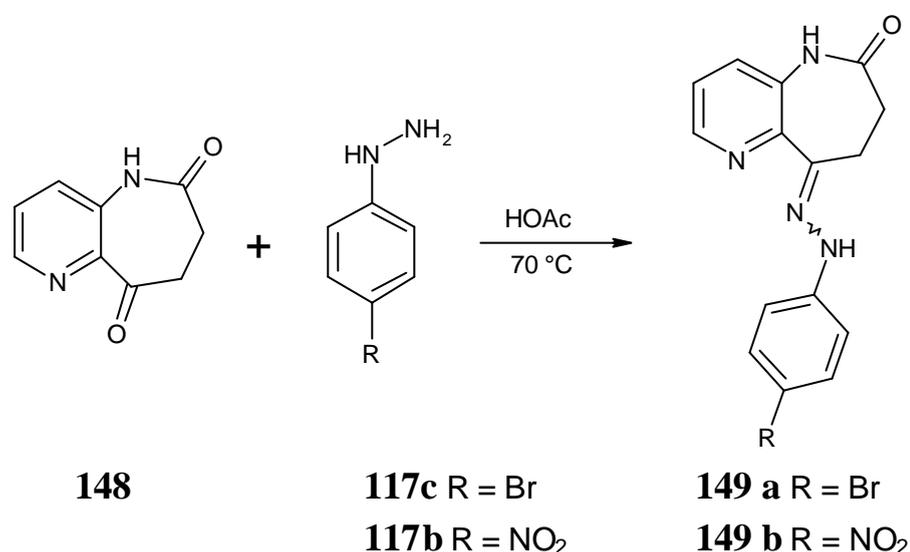


4.3.3 Synthese von 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-onen

Eine Reaktion des 5*H*-Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9(7*H*,8*H*)-dions **148** mit 4-Bromphenylhydrazin (**117c**) in Eisessig führte in wenigen Minuten zum 5-(4-Bromphenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-on (**149a**).

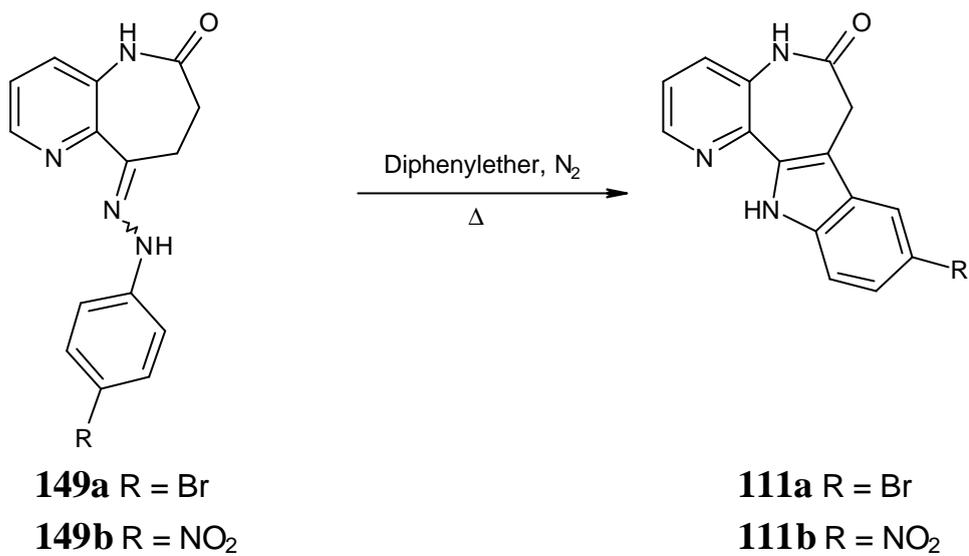
Analog zur bromsubstituierten Verbindung **149a** wurde aus **148** mit 4-Nitrophenylhydrazin **117b** das entsprechende nitrosubstituierte Phenylhydrazon **149b** dargestellt. (Schema 4-31)

Schema 4-31



Beim Versuch, das bromsubstituierte Hydrazon **149a** katalysiert durch Schwefelsäure zum Indol zu zyklisieren, wurde ein Gemisch verschiedener Produkte erhalten. Bessere Ergebnisse wurden bei der thermischen Indolisierung in siedendem Diphenylether erzielt, wobei die Menge des Lösungsmittels im Vergleich zu ähnlichen Vorschriften aus der Literatur erhöht wurde. Auf diese Weise konnten die neuen Paullonderivate 9-Brom- und 9-Nitro-7,12-dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on **111a** und **111b** synthetisiert werden. (Schema 4-32)

Schema 4-32

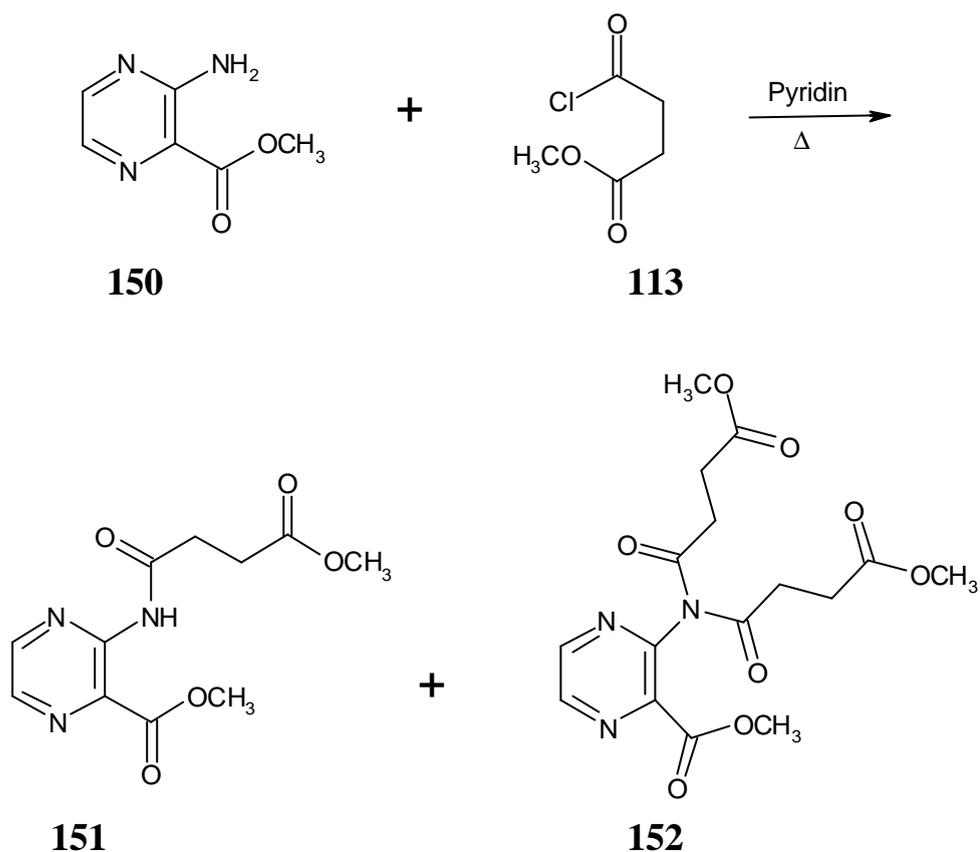


4.4 Synthese des 3-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2-carbonsäure-methylesters

Das Pyrazinderivat **151** sollte als Vorstufe für ein weiteres Paullonderivat mit veränderter heterozyklischer Grundstruktur gewonnen werden. Im ersten Schritt war hierzu die Synthese des Amids **151** aus dem kommerziell erhältlichen 3-Aminopyrazin-2-carbonsäuremethylester (**150**) durch eine Acylierungsreaktion geplant. Es wurden verschiedene Methoden ausprobiert, die schon die Gewinnung der Paullonvorstufen **114**, **146** und **161** ermöglicht hatten. Die Reaktion von Bernsteinsäuremethylesterchlorid **113** mit dem Ester **150** in siedendem Toluol erwies sich in früheren Untersuchungen als nicht erfolgreich.⁹³ Eine der Acylierung des 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylesters **125** analoge Reaktion mit Bernsteinsäuredimethylester**135** führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Hierbei wurde weder in Toluol mit Natriumhydrid noch mit Natriumethanolat in Ethanol jeweils unter Erhitzen zum Rückfluss eine Umsetzung des Ausgangsmaterials beobachtet.

Schließlich gelang die Synthese des Amids **151** durch Reaktion mit Bernsteinsäuremethylesterchlorid in Pyridin bei 95 °C. Bei dieser Methode entsteht als Nebenprodukt der diacylierte Aminopyrazin-carbonsäuremethylester **152**. (Schema 4-33) Die Trennung der beiden Produkte war durch Säulenchromatographie möglich, wobei allerdings nur sehr geringe Ausbeuten erzielt wurden.

Schema 4-33



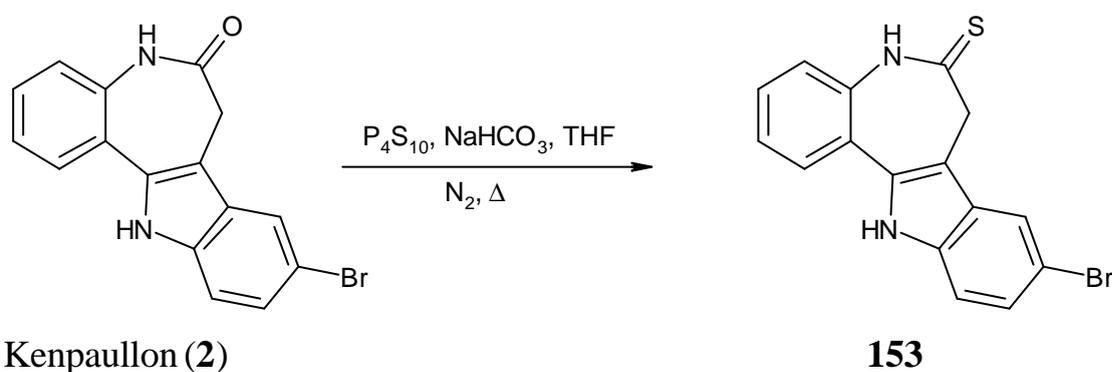
Im nächsten Schritt sollte **151** katalysiert durch Kaliumhydrid in Toluol ringgeschlossen werden. Diese Dieckmann-Zyklisierung verlief in ersten Versuchen erfolglos. Zudem zeigten die biologischen Daten für die Paullonderivate mit einem Stickstoffatom in Position 4 eine deutliche Verschlechterung der CDK-inhibitorischen Aktivität verglichen mit den benzoanalogen Paullonen. Aus diesen Gründen wurden die Versuche zur Gewinnung von Paullonderivaten mit Stickstoffatomen in den Positionen 1 und 4 an diesem Punkt abgebrochen.

5 Modifikationen an der Lactamgruppierung und der Substitution der Paullone

5.1 Thiolactam und Thiolactimether von Alsterpaullon

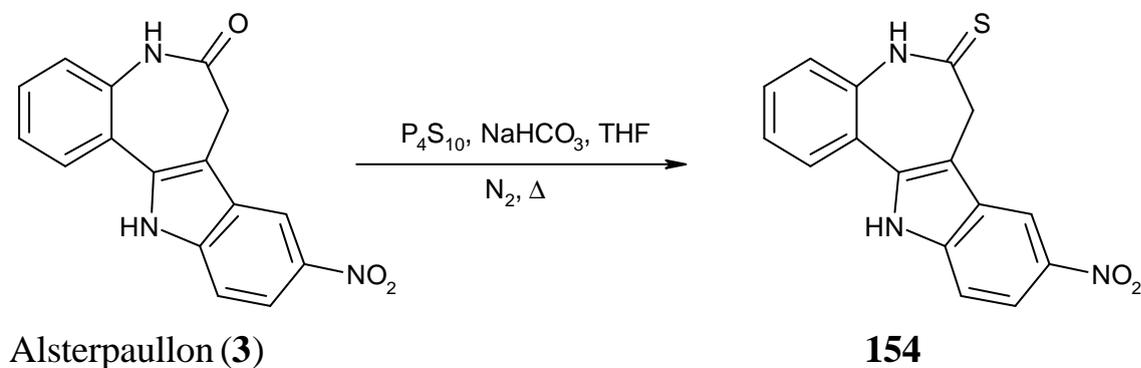
Die Reaktion an der Lactamgruppierung von Kenpaullon (**2**) zur Überführung der Funktionalität in eine Thiolactamfunktion durch Phosphorpentasulfid und Natriumhydrogencarbonat in Tetrahydrofuran (THF) wurde von C. Schultz beschrieben.^{8,9} (Schema 5-1)

Schema 5-1



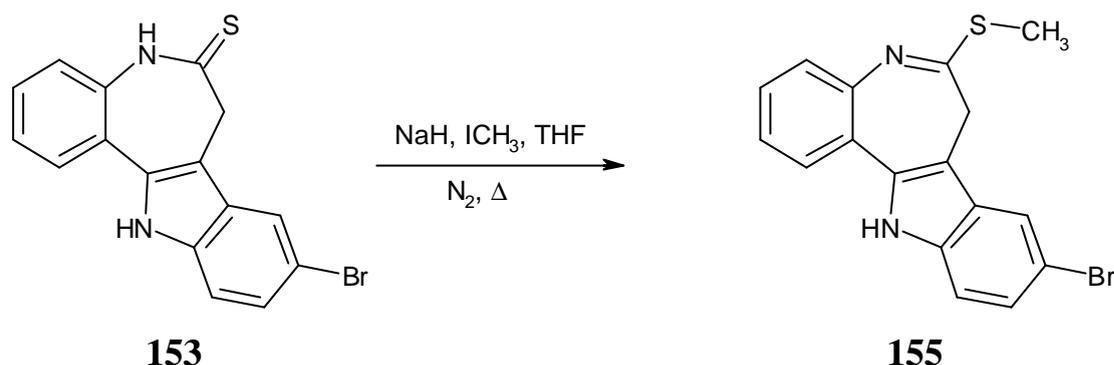
Die Umwandlung der Lactamfunktion von Alsterpaullon (**3**) wurde analog dazu durchgeführt und erbrachte das erwartete Thiolactam **154**. (Schema 5-2)

Schema 5-2



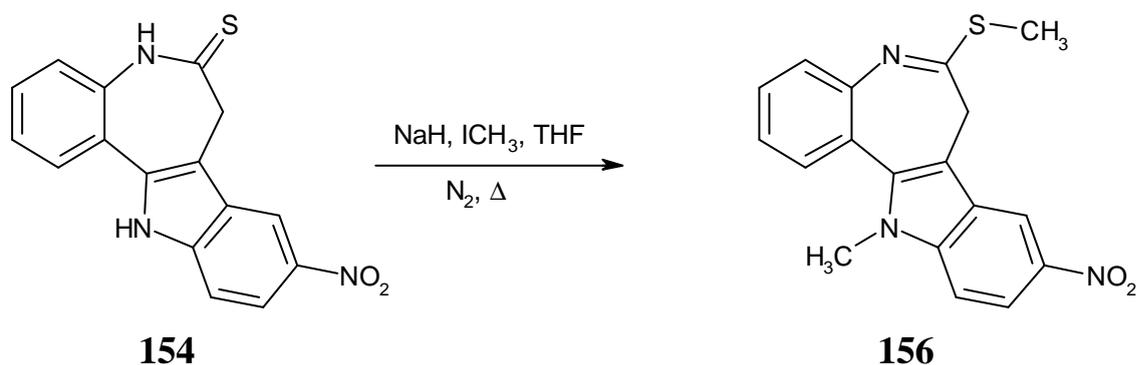
Im Anschluss daran sollte die ebenfalls von C. Schultz mit dem Kenpaullonderivat **153** durchgeführte Reaktion zum Thiolactimether **155** auf das Alsterpaullonderivat übertragen werden.^{8,9} Die Methode beinhaltet eine Deprotonierung des Thiolactams **153** durch Natriumhydrid und eine Alkylierung des Schwefelatoms durch Iodmethan. (Schema 5-3)

Schema 5-3



Bei der von Alsterpaullon abgeleiteten Verbindung **154** ist das Proton am Indolstickstoffatom durch den -M-Effekt der Nitrogruppe azider als das entsprechende Proton im Derivat des Kenpaullons **153**. Aus diesem Grund erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen nach Behandlung mit Natriumhydrid eine zweifache Alkylierung von **154**. (Schema 5-4)

Schema 5-4



Um eine Verbindung zu erhalten, welche nur an der Thiolactamfunktion alkyliert ist, wurde Iodmethan nicht wie zuvor im Überschuss, sondern in äquimolaren Mengen zugegeben. Hierbei resultierte ein Gemisch aus Edukt **154**, mono- und dialkyliertem Produkt. Ein Versuch ohne Basenzusatz in THF

erbrachte keine Umsetzung, während in DMSO bei Raumtemperatur wiederum ein Gemisch aus mehreren Produkten entstand, welche sich weder durch fraktionierende Kristallisation noch durch Säulenchromatographie trennen ließen.

5.2 Nitrierung von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on

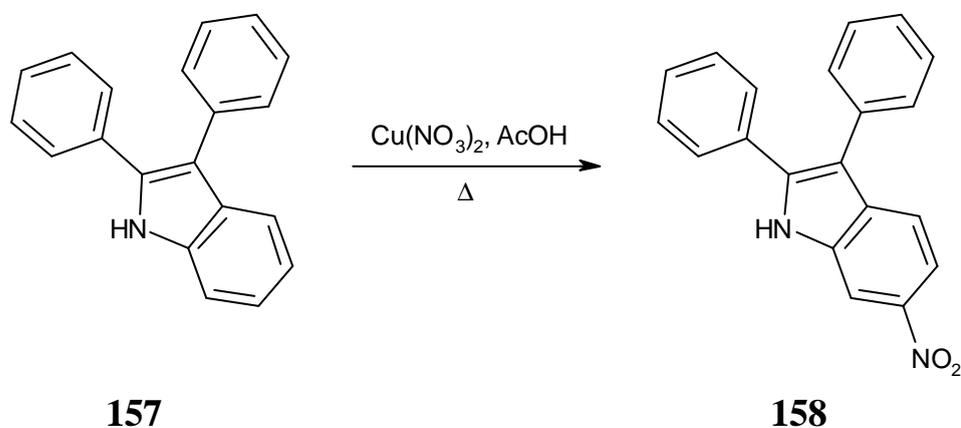
5.2.1 Synthese von 10-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on

Das 10-Brompaullon (**107**) wies bei Untersuchung seiner biologischen Aktivität an verschiedenen Kinasen ein Selektivitätsmuster auf, welches sich deutlich von dem des 9-Brompaullons Kenpaullon (**2**) unterscheidet. Die inhibitorische Aktivität des Kenpaullons wurde von Alsterpaullon (**3**) bei einigen Kinasen um eine Größenordnung übertroffen (siehe Kapitel 3.2.2). Aus diesen Gründen stellt die in diesem Kapitel vorgestellte Zielstruktur 10-Nitropaullon (**160**) als Isomeres von Alsterpaullon und Derivat des 10-Brompaullons eine interessante Verbindung zur Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen im Hinblick auf die Selektivität an verschiedenen Kinasen dar.

Ausgehend von dem unsubstituierten Paullon **159** sollte durch eine Nitrierungsreaktion das 10-Isomere **160** von Alsterpaullon dargestellt werden.

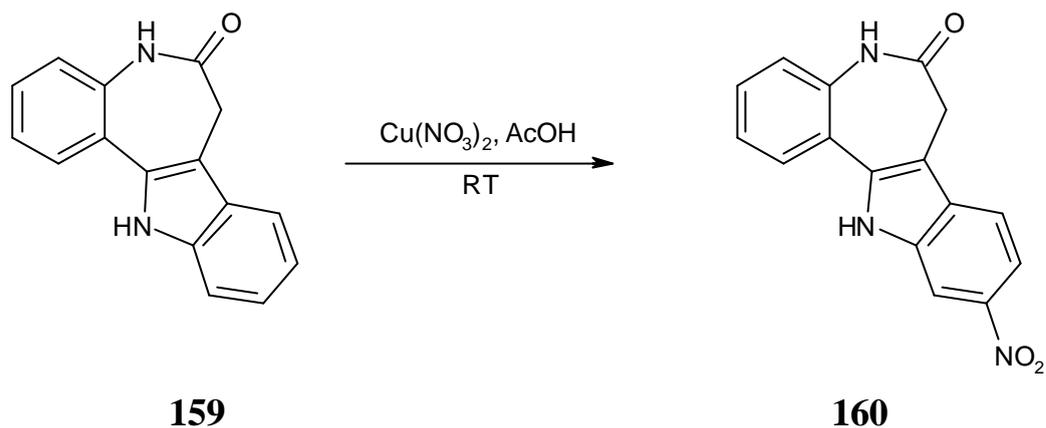
A. Da Settimo und M.F. Saettone berichten über verschiedene Möglichkeiten zur Nitrierung von 2,3-disubstituierten Indolen. Die Einführung eines Nitrosubstituenten in Position 6 des 2,3-Diphenylindols **157** wurde mit Kupfer(II)-nitrat in Eisessig durchgeführt.⁹⁴ (Schema 5-5)

Schema 5-5



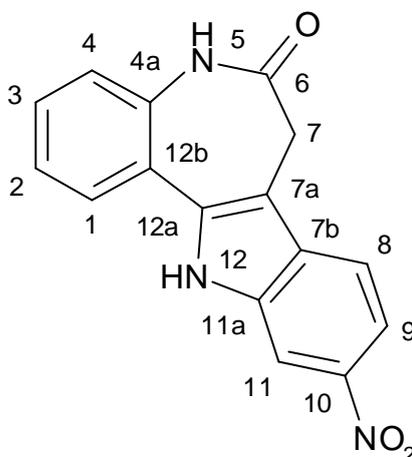
Durch Abwandlung der in der Literatur angegebenen Methode wurde eine Nitrierung des nach C. Kunick⁵ synthetisierten Paullons **159** erreicht. Hierbei konnte auf ein Erhitzen im Wasserbad verzichtet werden, da die Reaktion auch bei Raumtemperatur in wenigen Minuten zur vollständigen Umsetzung der Ausgangsverbindung führte. (Schema 5-6)

Schema 5-6



Im Anschluss daran durchgeführte Versuche zur Nitrierung des thienoanellierten Paullons **109a**, des von C. Schultz beschriebenen 2-Brompaullons^{8,9} und eines 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dions^{85,92} führten nur zu untrennbaren Gemischen verschiedener Reaktionsprodukte.

5.2.2 Strukturaufklärung von 10-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on



160

Die Strukturaufklärung von Verbindung **160** erfolgte mithilfe der ein- und der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie,* wodurch es möglich war, die ^1H - und ^{13}C -NMR Signale den einzelnen Positionen im Paullon zuzuordnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Zuordnung der Signale im ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum (chemische Verschiebung, δ -Werte, ppm) zu den jeweiligen Atomen im Paullon **160**

| Position im Paullon | ^1H -Signal δ (ppm) | ^{13}C -Signal δ (ppm) | Position im Paullon | ^1H -Signal δ (ppm) | ^{13}C -Signal δ (ppm) |
|---------------------|-------------------------------------|--|---------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | 7.81 | 127.4 | 7b | - | 131.0 |
| 2 | 7.34 | 123.9 | 8 | 7.89 | 118.3 |
| 3 | 7.48 | 129.5 | 9 | 7.97 | 114.4 |
| 4 | 7.30 | 122.5 | 10 | - | 142.2 |
| 4a | - | 136.2 | 11 | 8.33 | 107.9 |
| 5 | 10.21 | - | 11a | - | 135.6 |
| 6 | - | 171.3 | 12 | 12.43 | - |
| 7 | 3.62 | 31.4 | 12a | - | 139.0 |
| 7a | - | 108.6 | 12b | - | 121.6 |

* Bei den hier angegebenen NMR-Untersuchungen wurde DMSO-d_6 als Lösungsmittel verwendet.

Im ^1H -NMR-Spektrum findet man bei 3.62 ppm ein Singulett für die beiden Protonen der Methylengruppe des Azepinrings. Ein Singulett bei 10.21 ppm entspricht dem Lactam-NH, während das Indol-NH ein Signal bei 12.43 ppm bewirkt. Im aromatischen Bereich sind Signale für sieben Protonen zu finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass an einem der beiden Benzanellanden eine Nitrierung stattgefunden hat. Das ^1H -NMR-Spektrum unterscheidet sich sowohl von dem des unsubstituierten Paullons **159** als auch von dem von Alsterpaullon (**3**).^{5,8,9}

Anhand des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums können die aromatischen Protonen zum einen einem 4Spin-System und zum anderen einem 3-Spin-System zugeordnet werden. Die Protonen des 4Spin-Systems entsprechen den vier benachbarten aromatischen Protonen in den Positionen 1, 2, 3 und 4. Hierbei können die Signale bei 7.34 ppm und 7.48 ppm aufgrund ihrer Aufspaltung den beiden mittleren Protonen (Position 2 und 3) und die Signale bei 7.30 ppm und 7.81 ppm den äußeren Protonen (Position 1 und 4) dieses Spin-Systems zugeordnet werden. Das Signal bei 7.30 ppm (Position 4) zeigt im COSY-Spektrum ein Kreuzsignal zum Protonensignal bei 7.48 ppm (Position 3), welches ein weiteres zum Signal bei 7.34 ppm (Position 2) zeigt. Letzteres koppelt zusätzlich mit dem Proton, welches ein Signal bei 7.81 ppm (Position 1) bewirkt (siehe Bild 5-1).

Alle Signale für die Protonen in den Positionen 8, 9 und 10, die zum 3-Spin-System gehören, sind weiter Tieffeld-verschoben als die des 4Spin-Systems. Die Protonen des 3-Spin-Systems befinden sich an dem nitrierten Benzanellanden. Bei 7.89 ppm beobachtet man hier ein Dublett für das Proton in Position 8 mit einer großen Kopplungskonstante von 8.9 Hz für eine ortho-Kopplung. Eine entsprechende Kopplungskonstante findet man bei einem Signal für ein Proton bei 7.97 ppm (Position 9), welches zu einem doppelten Dublett aufgespalten ist. Die zweite Kopplungskonstante dieses Signals beträgt 2.0 Hz. Das korrespondierende dritte Signal des 3-Spin-Systems liegt bei 8.33 ppm (Position 11). Hierbei handelt es sich um ein Dublett mit der erwähnten meta-Kopplung von 2.0 Hz. Die Multiplizitäten des 3-Spin-Systems und das Vorhandensein einer meta-Kopplung lassen den Schluss zu, dass die Nitrierung in Position 10 zwischen dem Proton bei 7.97 ppm und dem bei 8.33 ppm stattgefunden hat. Die Kreuzsignale im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum bestätigen diese Annahme (siehe Bild 5-1).

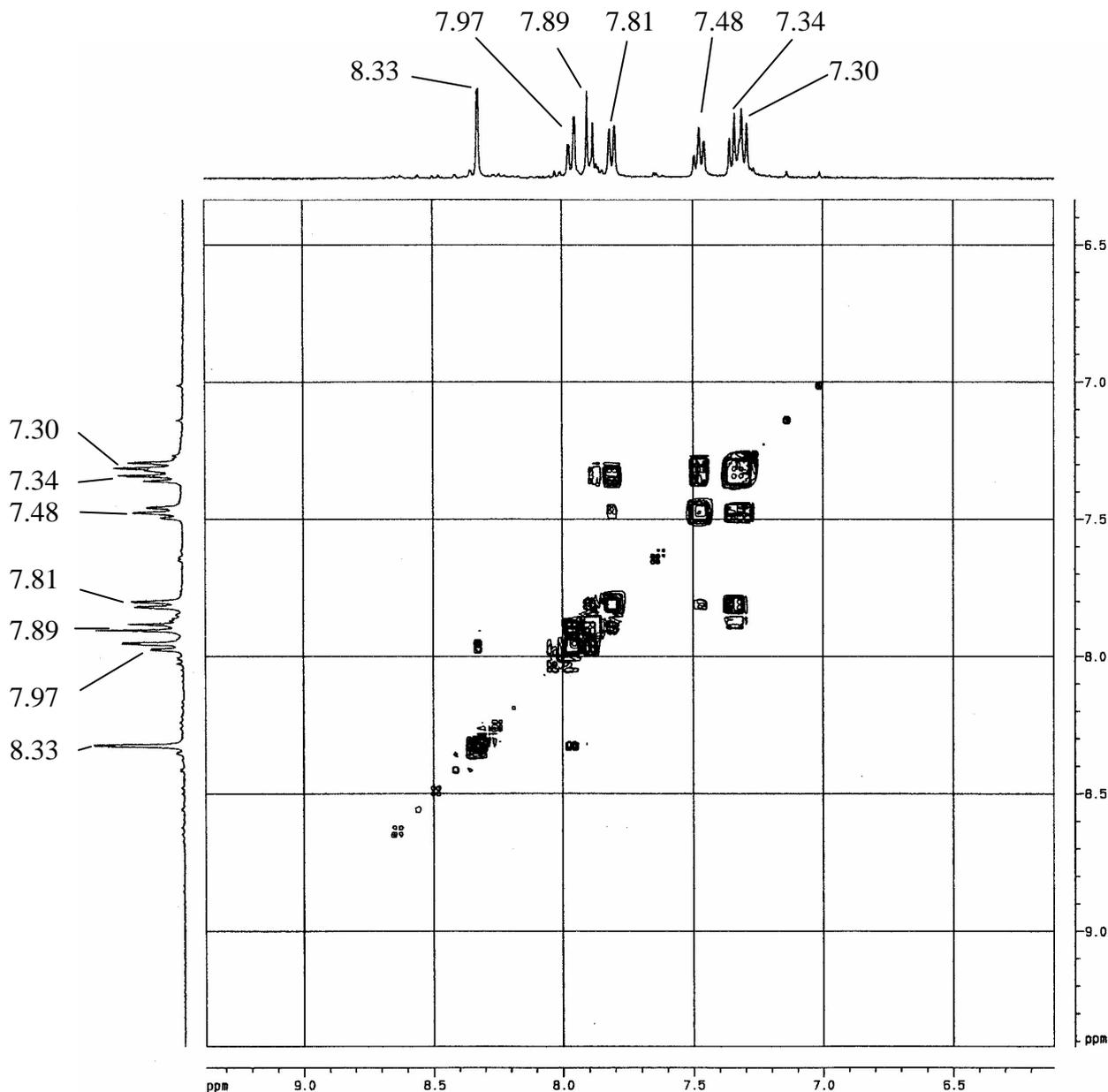


Bild 5-1: Ausschnitt aus dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Verbindung **160** (DMSO- d_6 , 500 MHz). Der abgebildete Bereich umfasst die Signale zwischen 5.20 ppm und 9.80 ppm.

Durch die Aufnahme von NOESY-, HMQC- und HMBC-Spektren sollte ein eindeutiger Beweis für die Richtigkeit des beschriebenen Strukturvorschlags erbracht werden.

Zuerst wurde anhand der Kreuzsignale im HMQC-Spektrum für jedes Protonensignal das Signal des jeweils benachbarten Kohlenstoffatoms bestimmt. In Tabelle 5-1 sind die chemischen Verschiebungen der Protonensignale denen der Kohlenstoffatome zugeordnet, an welchen sie angeknüpft sind.

Das Indol-NH zeigt im NOESY-Spektrum ein Kreuzsignal zu den Signalen bei 7.81 ppm des 4-Spin-Systems und 8.33 ppm des 3-Spin-Systems. Hierfür kommen die Positionen 1 und 11 des Paullonggrundgerüsts in Frage. Das Protonensignal bei 8.33 ppm ist wie erwähnt zu einem Dublett mit einer meta-Kopplung aufgespalten, weshalb das entsprechende Proton in ortho-Stellung zum Nitrosubstituenten zu suchen ist. Da es ein NOE-Kreuzsignal zum Indol-NH aufweist, kann es sich nicht in der vom Indol-NH weit entfernten Position 4 befinden. Anhand der bisher gewonnenen Informationen könnten also nur Position 2 oder Position 10 des Paullons einen Nitrosubstituenten tragen.

Das Proton des Lactamstickstoffatoms bei 10.21 ppm weist NOE-Kreuzsignale zur Azepin-Methylengruppe bei 3.62 ppm und zu einem Proton des 4-Spin-Systems bei 7.30 ppm auf. Da ein NOE-Kreuzsignal zwischen dem Lactam-Proton und dem Ring D des Paullons praktisch nicht möglich ist, muss das 4-Spin-System am Ring A zu finden sein. Das Signal bei 7.30 ppm kann der Position 4 des Paullons zugeordnet werden. Daraus folgt, dass die Nitrierung nur an Position 10 stattgefunden haben kann. Diese Schlussfolgerung soll durch weitere vorliegende Daten untermauert werden.

Die Azepin-CH₂-Gruppe zeigt im NOESY-Spektrum ein starkes Kreuzsignal zum Proton des 3-Spin-Systems bei 7.89 ppm (Position 8) und ein etwas schwächeres zum Proton des gleichen Spin-Systems bei 7.97 ppm (Position 9) auf. Zusätzlich sind Kreuzsignale zu zwei Protonen des 4-Spin-Systems zu beobachten: ein verglichen mit den zuvor genannten schwächeres zum Proton bei 7.30 ppm, welches zuvor der Position 4 zugeordnet wurde, und ein noch schwächeres zum Proton bei 7.34 ppm (Position 2). Die Kreuzsignale mit dem 3-Spin-System bestätigen die vorgeschlagene Struktur der nitrierten Verbindung **160**. Die beiden schwächeren NOE-Kreuzsignale der Azepin-CH₂-Gruppe zum 4-Spin-System lassen sich durch eine räumliche Nähe eines der beiden Methylenprotonen zu den Positionen 2 (4.57 Å) und 4 (4.39 Å)* am Ring A aufgrund der gewinkelten Konformation des Azepinrings erklären. Innerhalb des 4-Spin-Systems findet man wie erwähnt die entsprechenden ¹H-¹H-COSY-Kreuzsignale, die diese Zuordnung im Ring A ebenfalls plausibel machen.

Durch Auswertung der Kreuzsignale im HMBC-Spektrum lassen sich die beschriebenen Theorien überprüfen und die bisher nicht definierten ¹³C-Signale für die quartären Kohlenstoffatome zuordnen. Das Lactam-NH weist im HMBC-Spektrum neben den erwarteten Kreuzsignalen zu dem Carbonylkohlenstoff-

* Die angegebenen Werte beziehen sich auf Kenpaullon (2), dessen Konformation zuvor berechnet wurde. ^{55,84}

atom bei 171.3 ppm und dem Methylenkohlenstoffatom bei 31.4 ppm weitere Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 136.2 ppm und 121.6 ppm auf. Hierfür kommen die Positionen 4a und 12b in Frage. Diese quartären Kohlenstoffatome zeigen ebenfalls Kopplungen mit den Protonen des 4Spin-Systems. Eine Zuordnung ist aufgrund der Stärke der Kreuzsignale möglich, da die ^3J -Kopplungen in der Regel stärker ausgeprägt sind als die ^4J -Kopplungen. Das Proton in Position 2 (7.34 ppm) zeigt die stärkere ^3J -Kopplung zum Kohlenstoffatom bei 121.6 ppm und die schwächere ^4J -Kopplung zum Kohlenstoffatom bei 136.2 ppm. Umgekehrte Verhältnisse findet man beim Proton in Position 3 (7.48 ppm). Dadurch kann das Kohlenstoffsignal bei 136.2 ppm der Position 4a und das bei 121.6 ppm der Position 12b des Paullons zugeordnet werden.

Die Protonen der Azepin- CH_2 -Gruppe bewirken ein Kreuzsignal zum Carbonylkohlenstoffatom bei 171.3 ppm und drei weitere zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 108.6 ppm, 131.0 ppm und 139.0 ppm, welche ebenfalls mit dem Proton des Indolstickstoffatoms koppeln. Das Kohlenstoffatom bei 139.0 ppm befindet sich in Position 12a, da es ebenfalls mit dem Proton bei 7.81 ppm (Position 1) entsprechend einer ^3J -Kopplung koppelt. Ein schwächeres Kreuzsignal findet man noch zwischen dem Kohlenstoffatom bei 139.0 ppm und dem Proton bei 7.30 ppm (Position 4), welches einer Kopplung über vier Bindungen entspricht.

Das quartäre Kohlenstoffatom bei 131.0 ppm ist in Position 7b zu finden. Diese Aussage kann gemacht werden, da es Kopplungen mit allen Protonen des 3Spin-Systems aufweist, welche von der Position 7b über zwei oder drei Bindungen möglich sind. Entsprechende Kreuzsignale von Position 7a erscheinen hier weniger wahrscheinlich, da in jenem Fall zwei der Kopplungen zu den Protonen des 3-Spin-Systems über vier Bindungen bestehen müssten. Der Position 7a entspricht demnach das Kohlenstoffsignal bei 108.6 ppm, welches zusätzlich zu den beiden Kopplungen zu den Methylenprotonen und dem Indol-NH eine ^3J -Kopplung zum Proton in Position 8 bei 7.89 ppm aufweist.

Das Proton am Indolstickstoffatom weist die erwähnten Kreuzsignale zu den Kohlenstoffatomen in den Positionen 7a, 7b und 12a auf, die es mit den Methylenprotonen gemeinsam hat. Eine zusätzliche Kopplung besteht zum quartären Kohlenstoffatom bei 135.6 ppm, wofür nur noch die Position 11a in Frage kommt. Weitere Kopplungen dieses Kohlenstoffatoms bei 135.6 ppm zu den Protonen in den Positionen 8 und 11 bestätigen dies. Ein schwaches Kreuzsignal zeigt das Indol-NH zum tertiären Kohlenstoffatom in Position 11 bei 107.9 ppm.

Da an diesem Punkt alle quartären Kohlenstoffatome bis auf das C10 den entsprechenden ^{13}C -Signalen zugeordnet sind, muss dem C10 das Signal bei 142.2 ppm entsprechen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tieffeld-Verschiebung des ^{13}C -Signals, die durch den starken Elektronenzug der Nitrogruppe erklärt werden kann. Die Zuordnung wird außerdem durch die Kopplungen des Kohlenstoffatoms bei 142.2 ppm zu den Protonen des 3-Spin-Systems in den Positionen 8, 9 und 11 des Paullons **160** im HMBC-Spektrum bestätigt.

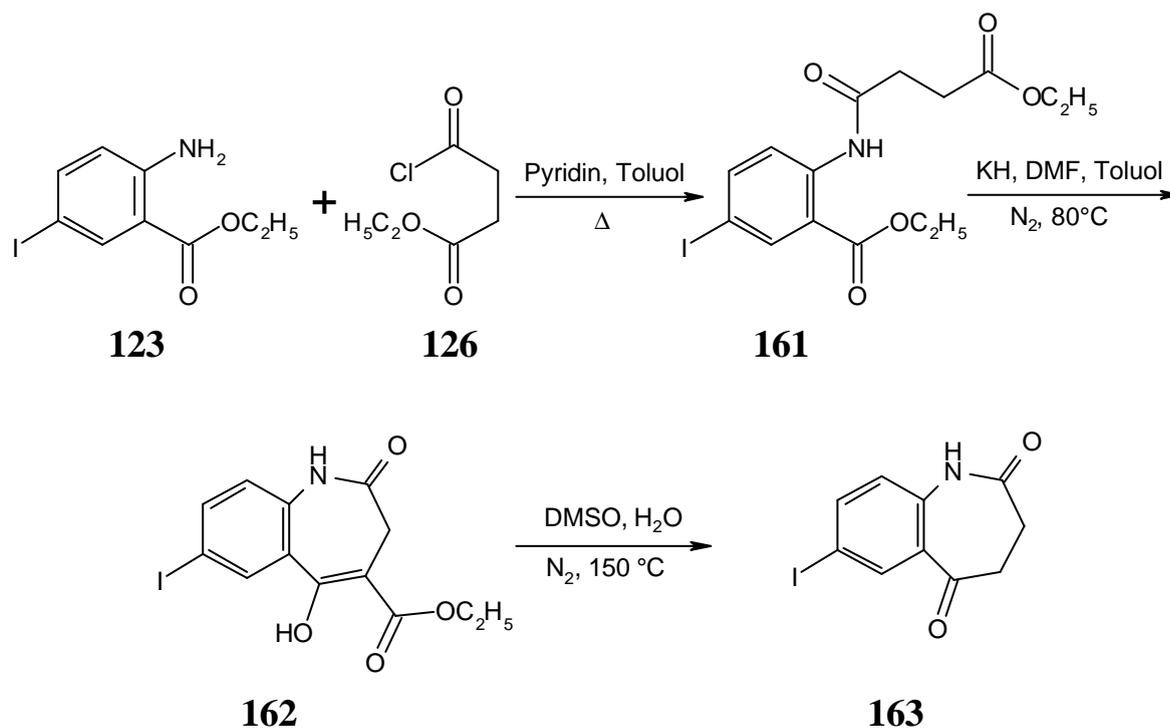
Die Auswertung der genannten NMR-Spektren ermöglichte eine Zuordnung aller ^1H - und ^{13}C -Signale zu den entsprechenden Positionen im Paullon **160**. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

5.3 Versuche zu Mannich-Reaktionen mit 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on

Um die Wasserlöslichkeit der Paullone zu erhöhen, sollten Derivate mit hydrophilen Resten synthetisiert werden. Als Anknüpfungspunkt bietet sich im Paullongrundgerüst die Position 2 an, weil an dieser Stelle positionierte Reste im Modell des CDK/Paullon-Komplexes aus der ATP-Bindungsspalte herausragen und deshalb einen relativ großen Raum zur Verfügung haben.

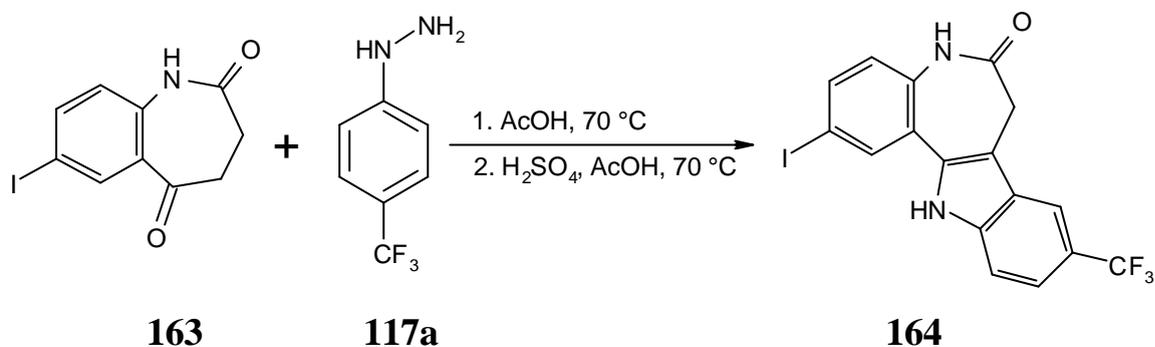
Das Ausgangsmaterial, 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**166**), wurde nach einer Vorschrift von C. Schultz gewonnen.⁸ Hierbei wird 2-Amino-5-iod-benzoesäure (**122**) unter Katalyse von Chlorwasserstoffgas mit Ethanol zum Ethylester **123** verestert (siehe Kapitel 4.2.1). Dieser wird mit Bernsteinsäurethylesterchlorid **126** zum Amid **161** umgesetzt. Eine Zyklisierung mit Kaliumhydrid ergibt den Ester **162**, der in wasserhaltigem DMSO zum iodsubstituierten Benzazepindion **163** dealkoxycarbonyliert. (Schema 5-7)

Schema 5-7



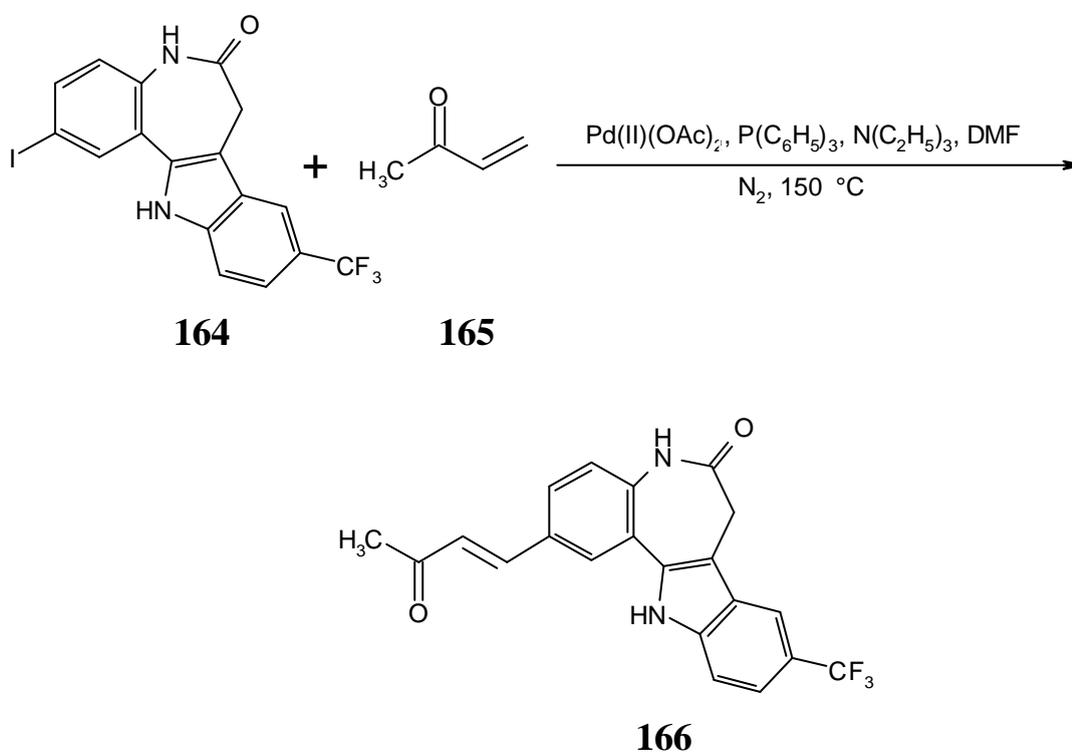
Durch eine Fischer-Indol-Synthese mit 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**) in Eisessig unter Zusatz von Schwefelsäure wurde das in Position 2 iodsubstituierte Paullon (**164**) erhalten. (Schema 5-8)

Schema 5-8



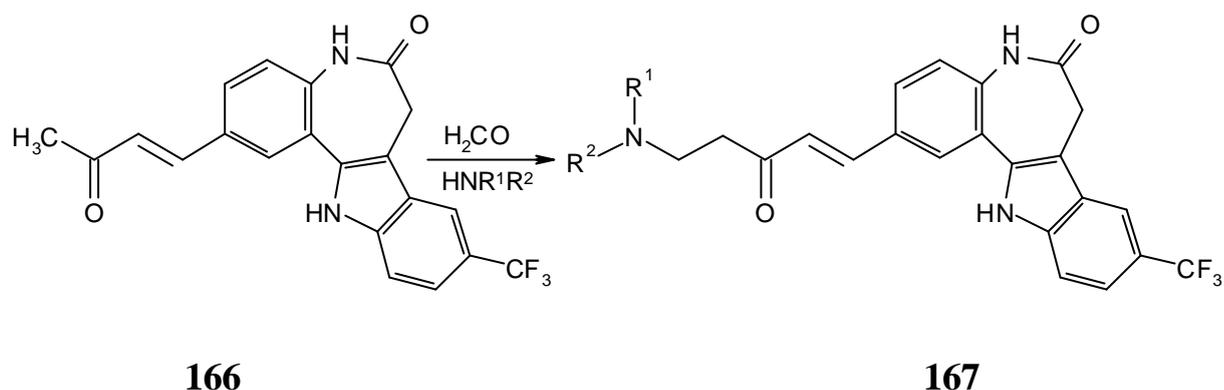
Der letzte Schritt lieferte mittels einer Heck-Reaktion aus dem Paullonderivat **164** und Methylvinylketon (**165**) das 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**166**).^{8,9} (Schema 5-9)

Schema 5-9



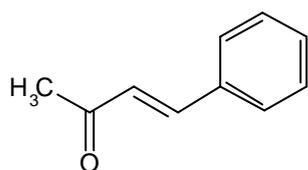
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mit dem Paullon **166** Mannich-Reaktionen durchgeführt werden. Die Aminoalkylierung sollte an der C,H-aciden Methylgruppe der Verbindung mit Formaldehyd und einem sekundären Amin stattfinden. (Schema 5-10)

Schema 5-10

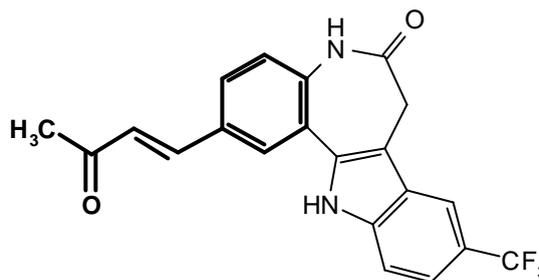


In der Literatur sind vielfältige Vorschriften für die Durchführung von Mannich-Reaktionen zu finden. Nach H. Hellmann und G. Optiz werden Ketone als C,H-acide Bestandteile der Mannich Reaktion einer Aminoalkylierung unterzogen, indem mit überschüssigem Paraformaldehyd und einem Amin-Hydrochlorid in alkoholischen Lösungsmitteln zum Rückfluss erhitzt wird. Als günstig wird eine Zugabe katalytischer Mengen alkoholischer oder konzentrierter Salzsäure zum Reaktionsgemisch eingeschätzt. Diese soll die Depolymerisation des Paraformaldehyds fördern. Eine Umsetzung mit den freien Aminen wird als möglich, jedoch unzweckmäßig bezeichnet.⁹⁵ M. Tramontini gibt als gängiges Lösungsmittel für eine Mannich Reaktion neben Ethanol und Wasser auch Essigsäure an.⁹⁶

Für die Umsetzung des Paullons **166** wurden vor allem Methoden ausgewählt, in denen in der Originalliteratur als C,H-acide Komponente Benzalacetone (**168**) verwendet wird, da das Paullon **166** ein entsprechendes Strukturelement enthält.



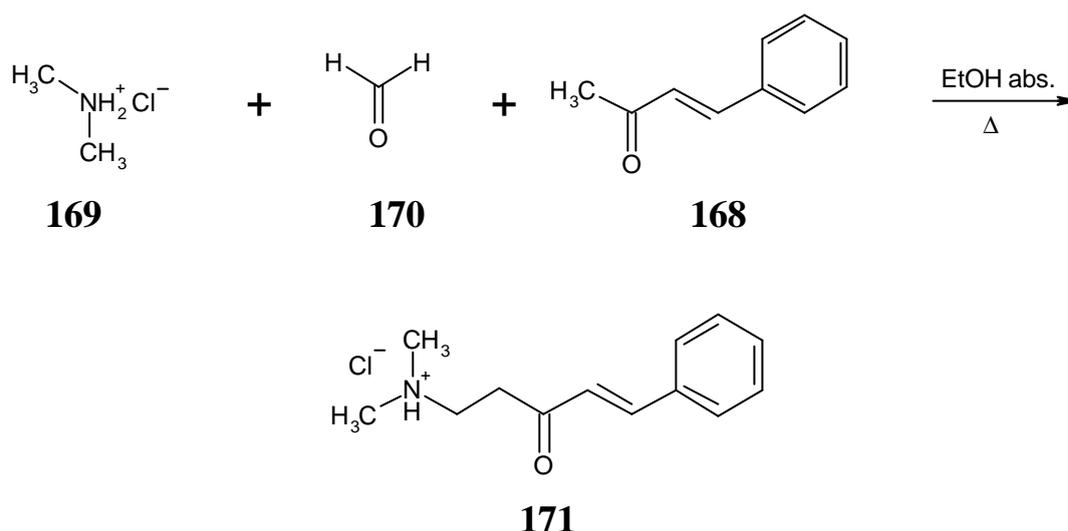
168



166

C. Mannich und B. Reichert beschreiben die Reaktion von Benzalaceton mit Dimethylamin-Hydrochlorid (**169**) und Paraformaldehyd (**170**) in absolutem Ethanol.⁹⁷ (Schema 5-11)

Schema 5-11



Bei einer entsprechenden Reaktion des Paullons **166** mit Paraformaldehyd und Dimethylamin-Hydrochlorid **169** konnte keine Umsetzung erreicht werden. Es wurde das eingesetzte Paullon wieder zurückgewonnen.

In weiteren Versuchen wurden katalytische Mengen konzentrierter oder ethanolischer Salzsäure zum Reaktionsgemisch gegeben, wie es H.B. Nisbet in einer ähnlichen Reaktion beschreibt.⁹⁸ Bei Anwendung dieser Bedingungen mit dem Paullon als Ausgangsmaterial wurde allerdings nur ein Produktgemisch in sehr geringer Ausbeute erhalten.

Der von M. Tramontini als mögliches Lösungsmittel erwähnte Eisessig⁹⁶ erschien für diese Reaktion günstig, da sich Paullone in der Regel gut in Eisessig

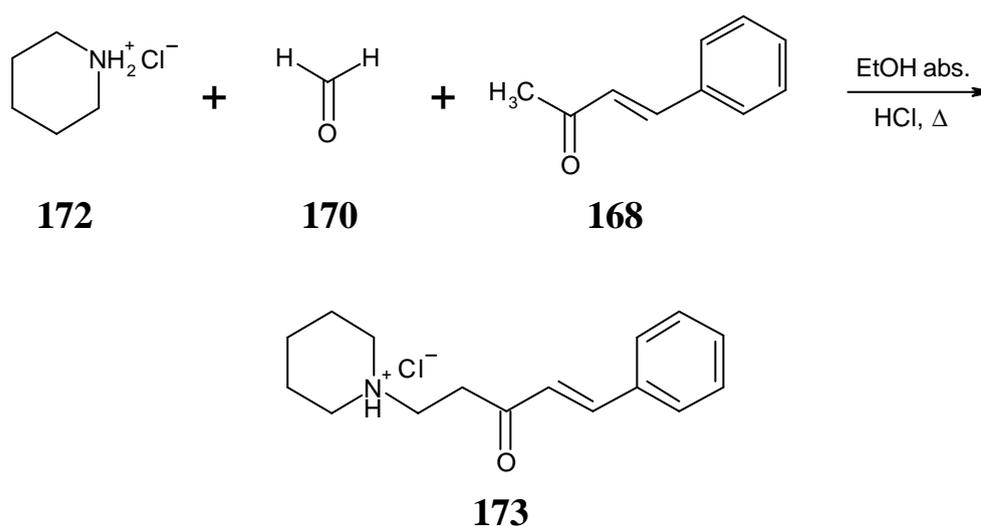
lösen und eine Reaktion deshalb gefördert würde. Leider ergab sich bei diesem Versuchsansatz ebenfalls nur eine geringe Menge eines Produktgemisches.

Bei der Reaktion von Dimethylamin-Hydrochlorid, Paraformaldehyd und Benzalacetone in Ethanol unter Salzsäurezusatz erwies sich das Dimethylamin-Hydrochlorid als ungünstig, da die Reaktion schleppend verlief und nur ein verunreinigtes Produkt gewonnen wurde, auf dessen weitere Aufreinigung verzichtet wurde.

Aufgrund der Angaben in der Literatur erschien Piperidiniumchlorid (**172**) wegen der höheren Ausbeuten als Aminkomponente günstiger als Dimethylamin-Hydrochlorid.^{95,99}

Die Reaktion von Piperidiniumchlorid mit Benzalacetone und Paraformaldehyd wurde zuerst von C. Mannich und M. Schütz beschrieben, in deren Versuchen absolutierter Ethanol als Lösungsmittel diente. Die Umsetzung erfolgte unter Erhitzen zum Rückfluss.¹⁰⁰ Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit probeweise durchgeführte, entsprechende Reaktion wurde nach einer Vorschrift des Organikum¹⁰¹ durchgeführt, die sich abweichend von den von C. Mannich und M. Schütz angegebenen Bedingungen einer Zugabe katalytischer Mengen konzentrierter Salzsäure bedient. Diese Methode führte zu akzeptablen Ausbeuten* an gewünschtem Produkt **173**. (Schema 5-12)

Schema 5-12



* Nach der zitierten Vorschrift wird das Produkt aus dem erkalteten Reaktionsgemisch abfiltriert und aus der Mutterlauge ebenfalls weiteres Produkt gewonnen. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde nur ein Teil des abfiltrierten Niederschlags aufgearbeitet und erbrachte dabei 34 % Ausbeute.

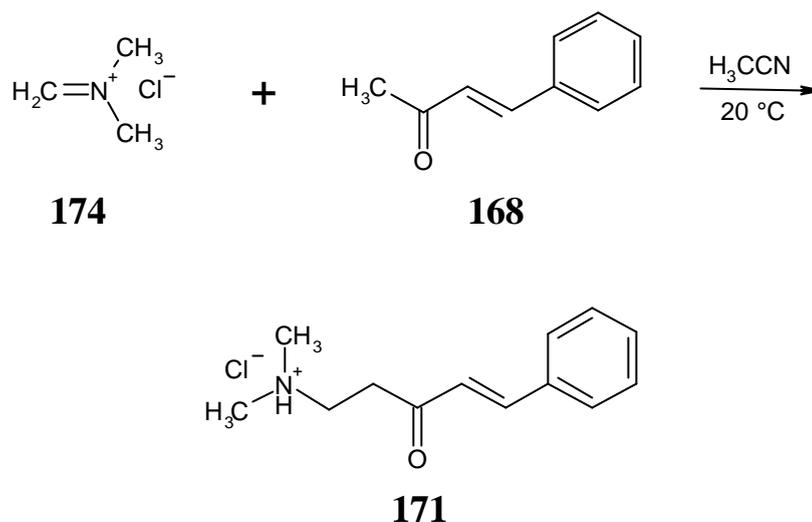
Nach erfolgreicher Aminomethylierung von Benzalaceton in Ethanol mit Salzsäurezusatz wurden auch andere Reaktionsbedingungen, vor allem andere Lösungsmittel getestet. Dies war nötig, da vermutet wurde, dass die ungenügende Löslichkeit des Paullons **166** in Ethanol die Mannich-Reaktion beeinträchtigen kann. Eine „Modellreaktion“ mit Benzalaceton gelang ebenfalls in Eisessig sowie in Toluol unter Salzsäurezusatz.

Leider ergaben die Versuche mit dem Paullon **166** als C,H-acide Komponente keine vergleichbaren Ergebnisse. Hier wurden als Lösungsmittel Ethanol mit Salzsäurezusatz, eine Mischung aus Toluol und Ethanol ebenfalls mit Salzsäurezusatz, Eisessig und DMF getestet. Bei letzterem wurde keine Umsetzung beobachtet, in allen anderen Fällen ergab sich wiederum nur ein nicht trennbares Gemisch.

Eine Reaktion in wässriger Lösung mit Formalin und Piperidin unter Erhitzen zum Rückfluss nach C. Hösch¹⁰² erbrachte keine Umsetzung, wie es aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Paullons zu erwarten war. Es wurde das eingesetzte Paullon wieder zurückgewonnen.

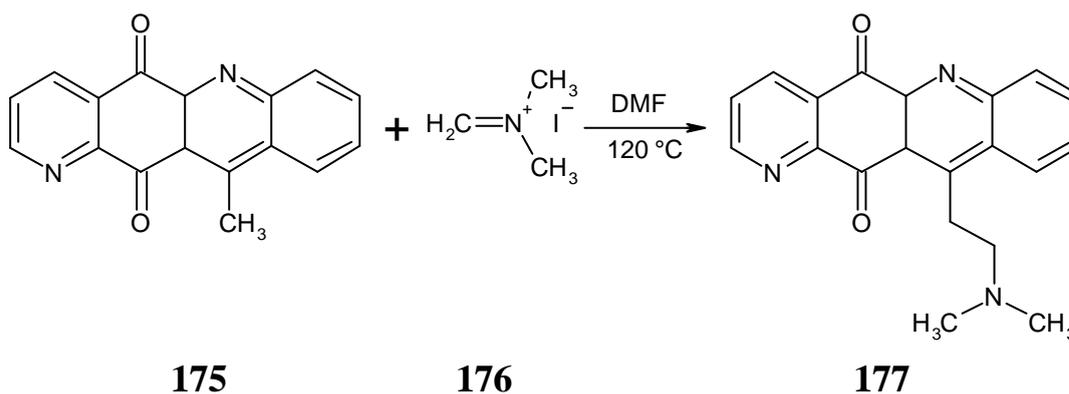
Nach diesen erfolglosen Versuchen, mithilfe einer klassischen Mannich-Reaktion zum gewünschten Produkt zu gelangen, wurde die Umsetzung des Paullons **166** mit N,N-Dimethyl-methylen-ammoniumchlorid (Eschenmosers Salz, **174**) versucht. G. Kinast und L.-F. Tietze verwendeten dieses Reagenz in einer Reaktion mit Benzalaceton, wobei mit wasserfreiem Acetonitril bei 20 °C gearbeitet wurde. (Schema 5-13) Bei Verwendung des Paullons anstelle von Benzalaceton wurde keine Umsetzung beobachtet.

Schema 5-13



Schließlich wurde als Lösungsmittel für letztere Reaktion DMF ausprobiert mit gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur auf $120\text{ }^\circ\text{C}$. Dies stellt eine modifizierte Methode nach B.S. Lindsay, H.C. Christiansen und B.R. Copp dar. Die Autoren beschreiben die Aminoalkylierung einer C,H-aciden Methylgruppe der Verbindung **175** durch N,N-Dimethyl-methylen-ammoniumiodid (**176**).¹⁰³ (Schema 5-14)

Schema 5-14



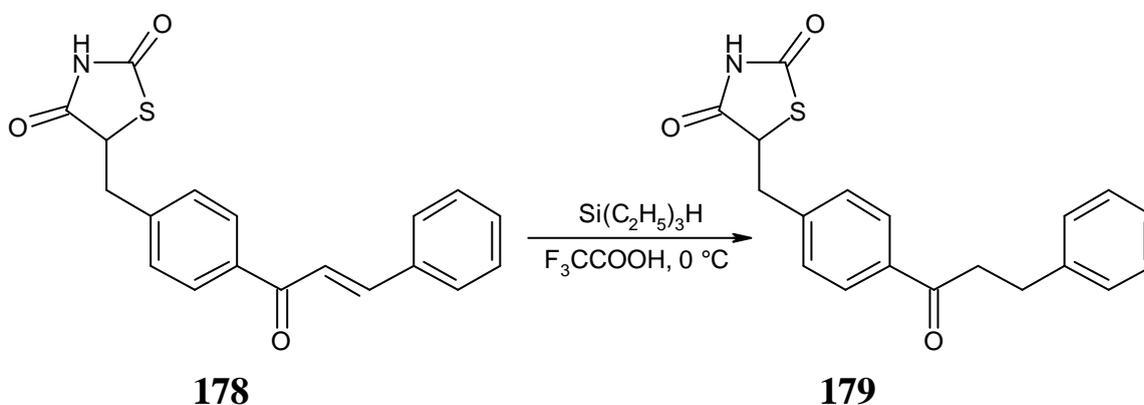
Die Reaktion des Paullons mit N,N-Dimethyl-methylen-ammoniumchlorid unter diesen Bedingungen führte allerdings wiederum zu einem Produktgemisch, aus welchem sich durch Säulenchromatographie keine Verbindung isolieren ließ.

5.4 Reduktion von 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on

Die Seitenkette von Paullon **166** sollte in einer weiteren Versuchsreihe einer Reduktion unterzogen werden, um die Auswirkungen dieser Strukturveränderung auf die Löslichkeit und die biologische Aktivität zu untersuchen. Die α,β -ungesättigte Ketofunktion des 3-Oxo-1-butenylsubstituenten kann zu verschiedenen Reduktionsprodukten führen. Theoretisch ist eine Reduktion zu einem Butyl-, 1-Butenyl-, 3-Oxobutyl-, 3-Hydroxy-1-butenyl- oder 3-Hydroxybutylrest möglich.

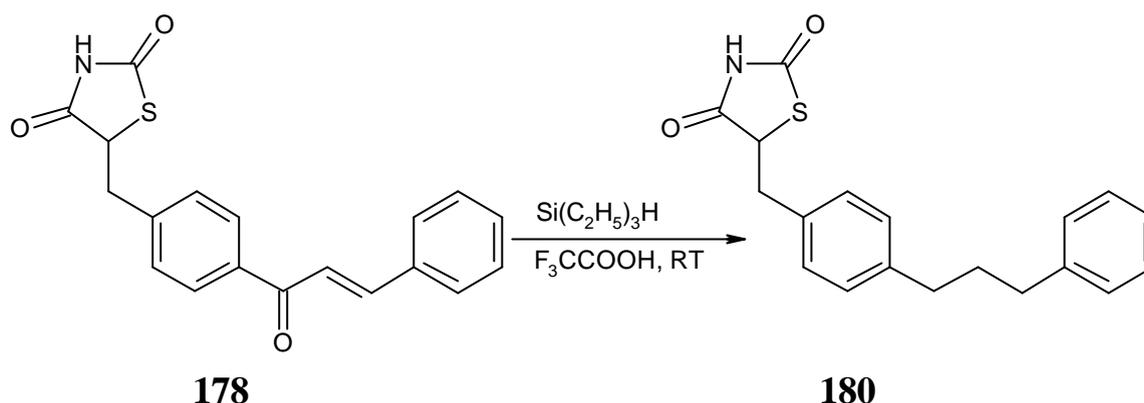
B. Hulin et al. beschreiben verschiedene Reduktionsreaktionen mit (*E*)-5-[4-(3-Phenyl-2-propenoyl)benzyl]thiazolidin-2,4-dion (**178**).¹⁰⁴ Mithilfe einer äquivalenten Menge Triethylsilan in Trifluoressigsäure bei 0 °C wurde die C-C-Doppelbindung des α,β -ungesättigten Ketons reduziert, nicht aber die Carbonylgruppe der genannten Funktion. (Schema 5-15)

Schema 5-15



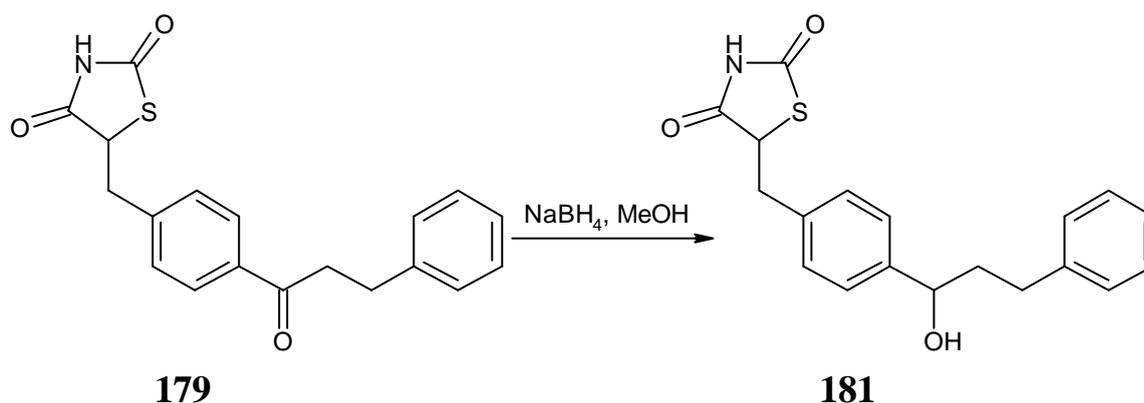
Die Umsetzung der Ausgangsverbindung **178** mit drei Äquivalenten Triethylsilan in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur führte zur vollständigen Reduktion der α,β -ungesättigten Ketofunktion, bei der eine aliphatische Struktur (**180**) entstand. (Schema 5-16)

Schema 5-16



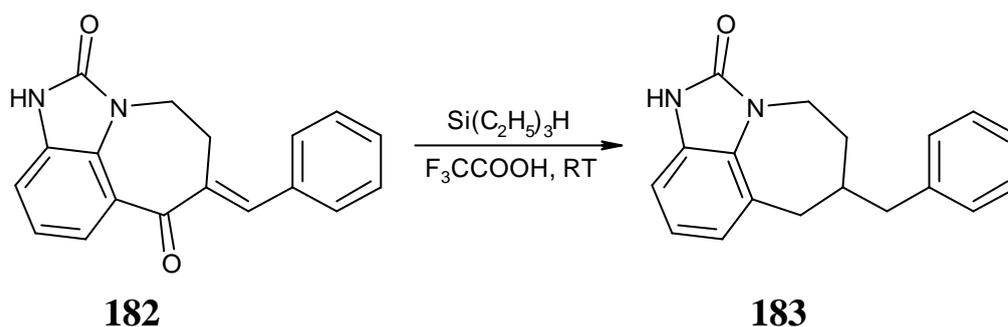
Die Autoren berichten außerdem von einer Reduktion der Keton-Carbonylgruppe von Verbindung **179** zur Hydroxylfunktion durch Natriumborhydrid in Methanol. (Schema 5-17)

Schema 5-17



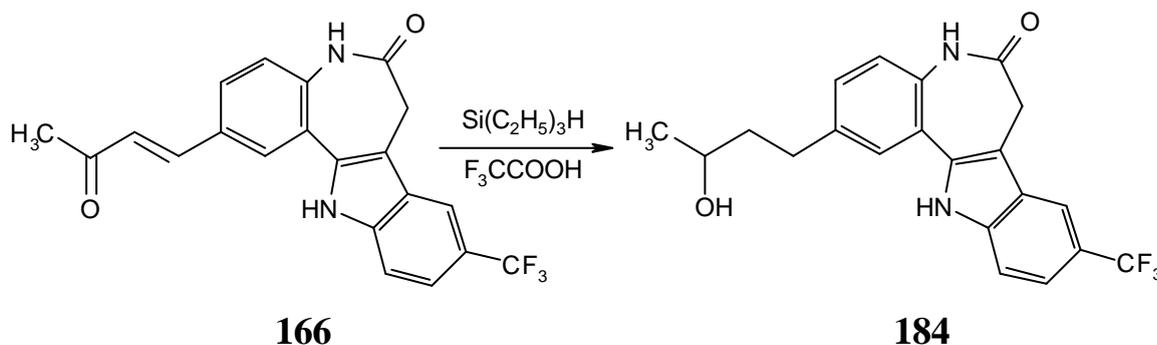
Eine ähnliche Methode wurde von E.J. Salaski angewendet, um ein α,β -ungesättigtes Keton zu reduzieren.¹⁰⁵ Dazu wurde der Heterozyklus **182** mit vier Äquivalenten Triethylsilan in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur umgesetzt, wobei sowohl die Alkenstruktur wie auch die Carbonylgruppe vollständig reduziert wurden. (Schema 5-18)

Schema 5-18



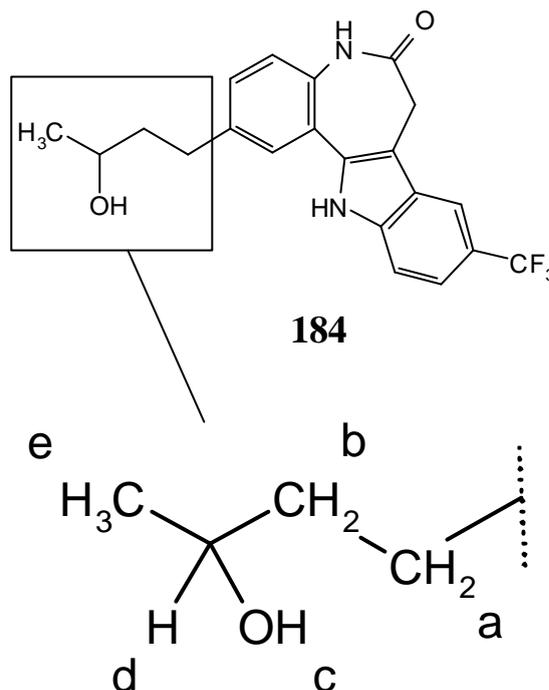
Wie bei den Verbindungen **178** und **182** sollte beim Paullon **166** die α,β -ungesättigte Keton-Teilstruktur reduziert werden. Das Paullon wurde dazu in Trifluoressigsäure gelöst und bei Raumtemperatur mit Triethylsilan umgesetzt. Ein dreifacher Überschuss an Triethylsilan führte nur zu einer unvollständigen Umsetzung des Edukts. Bei Verwendung von fünf Äquivalenten Triethylsilan resultierten mehrere Produkte, von denen das Hauptprodukt durch Säulenchromatographie isoliert werden konnte. Es handelt sich um ein Paullon mit einer 3-Hydroxybutyl-Kette in Position 2 (**184**). (Schema 5-19)

Schema 5-19



5.4.1 ^1H -COSY- und ^{13}C -NMR-Spektrum von 2-(3-Hydroxybutyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on

Die Strukturaufklärung von Verbindung **184** erfolgte unter anderem durch NMR-Spektroskopie. Die Kopplungen der einzelnen Protonen der Hydroxybutyl-Seitenkette im ^1H -COSY-Spektrum, die zur Definition der chemischen Struktur des Paullons **184** führten, sollen hier kurz beschrieben werden.



Die Protonen der endständigen Methylgruppe (e) bei 1.13 ppm weisen ein Kreuzsignal zum Proton auf, das ein Signal bei 3.66 ppm bewirkt. Hierfür kommt nur das Proton d in Frage. Bei diesem sind weitere Kreuzsignale zu finden: Eins besteht zum Proton c der Hydroxylfunktion bei 4.56 ppm, ein weiteres zu den Protonen (b) der benachbarten Methylengruppe bei 1.71 ppm. Die Protonen b dieser Methylengruppe bewirken schließlich das Kreuzsignal zu den Protonen (a) der am Aromaten angeknüpften Methylengruppierung bei 2.66 ppm und 2.77 ppm. Bei 3.59 ppm findet man das Signal für die Azepin-CH₂-Protonen. Da das Paullon **184** ein chirales Zentrum besitzt (Position 3 der Hydroxybutylseitenkette) sind die Signale für die CH₂-Protonen aufgrund des Diastereotopie-Effektes zu Multipletts aufgespalten. Das Signal bei 2.51 ppm wird vom Lösungsmittel DMSO verursacht und das Signal bei 3.39 ppm vom darin enthaltenen Wasser (siehe Bild 5-2).

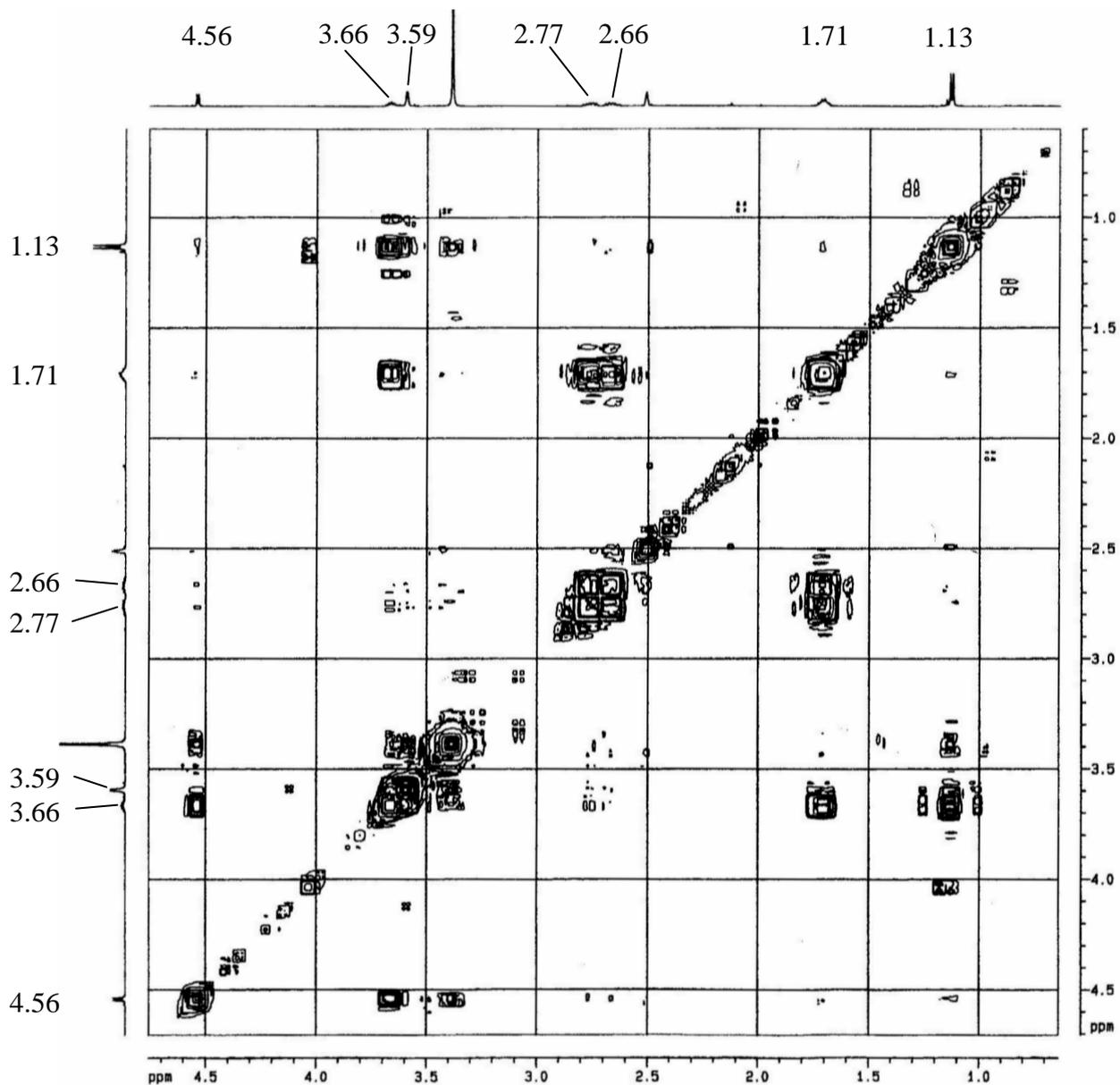
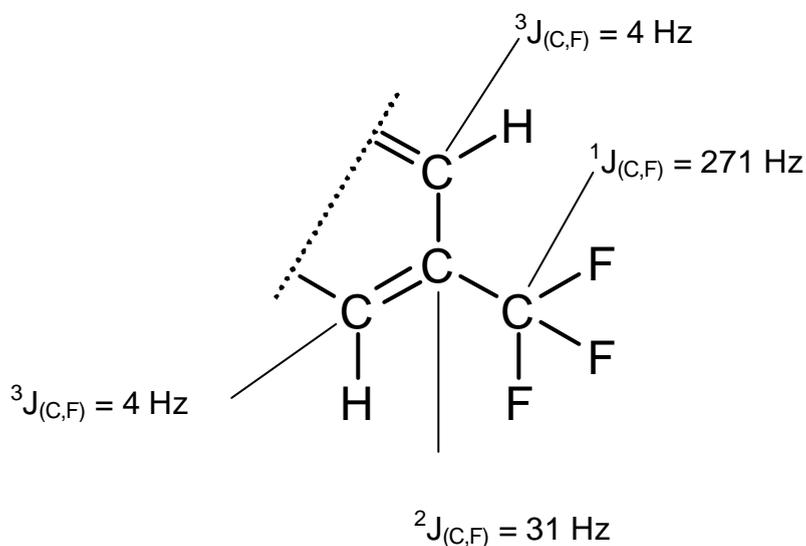
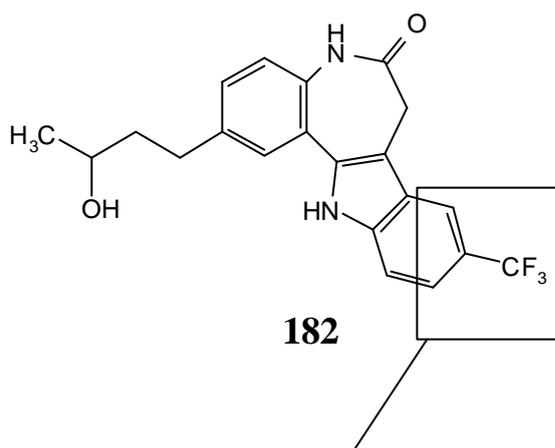


Bild 5-2: Ausschnitt aus dem ^1H -COSY-Spektrum der Verbindung **184** (DMSO- d_6 , 500 MHz). Der abgebildete Bereich umfasst die Signale zwischen 0.65 ppm und 4.75 ppm.

Anhand eines ^{13}C -NMR-Spektrums konnte festgestellt werden, dass die Trifluormethylgruppe im gewonnenen Paullon **182** unverändert enthalten ist. Fluorsubstituierte Moleküle zeigen im ^{13}C -NMR-Spektrum typische Kopplungen zwischen dem jeweiligen Fluoratom und benachbarten Kohlenstoffatomen.¹⁰⁶ Bei der im Paullon enthaltenen Trifluormethylgruppe können die Fluoratome mit insgesamt vier Kohlenstoffatomen koppeln, wobei sich jeweils ein Quartett mit unterschiedlichen Kopplungskonstanten ergibt. Die

Kopplungskonstante für die Kopplung zwischen den Fluoratomen und dem Kohlenstoffatom der Trifluormethylgruppe $^1J_{(C,F)}$ beträgt dabei theoretisch 272 Hz (hier: 271 Hz). Die $^2J_{(C,F)}$ -Kopplungskonstante zum C9 des Paullonggrundgerüsts, an dem der Trifluormethylsubstituent lokalisiert ist, beträgt theoretisch 32 Hz (hier: 31 Hz). Die beiden zu letzterer Position benachbarten tertiären Kohlenstoffatome, C8 und C10 des Paullons, weisen jeweils eine $^3J_{(C,F)}$ -Kopplungskonstante von 4 Hz auf.¹⁰⁶

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **182** ist das Signal für das Kohlenstoffatom der Trifluormethylgruppe bei 125.5 ppm zu finden. Häufig ist dieses Quartett bei Vermessung zu geringer Mengen entsprechender Derivate nicht auszumachen, da wegen der Aufspaltung die Peaks sehr klein sind. Das quartäre C9 des Paullons verursacht ein Quartett bei 120.0 ppm. Die beiden erwähnten tertiären Kohlenstoffatome zeigen Signale bei 115.8 und 118.2 ppm (siehe Bild 5-3).



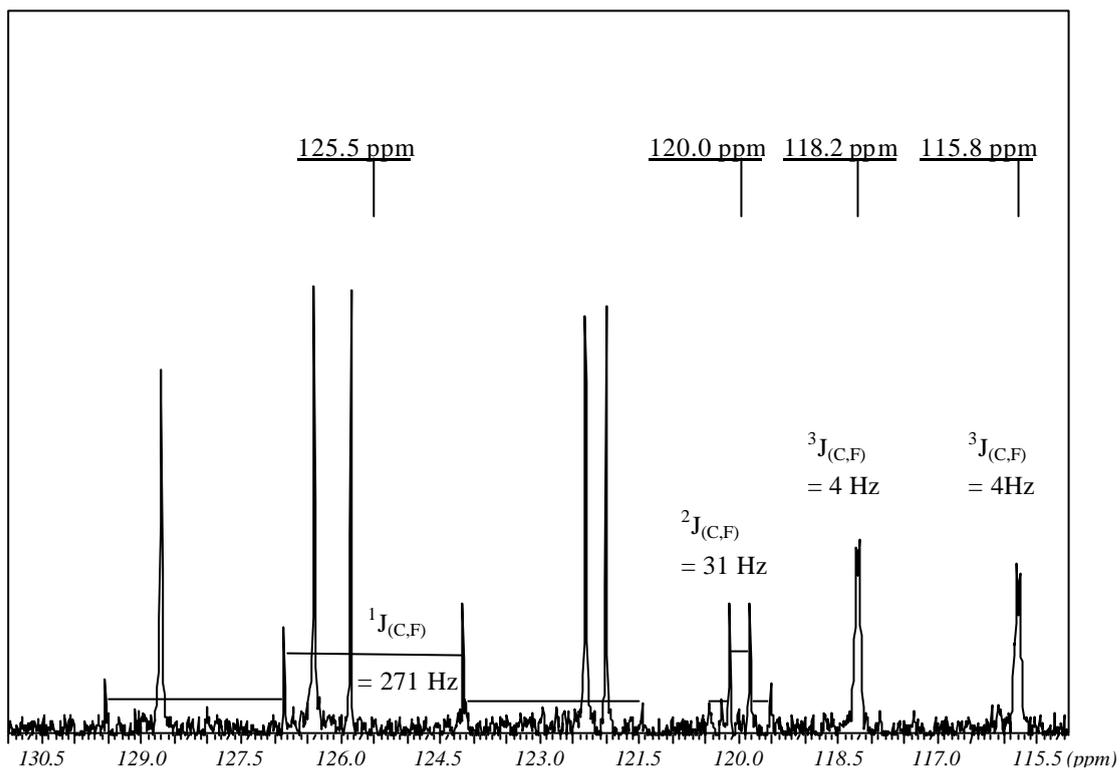


Bild 5-3: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) von Verbindung **182**. Der abgebildete Bereich umfasst die Signale zwischen 115.0 ppm und 131.0 ppm.

6 Biologische Aktivität der Paullonanaloga

Von C. Schultz wurden zahlreiche Paullone synthetisiert und anschließend bezüglich ihrer Aktivität an CDK1/Cyclin B, CDK5/p25 (bzw. p35) und GSK-3 β getestet. Zusätzlich wurde ihre Wirkung im NCI-Tumorzelllinien-Screening untersucht.⁷⁻⁹

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellten Paullonderivate wurden ebenfalls im Hinblick auf eine potentielle CDK- und GSK-3 β -inhibitorische Aktivität und antiproliferative Wirkung synthetisiert. Dabei sollten weitere Erkenntnisse über Strukturmodifikationen, die eine höhere Aktivität in den erwähnten Untersuchungen zur Folge haben, gewonnen werden. In den folgenden Abschnitten werden die von C. Schultz und M. Leost et al. berichteten Ergebnisse der biologischen Testung von zuvor beschriebenen Paullonderivaten mit aufgeführt, sofern sie als Vergleichswerte von Interesse sind.

6.1 CDK- und GSK-3 β -inhibitorische Aktivität

In Enzymassays wurden die Verbindungen **109b-h**, **110a-e**, **111a**, **128**, **138**, **147**, **139a-d**, **140**, **154**, **156** und **184** an CDK1/Cyclin B, CDK5/p25 (z.T. CDK5/p35) und GSK-3 β getestet.

Wie in den Kapiteln 2 und 3 ausführlich dargelegt, stellt die Hemmung des CDK1/Cyclin B-Komplexes eine Möglichkeit dar, auf eine deregulierte Zellteilung Einfluss zu nehmen. Die CDK1/Cyclin B-inhibitorische Wirkung der Paullonderivate macht diese Verbindungen deshalb zu potentiellen Krebstherapeutika.

Ebenfalls wurde in den angegebenen Kapiteln beschrieben, dass sowohl CDK1- als auch CDK5- und GSK-3 β -Deregulation eine Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung spielen. Eine Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Paullonanaloga bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität bei genannten Enzymen ist also aufgrund des möglichen Einsatzes zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung zusätzlich von Interesse.

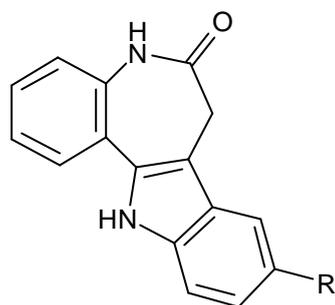
Die Messung der Aktivität der Paullonderivate gegenüber den angegebenen Enzymen erfolgte im Arbeitskreis von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich). Dabei wurde bestimmt, in welchem Maße eine von den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK1/Cyclin B und CDK5/p25 bzw. p35) katalysierte Phosphorylierung von Histon H1 durch das jeweilige Paullonderivat gehemmt wird. Die inhibitorische Wirkung einer Verbindung auf CDK5 wird durch das mit dieser CDK assoziierte Protein beeinflusst. Aus diesem Grund sollten Ergebnisse von Untersuchungen an CDK5/p35 nicht direkt mit denen von Tests an CDK5/p25 verglichen werden.

Für die Testung an GSK-3 β wird die inhibitorische Wirkung der Paullonanaloga auf die Phosphorylierung des GS-1-Peptids untersucht.

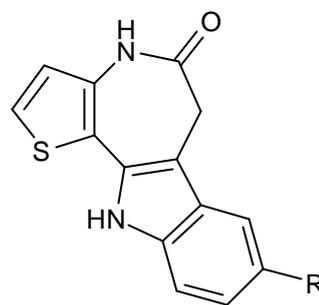
Für die Berechnung der Konzentration, die eine 50-prozentige Hemmung der Enzymaktivität (IC_{50}) bewirkt, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Alle Untersuchungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die folgende Tabelle 6-1 enthält die Testergebnisse für die 8-substituierten thienoanellierten Paullonderivate und die entsprechenden 9-substituierten benzoanalogen Paullone. Letztere wurden von C. Kunick (Kenpaullon) und C. Schultz dargestellt.^{5,7-9}

Tabelle 6-1: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- (p35-) und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]



185a-d, Kenpaullon, (**2**)
Alsterpaullon (**3**), **108**



109b-h

| | R | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M] | CDK5/p25 (p35) IC ₅₀ [μ M] | GSK-3 β IC ₅₀ [μ M] |
|----------------------------|------------------|--|---|--|
| 185a | CH ₃ | 2.0 | 6.3 | 0.13 |
| 185b | OCH ₃ | 0.90 | 2.1 | 2.2 |
| Kenpaullon (2) | Br | 0.40 | 0.85 | 0.023 |
| 185c | Cl | 0.60 | 0.80 | 0.024 |
| 185d | CF ₃ | 0.40 | 0.60 | 0.030 |
| Alsterpaullon (3) | NO ₂ | 0.035 | 0.040 | 0.004 |
| 108 | CN | 0.024 | 0.044 | 0.010 |
| 109b | CH ₃ | 4 | 40 ^a | 1.3 |
| 109c | OCH ₃ | 3.2 | 10 | 10 |
| 109d | Br | 0.6 | 4.0 | 0.12 |
| 109e | Cl | 0.5 | 5 ^a | 0.4 |
| 109f | CF ₃ | 0.7 | 1.5 | 0.14 |
| 109g | NO ₂ | 0.08 | 0.1 | 0.035 |
| 109h | CN | 0.075 | 0.32 | 0.33 |

^a Aktivität bei CDK5/p35

Die thienoanellierten Paullonderivate lassen sich aufgrund ihrer CDK1-inhibitorischen Wirkung in drei Gruppen einteilen. Die methyl- und methoxy-substituierten Verbindungen **109b** und **109c** sind dabei um eine Größenordnung schwächer aktiv als die chlor-, brom- und trifluormethylsubstituierten **109e**, **109d** und **109f**. Diese wiederum werden von den nitro- und cyanosubstituierten Substanzen **109g** und **109h** bezüglich ihrer CDK1-inhibitorischen Wirkung um

eine weitere Größenordnung übertroffen. Entsprechende Verhältnisse findet man auch bei den benzoanalogen Verbindungen Kenpaullon (**2**), Alsterpaullon (**3**), **108** und **185a-d**, wobei diese jeweils eine etwas höhere Aktivität als die thienoanellierten Derivate zeigen.

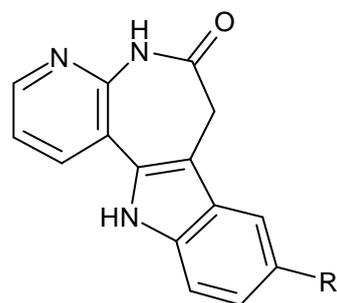
An CDK5 sind die Verbindungen um bis zu eine Größenordnung schwächer aktiv. Vergleichbares wurde schon von C. Schultz für einige benzoanellierte Derivate festgestellt. Die thienoanellierten Derivate können bezüglich ihrer CDK5-inhibitorischen Aktivität in ähnliche Gruppen eingeteilt werden, wie dies für die CDK1-Inhibition beschrieben wurde. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass das methyl- und das chloresubstituierte Derivat (**109b** und **109e**) an CDK5/p35 getestet wurden, während als CDK5-assoziiertes Protein in den anderen Fällen p25 verwendet wurde.

Für die GSK-3 β -inhibitorische Aktivität lässt sich die Einteilung in drei Gruppen nicht aufrechterhalten. Am schwächsten wirkt hier das methoxysubstituierte Derivat **109c**, während sich das methylsubstituierte Paullonderivat **109b** um eine Größenordnung aktiver zeigt. Überraschenderweise sind die IC₅₀-Werte von **109h** und **109e** vergleichbar, während **109g** eine vergleichsweise hohe Aktivität auch bei GSK-3 β behält. Die Verbindungen **109d** und **109f** erweisen sich wie erwartet als äquivalent. Sie liegen mit ihrer GSK-3 β -inhibitorischen Aktivität im mittleren Bereich der hier beschriebenen thienoanellierten Verbindungen **109**.

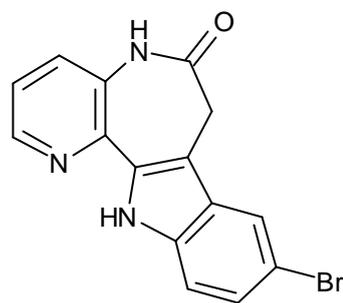
Im Vergleich zu den in der Literatur bereits beschriebenen Paullonen hat sich der Thienoanelland für die Inhibition der CDK1 als nahezu äquivalent zum Benzoanellanden der Paullone gezeigt. Schon etwas stärker aktivitätsmindernd scheint er bei Testungen an CDK5 zu sein, während er bei GSK-3 β eine Abschwächung der Wirkung um eine Größenordnung bewirkt. Beim Carbonitril **109h** wird die GSK-3 β -inhibitorische Aktivität durch Thienoanellierung verglichen mit dem 9-Cyanopaullon **108** sogar um das 330fache abgeschwächt.

In der nachfolgenden Tabelle 6-2 sind die IC₅₀-Werte für die pyridoanellierten Paullonderivate **110a-e** und **111a** aufgeführt.

Tabelle 6-2: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]



110a-e



111a

| | R | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M] | CDK5/p25 IC ₅₀ [μ M] | GSK-3 β IC ₅₀ [μ M] |
|-------------|------------------|--|---|--|
| 110a | CH ₃ | 200 | 430 | > 1000 |
| 110b | OCH ₃ | 90 | 420 | - ^b |
| 110c | Br | 8.4 | 12 | 6.0 |
| 110d | Cl | 23 | 42 | 500 |
| 110e | CF ₃ | 6 | 13 | 5.3 |
| 111a | | 1.5 | 4.2 | 0.025 |

^b Testergebnis liegt nicht vor.

Eine Pyridoanellierung, welche der formalen Einführung eines Stickstoffatoms in die Position 4 des Paullongrundgerüsts entspricht, hat deutlich negative Auswirkungen auf die inhibitorische Aktivität an CDK und GSK-3 β . Die in ihrer Wirkung äquivalenten Verbindungen **110c** und **110e** sind etwa eine Größenordnung schwächer aktiv als die entsprechenden thienoanellierten Derivate, und zwar bezüglich ihrer Aktivität an CDK1, CDK5 und GSK-3 β . Die Verbindung **110d** mit einem Chlorsubstituenten ist unerwarteterweise noch deutlich schwächer aktiv als **110c** und **110e**. Die höchsten IC₅₀-Werte zeigen, wie auch bei den in Tabelle 6-1 aufgeführten Substanzen, diejenigen mit einer Methyl- oder Methoxysubstitution (**110a** und **110b**).

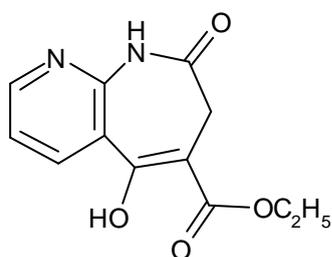
Das Paullonderivat **111a** mit einem Stickstoffatom in Position 1 bewirkt eine 50-prozentige Hemmung der CDK1- und CDK5-Enzymkomplexe erst durch vier- bis fünffach höhere Konzentrationen als die Leitstruktur Kenpaullon (**2**). Bemerkenswert ist hier allerdings die ausgeprägte Selektivität für GSK-3 β , bei

welcher das Paullonderivat **111a** eine mehr als sechzigfach höhere Aktivität aufweist als bei CDK1 und CDK5.

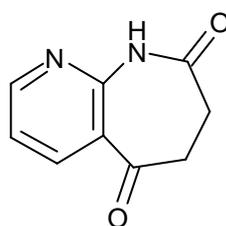
Ein formaler Austausch des Kohlenstoffatoms in Position 4 des Paullongrundgerüsts durch ein Stickstoffatom ist offensichtlich von Nachteil für die gewünschte Enzymwirkung. Dagegen sind Verbindungen mit einem Stickstoffatom in Position 1 des Paullongrundgerüsts als potentielle GSK-3 β -Inhibitoren mit einer Selektivität gegenüber CDK1 und CDK5 von Interesse.

Ebenfalls untersucht wurde die Aktivität einiger Vorstufen der Paullonderivate (**128**, **138**, **147**, **139a-d**) und die Wirkung des als Nebenprodukt gewonnenen Pyridazinonderivates **140**. Die entsprechenden IC₅₀-Werte sind in Tabelle 6-3 und Tabelle 6-4 enthalten.

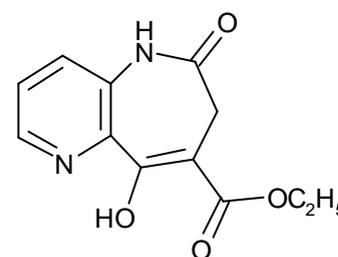
Tabelle 6-3: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]



128



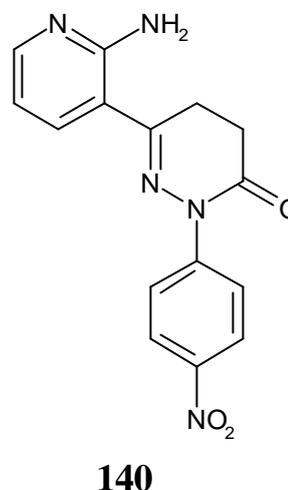
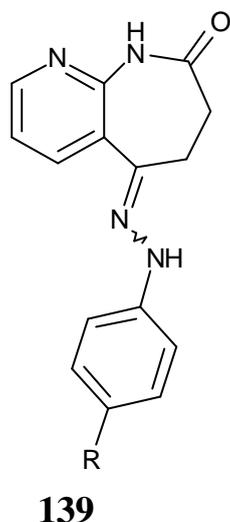
138



147

| | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M] | CDK5/p25 IC ₅₀ [μ M] | GSK-3 β IC ₅₀ [μ M] |
|------------|--|---|--|
| 128 | 850 | > 1000 | > 1000 |
| 138 | 1000 | > 1000 | > 1000 |
| 147 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |

Tabelle 6-4: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]

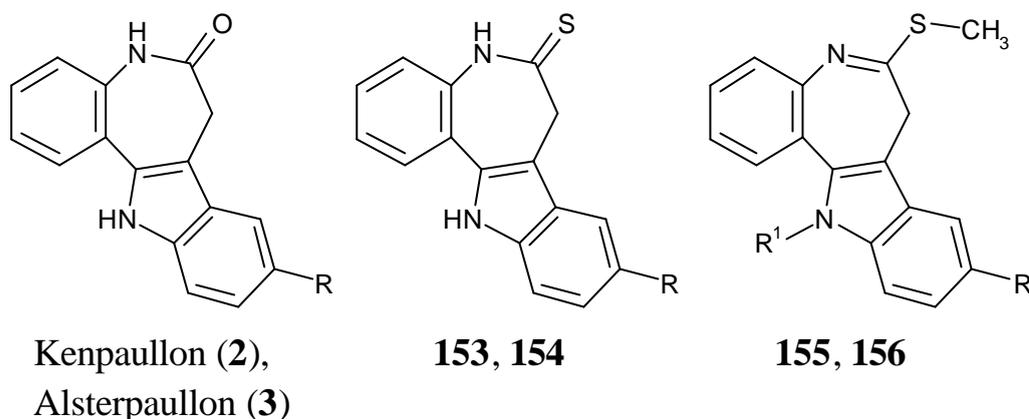


| | R | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M] | CDK5/p25 IC ₅₀ [μ M] | GSK-3 β IC ₅₀ [μ M] |
|-------------|-----------------|--|---|--|
| 139a | CF ₃ | 400 | > 1000 | > 1000 |
| 139b | NO ₂ | 500 | > 1000 | 520 |
| 139c | Br | 190 | 450 | 1000 |
| 139d | Cl | 230 | 1000 | > 1000 |
| 140 | | 530 | > 1000 | > 1000 |

Keine der aufgeführten Verbindungen zeigte an den drei Kinasen eine nennenswerte Aktivität. Alle IC₅₀-Werte lagen über 190 μ M, die meisten überschritten 500 μ M. Für benzoanalogue Hydrazone waren von C. Schultz ähnliche Ergebnisse berichtet worden.⁹

Die Daten in Tabelle 6-5 beleuchten die Auswirkungen, die die Veränderung der Lactamstruktur von Alsterpaullon auf die Aktivität hat. Die entsprechenden Werte für Kenpaullon und einige Derivate sind zum Vergleich mit aufgeführt.

Tabelle 6-5: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]



| | | | CDK1/Cyclin B | CDK5/p25 | GSK-3 β |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | R | R ¹ | IC ₅₀ [μ M] | IC ₅₀ [μ M] | IC ₅₀ [μ M] |
| Kenpaullon (2) | Br | | 0.40 | 0.85 | 0.023 |
| 153 | Br | | 2.3 | 8.0 | 2.0 |
| 155 | Br | H | 43 | 450 | 1.2 |
| Alsterpaullon (3) | NO ₂ | | 0.035 | 0.040 | 0.004 |
| 154 | NO ₂ | | 1.3 | 1.7 | 0.6 |
| 156 | NO ₂ | CH ₃ | 230 | 850 | 1000 |

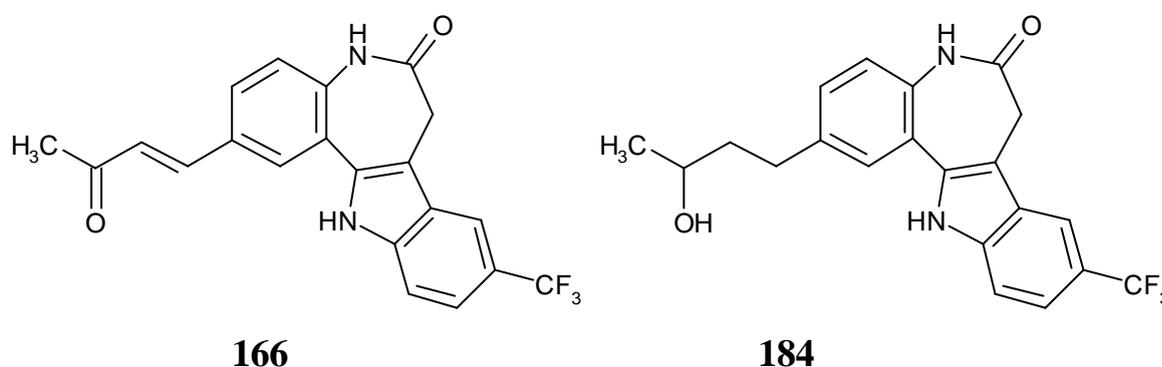
Die Umwandlung der Lactamfunktion von Kenpaullon (2) in eine Thiolactamgruppe führte zu Verbindung **153**, welche eine deutliche Abnahme der inhibitorischen Aktivität an CDK1 und CDK5 um etwa eine Größenordnung zeigte. Die Wirkung auf GSK-3 β wurde um das 100fache abgeschwächt. Bei weiterer Veränderung der Funktionalität zu einem Thiolactimether wurde Verbindung **155** gewonnen, welche eine drastische Verminderung der inhibitorischen Aktivität an CDK1 und CDK5 verglichen mit Kenpaullon erbrachte. Interessanterweise zeigte sich für Verbindung **155** eine Selektivität für GSK-3 β .⁷⁻⁹

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Derivatisierung von Alsterpaullon (3) sollte dieses Phänomen weiter beleuchten. Das Thiolactamderivat **154** hemmte die untersuchten Kinasen kaum stärker als das Analogon **153**. Damit führt der Austausch der Lactam- gegen eine Thiolactamgruppe bei Alsterpaullon zu einer Aktivitätsabschwächung um zwei Größenordnungen. Leider gelang die Darstellung eines von Alsterpaullon abgeleiteten

Thiolactimethers nicht. Das bei entsprechenden Versuchen gewonnen dimethylierte Derivat **156** zeigte in den Enzymassays keine nennenswerte Aktivität.

Die nachfolgende Tabelle 6-6 zeigt die Ergebnisse der Testung des Paullons **166** im Vergleich zu seinem bisher nicht beschriebenen Reduktionsprodukt **184**.

Tabelle 6-6: Hemmung der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 β -Aktivität, IC₅₀ [μ M]



| | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M] | CDK5/p25 IC ₅₀ [μ M] | GSK-3 β IC ₅₀ [μ M] |
|------------|--|---|--|
| 166 | 0.32 | 34 | 1.4 |
| 184 | 0.35 | 0.7 | 0.17 |

Bei Testung des Paullons **166** zeigte dies eine stärkere Wirkung bei CDK1 als bei den anderen Kinasen. Hierbei war die Aktivität an CDK1 in etwa um das dreifache höher als an GSK-3 β und sogar mehr als hundertfach höher als an CDK5.⁷⁻⁹

Die Reduktion der Seitenkette in Position 2 des Paullons **166** führte zum Paullon **184**. Diese Modifikation erbrachte praktisch keine Veränderung der CDK1-inhibitorischen Aktivität, während die Wirkung an CDK5 und GSK-3 β deutlich erhöht wurde, so dass hier keine Selektivität mehr festzustellen war.

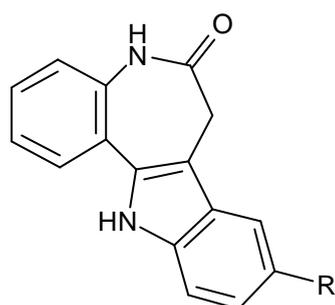
6.2 In vitro Antitumoraktivität

Die antiproliferativen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden im in vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI untersucht.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

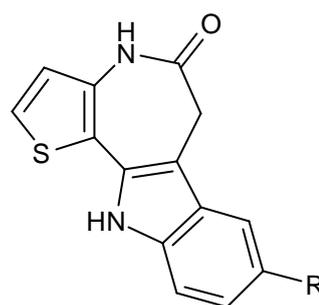
Angegeben ist hier jeweils der Mittelwert der \log_{10} GI₅₀-Werte aller Zelllinien (\log_{10} GI₅₀ [M] MG_MID). Für alle Testsubstanzen lag die höchste getestete Konzentration bei 10^{-4} M. Der dekadische Logarithmus der maximalen Testkonzentration ($\log_{10} 10^{-4} = -4.0$) wurde in die Berechnung der mittleren Antitumoraktivität (MG_MID) einbezogen, auch wenn bei dieser Konzentration durch die entsprechende Substanz keine 50-prozentige Hemmung der jeweiligen Zelllinie bewirkt wurde. Deshalb wird durch einen \log_{10} GI₅₀ [M] MG_MID von -4.0 angezeigt, dass an keiner der getesteten Zelllinien eine 50-prozentige Wachstumshemmung durch eine Konzentration der Testsubstanz erreicht wurde, die niedriger als 10^{-4} M liegt.

In Tabelle 6-7 sind die MG_MID-Werte für die thienoanellierte Paullonderivate **109b-h** im Vergleich zu denen der entsprechenden benzoanellierte Paullonen^{8,9} dargestellt.

Tabelle 6-7: in vitro Antitumoraktivität, log₁₀ GI₅₀ [M] MG_MID



Kenpaullon(2),
Alsterpaullon(3), **185a-d**



109b-h

| | R | log ₁₀ GI ₅₀ [M] MG_MID ^a |
|--------------------------|------------------|--|
| 185a | CH ₃ | -4.0 |
| 185b | OCH ₃ | -4.6 |
| Kenpaullon (2) | Br | -4.4/-4.3 |
| 185c | Cl | -4.1 |
| 185d | CF ₃ | -4.1 |
| Alsterpaullon (3) | NO ₂ | -6.4/-6.5 |
| 108 | CN | -4.1 |
| 109b | CH ₃ | -4.42 |
| 109c | OCH ₃ | -4.59 |
| 109d | Br | -4.05 |
| 109e | Cl | -4.07 |
| 109f | CF ₃ | -4.53 |
| 109g | NO ₂ | -5.47 |
| 109h | CN | -4.09 |

^a Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch einen Schrägstrich voneinander getrennt.

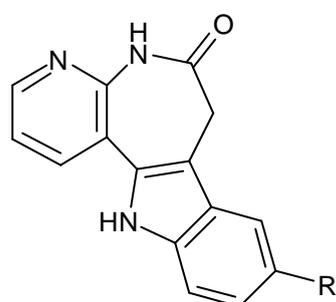
Die Derivate **109e**, **109d** und **109h** zeigen keine nennenswerte antiproliferative Aktivität. Eine überraschend schwache Aktivität des Carbonitrils **108** an Tumorzellen trotz einer ausgeprägten CDK1-inhibitorischen Wirkung wurde von C. Schultz schon beschrieben.^{8,9} Entsprechende Beobachtungen ergaben sich für die thienoanellierte Verbindung **109h**, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisiert worden war.

Das Trifluormethylderivat **109f** ist im Tumorzelllinien-Screening etwas aktiver als das entsprechende analoge Paullon **185d**. Entgegen ihrer deutlich schwächeren inhibitorischen Aktivität bei CDK1 sind die Verbindungen **109b**

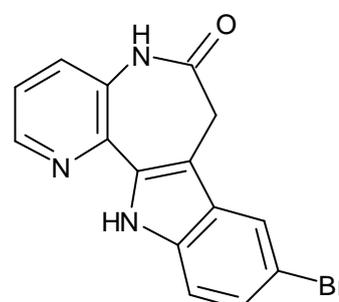
und **109c** an Tumorzelllinien aktiver als die brom- und chlosubstituierten Derivate **109d** und **109e**, welche im CDK1-Assay höhere Aktivität gezeigt haben. Die höchste Aktivität wurde wie erwartet bei der Alsterpaullon-ähnlichen Verbindung **109g** gefunden, wobei diese allerdings um eine Größenordnung schwächer aktiv war als Alsterpaullon (**3**).

Tabelle 6-8 enthält die MG_MID-Werte für die pyridoanellierten Paullonderivate **110a-e** und **111a**.

Tabelle 6-8: in vitro Antitumoraktivität, $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID



110a-e



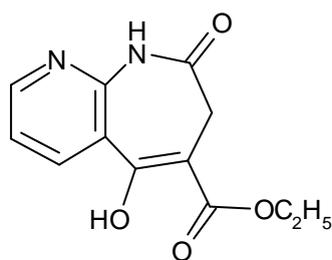
111a

| | R | $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID |
|-------------|------------------|--------------------------------|
| 110a | CH ₃ | -4.12 |
| 110b | OCH ₃ | -4.01 |
| 110c | Br | -4.01 |
| 110d | Cl | -4.00 |
| 110e | CF ₃ | -4.11 |
| 111a | | -4.21 |

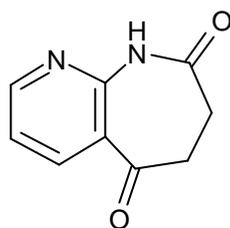
Von diesen Paullonanaloga mit veränderter heterozyklischer Grundstruktur zeigte keines eine erwähnenswerte antiproliferative Aktivität. Der niedrigste ermittelte MG_MID-Wert lag bei -4.21 für das Kenpaullonderivat **111a** mit einem Stickstoffatom in Position 1. Diese Werte korrelieren mit der jeweiligen CDK1-inhibitorischen Aktivität.

Tabelle 6-9 und Tabelle 6-10 enthalten die in vitro Antitumoraktivitäten einiger Vorstufen der Paullone einschließlich einiger Hydrazone beschrieben durch die entsprechenden MG_MID-Werte. Ebenfalls aufgeführt ist der MG_MID-Wert für das Nebenprodukt der Fischer-Indol-Synthese **140a**.

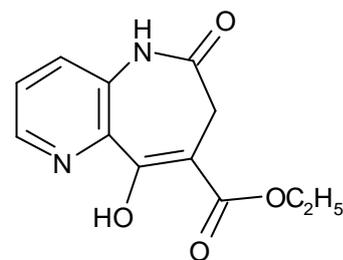
Tabelle 6-9: in vitro Antitumoraktivität, $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID



128



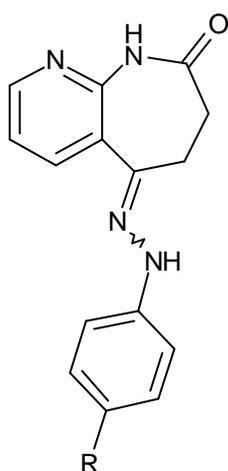
138



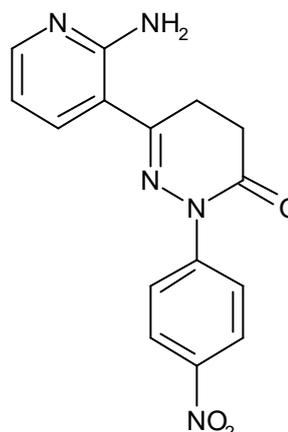
147

| | $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID |
|------------|--------------------------------|
| 128 | -4.06 |
| 138 | -4.02 |
| 147 | -4.00 |

Tabelle 6-10: in vitro Antitumoraktivität, $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID



139a-d



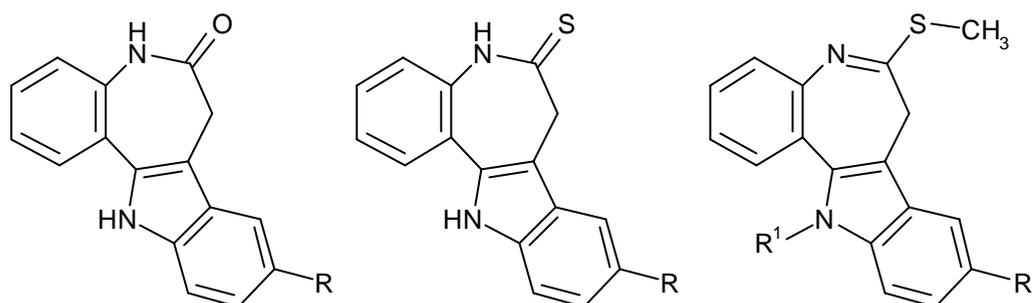
140a

| | R | $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID |
|-------------|-----------------|--------------------------------|
| 139a | CF ₃ | -4.00 |
| 139c | Br | -4.02 |
| 139d | Cl | -4.07 |
| 140a | | -4.02 |

Die Verbindungen **139a**, **c**, **d** und **140a** zeigten praktisch keine antiproliferativen Eigenschaften. Von C. Schultz wurden entsprechende Ergebnisse auch für benzoanellierte Hydrazonderivate berichtet.⁸

In der nachfolgenden Tabelle 6-11 sind die MG_MID-Werte für die Paullone mit veränderter Lactamstruktur **154** und **156** aufgeführt. Zum Vergleich sind ebenfalls die Ausgangsverbindung Alsterpaullon (**3**) sowie Kenpaullon (**2**) und die von C. Schultz beschriebene von Kenpaullon abgeleitete Verbindung **155** aufgeführt.^{8,9}

Tabelle 6-11: in vitro Antitumoraktivität, log₁₀ GI₅₀ [M] MG_MID



Kenpaullon (**2**),
Alsterpaullon (**3**)

154

155, 156

| | R | R ¹ | log ₁₀ GI ₅₀ [M] MG_MID ^a |
|----------------------------|-----------------|-----------------|--|
| Kenpaullon (2) | Br | | -4.4/-4.3 |
| 155 | Br | H | -5.5/-5.7 |
| Alsterpaullon (3) | NO ₂ | | -6.4/-6.5 |
| 154 | NO ₂ | | -4.70 |
| 156 | NO ₂ | CH ₃ | -4.20 |

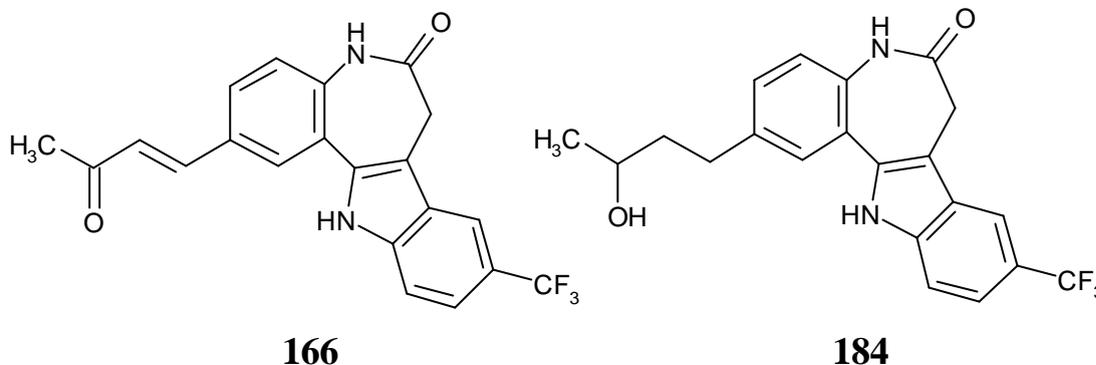
^a Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch einen Schrägstrich voneinander getrennt.

Die Veränderung der Lactamgruppe von Kenpaullon in eine Thiolactimetherfunktion, die zu Verbindung **155** geführt hat, erbrachte eine Aktivitätssteigerung im Tumorzelllinien-Screening um eine Größenordnung. Für das entsprechende Thiolactam **153** liegen keine Daten vor.⁸

Das Thiolactam **154**, welches sich von Alsterpaullon ableitet, zeigt zwar noch eine Antitumoraktivität, allerdings ist diese verglichen mit der von Alsterpaullon durch die Strukturveränderung drastisch um fast zwei Größenordnungen vermindert. Die Verbindung **156**, die bei dem Versuch entstand, einen von Alsterpaullon abgeleiteten Thiolactimether darzustellen, erwies sich als noch weniger aktiv.

Tabelle 6-12 enthält die MG_MID-Werte für das Paullon **166** und dessen Reduktionsprodukt **184**.

Tabelle 6-12: in vitro Antitumoraktivität, $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID



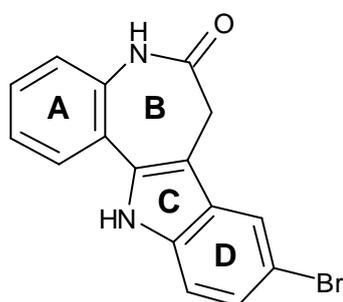
| | $\log_{10} GI_{50}$ [M] MG_MID ^a |
|------------|---|
| 166 | -5.27/-5.57 |
| 184 | -5.38 |

^a Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch einen Schrägstrich voneinander getrennt.

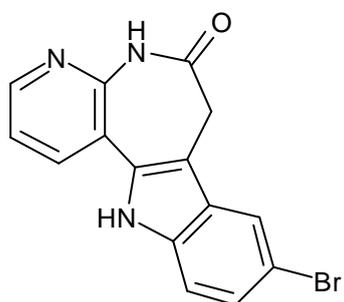
Die Veränderung der Seitenkette in Position 2 des Paullons **166** erbrachte keine Veränderung der IC_{50} -Werte bei CDK1 (siehe Tabelle 6-6). Wie anhand der in Tabelle 6-12 aufgeführten Werte zu sehen ist, erwies sich das Paullon **184** ebenfalls als äquipotent bei Tumorzelllinien verglichen mit der Ausgangsverbindung **166**.¹¹¹

7 Molecular Modelling

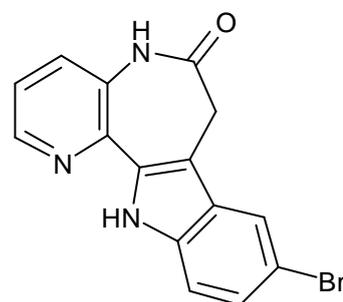
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem Abwandlungen des heterozyklischen Grundgerüsts der Leitstruktur Kenpaullon (**2**) durchgeführt. Dabei wurde der Benzoanelland des Azepins (Ring A) durch einen Thieno- und zwei verschiedene Pyridoanellanden ersetzt. Letztere Veränderungen entsprechen einer formalen Einführung eines Stickstoffatoms in die Position 1 oder 4 des Kenpaullons. In Tabelle 7-1 sind die IC_{50} -Werte für die CDK1-Aktivität dieser vier Verbindungen aufgeführt.



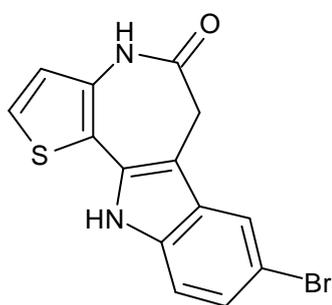
Kenpaullon (**2**)



110c



111a



109d

Tabelle 7-1: Hemmung der CDK1/Cyclin B-Aktivität, IC₅₀ [μM]

| | CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μM] |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Kenpaullon (2) | 0.4 |
| 110c | 8.4 |
| 111a | 1.5 |
| 109d | 0.6 |

Um eine Erklärung für die deutlich abgeschwächte Aktivität der Verbindung **110c** und die ebenfalls schwächere Wirkung des Derivates **111a** an CDK1 verglichen mit Kenpaullon (**2**) zu finden, wurden Molecular Modelling-Untersuchungen an diesen Verbindungen durchgeführt.

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben wurde die Ausrichtung von Kenpaullon in der ATP-Bindungsspalte berechnet, da eine Kristallstruktur von einem Paullon im Komplex mit CDK2 bisher nicht zur Verfügung steht. In der Docking-Studie wurde eine energieminierte Konformation von Kenpaullon in die ATP-Tasche von CDK2 eingepasst.^{55,84} Zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Lactamgruppierung des Inhibitors und dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von Leu83 sowie dem Peptid-NH von Leu83 scheinen hierbei von Bedeutung zu sein. Eine dritte Wasserstoffbrückenbindung besteht möglicherweise zwischen dem Indol-NH des Paullons und Gln131. Die Differenzen in der Aktivität der vier untersuchten Verbindungen hängen offensichtlich außerdem mit der Tatsache zusammen, dass das Peptid-Carbonylsauerstoffatom von His84 in die Richtung der 4-Position des Kenpaullon-Grundgerüsts weist (siehe Bild 7-1) Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Molecular Modelling-Untersuchungen wurden die Koordinaten für die dreidimensionale Kenpaullon-Struktur von einer zuvor durchgeführten Docking-Studie übernommen.^{55,84} Die Strukturen der Verbindungen **110c**, **111a** und **109d** wurden in SYBYL³³ konstruiert und energieminiert (Tripos-Kraftfeld), wobei die Struktur von Kenpaullon als Vorlage diente. Alle vier Strukturen wurden mit einem quantenmechanischen Verfahren (Hartree-Fock 3-21G*) in SPARTAN¹¹² abermals energieminiert. Es folgte die Berechnung der elektrostatischen Potentiale, welche schließlich auf die van-der-Waals-Oberfläche der korrespondierenden Moleküle projiziert wurden (siehe Bild 7-2, Bild 7-3 und Bild 7-4).

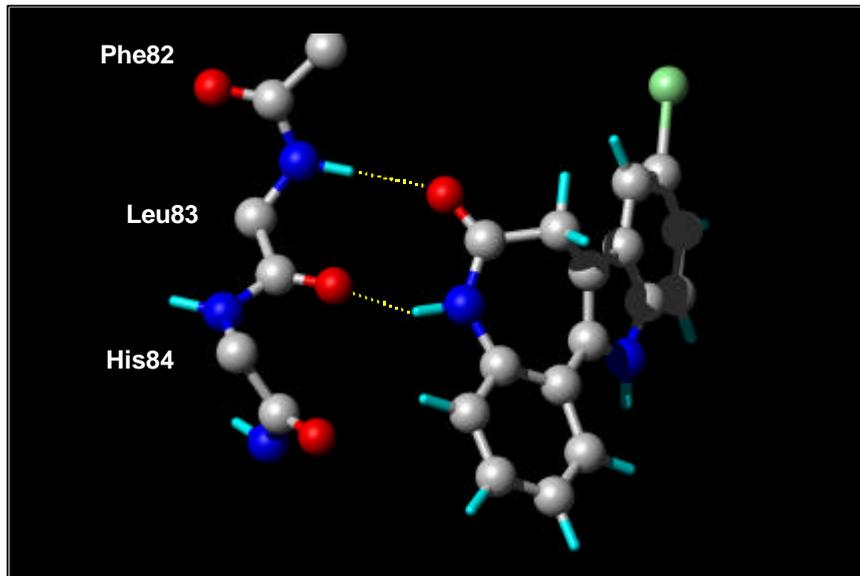


Bild 7-1: Dreidimensionale Ausrichtung von Kenpaullon (**2**) in der ATP-Bindungstasche der CDK. Es sind die Backbone-Atome der Aminosäuren Phe82, Leu83 und His84 der CDK2 dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gelb-gepunktete Linien angezeigt.

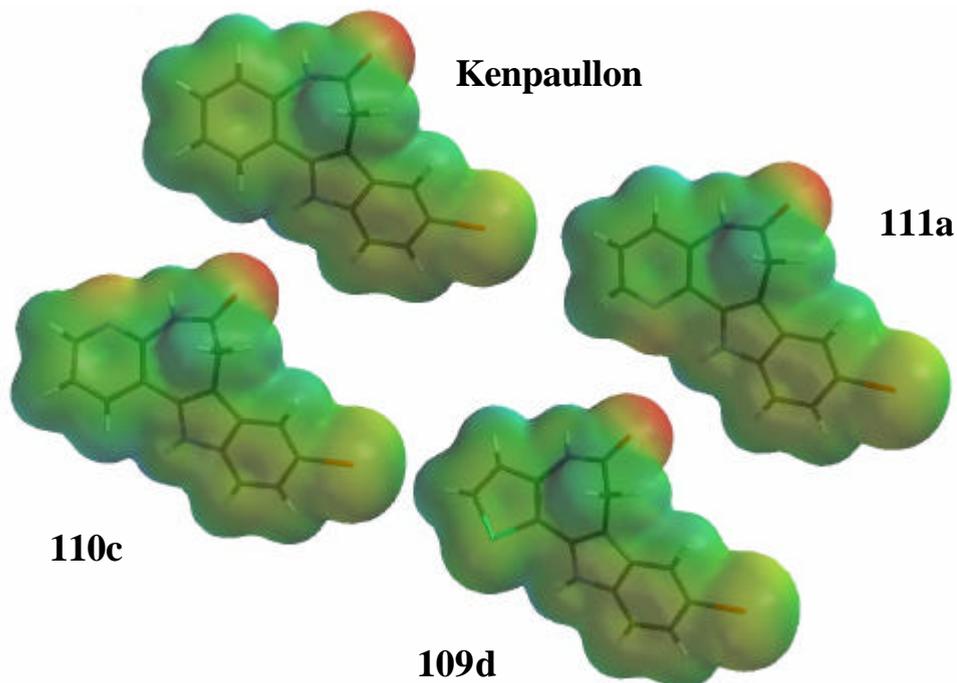


Bild 7-2: Elektrostatische Potentiale von Kenpaullon (**2**) (oben) und den Verbindungen **110c** (links), **111a** (rechts) und **109d** (unten) in transparenter Darstellung auf die van-der-Waals-Oberflächen der jeweiligen Moleküle projiziert.

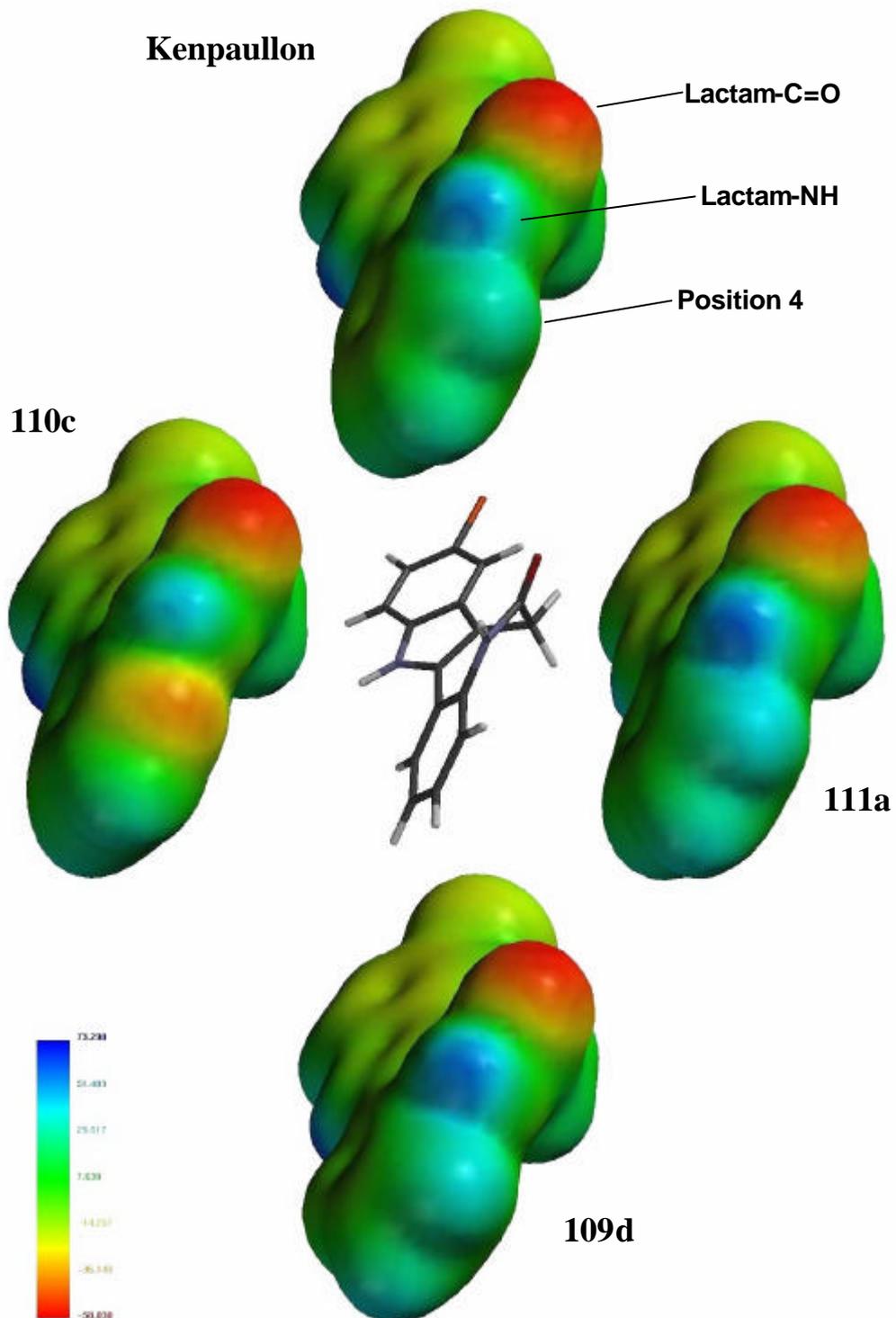


Bild 7-3: Elektrostatische Potentiale von Kenpaullon (**2**) (oben) und den Verbindungen **110c** (links), **111a** (rechts) und **109d** (unten) projiziert auf die van-der-Waals-Oberflächen. Abgebildet ist der Bereich um Position 3 und 4 und die Lactamfunktion (bezogen auf Kenpaullon). Die Struktur von Kenpaullon in der Mitte soll als Anhaltspunkt dienen, um den Blickwinkel auf die Moleküle zu verdeutlichen.

Bild 7-3 und Bild 7-4 veranschaulichen die Unterschiede der elektrostatischen Potentiale der verschiedenen Paullonderivate. Bild 7-3 verdeutlicht besonders die elektronischen Gegebenheiten im Bereich der Lactamgruppierung und der Position 4 des Paullongrundgerüsts (bzw. Position 3 von **109d**). Deutlich zu erkennen ist das jeweilige Lactam-NH mit einer blau eingefärbten Oberfläche, welche das positivere elektrostatische Potential anzeigt. Das Sauerstoffatom der Lactam-Carbonylgruppe erscheint rot, welches wiederum dessen negativeres elektrostatisches Potential signalisiert.

Die ab initio-Berechnungen machen deutlich, dass ein formaler Austausch des Kohlenstoffatoms in Position 4 von Kenpaullon durch ein Stickstoffatom das elektrostatische Potential an dieser Stelle beträchtlich verändert. Während in Kenpaullon und dem Thiophenanalogen **109d** diese Region durch ein positiveres elektrostatisches Potential gekennzeichnet ist, findet man bei Verbindung **110c** ein negativeres Potential durch das Stickstoffatom in Position 4. Dieses negativere Potential verursacht offensichtlich Abstoßungskräfte zwischen dem genannten Stickstoffatom von **110c** und dem Peptid-Carbonylsauerstoffatom von His84 der Cyclin-abhängigen Kinase. Außerdem erscheint das Lactam-NH von **110c** weniger positiv als in den anderen Paullonderivaten, wodurch zusätzlich die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Leu83-Carbonylsauerstoffatom und dem Lactam-NH der Verbindung **110c** geschwächt wird. Obwohl das 1-Aza-Derivat von Kenpaullon (**111a**) in der betrachteten Region um das Lactam-NH und die Position 4 ein sogar etwas positiveres elektrostatisches Potential aufweist als Kenpaullon und das thienoanellierte Derivat **109d**, ergab es im Enzymassay eine schwächere Aktivität als diese beiden.

Hierfür könnten die elektrostatischen Potentiale der Region um die Position 1 des Paullongrundgerüsts eine Erklärung bieten, da der formale Austausch des Kohlenstoffatoms in Position 1 von Kenpaullon durch ein Stickstoffatom den einzigen strukturellen Unterschied zwischen Kenpaullon und seinem Derivat **111a** darstellt. Dieser Bereich wird im Bild 7-4 dargestellt, in welchem die Moleküle bezogen auf die sonst verwendete Ausrichtung bei Abbildung der Strukturformel „von unten“ gezeigt werden.

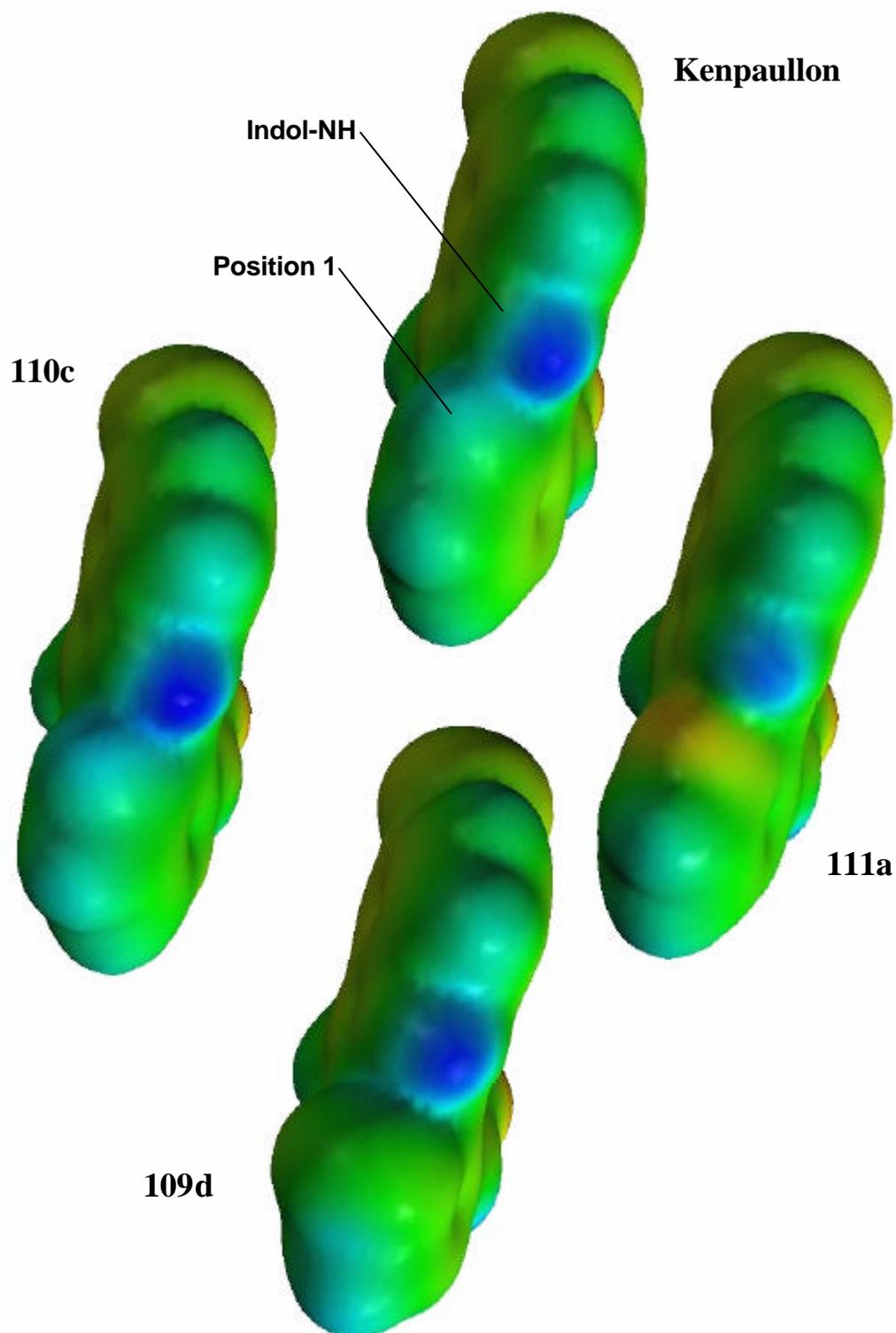


Bild 7-4: Elektrostatische Potentiale von Kenpaullon (**2**) (oben) und den Verbindungen **110c** (links), **111a** (rechts) und **109d** (unten) projiziert auf die van-der-Waals-Oberflächen. Abgebildet ist der Bereich um Position 1, das Indol-NH und Position 11 (bezogen auf Kenpaullon). Zur Farbskalierung siehe Bild 7-3.

Kenpaullon (oben) und die Derivate **110c** (links) und **109d** (unten) weisen eine tiefblau eingefärbte Oberfläche an der Stelle auf, an der das Indol-NH positioniert ist. Bei dem 1-Aza-Derivat von Kenpaullon **111a** (rechts) erkennt man eine Aufhellung des Farbtons, wodurch eine Verschiebung zu einem weniger positiven Potential angezeigt wird. Zusätzlich ist das Potential in Position 1 der Verbindung **111a** verglichen mit dem von Kenpaullon (**2**) und dem der Paullonderivate **110c** und **109d** zu noch negativeren Werten verschoben, welches durch die rötliche Färbung angezeigt wird. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Indol-NH und der Peptid-Carbonylfunktion von Gln131 der CDK würde durch die Gegebenheiten in Verbindung **111a** geschwächt. Da das Paullonderivat **111a** trotz der günstigeren elektronischen Beschaffenheit im Bereich um Position 4 und das Lactam-NH eine schwächere CDK-inhibitorische Aktivität als Kenpaullon aufweist, scheint die Region um das Indol-NH und die Position 1 eine zweite für die CDK-Bindung wichtige Region im Paullongrundgerüst zu sein. Hierbei führen Veränderungen des elektrostatischen Potentials in Richtung negativerer Werte zu Wirkungseinbußen.

Insgesamt kann anhand der Molecular Modelling-Untersuchungen folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Durch ein negatives elektrostatisches Potential in Position 4* des Paullongrundgerüsts wird offensichtlich einerseits die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Lactam-NH des Inhibitors und Leu83 der CDK geschwächt. Andererseits können sich zusätzlich Abstoßungskräfte zwischen dem His84-Carbonylsauerstoffatom der CDK und Position 4 des Paullongrundgerüsts ausbilden, sofern der Inhibitor hier ein negatives elektrostatisches Potential aufweist. Diese Merkmale findet man bei Verbindung **110c**. Dagegen scheint die verglichen mit Kenpaullon schwächere Aktivität des Derivates **111a** mit dessen vermindertem elektrostatischem Potential in Position 1 bzw. im Bereich des Indol-Stickstoffatoms zusammenzuhängen. Solche elektronischen Eigenschaften können eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gln131 der CDK schwächen.

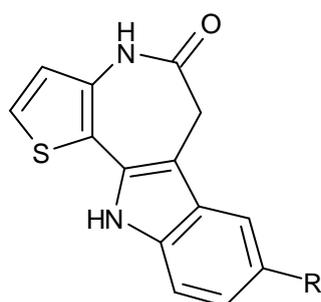
In Zukunft sollte bei Entwicklung neuer Paullonderivate darauf geachtet werden, dass in den Regionen um Position 1, Position 4, das Lactam- und das Indol-NH keine Veränderungen durchgeführt werden, welche das elektrostatische Potential in diesen Bereichen zu negativeren Werten verschieben.

* Nummerierung bezieht sich auf Kenpaullon.

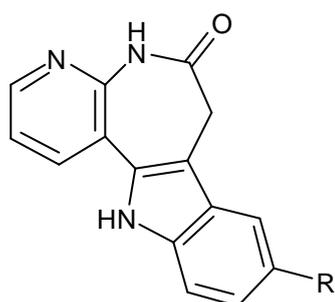
8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Übersicht über die bisher verfügbaren Daten zu Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und ihren Aufgaben im Zellzyklus gegeben sowie die Relevanz von Fehlfunktionen im Zusammenhang mit CDK für pathologische Vorgänge diskutiert. Die bis jetzt entwickelten Inhibitorklassen werden vorgestellt.

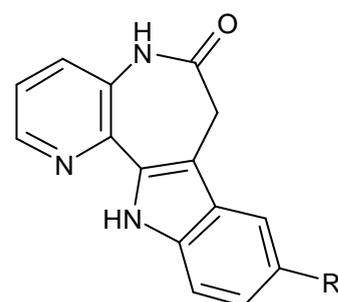
Mit dem Ziel der Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden im organisch-präparativen Teil der vorliegenden Arbeit Strukturmodifikationen an CDK-Inhibitoren aus der Klasse der Paullone durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden Paullonanaloga mit abgewandeltem heterozyklischen Gerüst synthetisiert. Die neuen Verbindungen zeichnen sich durch eine Thienoazepin-Teilstruktur (**109**) bzw. Pyridoazepin-Teilstrukturen (**110** und **111**) aus.



109



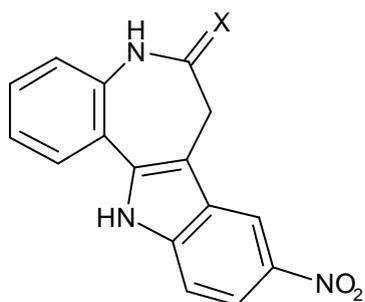
110



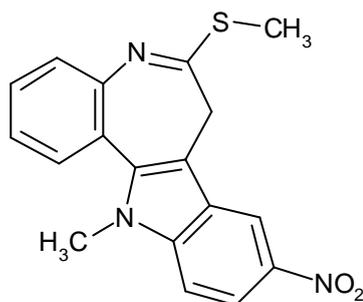
111

111a R = Br

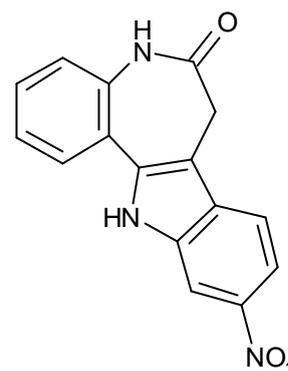
Darüber hinaus wurden Derivate des bisher interessantesten Vertreters aus der Reihe der Paullone, des Alsterpaullons (**3**), dargestellt. Die dabei durchgeführten Strukturvariationen umfassten Modifikationen an der Lactamstruktur (**154**, **156**) sowie des Substitutionsmusters (**160**). Das neue Derivat **184** wurde als Ergebnis präparativer Studien erhalten, bei denen die Synthese von 9-trifluormethyl-substituierten Paullonen mit einer modifizierten Kette in 2-Position angestrebt wurde.



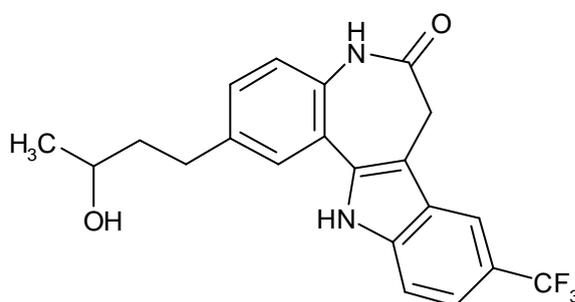
Alsterpaullon (**3**) X = O
154 X = S



156



160



184

Die bisher vorliegenden Ergebnisse der biologischen Testung zeigen, dass keines der neuen Paullone in Bezug auf die Hemmung Cyclin-abhängiger Kinasen oder die Hemmung des Wachstums von Tumorzellen potenter als Alsterpaullon ist.* Hervorzuheben ist, dass mit Verbindung **111a** ein Paullon mit hoher Selektivität für die Hemmung von Glycogen Synthase Kinase 3 β entwickelt werden konnte.

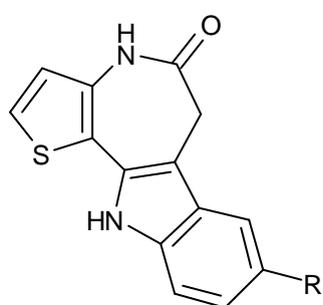
Ergebnisse von Molecular Modelling-Studien deuten darauf hin, dass Unterschiede in der Elektronendichteverteilung des heterozyklischen Systems dafür verantwortlich sind, dass die pyridoanellierten Paullone **110** und **111** abgeschwächte CDK-inhibitorische Aktivität im Vergleich zu benzo- und thienoanellierten Derivaten aufweisen.

* Für Verbindung **160** lagen bis zum Abschluss dieser Arbeit keine Testergebnisse vor.

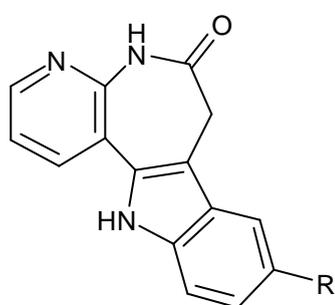
9 Summary

The thesis presented here is introduced by an overview on the available data concerning cyclin-dependent kinases (cdks) and their functions in cell cycle regulation. In this context the relevance of disorders in the cdk-system for pathogenesis is discussed, and the various cdk-inhibitor classes known to date are summarised.

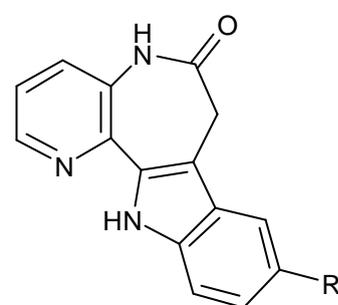
Preparative studies were performed to investigate structure activity relationships of the paullone class of cdk-inhibitors, yielding derivatives with modified heterocyclic scaffolds. The new compounds are characterised by a thienoazepine substructure (**109**) or a pyridoazepine substructure (**110** und **111**).



109



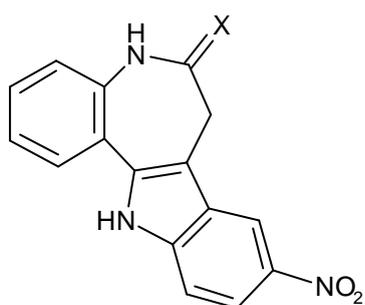
110



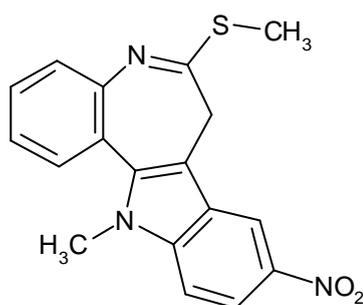
111

111a R = Br

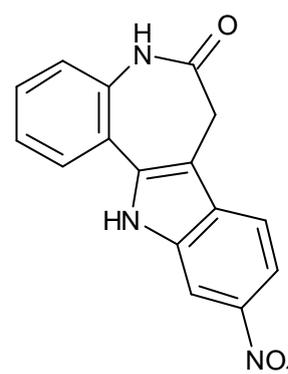
Furthermore derivatives of the most interesting paullone, Alsterpaullone (**3**), were synthesised. The variations include modifications of the lactam structure (**154**, **156**) and of the substitution pattern (**160**). The new compound **184** was synthesised as a result of preparative studies with trifluoromethyl substituted paullones with side chains in position 2.



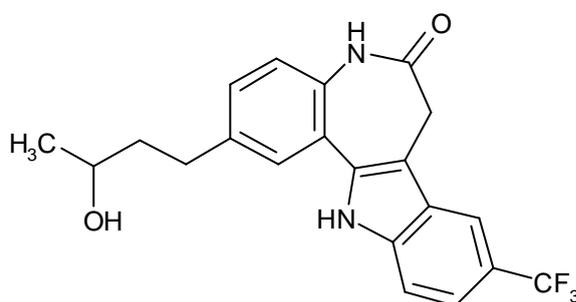
Alsterpaullone (**3**) X = O
154 X = S



156



160



184

None of the new derivatives showed an increased inhibitory activity on cdk or on the growth of tumor cells compared to Alsterpaullone.* Compound **111a** represents a new paullone with a remarkable selectivity for the inhibition of glycogen synthase kinase 3 β .

Molecular modelling studies indicate that differences in the electron density of the heterocyclic systems are responsible for the decreased cdk inhibitory activity of the pyrido derivatives **110** and **111** compared to the benzo- and the thienoannelated derivatives.

* The results of the biological testing for compound **160** are not available, yet.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeines

Schmelzpunkte:

Gallenkamp Variable Heater

Electrothermal IA 9100

IR-Spektren:

Philips PU 9712 infrared spectrophotometer

Philips Pye Unicam SP 3 – 200 S infrared spectrophotometer

Die Proben wurden als KBr-Pressling oder als Film auf NaCl vermessen.

¹H-NMR-Spektren und zweidimensionale Spektren:

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Bruker DRX 500 (500 MHz)

- Lösungsmittel: DMSO-d₆
- innerer Standard: Tetramethylsilan
- Angabe der chemischen Verschiebung mit δ -Werten (ppm)
- Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration
- Für Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: (s) = Singulett; (d) = Dublett; (t) = Triplett; („t“) = als Triplett erscheinendes Signal, das jedoch aus zwei Dubletts mit sehr ähnlichen Kopplungskonstanten zusammengesetzt ist; (q) = Quartett; (m) = Multipllett; (dd) = Dublett vom Dublett; (dt) = Dublett vom Triplett; Der Zusatz „br“ bedeutet, dass das Signal verbreitert auftritt.
- Angabe der Kopplungskonstanten J in Hz

¹³C-NMR-Spektren:

Bruker AMX 400 (100.6 MHz)

Bruker DRX 500 (125.8 MHz)

- Lösungsmittel: DMSO-d₆
- innerer Standard: Tetramethylsilan
- Angabe der chemischen Verschiebung mit δ -Werten (ppm)
- Die Spektren wurden ¹H-breitbandenkoppelt und zusätzlich als DEPT-Spektrum aufgenommen.

- Für Signalmultiplizitäten wird folgende Abkürzung verwendet:
(q) = Quartett.
- Angabe der Kopplungskonstanten J in Hz

Elementaranalysen:

C, H, N: Heraeus CHN-O-Rapid

S: Titration mit 0.005 M Ba(ClO₄)₂-Lösung gegen Sulfonazo III nach Verbrennung in der „Mikroverbrennungsapparatur nach Schöniger“ und anschließender Oxidation mit Wasserstoffperoxid.

Br: Titration des Halogenids mit 0.005 M Hg(ClO₄)₂-Lösung gegen Diphenylcarbazon nach Verbrennung in der „Mikroverbrennungsapparatur nach Schöniger“.

Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent

Massenspektren

Doppelfokussierendes Massenspektrometer VG 70-250S (VG Analytical, Manchester, UK)

Aufnahme von EI/HRMS (Electron Impact/High Resolution Mass Spectrum, Elektronenstoß-Massenspektrometrie/Hochauflösungsspektrum) mit Xenon-FAB-Kanone mit der Multichannel-Analysis-Methode.

Vergleichssubstanz: PEG 600 (average molecular weight: 600)

Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Molmassen.

Mitteldruckchromatographie

Säule: Lobar[®] Fertigsäule, Größe B (310-25); LiChroprep[®] RP-18 (40-63 µM) für die Flüssigkeitschromatographie, Merck 10625

Detektion: UV/VIS Filter-Photometer Büchi, 254 nm

Dünnschichtchromatographie:

DC-Mikroarten Polygram Sil G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel

Reinigung und Trocknen von Lösungsmitteln erfolgte nach publizierten Methoden.¹¹³

10.2 Synthesen/Analytische Daten

AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 6,11-Dihydrothieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-one (109b, d und e)

272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) und 1.75 mmol des jeweiligen substituierten Phenylhydrazins werden in 15 ml Eisessig bei 70 °C bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts **116** gerührt. (Bei Verwendung eines Phenylhydrazin-Hydrochlorids werden zusätzlich 144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat zugefügt.) Nach dem Abkühlen gibt man 0.125 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzu und rührt wiederum bei 70 °C. Die Schwefelsäurezugabe wird nach jeweils 1.5 Stunden wiederholt, sofern die Reaktion bis dahin nicht vollständig abgeschlossen ist. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in 60 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und umkristallisiert.

AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 7,12-Dihydropyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one (110a, c und d)

176 mg (1 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) und 1.2 mmol des jeweiligen substituierten Phenylhydrazins werden in 10 ml Eisessig bei 70 °C bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts **138** gerührt. (Bei Verwendung eines Phenylhydrazin-Hydrochlorids werden zusätzlich 98 mg (1.2 mmol) Natriumacetat zugefügt.) Nach dem Abkühlen gibt man 0.1 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzu und rührt wiederum bei 70 °C. Die Schwefelsäurezugabe wird nach jeweils 1.5 Stunden wiederholt, sofern die Reaktion bis dahin nicht vollständig abgeschlossen ist. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in 40 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und umkristallisiert.

AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 8-Phenylhydrazono-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-one (118a-d)

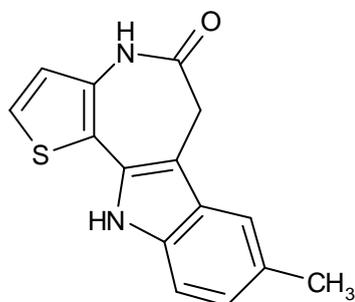
91 mg (0.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) und 0.58 mmol des jeweiligen substituierten Phenylhydrazins werden in 5 ml

Eisessig bei 70 °C bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. (Bei Verwendung eines Phenylhydrazin-Hydrochlorids werden zusätzlich 48 mg (0.58 mmol) Natriumacetat zugefügt.) Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in 10 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und umkristallisiert.

AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 9-Phenylhydrazono-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-one (139a-d)

88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-b]azepin-5,8-dion (**138**) und 0.58 mmol des jeweiligen substituierten Phenylhydrazins werden in 5 ml Eisessig bei 70 °C bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. (Bei Verwendung eines Phenylhydrazin-Hydrochlorids werden zusätzlich 48 mg (0.58 mmol) Natriumacetat zugefügt.) Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in 10 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen. Der Niederschlag wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen und umkristallisiert.

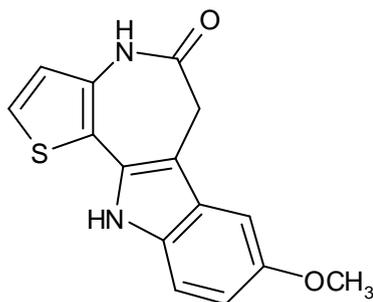
8-Methyl-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5(4H)-on (**109b**)



Nach AAV 1 aus 272 mg (1.5 mmol) 4H-Thieno[3,2-b]azepin-5,8(6H,7H)-dion (**116**), 278 mg (1.75 mmol) 4-Methyl-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117e**) und 144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol. Braune Kristalle; Ausbeute 125 mg (31 %); Schmp.: > 330 °C, Verfärbung ab 260 °C; IR (KBr): 3220 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ (CH arom.), 2960 cm⁻¹ (CH aliph.), 1640 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.48 (s, 2H, Azepin-CH₂), 6.92 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 6.96 (dd, 1H, 8.4/1.3 Hz, arom. H), 7.26 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.39 (s, 1H, arom. H), 7.57 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 10.31 (s, 1H, NH), 11.37 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆,

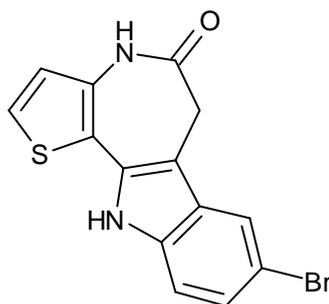
100.6 MHz): δ (ppm) = 21.1 (CH₃), 32.3 (Azepin-CH₂), 111.0, 117.2, 123.0, 123.5, 124.5 (tert. arom. C-Atome), 104.6, 116.6, 126.6, 127.8, 129.3, 134.3, 136.1 (quart. arom. C-Atome), 168.5 (C=O); C₁₅H₁₂N₂OS (268.34); Ber. C 67.14, H 4.51, N 10.44, S 11.95; Gef. C 67.02, H 4.69, N 10.34, S 12.18.

8-Methoxy-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5(4H)-on (109c)



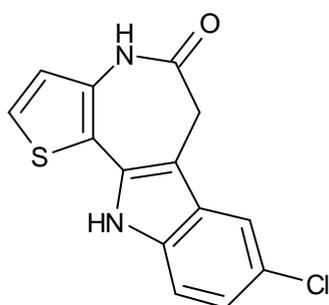
272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**), 306 mg (1.75 mmol) 4-Methoxy-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117f**) und 144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat werden in 5 ml Eisessig 5 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen gießt man in 25 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung, saugt den Niederschlag ab und wäscht ihn mit Wasser. Umkristallisieren aus Ethanol. Braune Kristalle; Ausbeute 191 mg (43 %); Schmp.: > 330 °C, Verfärbung ab 263 °C; IR (KBr): 3200 cm⁻¹ (NH), 3080 cm⁻¹ (CH arom.), 2980 cm⁻¹ (CH aliph.), 1640 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.52 (s, 2H, Azepin-CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.77 (dd, 1H, 8.6/2.6 Hz, arom. H), 6.92 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 7.14 (d, 1H, 2.5 Hz, arom. H), 7.26 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.56 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 10.31 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH₃), 32.3 (Azepin-CH₂), 99.3, 112.0, 112.2, 123.1, 124.5 (tert. arom. C-Atome), 105.0, 116.6, 126.8, 129.8, 132.8, 134.3, 153.7 (quart. arom. C-Atome), 168.7 (C=O); C₁₅H₁₂N₂O₂S (284.34); Ber. C 63.36, H 4.25, N 9.85, S 11.28; Gef. C 63.17, H 4.50, N 9.76, S 11.02.

8-Brom-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5(4H)-on (109d)



Nach AAV 1 aus 272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**), 391 mg (1.75 mmol) 4-Brom-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117c**) und 144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol/Toluol. Silbergraues, feines Pulver; Ausbeute 132 mg (26 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 293 °C; IR (KBr): 3400 cm⁻¹ (NH), 3055 cm⁻¹ (CH arom.), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.54 (s, 2H, Azepin-CH₂), 6.94 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 7.24 (dd, 1H, 8.6/2.0 Hz, arom. H), 7.34 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.86 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 10.37 (s, 1H, NH), 11.73 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 32.0 (Azepin-CH₂), 113.2, 120.0, 123.1, 124.2, 125.4 (tert. arom. C-Atome), 104.5, 111.9, 115.7, 128.3, 130.8, 135.1, 136.3 (quart. arom. C-Atome), 168.4 (C=O); C₁₄H₉BrN₂OS (333.21); Ber. C 50.46, H 2.72, N 8.41, Br 23.98, S 9.62; Gef. C 50.39, H 2.90, N 8.32, Br 24.09, S 9.53.

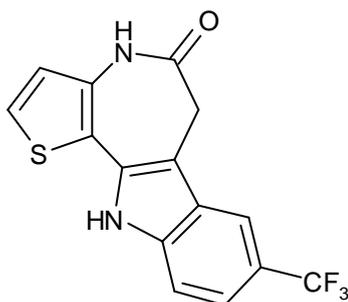
8-Chlor-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5(4H)-on (109e)



Nach AAV 1 aus 272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**), 313 mg (1.75 mmol) 4Chlor-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117d**) und

144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol. Hellgraues Pulver; Ausbeute 139 mg (32 %); Schmp.: > 330 °C, Verfärbung ab 295 °C; IR (KBr): 3410/3160 cm⁻¹ (NH), 3050 cm⁻¹ (CH arom.), 2960 cm⁻¹ (CH aliph.) 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, Azepin-CH₂), 6.94 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.13 (dd, 1H, 8.6/2.0 Hz, arom. H), 7.38 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.73 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.39 (s, 1H, NH), 11.73 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 32.0 (Azepin-CH₂), 112.7, 117.0, 121.7, 123.0, 125.3 (tert. arom. C-Atome), 104.6, 115.8, 124.0, 127.6, 130.9, 135.1, 136.0 (quart. arom. C-Atome), 168.4 (C=O); C₁₄H₉ClN₂OS (288.76); Ber. C 58.23, H 3.14, N 9.70; Gef. C 58.09, H 3.31, N 9.61.

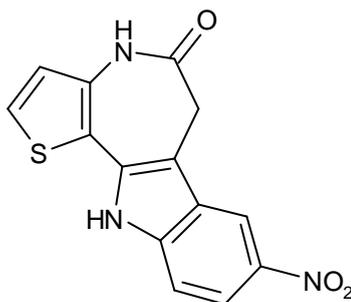
8-Trifluormethyl-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5(4H)-on
(109f)



339 mg (1 mmol) 8-(4-Trifluormethyl-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-thieno[3,2-b]azepin-5-on (**118a**) werden in 20 ml Diphenylether 2 Stunden unter Stickstoffbegasung zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 50 ml n-Hexan zugegeben. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit n-Hexan oder Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Olivgrünes, feines Pulver; Ausbeute 83 mg (26 %); Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3450 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ (CH arom.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.64 (s, 2H, Azepin-CH₂), 6.96 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 7.34 (dd, 1H, 8.6/1.0 Hz, arom. H), 7.56 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.66 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 8.09 (s, 1H, arom. H), 10.44 (s, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 31.9 (Azepin-CH₂), 111.9, 115.49 (q, ³J_{C,F} = 4.1 Hz, C-C-CF₃), 118.1 (q, ³J_{C,F} = 3.6 Hz, C-C-CF₃), 123.1, 125.7 (tert. arom. C-Atome), 105.6, 115.50, 120.2 (q, ²J_{C,F} = 32.0

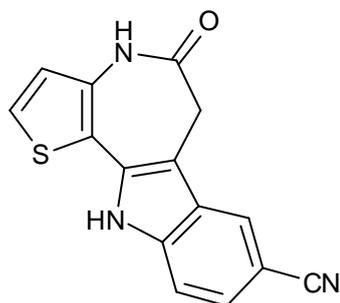
Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 125.4 (q, $^1\text{J}_{\text{C,F}} = 271.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 125.9, 131.4, 135.4, 139.0 (quart. arom. C-Atome), 168.4 (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$ (322.31); Ber. C 55.90, H 2.81, N 8.69, S 9.95; Gef. C 55.81, H 3.07, N 8.99, S 10.20.

8-Nitro-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on (109g)



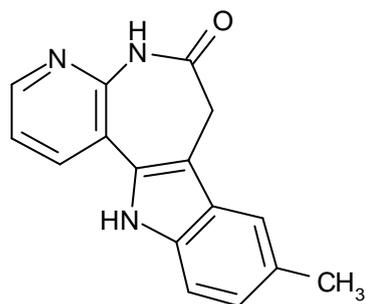
316 mg (1 mmol) 8-(4-Nitro-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-on (**118b**) werden in 150 ml Diphenylether 3 Stunden unter Stickstoffbegasung vorsichtig zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 500 ml n-Hexan oder Petrolether zugegeben. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit n-Hexan oder Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Dunkelbraunes, feines Pulver; Ausbeute 189 mg (63 %); Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3400 cm^{-1} (NH), 3180/3070 cm^{-1} (CH arom.), 2980 cm^{-1} (CH aliph.), 1665 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.67 (s, 2H, Azepin- CH_2), 6.97 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.54 (d, 1H, 8.7 Hz, arom. H), 7.70 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 8.04 (dd, 1H, 8.9/2.3 Hz, arom. H), 8.68 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.50 (s, 1H, NH), 12.34 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 32.4 (Azepin- CH_2), 112.1, 115.2, 117.6, 123.6, 126.7 (tert. arom. C-Atome), 107.2, 115.4, 126.4, 133.4, 136.5, 141.1, 141.5 (quart. arom. C-Atome), 168.7 (C=O); EI/HRMS für $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (299.31): Ber: 299.0365, Gef.: 299.0363.

5-Oxo-4,5,6,11-tetrahydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-8-carbonitril
(109h)



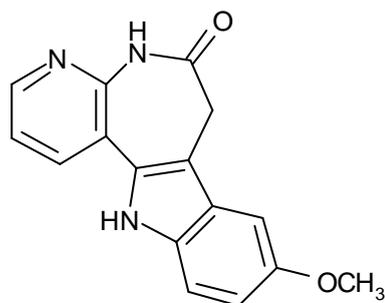
333 mg (1 mmol) 8-Brom-6,11-dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on (**109d**) und 179 mg (2 mmol) Kupfer(I)cyanid werden in 10 ml *N*-Methylpyrrolidon 2,5 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 10 ml Wasser hinzugefügt, und es wird ca. 20 Minuten gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in 10 ml Wasser und 2.5 ml Ethylendiamin aufgenommen und 15 Minuten gerührt. Der Niederschlag wird abermals abgesaugt und mit 10-prozentiger Natriumcyanidlösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Beigefarbenes Pulver; Ausbeute 64 mg (23 %); Schmp.: > 330 °C, Verfärbung ab 325 °C; IR (KBr): 3400/3180 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ (CH arom.), 2960 cm⁻¹ (CH aliph.), 2210 cm⁻¹ (CN), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.60 (s, 2H, Azepin-CH₂), 6.96 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.48 (dd, 1H, 8.6/1.6 Hz, arom. H), 7.55 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.67 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 8.27 (s, 1H, arom. H), 10.46 (s, 1H, NH), 12.15 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 31.9 (Azepin-CH₂), 112.4, 123.1, 123.4, 124.5, 125.9 (tert. arom. C-Atome), 101.4, 105.4, 115.1, 120.5, 126.4, 131.7, 135.7, 139.3 (quart. arom. C-Atome), 168.3 (C=O); EI/HRMS für C₁₅H₉N₃OS (279.32): Ber: 279.0466, Gef.: 279.0458.

9-Methyl-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (110a)



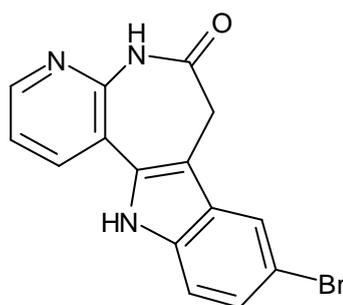
Nach AAV 2 aus 140 mg (0.8 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) und 159 mg (1 mmol) 4-Methyl-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117e**) und 82 mg (1 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol. Hellgelbe, sehr feine Nadeln; Ausbeute: 139 mg (64 %); Schmp.: > 330 °C, Braunfärbung ab 322 °C; IR (KBr): 3250/3160 cm⁻¹ (NH), 3090-3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2950/2900 cm⁻¹ (CH aliph.), 1635 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.58 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.03 (dd, 1H, 8.1/1.0 Hz, arom. H), 7.31-7.35 (m, 2H, arom. H), 7.47 (s, 1H, arom. H), 8.14 (dd, 1H, 7.6/1.5 Hz, arom. H), 8.41 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, arom. H), 10.30 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 21.1 (CH₃), 31.8 (Azepin-CH₂), 111.2, 117.6, 119.2, 124.1, 135.2, 147.3 (tert. arom. C-Atome), 107.2, 117.9, 126.6, 127.8, 130.3, 136.2, 147.4 (quart. arom. C-Atome), 171.3 (C=O); C₁₆H₁₃N₃O (263.30); Ber. C 72.99, H 4.98, N 15.96; Gef. C 72.89, H 5.21, N 15.91.

9-Methoxy-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (110b)



140 mg (0.8 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**), 210 mg (1.2 mmol) 4-Methoxy-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117f**) und 98 mg (1.2 mmol) Natriumacetat werden 2 Stunden in 2 ml Eisessig bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 20 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol/Toluol. Rostorangefarbene, glänzende Kristalle; Ausbeute: 175 mg (78 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 295 °C; IR (KBr): 3370 cm⁻¹ (NH), 3120-3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2960-2880 cm⁻¹ (CH aliph.), 1645 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.62 (s, 2H, Azepin-CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 6.83 (dd, 1H, 8.9/2.3 Hz, arom. H), 7.21 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 7.31-7.35 (m, 2H, arom. H), 8.14 (dd, 1H, 7.6/1.5 Hz, arom. H), 8.41 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, arom. H), 10.33 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 55.3 (OCH₃), 31.8 (Azepin-CH₂), 99.5, 112.2, 113.1, 119.2, 135.2, 147.2 (tert. arom. C-Atome), 107.6, 117.9, 126.8, 130.8, 132.9, 147.4, 153.6 (quart. arom. C-Atome), 171.4 (C=O); C₁₆H₁₃N₃O₂ (279.30); Ber. C 68.81, H 4.69, N 15.05; Gef. C 68.64, H 4.88, N 14.79.

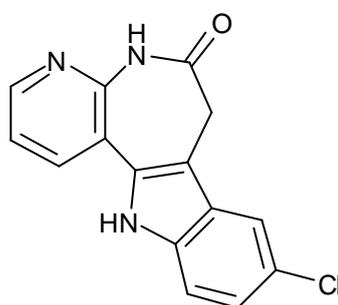
9-Brom-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**110c**)



Nach AAV 2 aus 176 mg (1 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**), 261 mg (1.2 mmol) 4-Brom-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117c**) und 98 mg (1.2 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol. Hell-orangefarbene Kristalle; Ausbeute: 164 mg (43 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 329.5°C; IR (KBr): 3140 cm⁻¹ (NH), 3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2900-2860 cm⁻¹ (CH aliph.), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.64 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.03 (dd, 1H, 8.6/2.0 Hz, arom. H), 7.35 (dd, 1H, 7.7/4.8 Hz, Pyrido-H), 7.42 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.95 (d, 1H, 2.0

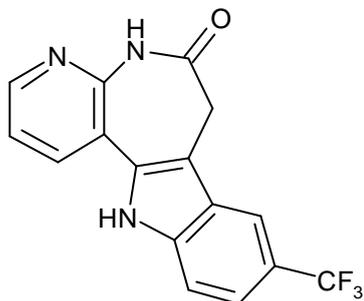
Hz, arom. H), 8.17 (dd, 1H, 7.9/1.8 Hz, Pyrido-H), 8.45 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, Pyrido-H), 10.37 (s, 1H, NH), 11.92 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin- CH_2), 113.4, 119.2, 120.6, 124.9, 135.6, 147.9 (tert. arom. C-Atome), 107.3, 111.8, 117.3, 128.2, 131.8, 136.3, 147.6 (quart. arom. C-Atome), 171.2 (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}$ (328.17); Ber. C 54.90, H 3.07, N 12.80, Br 24.35; Gef. C 54.50, H 2.99, N 12.55, Br 24.07.

9-Chlor-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**110d**)



Nach AAV 2 aus 176 mg (1 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**), 215 mg (1.2 mmol) 4-Chlor-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117d**) und 98 mg (1.2 mmol) Natriumacetat. Umkristallisieren aus Ethanol. Hell-orangefarbene Kristalle; Ausbeute: 146 mg (51 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 320 °C; IR (KBr): 3260/3180 cm^{-1} (NH), 3060-3120 cm^{-1} (CH arom.), 2960/2900 cm^{-1} (CH aliph.), 1645 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.64 (s, 2H, Azepin- CH_2), 7.19 (dd, 1H, 8.6/1.5 Hz, arom. H), 7.35 (dd, 1H, 7.9/4.8 Hz, arom. H), 7.46 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.82 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 8.16 (dd, 1H, 7.9/1.3 Hz, arom. H), 8.45 (dd, 1H, 4.6/1.0 Hz, arom. H), 10.38 (s, 1H, NH), 11.91 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin- CH_2), 113.0, 117.6, 119.2, 122.4, 135.5, 147.8 (tert. arom. C-Atome), 107.4, 117.3, 123.9, 127.5, 132.0, 136.1, 147.6 (quart. arom. C-Atome), 171.2 (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ (283.72); Ber. C 63.50, H 3.55, N 14.81; Gef. C 63.08, H 3.51, N 14.64.

9-Trifluormethyl-7,12-dihydro-pyrido[2',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on
(110e)



Methode A

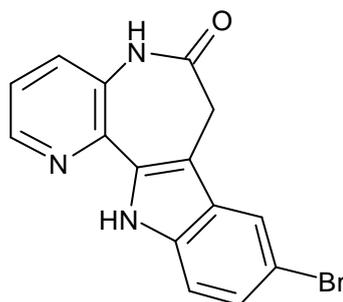
176 mg (1 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) und 264 mg (1.5 mmol) 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**) in 10 ml Eisessig werden bei 70 °C 1.5 Stunden gerührt. Nach Zugabe von 0.1 ml konzentrierter Schwefelsäure wird bei 70 °C gerührt. Nach 2.5 Stunden werden zusätzlich 0.15 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben. Nach 3 Stunden lässt man abkühlen, gießt in 50 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung und saugt den Niederschlag ab. Umkristallisieren aus Ethanol. Beigefarbenes Pulver; Ausbeute: 10 mg (3 %); Schmp.: > 330 °C, Zersetzung unter Dunkelfärbung ab 304.5 °C; IR (KBr): 3245/3180 cm⁻¹ (NH), 3100-3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2950-2890 cm⁻¹ (CH aliph.), 1640 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.73 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.37 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, arom. H), 7.49 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.63 (d, 1H, 8.2 Hz, arom. H), 8.19-8.21 (m, 2H, arom. H), 8.47 (dd, 1H, 6.8/1.8 Hz, arom. H), 10.42 (s, 1H, NH), 12.19 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 31.5 (Azepin-CH₂), 112.2, 116.2 (q, ³J_{C,F} = 3.5 Hz, C-C-CF₃), 118.7 (q, ³J_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-CF₃), 119.2, 135.6, 148.1 (tert. arom. C-Atome), 108.6, 117.1, 120.2 (q, ²J_{C,F} = 31.5 Hz, C-CF₃), 125.4 (q, ¹J_{C,F} = 271.6 Hz, CF₃), 125.7, 132.5, 139.1, 147.7 (quart. arom. C-Atome), 171.2 (C=O); C₁₆H₁₀F₃N₃O (317.27); Ber. C 60.57, H 3.18, N 13.24; Gef. C 60.20, H 3.44, N 13.05.

Methode B

211 mg (0.63 mmol) 9-(4-Trifluormethyl-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-on (**139a**) werden in 15 ml Diphenylether unter Stickstoffbegasung vorsichtig zum Sieden erhitzt. Nach ca. 13 Stunden zeigt die DC-Reaktionskontrolle eine vollständige Umsetzung an. Man lässt abkühlen,

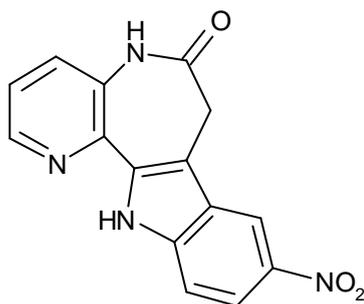
fügt 50 ml n-Hexan zu und saugt ab. Der Niederschlag wird mit Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Braunes Pulver; Ausbeute: 77 mg (39 %); Schmp.: > 330 °C, Zersetzung unter Dunkelfärbung ab 302 °C; Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A gewonnen Verbindung überein.

9-Brom-7,12-dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (**111a**)



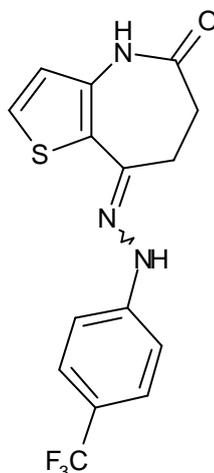
345 mg (1 mmol) 5-(4-Brom-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido-[3,2-*b*]azepin-8-dion (**149a**) werden in 90 ml Diphenylether unter Stickstoffbegasung 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 150 ml n-Hexan (oder Petrolether) zugefügt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Olivgrünes Pulver; Ausbeute: 267 mg (81 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 300 °C; IR (KBr): 3340/3180 cm⁻¹ (NH), 3050 cm⁻¹ (CH arom.), 2970/2920 cm⁻¹ (CH aliph.), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.67 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.30 (dd, 1H, 8.6/2.0 Hz, arom. H), 7.41-7.45 (m, 2H, arom. H), 7.63 (dd, 1H, 8.1/1.0 Hz, arom. H), 7.97 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 8.49 (dd, 1H, 4.6/1.0 Hz, arom. H), 10.27 (s, 1H, NH), 11.94 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 31.6 (Azepin-CH₂), 113.8, 120.8, 122.9, 125.2, 129.4, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 108.3, 111.6, 128.0, 132.3, 133.9, 136.0, 139.9 (quart. arom. C-Atome), 170.9 (C=O); C₁₅H₁₀BrN₃O (328.17); Ber. C 54.90, H 3.07, N 12.80; Gef. C 54.59, H 3.34, N 12.79.

9-Nitro-7,12-dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**111b**)



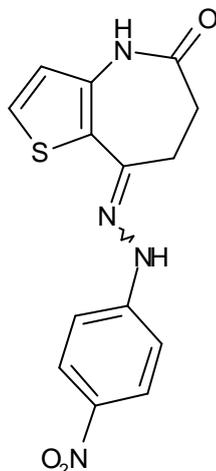
311 mg (1 mmol) 5-(4-Nitro-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido-[3,2-*b*]azepin-8-dion (**149b**) werden in 150 ml Diphenylether unter Stickstoffbegasung zum Sieden erhitzt (ca. 2 Stunden). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 300 ml *n*-Hexan (oder Petrolether) zugefügt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Braunes Pulver; Ausbeute: 187 mg (63 %); Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3420/3190 cm⁻¹ (NH), 3080 cm⁻¹ (CH arom.), 2960 cm⁻¹ (CH aliph.), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.82 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.49 (dd, 1H, 8.3/4.5 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.67 (dd, 1H, 8.3/1.1 Hz, arom. H), 8.10 (dd, 1H, 9.0/2.2 Hz, arom. H), 8.53 (dd, 1H, 4.6/1.3 Hz, arom. H), 8.80 (d, 1H, 2.3 Hz, arom. H), 10.35 (s, 1H, NH), 12.50 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 31.9 (Azepin-CH₂), 112.7, 116.4, 118.4, 123.9, 130.0, 144.9 (tert. arom. C-Atome), 111.4, 126.1, 133.2, 136.5, 139.7, 140.8, 141.3 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O); EI/HRMS für C₁₅H₁₀N₄O₃ (294.27): Ber: 294.0753, Gef.: 294.0744.

8-(4-Trifluormethyl-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-on (**118a**)



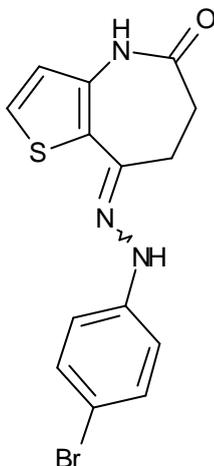
Nach AAV 3 aus 91 mg (0.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) und 103 mg (0.58 mmol) 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**). Reaktionszeit: 2.5 Stunden. Umkristallisieren aus Ethanol. Orangegelbe Kristalle; Ausbeute 84 mg (47 %); Schmp.: 226 °C, Verfärbung ab 222 °C; IR (KBr): 3210 cm⁻¹ (NH), 3100 cm⁻¹ (CH arom.), 2980 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.61-2.64 und 2.92-2.94 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.74 (d, 1H, 5.4 Hz, Thieno-H), 7.24 (d, 2H, 8.5 Hz, arom. H), 7.40 (d, 1H, 5.4 Hz, Thieno-H), 7.54 (d, 2H, 8.9 Hz, arom. H), 9.72 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125.8 MHz): δ(ppm) = 24.3, 32.0 (CH₂-CH₂), 112.2, 123.2, 126.0, 126.2 (q, ³J_{C,F} = 4 Hz, C-C-CF₃) (tert. arom. C-Atome), 118.6 (q, ²J_{C,F} = 27 Hz, C-CF₃), 124.6, 134.8, 142.6 (quart. arom.. C-Atome), 148.5 (C=N), 172.2 (C=O) Das Signal für die CF₃-Gruppe ist wegen zu geringer Peakhöhe nicht zu identifizieren.; C₁₅H₁₂F₃N₃OS (339.34); Ber. C 53.09, H 3.56, N 12.38; Gef. C 53.35, H 3.72, N 11.94.

8-(4-Nitro-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-on
(118b)



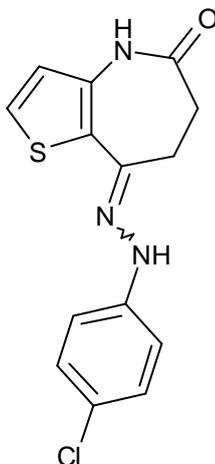
Nach AAV 3 aus 91 mg (0.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**), 89 mg (0.58 mmol) 4-Nitro-phenylhydrazin (**117b**) und 48 mg (0.58 mmol) Natriumacetat. Reaktionszeit: 2 Stunden. Umkristallisieren aus Ethanol. Blutrote Nadeln; Ausbeute 81 mg (51 %); Schmp.: 277 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3280 cm⁻¹ (NH), 3090 cm⁻¹ (CH arom.), 2990 cm⁻¹ (CH aliph.), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.63-2.66 und 2.95-2.99 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.76 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.21-7.24 (m, 2H, arom. H), 7.46 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 8.13-8.15 (m, 2H, arom. H), 10.23 (bs, 1H, NH), 10.26 (bs, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 24.2, 31.9 (CH₂-CH₂), 111.7, 125.9 (tert. arom. C-Atome, Phenyl-C), 123.2, 126.9 (tert. arom. C-Atome, Thieno-C), 123.9, 135.7, 138.5, 145.4 (quart. arom. C-Atome), 150.8 (C=N), 172.2 (C=O); C₁₄H₁₂N₄O₃S (316.34); Ber. C 53.16, H 3.82, N 17.71; Gef. C 52.82, H 4.09, N 17.31.

8-(4-Brom-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-on
(118c)



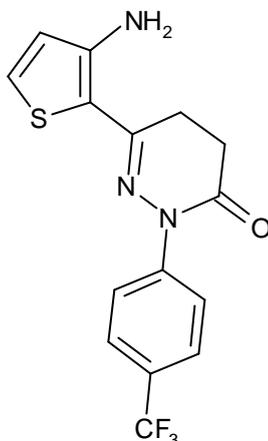
Nach AAV 3 aus 91 mg (0.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) und 130 mg (0.58 mmol) 4Brom-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117c**). Reaktionszeit: 1.5 Stunden. Umkristallisieren aus Ethanol. Goldgelb glänzende Nadeln; Ausbeute 49 mg (28 %); Schmp.: 228 °C, Dunkelfärbung ab 224 °C; IR (KBr): 3195 cm⁻¹ (NH), 3090 cm⁻¹ (CH arom.), 2990 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.59-2.62 und 2.87-2.90 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.72 (d, 1H, 5.1 Hz, Thieno-H), 7.05-7.09 (m, 2H, arom. H), 7.35-7.38 (m, 3H, arom. H), 9.41 (s, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 24.3, 32.0 (CH₂-CH₂), 114.5, 123.1, 125.6, 131.5 (tert. arom. C-Atome), 109.8, 125.0, 134.2, 141.1, (quart. arom. C-Atome), 144.9 (C=N), 172.3 (C=O); C₁₄H₁₂BrN₃OS (350.24); Ber. C 48.01, H 3.45, N 12.00, S 9.16; Gef. C 47.99, H 3.61, N 11.84, S 9.02.

8-(4-Chlor-phenylhydrazono)-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-thieno[3,2-*b*]azepin-5-on
(118d)



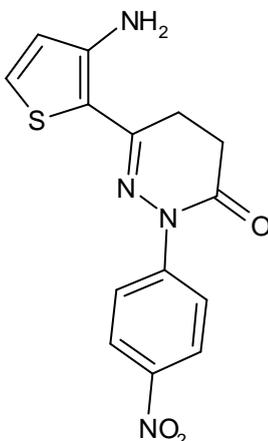
Nach AAV 3 aus 91 mg (0.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**), 104 mg (0.58 mmol) 4Chlor-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117d**) und 48 mg (0.58 mmol) Natriumacetat. Reaktionszeit: 1.5 Stunden. Umkristallisieren aus Ethanol. Goldorangefarbene Kristalle; Ausbeute 38 mg (25 %); Schmp.: 226 °C, Verfärbung ab 211 °C; IR (KBr): 3200 cm⁻¹ (NH), 3090 cm⁻¹ (CH arom.), 2980 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 Hz): δ (ppm) = 2.59-2.62 und 2.87-2.90 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.72 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 7.10-7.14 (m, 2H, arom. H), 7.23-7.27 (m, 2H, arom. H), 7.36 (d, 1H, 5.6 Hz, Thieno-H), 9.40 (s, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 24.3, 32.1 (CH₂-CH₂), 114.0, 123.1, 125.5, 128.6 (tert. arom. C-Atome), 122.2, 125.0, 134.2, 141.0 (quart. arom. C-Atome), 144.5 (C=N), 172.3 (C=O); C₁₄H₁₂ClN₃OS (305.79); Ber. C 54.99, H 3.96, N 13.74; Gef. C 54.76, H 4.20, N 13.60.

6-(3-Amino-2-thienyl)-2-(4-trifluormethylphenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-on (119a)



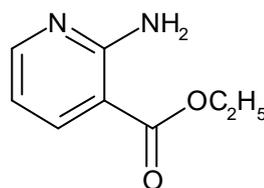
272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) und 308 mg (1.75 mmol) 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**) werden in 5 ml Eisessig. 2.5 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit 0.125 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 4 Stunden bei 70 °C gerührt. Man lässt abkühlen, gießt in 25 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung, rührt und überführt in einen Scheidetrichter. Das dunkelgrüne Öl wird mit Toluol extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Man kocht mit 2.5 ml Ethanol auf und lässt abkühlen. Grünlich-gelbe, kurze Nadeln; Ausbeute: 37 mg (8 %); Schmp.: 156.5 °C; IR (KBr): 3430/3320 cm⁻¹ (NH), 2900 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.70-2.74 und 2.95-2.99 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.52 (bs, 2H, NH₂), 6.72 (d, 1H, 5.6 Hz, Thienyl-H), 7.49 (d, 1H, 5.1 Hz, Thienyl-H), 7.80 (m, 4H, Phenyl-H); ¹H-NMR (D₂O/DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.70-2.74 und 2.96-3.00 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.73 (d, 1H, 5.1 Hz, Thienyl-H), 7.49 (d, 1H, 5.6 Hz, Thienyl-H), 7.77-7.83 (m, 4H, Phenyl-H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 25.5, 27.9 (CH₂-CH₂), 121.4, 124.4, 125.5 (q, ³J_{C,F} = 3.7 Hz, C-C-CF₃), 127.8 (tert. arom. C-Atome), 105.4, 124.1 (q, ¹J_{C,F} = 271 Hz, CF₃), 125.8 (q, ²J_{C,F} = 32 Hz, C-CF₃), 144.7, 148.7 (quart. arom. C-Atome), 152.7 (C=N), 165.3 (C=O); C₁₅H₁₂F₃N₃OS (339.34); Ber. C 53.09, H 3.56, N 12.38; Gef. C 52.89, H 3.55, N 12.27.

6-(3-Amino-2-thienyl)-2-(4-nitrophenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-on
(119b)



Zu einer Suspension von 272 mg (1.5 mmol) 4*H*-Thieno[3,2-*b*]azepin-5,8(6*H*,7*H*)-dion (**116**) in 2.5 ml Eisessig tropft man eine Suspension von 268 mg (1.75 mmol) 4Nitro-phenylhydrazin (**117b**) und 144 mg (1.75 mmol) Natriumacetat in 2.5 ml Eisessig. Anschließend wird 2 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit 0.125 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 19 Stunden bei 70 °C gerührt. Es werden in Abständen von ca. 2 Stunden erneut jeweils 0.20 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt bis die DC-Reaktionskontrolle eine vollständige Umsetzung des Zwischenproduktes anzeigt. Man lässt abkühlen, gießt in 70 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung und saugt den Niederschlag ab. Umkristallisieren aus Ethanol. Dunkelrote Kristalle, Blättchen; Ausbeute: 111 mg (25 %); Schmp.: 179.5 °C; IR (KBr): 3480/3340 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ (CH arom.), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.73-2.77 und 2.97-3.00 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.55 (bs, 2H, NH₂), 6.73 (d, 1H, 5.6 Hz, Thienyl-H), 7.51 (d, 1H, 5.6 Hz, Thienyl-H), 7.88-7.92 (m, 2H, arom. H), 8.28-8.32 (m, 2H, arom. H); ¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O, 400 MHz): δ (ppm) = 2.73-2.77 und 2.97-3.00 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.75 (d, 1H, 5.3 Hz, Thienyl-H), 7.51 (d, 1H, 5.4 Hz, Thienyl-H), 7.87-7.90 (m, 2H, arom. H), 8.29-8.32 (m, 2H, arom. H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 25.4, 28.1 (CH₂-CH₂), 121.4, 123.85, 123.94, 128.2 (tert. arom. C-Atome), 105.3, 144.0, 146.7, 148.9 (quart. arom. C-Atome), 153.4 (C=N), 165.7 (C=O); C₁₄H₁₂N₄O₃S (316.34); Ber. C 53.16, H 3.82, N 17.71; Gef. C 53.12, H 3.80, N 17.66.

2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (125)



Methode A

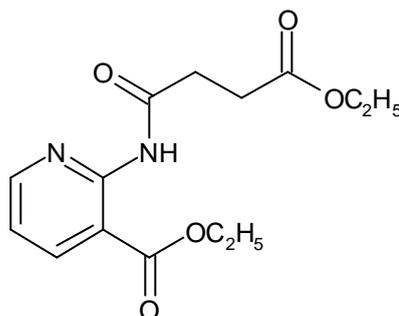
5.08 g (37 mmol) 2-Aminopyridin-3-carbonsäure (**124**) werden in 50 ml abs. Ethanol gelöst. Es wird Chlorwasserstoffgas eingeleitet (ca. 45 min). Anschließend wird unter Rückfluss erhitzt (ca. 13 h) bis die DC-Reaktionskontrolle (Elutionsmittel: Ethylacetat/Ammoniak, ca. 20:1) eine vollständige Umsetzung anzeigt. Es wird im Vakuum zur Trockene einrotiert und der Rückstand in möglichst wenig Wasser gelöst. Anschließend wird mit ca. 300 ml 5-prozentiger Natriumcarbonatlösung versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und mit 5-prozentiger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol oder Ethanol/Petrolether. Farblose Kristalle; Ausbeute: 3.83 g (63 %); Schmp.: 94.5 °C (Lit.^{114,115}: 94-96 °C, 95 °C); Die IR-Daten entsprechen der Literatur.¹¹⁵ ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 4.27 (q, 2H, 7.1 Hz, CH₂), 6.63 (dd, 1H, 8.1/4.9 Hz, arom. H), 7.16 (bs, 2H, NH₂), 8.06 (dd, 1H, 7.6/1.8 Hz, arom. H), 8.20 (dd, 1H, 4.6/2.0 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 14.0 (prim. CH₃), 60.4 (CH₂), 111.8, 139.5, 153.8 (tert. arom. C-Atome), 104.7, 159.4, 166.4 (quart. arom. C-Atome); C₈H₁₀N₂O₂ (166.18).

Methode B

1381 mg (10 mmol) 2-Aminopyridin-3-carbonsäure (**124**) werden bei Raumtemperatur in 40 ml N,N-Dimethylformamid 5 min gerührt. Es werden 2764 mg (20 mmol) Kaliumcarbonat zugefügt und weitere 30 min gerührt. 1560 mg (10 mmol) Iodethan in 10 ml N,N-Dimethylformamid werden langsam zu der Suspension getropft. Anschließend wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird auf 200 ml Eiswasser gegossen und gerührt. Nach dem Schmelzen des Eises wird fünfmal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Umkristallisieren aus Ethanol

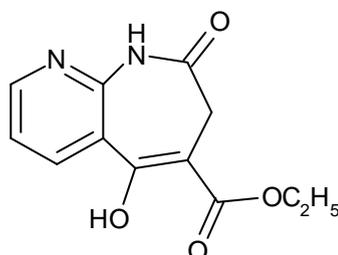
oder Ethanol/Petrolether. Gelbliche Kristalle; Ausbeute: 1.02 g (61 %); Schmp.: 95 °C (Lit.^{114,115}: 94-96 °C, 95 °C).

2-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (127)



2018 mg (20 mmol) Calciumcarbonat werden mit 1662 mg (10 mmol) 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) in 10 ml Toluol (trocken) gerührt. Zu dieser Suspension tropft man bei Raumtemperatur eine Lösung aus 1646 mg (10 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**126**) in 20 ml Toluol (trocken). Anschließend wird 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Es resultieren 1.7 g eines gelben Öls, welches ohne weitere Reinigung eingesetzt wird; Ausbeute 1,7 g (58 %).

5-Hydroxy-8-oxo-8,9-dihydro-7H-pyrido[2,3-b]azepin-6-carbonsäureethylester (128)



Methode A

2.0 g (50 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) werden unter Stickstoffbegasung

dreimal mit 10 ml Toluol (trocken) gewaschen und dann in 10 ml Toluol (trocken) suspendiert. 3679 mg (12.5 mmol) 2-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)-amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**127**) werden in 5.7 ml N,N-Dimethylformamid und 40 ml Toluol (trocken) gelöst und über den Tropftrichter in die unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Siliconbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bei maximal 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen werden vorsichtig ca. 2.5 ml Eisessig bis zur neutralen Reaktion und anschließend 50 ml Wasser zugetropft. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Feine, farblose Nadeln; Ausbeute 228 mg (7 %); Schmp.: 212 °C, Dunkelfärbung ab 211°C; IR (KBr): 3420 cm⁻¹ (NH), 3040-3120 cm⁻¹ (CH arom.), 2960/2900 cm⁻¹ (CH aliph.), 1680/1645 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 3.03 (s, 2H, Azepin-CH₂), 4.31 (q, 2H, 7.1 Hz, CH₂), 7.34 (dd, 1H, 8.1/4.6 Hz, arom. H), 8.23 (dd, 1H, 7.9/1.8 Hz, arom. H), 8.58 (dd, 1H, 4.6/2.0 Hz, arom. H), 10.72 (bs, 1H, NH), 12.47 (bs, 1H, OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 13.9 (prim. CH₃), 30.9 (Azepin-CH₂), 61.5 (CH₂), 119.3, 137.7, 151.5 (tert. arom. C-Atome), 96.1, 119.8, 149.2, 164.3 (quart. arom. C-Atome), 170.1, 171.7 (C=O); C₁₂H₁₂N₂O₄ (248.24); Ber. C 58.06, H 4.87, N 11.29; Gef. C 58.05, H 4.97, N 11.39.

Methode B

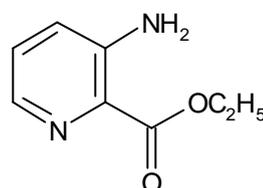
Zu einer frisch zubereiteten Natriumethanolatlösung aus 93 mg (4 mmol) Natrium und 2 ml abs. Ethanol werden 871 mg (5 mmol) Bernsteinsäurediethylester (**135**) und 332 mg (2 mmol) 2-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**125**) gegeben. Die Mischung wird für 3 Stunden unter Stickstoffbegasung zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abgesaugt, in Wasser gelöst und mit 15-prozentiger Essigsäure versetzt bis ein Niederschlag entsteht. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 15-prozentiger Essigsäure gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Feine, gelbe Nadeln. Ausbeute: 85 mg (14 %): Schmp.: 212 °C, Dunkelfärbung ab 207 °C. Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der nach Methode A gewonnenen Verbindung.

Methode C

640 mg einer 60-prozentigen Suspension von Natriumhydrid in Paraffinöl (entsprechen ca. 16 mmol Natriumhydrid) werden in 5 ml Toluol (trocken) unter Stickstoffbegasung auf 90 °C erhitzt. 664 mg (4 mmol) 2-Aminopyridin-3-

carbonsäureethylester (**125**) und 1045 mg (6 mmol) Bernsteinsäurediethylester (**135**) in 20 ml Toluol (trocken) werden langsam zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) lässt man abkühlen und tropft vorsichtig 20 ml 15-prozentige Essigsäure zu. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Feine, farblose Nadeln. Ausbeute: 387 mg (39 %): Schmp.: 211.5 °C, Braunfärbung ab 209 °C. Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der nach Methode A gewonnenen Verbindung.

3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**129**)



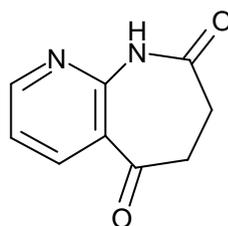
Methode A

1.00 g (7.25 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**144**) werden bei Raumtemperatur in 30 ml N,N-Dimethylformamid gerührt. Nach Zugabe von 2.00 g (14.5 mmol) Kaliumcarbonat wird 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 1.13 g (7.25 mmol) Iodethan in 20 ml N,N-Dimethylformamid zugetropft und ca. 3 Stunden gerührt. Nach erfolgter Reaktion wird auf 145 ml Eiswasser gegossen und sechsmal mit 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phase werden mit 10-prozentiger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Umkristallisieren aus Petrolether/Ethanol; Farblose Nadeln; Ausbeute: 550 mg (44 %); Schmp.: 130 °C (Lit.⁹⁰: 132 °C); IR (KBr): 3410/3280 cm⁻¹ (NH), 3160 cm⁻¹ (CH arom.), 2980 cm⁻¹ (CH aliph.), 1690 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 4.28 (q, 2H, 7.0 Hz, CH₂), 6.65 (bs, 2H, NH₂), 7.20 (dd, 1H, 8.4/1.5 Hz, arom. H), 7.27 (dd, 1H, 8.3/4.0 Hz, arom. H), 7.85 (dd, 1H, 4.0/1.4 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 14.1 (CH₃), 60.0 (CH₂), 124.3 127.9, 136.7 (tert. arom. C-Atome), 126.2, 147.6 (quart. arom. C-Atome), 167.1 (C=O); C₈H₁₀N₂O₂ (166.18);

Methode B

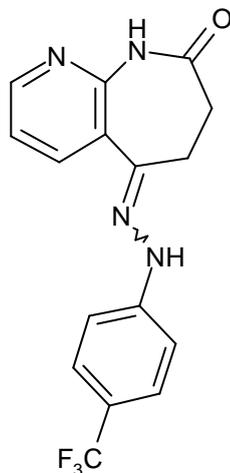
2.07 g (15 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**144**) werden unter Rückfluss mit 4 g absolutiertem Ethanol und 4.1 g konzentrierter Schwefelsäure 24 Stunden gerührt. Das gekühlte Produkt wird auf ca. 75 ml Eis gegossen, mit 25-prozentiger Ammoniaklösung basisch eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Umkristallisieren aus Petrolether/Ethanol; Bräunliche Nadeln; Ausbeute: 1345 mg (54 %); Schmp.: 129 °C (Lit.⁹⁰: 132 °C); Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der nach Methode A gewonnenen Verbindung.

6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-b]azepin-5,8-dion (**138**)



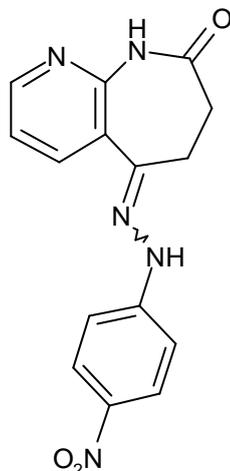
372 mg (1.5 mmol) 5-Hydroxy-8-oxo-8,9-dihydro-7H-pyrido[2,3-b]azepin-6-carbonsäureethylester (**128**) werden in 15 ml DMSO p.A. mit 0.5 ml Wasser unter Stickstoffbegasung bei 150 °C gerührt. Es werden bis zur vollständigen Umsetzung ca. alle 2 Stunden weitere 0.5 ml Wasser zugefügt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 40 ml Wasser gegossen und über Nacht gekühlt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Beigefarbene Kristalle; Ausbeute: 214 mg (81 %); Schmp.: 221 °C, Dunkelfärbung ab 195 °C; IR (KBr): 3130 cm⁻¹ (NH), 3050 cm⁻¹ (CH arom.), 2910/2960 cm⁻¹ (CH aliph.), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.74-2.77 und 2.93-2.96 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.26 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, arom. H), 8.26 (dd, 1H, 7.9/1.8 Hz, arom. H), 8.56 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, arom. H), 10.39 (bs, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 29.3, 37.1 (Azepin-CH₂), 119.2, 139.8, 153.0 (tert. arom. C-Atome), 120.9, 150.8 (quart. arom. C-Atome), 172.8, 197.2 (C=O); C₉H₈N₂O₂ (176.18); Ber. C 61.36, H 4.56, N 15.90; Gef. C 61.10, H 4.61, N 15.52.

9-(4-Trifluormethyl-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-on (**139a**)



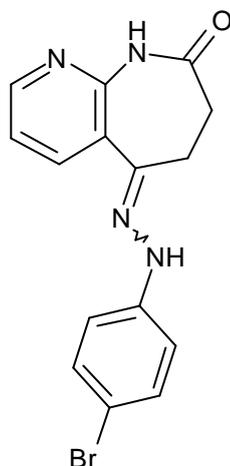
Nach AAV 4 aus 88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) und 103 mg (0.58 mmol) 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**). Reaktionszeit: 55 Minuten. Umkristallisieren aus Ethanol. Farbloses Pulver; Ausbeute 54 mg (33 %); Schmp.: 263 °C, Braunfärbung ab 258 °C; IR (KBr): 3290/3170 cm^{-1} (NH), 3040 cm^{-1} (CH arom.), 2900-2840 cm^{-1} (CH aliph.), 1675 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.60-2.63 und 3.01-3.04 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.23 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, Pyrido-H), 7.35 (d, 2H, 8.1 Hz, Phenyl-H), 7.55 (d, 2H, 8.6 Hz, Phenyl-H), 8.10 (dd, 1H, 7.6/2.0 Hz, Pyrido-H), 8.37 (dd, 1H, 4.8/1.8 Hz, Pyrido-H), 9.80 (s, 1H, NH), 10.09 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 29.0, 31.0 (CH₂-CH₂), 112.8, 120.0, 126.2, (q, $^3J_{\text{C,F}} = 4.1$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 138.4, 148.3 (tert. arom. C-Atome), 119.3 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 31.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 124.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 270.6$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$) 125.6, 143.7, 148.5, 149.7 (quart. arom. C-Atome), 172.7 (C=O); C₁₆H₁₃F₃N₄O (334.30); Ber. C 57.49, H 3.92, N 16.76; Gef. C 57.09, H 3.74, N 16.47.

9-(4-Nitro-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-on
(139b)



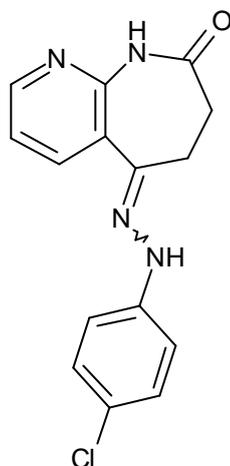
Nach AAV 4 aus 88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-b]azepin-5,8-dion (**138**), 89 mg (0.58 mmol) 4-Nitro-phenylhydrazin (**117b**). Reaktionszeit: 45 Minuten. Umkristallisieren aus Ethanol. Orangefarbene Kristalle; Ausbeute: 72 mg (46 %); Schmp.: 302 °C, Braunfärbung ab 299.5 °C; IR (KBr): 3290 cm⁻¹ (NH), 3030 cm⁻¹ (CH arom.), 2890 cm⁻¹ (CH aliph.), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.61-2.64 und 3.05-3.08 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.24 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, Pyrido-H), 7.34 (d, 2H, 9.1 Hz, Phenyl-H), 8.11-8.16 (m, 3H, arom. H), 8.40 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, Pyrido-H), 10.13 (s, 1H, NH), 10.26 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 28.2, 31.0 (CH₂-CH₂), 112.4, 120.0, 125.7, 138.5, 148.7 (tert. arom. C-Atome), 125.2, 139.1, 146.6, 149.8, 151.0 (quart. arom. C-Atome), 172.5 (C=O); C₁₅H₁₃N₅O₃ (311.30); Ber. C 57.88, H 4.21, N 22.50; Gef. C 57.63, H 4.41, N 21.97.

9-(4-Brom-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-on
(139c)



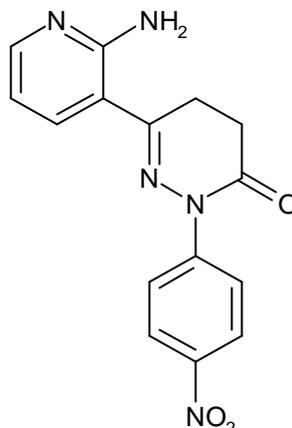
Nach AAV 4 aus 88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-b]azepin-5,8-dion (**138**) und 130 mg (0.58 mmol) 4-Brom-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117c**). Reaktionszeit: 55 Minuten. Umkristallisieren aus Ethanol. Beigefarbenes Pulver; Ausbeute 107 mg (62 %); Schmp.: 259 °C, Braunfärbung ab 257 °C; IR (KBr): 3290/3180 cm^{-1} (NH), 3040 cm^{-1} (CH arom.), 2960/2850 cm^{-1} (CH aliph.), 1675 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.56-2.61 und 2.96-2.99 (m, AA'XX', 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 7.16 (d, 2H, 9.2 Hz, Phenyl-H), 7.21 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, Pyrido-H), 7.37 (d, 2H, 8.6 Hz, Phenyl-H), 8.07 (dd, 1H, 7.6/1.5 Hz, Pyrido-H), 8.35 (dd, 1H, 4.8/1.8 Hz, Pyrido-H), 9.49 (s, 1H, NH), 10.06 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 28.9, 31.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 115.0, 119.9, 131.5, 138.2, 148.0 (tert. arom. C-Atome), 110.5, 125.7, 142.1, 144.8, 149.5 (quart. arom. C-Atome), 172.6 (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}$ (345.20); Ber. C 52.19, H 3.80, N 16.23; Gef. C 52.04, H 3.85, N 16.11.

9-(4-Chlor-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-on
(139d)



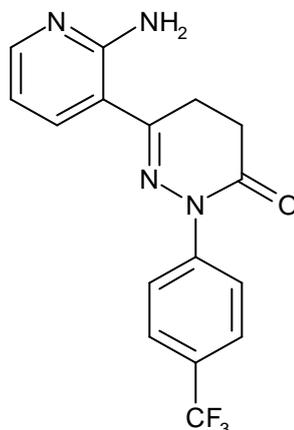
Nach AAV 4 aus 88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrido[2,3-b]azepin-5,8-dion (**138**), 104 mg (0.58 mmol) 4-Chlor-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117d**) und 48 mg (0.58 mmol) Natriumacetat. Reaktionszeit: 30 Minuten. Umkristallisieren aus Ethanol. Farblose Nadeln; Ausbeute 71 mg (47 %); Schmp.: 259.5 °C, Braunfärbung ab 257 °C; IR (KBr): 3280 cm⁻¹ (NH), 3030 cm⁻¹ (CH arom.), 2840 cm⁻¹ (CH aliph.), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.58-2.61 und 2.96-2.99 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.19-7.27 (m, 5H, arom. H), 8.08 (dd, 1H, 7.6/1.5 Hz, Pyrido-H), 8.35 (dd, 1H, 4.6/1.5 Hz, Pyrido-H), 9.48 (s, 1H, NH), 10.05 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 28.9, 31.1 (CH₂-CH₂), 114.4, 119.9, 128.6, 138.2, 148.0 (tert. arom. C-Atome), 122.8, 125.7, 141.9, 144.4, 149.5 (quart. arom. C-Atome), 172.6 (C=O); C₁₅H₁₃ClN₄O (300.75); Ber. C 59.91, H 4.36, N 18.63; Gef. C 59.74, H 4.30, N 18.40.

6-(2-Amino-3-pyridyl)-2-(4-nitrophenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-on
(140a)



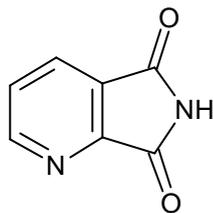
88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**), 115 mg (0.75 mmol) 4-Nitro-phenylhydrazin (**117b**) werden in 5 ml Eisessig 1.5 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit 0.05 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und bei 70 °C gerührt. Es werden in Abständen von ca. 2 Stunden erneut jeweils 0.05 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt bis die DC-Reaktionskontrolle (Elutionsmittel: Toluol/Aceton 1:1) eine vollständige Umsetzung des Zwischenproduktes anzeigt (ca. 4.5 Stunden). Man lässt abkühlen und gießt in 10 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung. Es wird fünfmal mit 10 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Umkristallisieren aus Ethanol. Rostrote Kristalle; Ausbeute: 47 mg (30 %); Schmp.: 264.5 °C, Dunkelfärbung ab 260 °C; IR (KBr): 3380/3240 cm⁻¹ (NH), 3130 cm⁻¹ (CH arom.), 1680 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.77-2.81 und 3.18-3.22 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.68 (dd, 1H, 7.9/5.0 Hz, Pyridyl-H), 7.23 (s, 2H, NH₂), 7.83-7.87 (m, 2H, arom. H), 7.90 (dd, 1H, 7.9/1.8 Hz, Pyridyl-H), 8.06 (dd, 1H, 4.8/1.8 Hz, Pyridyl-H), 8.31-8.34 (m, 2H, arom. H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 22.7, 27.5 (CH₂-CH₂), 111.8, 124.0, 124.5, 137.3, 149.7 (tert. arom. C-Atome), 110.9, 144.5, 146.4, 155.4, 156.6 (quart. arom. C-Atome), 165.7 (C=O); C₁₅H₁₃N₅O₃ (311.30); Ber. C 57.88, H 4.21, N 22.50; Gef. C 57.67, H 4.35, N 22.03.

6-(2-Amino-3-pyridyl)-2-(4-trifluormethyl-phenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-pyridazin-3-on (140b)



88 mg (0.5 mmol) 6,7,8,9-Tetrahydro-5*H*-pyrido[2,3-*b*]azepin-5,8-dion (**138**) und 132 mg (0.75 mmol) 4-Trifluormethyl-phenylhydrazin (**117a**) werden in 5 ml Eisessig. 1.5 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit 0.05 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 7 Stunden bei 70 °C gerührt. Man lässt abkühlen, gießt in 10 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung, rührt und überführt in einen Scheidetrichter. Es wird dreimal mit 10 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden langsam eingeeengt. Der entstehende helle Niederschlag wird durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Umkristallisieren aus Ethanol. Gelbe Nadeln; Ausbeute: 33 mg (20 %); Schmp.: 178 °C, Verfärbung ab 159.5 °C; IR (KBr): 3420/3300 cm⁻¹ (NH), 2890 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.74-2.78 und 3.17-3.21 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 6.68 (dd, 1H, 7.9/4.8 Hz, Pyridyl-H), 7.25 (bs, 2H, NH₂), 7.75-7.78 (m, 2H, arom. H), 7.82-7.85 (m, 2H, arom. H), 7.90 (dd, 1H, 8.1/1.5 Hz, Pyridyl-H), 8.05 (dd, 1H, 4.8/1.0 Hz, Pyridyl-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 23.0, 27.7 (CH₂-CH₂), 112.3, 125.4, 126.1 (q, ³J_{C,F} = 3.7 Hz, C-C-CF₃), 137.7, 150.1 (tert. arom. C-Atome), 111.3, 145.0, 155.1, 157.1 (quart. arom. C-Atome), 165.9 (C=O) Die Signale für das Kohlenstoffatom der Trifluormethylgruppe und das Kohlenstoffatom, an dem diese angeknüpft ist, konnten wegen der Aufspaltung zum Quartett und die dadurch geringere Peakhöhe nicht identifiziert werden. EI/HRMS für C₁₆H₁₃F₃N₄O (334.30): Ber: 334.1041, Gef.: 334.1032.

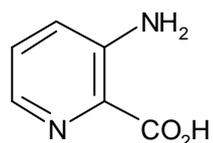
5H-Pyrrolo[3,4-b]pyridin-5,7(6H)-dion (143)



22.5 g (135 mmol) Pyridin-2,3-dicarbonsäure (**141**) werden im tarierten Kolben mit 25 g Acetanhydrid versetzt und bis zur Lösung erwärmt. Dann werden während ca. 1 Stunde so viel Essigsäure und Acetanhydrid abdestilliert bis das Thermometer im Inneren des Kolbens 160 °C anzeigt.

Es wird Acetanhydrid bis zum Gewicht von 12 g ergänzt, und es werden 14 g (237 mmol) Acetamid zugefügt. Anschließend rührt man 8 Stunden bei 120-125 °C. Das nach dem Abkühlen auskristallisierte Imid wird nach Zerreiben im Mörser abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Zur Reinigung wird das Produkt in 100 ml heißem Wasser suspendiert und nach dem Erkalten abgesaugt. Braune Kristalle; Ausbeute: 17.7 g (89 %); Schmp.: 242 °C (Lit.^{89,116,117}: 230 °C, 233 °C, 241.5-243.5 °C); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.78 (dd, 1H, 7.6/4.6 Hz, arom. H), 8.27 (dd, 1H, 7.6/1.5 Hz, arom. H), 8.98 (dd, 1H, 4.8/1.3 Hz, arom. H) 11.69 (bs, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 127.7 131.2, 154.9 (tert. arom. C-Atome), 128.0, 152.0 (quart. arom. C-Atome), 167.3, 167.6 (C=O); C₇H₄N₂O₂ (148.12). Zu den spektroskopischen Daten siehe auch L.I.M. Spiessens und M.J.O. Anteunis.¹¹⁸

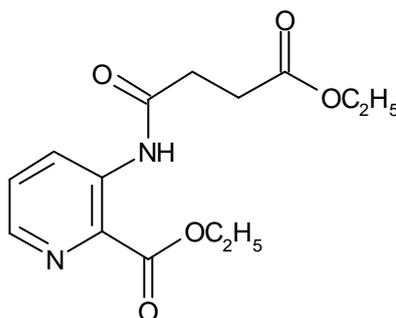
3-Aminopyridin-2-carbonsäure (144)



Zu einer Lösung von 5.0 g (33.8 mmol) 5H-Pyrrolo[3,4-b]pyridin-5,7(6H)-dion (**143**) in 100 ml eiskalter 10-prozentiger Natronlauge gibt man eine wässrige Natriumhypobromit-Lösung aus 5.6 g (35 mmol) Brom in 35 ml eiskalter 15-prozentiger Natronlauge. Die Mischung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur und

anschließend 1 Stunde bei 85 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 50-prozentiger Schwefelsäure auf pH 5 gebracht und für zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Der entstehende Niederschlag wird abgetrennt und verworfen. Das Filtrat wird in eine Lösung von 7088 mg (35.5 mmol) Kupfer(II)acetat (-1-Hydrat) in 140 ml heißem Wasser und 3.5 ml Eisessig gegossen. Der Niederschlag wird abfiltriert und in ca. 125 ml heißem Wasser suspendiert. In diese Suspension wird Schwefelwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet. Dies geschieht entweder aus einer Schwefelwasserstoff-Druckflasche oder durch Überleiten aus einem Kolben mit 10-prozentiger Schwefelsäure, in die eine konzentrierte Lösung aus Natriumsulfid getropft wird. Anschließend wird das ausgefallene Kupfersulfid abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das gewünschte Produkt kristallisiert beim Kühlen aus und kann abgesaugt werden. Beigefarbene Kristalle; Ausbeute: 4150 mg (89 %); Schmp.: 209.5 °C (Lit.^{90,119}: 210 °C); IR (KBr): 3370 cm⁻¹ (NH), 3020-3050 cm⁻¹ (CH arom.), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ (ppm) = 6.94 (bs, 2H, NH₂), 7.27 (dd, 1H, 8.4/1.3 Hz, arom. H), 7.34 (dd, 1H, 8.6/4.1 Hz, arom. H), 7.83 (dd, 1H, 4.3/1.3 Hz, arom. H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 125.2 128.2, 134.9 (tert. arom. C-Atome), 126.3, 147.6 (quart. arom. C-Atome), 167.6 (C=O); C₆H₆N₂O₂ (138.13);

3-[(Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäure-ethylester (146)



Methode A

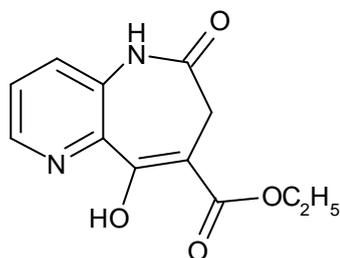
2018 mg (20 mmol) Calciumcarbonat werden mit 1662 mg (10 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**129**) in 25 ml Toluol (trocken) im Eisbad gerührt. Zu dieser Suspension tropft man bei 05 °C eine Lösung aus

2057 mg (12.5 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**126**) in 25 ml Toluol (trocken). Anschließend wird bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt (7 Stunden). Das Reaktionsgemisch wird heiß filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Der gelbliche Feststoff wird in Ethylacetat gelöst und zur Entfernung der Bernsteinsäurederivate dreimal mit 7-prozentiger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach einmaligem Waschen mit Wasser wird über Natriumsulfat getrocknet und erneut im Vakuum zur Trockene einrotiert. Eine andere Reinigungsmöglichkeit ist die Durchführung einer Säulenchromatographie mit Ethylacetat/Petrolether (2:1) als Elutionsmittel. Farblose Kristalle; Ausbeute 2355 mg (80 %); Schmp.: 67.5 °C; IR (KBr): 3270 cm⁻¹ (NH), 2980 cm⁻¹ (CH arom.), 2980 cm⁻¹ (CH aliph.), 1740/1665 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.17 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 1.32 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 2.58-2.61 und 2.66-2.69 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 4.05 (q, 2H, 7.1 Hz, CH₂), 4.32 (q, 2H, 6.9 Hz, CH₂), 7.60 (dd, 1H, 8.1/4.6 Hz, arom. H), 8.38-8.40 (m, 2H, arom. H), 10.44 (bs, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 13.9, 14.0 (CH₃), 28.5, 31.1 (CH₂-CH₂), 59.9, 61.2 (O-CH₂), 127.1, 129.8, 144.0 (tert. arom. C-Atome), 135.4, 137.2 (quart. arom. C-Atome), 165.9, 170.4, 172.0 (C=O); C₁₄H₁₈N₂O₅ (294.31); Ber. C 57.13, H 6.16, N 9.52; Gef. C 56.83, H 6.13, N 9.25.

Methode B

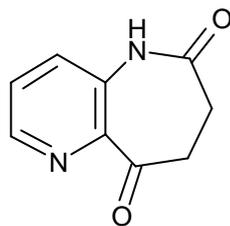
Zu 3160 mg (19 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**129**) in 2.2 ml Pyridin (trocken) und 25 ml Toluol (trocken) wird unter Rühren und Kühlen eine Lösung von 3912 mg (24 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**126**) in 6 ml Toluol (trocken) getropft. Anschließend wird bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt (ca. 2 Stunden). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 8.5 ml Wasser versetzt, in einen Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird zweimal mit 10 ml 10-prozentiger Salzsäure, zweimal mit 10 ml 5-prozentiger Natriumcarbonatlösung und einmal mit 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Farblose Kristalle; Ausbeute 4530 mg (81 %); Schmp.: 68.5 °C; Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A gewonnenen Verbindung überein.

9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester
(147)



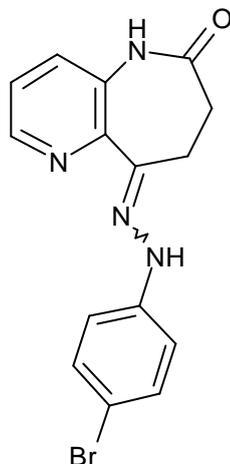
1605 mg (40 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 5 ml Toluol (trocken) gewaschen und dann in 3 ml Toluol (trocken) suspendiert. 2355 mg (8 mmol) 3-[(Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-pyridin-2-carbonsäureethylester (**146**) werden in 3.6 ml N,N-Dimethylformamid (trocken) und 30 ml Toluol (trocken) gelöst und über den Tropftrichter in die unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Siliconbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bei 70-75 °C gerührt. Nach dem Abkühlen werden vorsichtig ca. 2.4 ml Eisessig bis zur neutralen Reaktion und anschließend 25 ml Wasser zugetropft. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Farblose Kristalle; Ausbeute 847 mg (43 %); Schmp.: 221 °C, Dunkelfärbung ab 218 °C; IR (KBr): 3140/3080/3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2960/2900 cm⁻¹ (CH aliph.), 1700/1645 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH₃), 2.98 (s, 2H, Azepin-CH₂), 4.31 (q, 2H, 6.9 Hz, CH₂), 7.55-7.61 (m, 2H, arom. H), 8.52 (dd, 1H, 4.0/2.0 Hz, arom. H), 10.43 (s, 1H, NH), 12.14 (bs, 1H, OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 14.0 (CH₃), 30.5, 61.3 (CH₂), 125.8, 129.6, 144.8 (tert. arom. C-Atome), 98.0, 135.4, 141.5, 164.5 (quart. arom. C-Atome), 170.0, 172.0 (C=O); C₁₂H₁₂N₂O₄ (248.24); Ber. C 58.06, H 4.87, N 11.29; Gef. C 57.96, H 4.91, N 11.20.

5H-Pyrido[3,2-b]azepin-6,9(7H,8H)-dion (148)



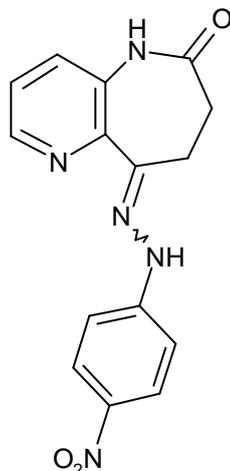
125 mg (0.5 mmol) (**147**) werden in 10 ml N,N-Dimethylformamid unter Stickstoffbegasung 5 Stunden bei 150 °C gerührt. Alle 30 Minuten werden 2 Tropfen Wasser hinzugegeben. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Für eine Weiterverarbeitung ist die Verbindung **148** nicht aufgereinigt, sondern nach dem Trocknen (zu den Hydrazonen **149**) umgesetzt worden. Eine Reinigung ist möglich durch Mitteldruckchromatographie über eine RP-18-Säule. Dazu wird der Rückstand in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (1:1) gelöst und auf die Säule aufgebracht. Nach einer kurzen Waschphase mit reinem Wasser wird mit 5-prozentigem Methanol eluiert. Beigefarbene Kristalle; Ausbeute (ungereinigt): 84 mg (95 %); Schmp.: 185.5 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3210/3120 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ (CH arom.), 2900/2950 cm⁻¹ (CH aliph.), 16875 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.71-2.74 und 2.97-3.00 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.53-7.59 (m, 2H, arom. H), 8.45 (dd, 1H, 4.1/2.0 Hz, arom. H), 10.11 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 29.0, 38.7 (Azepin-CH₂), 127.2, 129.9, 145.0 (tert. arom. C-Atome), 136.5, 142.8 (quart. arom. C-Atome), 173.2, 197.6 (C=O); C₉H₈N₂O₂ (176.18); Ber. C 61.36, H 4.56, N 15.90; Gef. C 61.17, H 4.52, N 15.77.

5-(4-Brom-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-on
(149a)



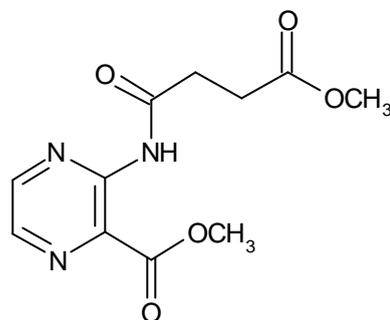
359 mg (2 mmol) 5H-Pyrido[3,2-b]azepin-6,9(7H,8H)-dion (**148**), 492 mg (2.2 mmol) 4-Brom-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**117c**) und 180 mg (2.2 mmol) Natriumacetat werden in 20 ml Eisessig bei 70 °C 15 Minuten gerührt. Nach dem Abkühlen wird in 80 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen und mindestens 30 Minuten gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit 5-prozentiger Natriumacetatlösung und Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Gelbe Kristalle; Ausbeute: 516 mg (75 %); Schmp.: 217 °C, Sintern unter Dunkelfärbung ab 212.5 °C; IR (KBr): 3280 cm⁻¹ (NH), 3080-3120 cm⁻¹ (CH arom.), 2950/2890 cm⁻¹ (CH aliph.), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.55-2.58 und 3.01-3.04 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.12-7.16 (m, 2H, arom. H), 7.34-7.41 (m, 4H, arom. H), 8.41 (dd, 1H, 4.1/1.3 Hz, arom. H), 9.50 (s, 1H, NH), 9.80 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 29.8, 30.5 (Azepin-CH₂), 115.0, 123.3, 129.3, 131.4, 145.4 (tert. arom. C-Atome), 110.5, 134.2, 142.7, 144.8, 147.9 (quart. arom. C-Atome), 172.9 (C=O); EI/HRMS für C₁₅H₁₃BrN₄O (345.20): Ber: 344.0273, Gef.: 344.0251.

5-(4-Nitro-phenylhydrazono)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-on
(149b)



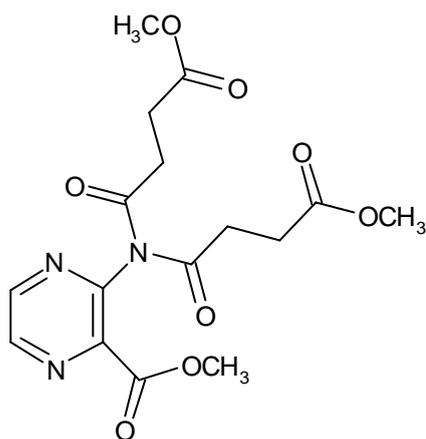
718 mg (4 mmol) 5H-Pyrido[3,2-b]azepin-6,9(7H,8H)-dion (**148**), 674 mg (4.4 mmol) 4-Nitro-phenylhydrazin (**117b**) werden in 40 ml Eisessig bei 70 °C 35 Minuten gerührt. Nach dem Abkühlen wird in 160 ml 5-prozentige Natriumacetatlösung gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Goldgelb glänzende Kristalle, Blättchen; Ausbeute: 567 mg (45.5 %); Schmp.: 280.5 °C, unter Dunkelfärbung; IR (KBr): 3220 cm⁻¹ (NH), 3040 cm⁻¹ (CH arom.), 2940 cm⁻¹ (CH aliph.), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.58-2.61 und 3.10-3.14 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 7.31-7.33 (m, 2H, Phenyl-H), 7.39-7.44 (m, 2H, arom. H), 8.13-8.15 (m, 2H, Phenyl-H), 8.44 (dd, 1H, 4.1/2.0 Hz, Pyrido-H), 9.83 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 30.1, 30.4 (Azepin-CH₂), 112.4, 123.9, 125.7, 129.4, 145.5 (tert. arom. C-Atome), 134.7, 139.1, 147.2, 147.4, 151.0 (quart. arom. C-Atome), 172.7 (C=O); C₁₅H₁₃N₅O₃ (311.30); Ber. C 57.88, H 4.21, N 22.50; Gef. C 57.87, H 4.50, N 22.58;

3-[(4-Methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2-carbonsäuremethylester (151)
und 3-[Bis(4-methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2-carbonsäuremethylester (152)



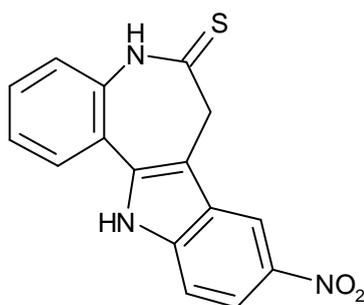
Eine Mischung aus 153 mg (1 mmol) 3-Aminopyrazin-2-carbonsäuremethylester (**150**) und 241 mg (1.6 mmol) Bernsteinsäuremethylesterchlorid (**113**) werden in 2 ml Pyridin (trocken) auf 95 °C erhitzt, nach 2 Stunden werden erneut 241 mg (1.6 mmol) Bernsteinsäuremethylesterchlorid (**113**) zugegeben, und es wird weitere 20 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 8 ml Wasser verdünnt und fünfmal mit 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Es resultiert ein braunes Öl, aus welchem durch Säulenchromatographie **151** isoliert werden kann. Elutionsmittel: Ethylacetat/Petrolether (2:1). Gelbes Öl; Ausbeute 65 mg (24 %); IR (Film): 3270 cm⁻¹ (NH), 2950 cm⁻¹ (CH aliph.), 1740 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ (ppm) = 2.56-2.59 und 2.68-2.71 (m, AA'XX', 4H, CH₂-CH₂), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, CH₃), 8.48 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 8.63 (d, 1H, 2.5 Hz arom. H), 11.02 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 51.3, 52.1 (CH₃), 28.0, 30.1 (CH₂-CH₂), 139.4, 144.9 (tert. arom. C-Atome), 137.8, 144.8 (quart. arom. C-Atome), 164.7, 170.9, 172.4 (C=O); EI/HRMS für C₁₁H₁₃N₃O₅ (267.24): Ber.: 267.0855, Gef.: 267.0859.

3-[Bis(4-methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2-carbonsäuremethylester
Bei dieser Methode entsteht als Nebenprodukt der 3-[Bis(4-methoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyrazin-2-carbonsäuremethylester (**152**), dessen Isolierung ebenfalls durch die beschriebene Säulenchromatographie möglich ist.



Gelbes Öl; Ausbeute 54 mg (14 %); IR (Film): 2950 cm^{-1} (CH aliph.), 1730 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) = 2.52-2.55 und 2.77-2.80 (m, AA'XX', 8H, CH₂-CH₂, CH₂-CH₂), 3.58 (s, 6H, CH₃, CH₃), 3.88 (s, 3H, CH₃), 8.95 (d, 1H, 2.2 Hz, arom. H), 8.98 (d, 1H, 2.5 Hz arom. H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 51.3, 53.1 (CH₃), 27.9, 33.0 (CH₂-CH₂), 145.1, 147.3 (tert. arom. C-Atome), 142.3, 146.8 (quart. arom. C-Atome), 163.0, 172.1, 173.5 (C=O); EI/HRMS für C₁₆H₁₉N₃O₈ (381.35): Ber.: 381.1172, Gef.: 381.1153.

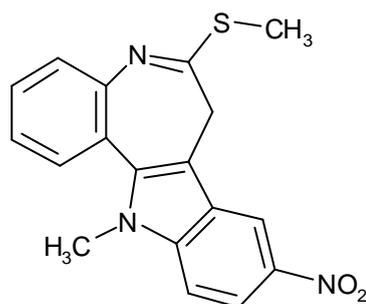
9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-thion (154)



Eine Lösung aus 293 mg (1 mmol) 9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3**) wird in 30 ml Tetrahydrofuran (trocken) bei 50 °C unter Stickstoffbegasung gerührt. Zu dieser Lösung gibt man 250 mg (1.12 mmol) Phosphorpentasulfid und gleich im Anschluss daran 370 mg (4.4 mmol) Natriumhydrogencarbonat. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Suspension auf 50 ml zerstoßenes Eis gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Gelbes Pulver; Ausbeute:

136 mg (44 %); Schmp.: > 330 °C, Dunkelfärbung ab 285 °C; IR (KBr): 3380/3150 cm⁻¹ (NH), 3070 cm⁻¹ (CH arom.), 2990 cm⁻¹ (CH aliph.); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 4.04 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.43-7.52 (m, 3H, arom. H), 7.63 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.83 (d, 1H, 7.1 Hz, arom. H), 8.10 (dd, 1H, 9.1/2.0 Hz, arom. H), 8.68 (d, 1H, 2.5 Hz, arom. H), 12.17 (s, 1H, NH), 12.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ(ppm) = 39.5 (Azepin-CH₂), 112.0, 115.2, 117.6, 123.2, 125.6, 127.0, 128.7 (tert. arom. C-Atome), 111.7, 123.1, 125.3, 135.5, 136.5, 140.5, 140.9 (quart. arom. C-Atome), 200.2 (C=S); C₁₆H₁₁N₃O₂S (309.35); Ber. C 62.12, H 3.58, N 13.58; Gef. C 62.06, H 3.79, N 13.36.

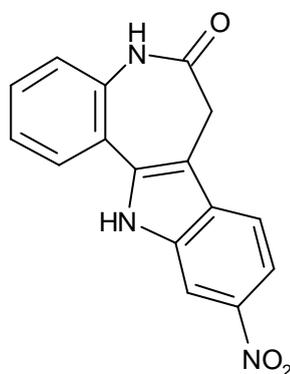
12-Methyl-6-methylthio-9-nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin (156)



108 mg (0.35 mmol) 9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-thion (**154**) in 10 ml Tetrahydrofuran (trocken) werden mit 15 mg einer 60-prozentigen Suspension von Natriumhydrid in Paraffinöl (entsprechen ca. 0.37 mmol NaH) unter Stickstoffbegasung gerührt. Nach Zugabe von 60 mg (0.42 mmol) Iodmethan wird zum Sieden erhitzt. Die Zugabe von Iodmethan wird nach 1, 1.5 und 3 Stunden wiederholt. Nach 2 Stunden werden außerdem weitere 15 mg einer 60-prozentigen Suspension von Natriumhydrid in Paraffinöl zugegeben. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Suspension auf 50 ml Eiswasser gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen, am nächsten Tag abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Ockerfarbene Kristalle; Ausbeute: 55 mg (47 %); Schmp.: 237 °C, Dunkelfärbung ab 232°C; IR (KBr): 3070 cm⁻¹ (CH arom.), 2920 cm⁻¹ (CH aliph.); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.84 (bs, 1H, CH), 3.95 (s, 3H, CH₃), 4.31 (bs, 1H, CH), 7.33

(„dt“, 1H, 7.6/1.3 Hz, arom. H), 7.41 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.49 („dt“, 1H, 7.6/1.0 Hz, arom. H), 7.77 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.83 (d, 1H, 7.6 Hz, arom. H), 8.13 (dd, 1H, 9.2/2.5 Hz, arom. H), 8.88 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 13.2, 32.5 (CH_3), 31.0 (Azepin- CH_2), 110.9, 115.3, 117.2, 123.2, 126.7, 128.2, 128.6 (tert. arom. C-Atome), 113.2, 119.9, 123.9, 136.9, 141.1, 141.4, 146.1, 164.6 (quart. arom. C-Atome); $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (337.40); Ber. C 64.08, H 4.48, N 12.45; Gef. C 63.85, H 4.57, N 12.29.

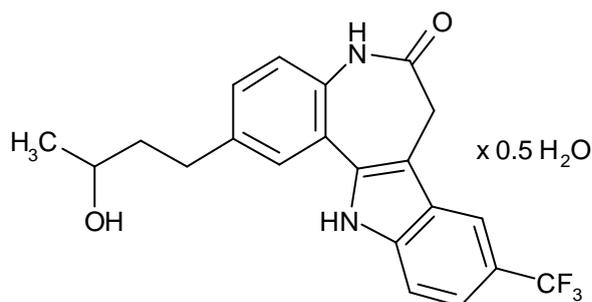
10-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (160)



250 mg (1 mmol) 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**159**) werden (eventuell unter Erwärmen) in ca. 20 ml Eisessig gelöst. Bei Raumtemperatur gibt man zu dieser Lösung 146 mg (0.64 mmol) Kupfer(II)nitrat. Es wird bis zur vollständigen Umsetzung der Ausgangsverbindung **159** gerührt (ca. 5-30 Minuten). Das Reaktionsgemisch wird auf 40 ml zerstoßenes Eis gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Umkristallisieren aus Ethanol. Gelbes Pulver; Ausbeute: 12 mg (4 %); Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3320/3200 cm^{-1} (NH), 3060-3110 cm^{-1} (CH arom.), 2920-2960 cm^{-1} (CH aliph.), 1645 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.62 (s, 2H, Azepin- CH_2), 7.30 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 7.34 („dt“, 1H, 7.8 Hz, arom. H), 7.48 („dt“, 1H, 7.6/1.0 Hz, arom. H), 7.81 (d, 1H, 7.6 Hz, arom. H), 7.89 (d, 1H, 8.9 Hz, arom. H), 7.97 (dd, 1H, 8.9/2.0 Hz, arom. H), 8.33 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.21 (s, 1H, NH), 12.43 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.4 (Azepin- CH_2), 107.9, 114.4, 118.3, 122.5, 123.9, 127.4, 129.5 (tert. arom. C-Atome), 108.6, 121.6, 131.0,

135.6, 136.2, 139.0, 142.2 (quart. arom. C-Atome), 171.3 (C=O); EI/HRMS für $C_{16}H_{11}N_3O_3$ (293.28): Ber.: 293.0800, Gef.: 293.0842.

2-(3-Hydroxybutyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on Hemihydrat (184)



489 mg (1.27 mmol) 2-(3-Oxo-1-butenyl)-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**166**) werden unter Erwärmen in 75 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach Zusatz von 1.0 ml (6.36 mmol) Triethylsilan wird 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in ca. 400 ml Wasser gegossen und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Es resultieren ca. 500 mg Niederschlag. Dieser wird in Aceton gelöst, an Kieselgel adsorbiert und durch Säulenchromatographie gereinigt (Elutionsmittel: Ethylacetat). Umkristallisieren aus Ethanol. Farblose, kurze Nadeln; Ausbeute: 80 mg (16 %); Schmp.: 291.5 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3300-3180 cm^{-1} (OH, NH), 3040/3070 cm^{-1} (CH arom.), 2940-2960 cm^{-1} (CH aliph.), 1645 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.13 (d, 3H, 6.1 Hz, CH₃), 1.68-1.73 (m, 2H, CH₂), 2.62-2.70 (m, 1H, CH), 2.73-2.80 (m, 1H, CH), 3.57-3.64 (m, 2H, Azepin-CH₂), 3.63-3.69 (m, 1H, CH), 4.56 (d, 1H, 4.6 Hz, OH), 7.19 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.26 (dd, 1H, 8.1/1.0 Hz, arom. H), 7.46 (d, 1H, 8.7 Hz, arom. H), 7.61-7.64 (m, 2H, arom. H), 8.13 (s, 1H, arom. H) 10.08 (s, 1H, NH), 12.07 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 23.6 (CH₃) 31.0, 31.2, 40.6 (CH₂), 65.2, 112.0, 115.8 (q, ³J_{C,F} = 4.1 Hz, C-C-CF₃), 118.2 (q, ³J_{C,F} = 4.1 Hz, C-C-CF₃), 122.3, 126.4, 128.7 (tert. arom. C-Atome), 108.2, 120.0 (q, ²J_{C,F} = 31.2 Hz, C-CF₃), 122.0, 125.5 (q, ¹J_{C,F} = 271.3 Hz, CF₃), 125.8, 133.5, 134.8, 137.9, 138.7 (quart. arom. C-Atome), 171.3 (C=O); C₂₁H₁₉F₃N₂O₂x0.5 H₂O (397.40); Ber. C 63.47, H 5.33,

N 7.05; Gef. C 63.64, H 4.97, N 6.86; EI/HRMS für $C_{21}H_{19}F_3N_2O_2$ (388.39):
Ber.: 388.1399, Gef.: 388.1444.

10.3 Pharmakologische Testung

10.3.1 CDK-Testsysteme

Die CDK-inhibitorische Aktivität der dargestellten Verbindungen wurde durch die quantitative Bestimmung der durch CDK katalysierten Phosphorylierung von Histon H1 bestimmt. Diese Testung wurde im Arbeitskreis von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) durchgeführt. Gemessen wurde die Inkorporierung von radioaktiv markiertem Phosphat in Histon H1.

Zur Berechnung der Konzentration eines Inhibitors, die eine 50-prozentige Enzymhemmung (IC_{50}) hervorruft, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von jeder Testsubstanz für die Inhibition des CDK1/Cyclin B-, des CDK5/p35- bzw. CDK5/p25-Komplexes aufgestellt.

CDK1/Cyclin B-Testsystem^{7,11,120}

Durch Affinitätschromatographie an $p9^{CKShs1}$ -Sephrose-Kügelchen wird CDK1/Cyclin B aus in der M-Phase befindlichen Oocyten des Seesterns *Marthasterias glacialis* isoliert. Anschließend wird mit freiem $p9^{CKShs1}$ eluiert.

In der Testmischung sind bei 30 μ l Endvolumen folgende Bestandteile enthalten: 0.5-1 μ l gereinigtes Enzym, 5 μ l Histon H1 (5 mg/ml), 5 μ l [γ -³²P]ATP (15 μ M, 3000 Ci/mmol, 1 mCi/ml) und 3 μ l des Inhibitors (0.1-1 000 μ M) in Puffer C [60 mM β -Glycerolphosphat, 15 mM p-Nitrophenylphosphat, 25 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (Mops, pH 7.2), 5 mM Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), 15 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Phenylphosphat, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und 100 μ mol Benzamidin].

Zur Bestimmung der maximalen Phosphorylierungsrate wird Puffer C anstelle der Testsubstanz eingesetzt. In Abwesenheit von Histon H1 in der Testmischung wird die nichtspezifische Bindung bestimmt, welche von jedem Volumen abgezogen wird. Die jeweilige Testung beginnt mit der Zugabe von radioaktivem ATP. Nach 10 Minuten Inkubation bei 30 °C werden 25 μ l des Flüssigkeitsüberstandes auf Whatman P81 Phosphocellulose-Papier (2.5 x 3.0 cm) getupft. Die Filter werden nach 20 Sekunden für je 5 Minuten mit einer

Lösung aus 10 ml Phosphorsäure in je 1 l Wasser gewaschen und in nassem Zustand in 1 ml ACS Szintillationsmischung (Amersham) überführt. Die ^{32}P -Radioaktivität wird durch einen Packard Tri-Carb-Zähler bestimmt. Da die Testsubstanz in DMSO als 100 mM Stammlösung gelöst ist, werden Kontrollanalysen durch Verwendung entsprechender DMSO-Verdünnungen durchgeführt, wobei die DMSO-Konzentration in der Reaktionsmischung nie höher als 1 % ist.

Die Kinase-Aktivität wird als molare Menge der Phosphatgruppen, die nach 10 Minuten Inkubation in Histon H1 aufgenommen werden, oder in % der maximalen Kinase-Aktivität bestimmt. Alle Tests erfolgen als Dreifachbestimmungen.^{7,11}

Zur Berechnung der Konzentration eines Inhibitors, die eine 50-prozentige Enzymhemmung (IC_{50}) hervorruft, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von jeder Testsubstanz für die Inhibition des CDK1/Cyclin B-Komplexes aufgestellt.

CDK5/p35-Testsystem und CDK5/p25-Testsystem^{7,11,120}

CDK5/p35 wird aus Rinderhirn gewonnen. Die Reinigung erfolgt wie in der Literatur angegeben.¹²¹ Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen der Superose 12-Säule wird eingengt bis eine ungefähre Endkonzentration von 25 μg Enzym/ml vorliegt. Die Aktivität wird wie für den CDK1/Cyclin B-Komplex beschrieben bestimmt. Hierbei wird die Kinase mit 1 mg/ml Histon H1 und 15 μM [γ - ^{32}P]ATP versetzt bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten und einem Endvolumen der Testmischung von 30 μl .

Der CDK5/p25-Komplex wurde hergestellt durch Mischen äquivalenter Mengen an rekombinanter Säugetier-CDK5 und p25, die in *Escherichia coli* exprimiert wurden. Die Aktivität wird in Puffer C bestimmt, wie es für CDK1/Cyclin beschrieben wurde.⁷

10.3.2 GSK-3 β -Testsystem

Die Aktivität der dargestellten Verbindungen bei GSK-3 β wurde durch die quantitative Bestimmung der durch GSK-3 β katalysierten Phosphorylierung des GS-1Peptids bestimmt. Diese Testung wurde ebenfalls im Arbeitskreis von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) durchgeführt. Gemessen wurde die Inkorporierung von radioaktiv markiertem Phosphat in das GS-1-Peptid.^{7,11}

GSK-3 β wird in Sf9 Insektenzellen exprimiert und daraus isoliert. Die Testung erfolgt nach 1/100 Verdünnung in 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin), 10 mM Dithiothreitol, mit 5 μ l des GS-1-Peptids als Substrat (40 μ M) in der Gegenwart von 15 μ M [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 1 mCi/ml) in Puffer A (10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), 1 mM Dithiothreitol, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 μ g/ml Heparin). Als Endvolumen werden 30 μ l erhalten. Nach 30 Minuten Inkubation bei 30 °C werden 25 μ l des Flüssigkeitsüberstandes auf Whatman P81 Phosphocellulose-Papier (2.5 x 3.0 cm) getupft. Die Filter werden nach 20 Sekunden für je 5 Minuten mit einer Lösung aus 10 ml Phosphorsäure pro 1 l Wasser gewaschen und in nassem Zustand in 1 ml ACS Szintillationsmischung (Amersham) überführt. Die ³²P-Radioaktivität wird durch einen Packard Tri-Carb-Zähler bestimmt. Da die Testsubstanz in DMSO gelöst ist, werden Kontrollanalysen durch Verwendung entsprechender DMSO-Verdünnungen durchgeführt.

Zur Berechnung der Konzentration eines Inhibitors, die eine 50-prozentige Enzymhemmung (IC₅₀) hervorruft, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von jeder Testsubstanz für die Inhibition der GSK-3 β aufgestellt.

10.3.3 In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI (NCI Human Tumor Cell Line Anti-Cancer Drug Screen)

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Paullonderivate und einige Vorstufen wurden neben der Testung an isolierten Enzymen ebenfalls einer Untersuchung bezüglich ihrer Antitumoraktivität gegen Zelllinien unterzogen. Diese Tests wurden vom National Cancer Institute (in Bethesda, USA) im Rahmen eines in vitro Screening Programms durchgeführt. In der Literatur sind genauere Angaben zu finden.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

Im Rahmen des Screenings werden die entsprechenden Substanzen an sechzig menschlichen Tumorzelllinien getestet. Die Zelllinien leiten sich von insgesamt neun verschiedenen Krebsarten ab: Neben Brust-, Prostata-, Nieren-, Eierstock-, Darm- und Lungenkrebs sind Leukämie, Melanom und Krebs des Zentralen Nervensystems vertreten.

Bei den Untersuchungen werden die Tumorzellen in den Kavitäten von Mikrotiterplatten mit der Testsubstanz inkubiert. Es werden jeweils fünf verschiedene Konzentrationen zwischen 10^{-8} M und 10^{-4} M verwendet.

Das Medium wird nach 48 Stunden entfernt. Die Zellen werden gewaschen und fixiert. Durch den Farbstoff Sulforhodamin B, welcher an basischen Aminosäuren bindet, kann der solubilisierte Rückstand in den Kavitäten so angefärbt werden, dass eine spektrophotometrische Messung die Bestimmung der Zellmasse erlaubt. Aus dieser lässt sich das prozentuale Wachstum der Zellen bestimmen.

Aus den Daten wurden für die hier beschriebenen Verbindungen für jede Zelllinie Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Die entsprechenden Aktivitäten werden durch die dekadischen Logarithmen der molaren Testsubstanzkonzentrationen angegeben, und zwar für die jeweilige Konzentration, die eine 50-prozentige Wachstumshemmung (GI_{50}), eine totale Wachstumshemmung (TGI) und ein Absterben der Hälfte der Tumorzellen (LC_{50}) bewirkten. Für die GI_{50} , die TGI und die LC_{50} wurden vom NCI die entsprechenden Mittelwerte der \log_{10} -Werte aller getesteten Zelllinien berechnet und als sogenannter Meangraph Midpoint (MG_MID) angegeben. Der MG_MID beschreibt die durchschnittliche Aktivität einer Substanz gegenüber der Gesamtheit der Tumorzelllinien.

Die Testergebnisse werden für jede Testsubstanz in Form eines Balkendiagramms aufgestellt, welches die relative Empfindlichkeit einer

einzelnen Zelllinie im Vergleich zu dem entsprechenden MG_MID-Wert veranschaulicht. Das folgende Bild 10-1 zeigt als Beispiel das Balkendiagramm von Verbindung **154**. Die Balkendiagramme der drei Parameter (GI_{50} , TGI, LC_{50}) enthalten als zentrale Achsen den ihnen zugehörigen Meangraph Midpoint-Wert. Balken nach rechts kennzeichnen Zelllinien, die empfindlicher reagieren als der Durchschnitt. Ein Balken nach links bedeuten eine verminderte Empfindlichkeit der entsprechenden Zelllinie verglichen mit dem Durchschnitt. Die Balkenlänge ist proportional zur relativen Empfindlichkeit der Zelllinie im Vergleich zum MG_MID. Die Angabe der Werte erfolgt logarithmisch, weshalb eine um 1 erhöhte Empfindlichkeit eine Hemmung der Zelllinie durch eine zehnfach niedrigere Konzentration der Testsubstanz bedeutet als durch den MG_MID beschrieben wird. Die Verbindung **154** weist z.B. eine Selektivität für die Leukämie-Zelllinie SR für die ersten beiden Parameter auf, wie im Bild 10-1 zu erkennen ist.

Die Balkendiagramme einer Testsubstanz ergeben ein Profil welches auch als „Fingerprint“ bezeichnet wird. Dieses Muster kann mithilfe des COMPARE-Algorithmus¹⁰⁹ ausgewertet werden, wobei Selektivitätsprofile verschiedener Verbindungen verglichen werden. Zeigt sich eine hohe Korrelation, so lässt sich für die entsprechenden Testsubstanzen ein gemeinsamer Wirkmechanismus postulieren.

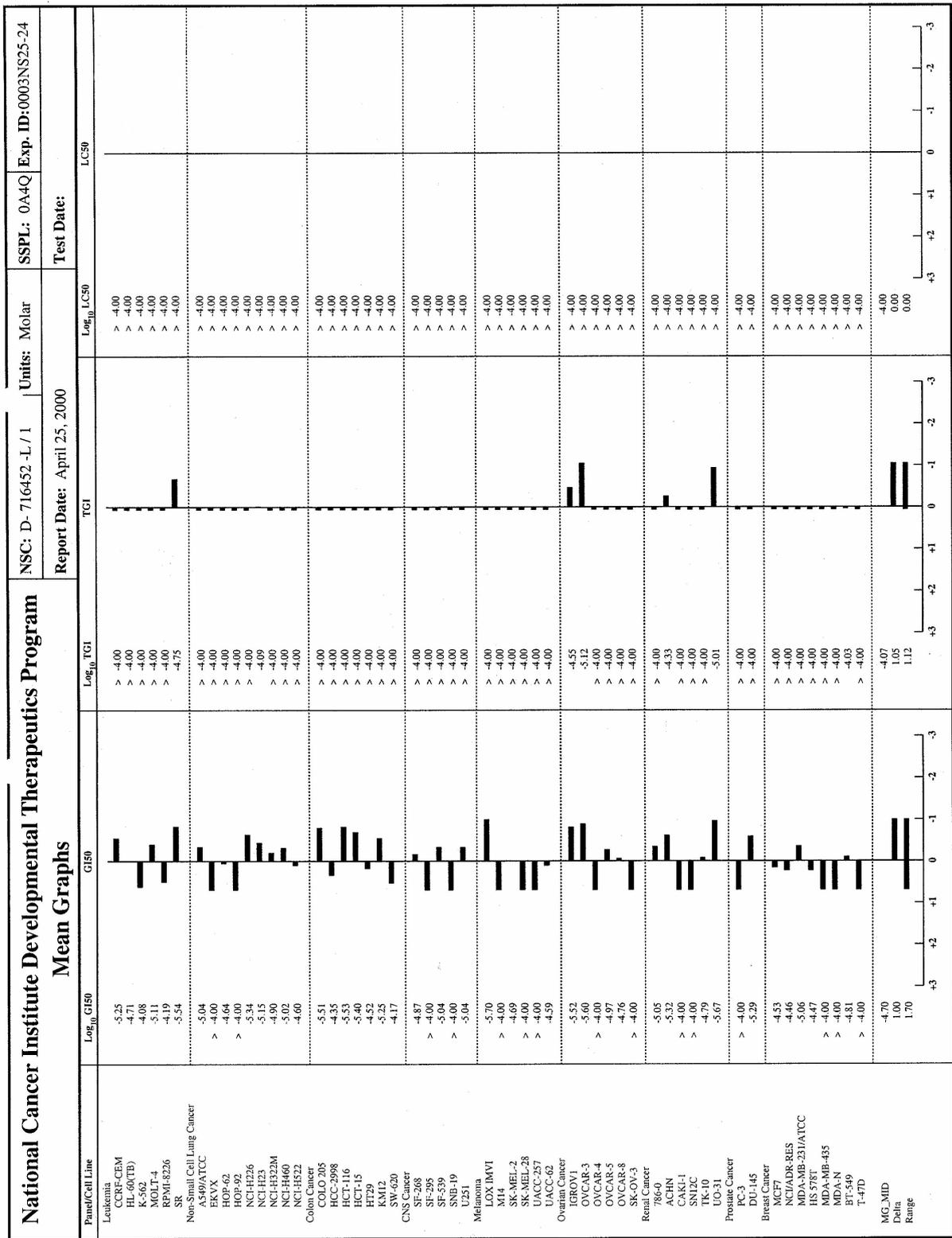


Bild 10-1: Balkendiagramm von Verbindung 154

11 Literaturverzeichnis

- (1) Coleman, K.G.; Lyssikatos, J.P.; Ynag, B.V.: Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1997**, *32*, 171-179.
- (2) Kelland, L.R.: Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2903-2911.
- (3) Sedlacek, H.H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A.; Senderowicz, A.; Sausville, E.: Flavopiridol (L86-8275, NSC-649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int. J. Oncol.* **1996**, *9*, 1143-1168.
- (4) Walker, D.H.: Small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases: molecular tools and potential therapeutics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *227*, 149-165.
- (5) Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1992**, *325*, 297-299.
- (6) Kunick, C.: Fused azepinones with antitumor activity. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 181-194.
- (7) Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Zaharevitz, D.W.; Gussio, R.; Senderowicz, A.; Sausville, E.; Kunick, C.; Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1-13.
- (8) Schultz, C.: Antitumoraktive [*d*]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.
- (9) Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zaharevitz, D.W.; Gussio, R.; Sausville, E.A.; Meijer, L.; Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/ cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2909-2919.
- (10) Voet, D.; Voet, J.: *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), **1992**.
- (11) Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J.A.; Snyder, G.L.; Greengard, P.; Biernat, J.; Wu, Y.-Z.; Mandelkow, E.-M.; Eisenbrand, G.; Meijer, L.: Indirubins inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and

- CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 251-260.
- (12) Sielecki, T.M.; Boylan, J.F.; Benfield, P.A.; Trainor, G.L.: Cyclin-dependent kinase inhibitors: Useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1-18.
- (13) Krauss, G.: *Regulation des Zellzyklus*, Wiley-VCH, Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), **1997**, 392-463.
- (14) Jeffrey, P.D.; Russo, A.A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massague, J.; Pavletich, N.P.: Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* **1995**, *376*, 313-320.
- (15) Morgan, D.O.: Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
- (16) Barvian, M.; Boschelli, D.H.; Crossrow, J.; Dobrusin, E.; Fattaey, A.; Fritsch, A.; Fry, D.; Harvey, P.; Keller, P.; Garrett, M.; La, F.; Leopold, W.; McNamara, D.; Quin, M.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Toogood, P.; Wu, Z.; Zhang, E.: Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4606-4616.
- (17) Gray, N.; Detivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L.: ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 859-875.
- (18) Rosania, G.R.; Chang, Y.-T.: Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1-13.
- (19) Meijer, L.; Thunnissen, A.-M.W.H.; White, A.W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L.-H.; Walter, J.; Cleverly, K.E.; Salinas, P.C.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Kim, S.-H.; Pettit, G.R.: Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
- (20) Meijer, L.; Leclerc, S.; Leost, M.: Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 279-284.
- (21) Mandelkow, E.: The tangled tale of tau. *Nature* **1999**, *402*, 588-589.
- (22) Morgan, D.O.: Principles of CDK regulation. *Nature* **1995**, *374*, 131-134.
- (23) Manser, E.; Chong, C.; Zhao, Z.S.; Leung, T.; Michael, G.; Hall, C.; Lim, L.: Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25070-25078.

- (24) Yee, A.; Nichols, M.A.; Wu, L.; Hall, F.L.; Kobayashi, R.; Xiong, Y.: Molecular cloning of CDK7-associated human MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 60-6062.
- (25) Fujinaga, K.; Taube, R.; Wimmer, J.; Cujec, T.P.; Peterlin, B.M.: Interactions between human cyclin T, Tat, and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *4*, 1285-1290.
- (26) Webster, K.R.: The therapeutic potential of targeting the cell cycle. *Expert Opin. Invest. Drugs* **1998**, *7*, 865-887.
- (27) Draetta, G.; Pagano, M.: Cell cycle control and cancer. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 241-248.
- (28) Kim, S.-H.: Structure-based inhibitor design for CDK2, a cell cycle controlling protein kinase. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 555-565.
- (29) Garrett, M.D.; Fattaey, A.: CDK inhibition and cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 104-111.
- (30) Pavletich, N.P.: Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 821-828.
- (31) Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
- (32) Schulze-Gahmen, U.; De Bondt, H.L.; Kim, S.-H.: High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4540-4546.
- (33) SYBYL 6.7, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- (34) Kraker, A.J.; Booher, R.N.: New targets in cell cycle regulation. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1999**, *34*, 247-256.
- (35) Arris, C.E.; Boyle, F.T.; Calvert, A.H.; Curtin, N.J.; Endicott, J.A.; Garman, E.F.; Gibson, A.E.; Golding, B.T.; Grant, S.; Griffin, R.J.; Jewsbury, P.; Johnson, L.N.; Lawrie, A.M.; Newell, D.R.; Noble, M.E.M.; Sausville, E.A.; Schultz, R.; Yu, W.: Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct

- molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2797-2804.
- (36) Russo, A.A.; Jeffrey, P.D.; Pavletich, N.P.: Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 696-700.
- (37) Kamb, A.: Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *227*, 139-148.
- (38) Brooks, G.; La Thangue, N.B.: The cell cycle and drug discovery: the promise and the hope. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 455-464.
- (39) Russo, A.A.; Jeffrey, P.D.; Patten, A.K.; Massague, J.; Pavletich, N.P.: Crystal structure of the p27 KIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-CDK2-complex. *Nature* **1996**, *382*, 325-331.
- (40) Munk, K.: *Grundstudium Biologie*, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **2000**.
- (41) Broers, J.L.V.; Machiels, B.M.; van Eys, G.J.J.M.; Kuijpers, H.J.H.; Manders, E.M.M.; van Driel, R.; Ramaekers, C.S.: Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Science* **1999**, *112*, 3463-3475.
- (42) Yamamoto, H.; Monden, T.; Miyoshi, H.; Izawa, H.; Ikeda, K.; Tsujie, M.; Ohnishi, T.; Sekimoto, M.; Tomita, N.; Monden, M.: Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* **1998**, *13*, 233-239.
- (43) Meijer, L.: Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* **1996**, *6*, 393-397.
- (44) Albrecht, T.; Thompson, E.A.; Bresnahan, W.; Meijer, L.: Suppression of cyclin kinase 2 activity for prevention and treatment of DNA viral infections. *PCT Int. Appl. WO 98 39007*, **1998**.
- (45) Pippin, J.W.; Qu, Q.; Meijer, L.; Shankland, S.J.: Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2512-2520.
- (46) Pei, J.-J.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Bogdanovic, N.; Winblad, B.; Cowburn, R.F.: Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res.* **1998**, *797*, 267-277.
- (47) Osuga, H.; Osuga, S.; Wang, F.; Fetni, R.; Hogan, M.J.; Slack, R.S.; Hakim, A.M.; Ikeda, J.-E.; Park, D.S.: Cyclin-dependent kinases as a

- therapeutic target for stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10254-10259.
- (48) Davis, S.T.; Benson, B.G.; Bramson, H.N.; Chapman, D.E.; Dickerson, S.H.; Dold, K.M.; Eberwein, D.J.; Edelstein, M.; Frye, S.V.; Gampe Jr., R.T.; Griffin, R.J.; Harris, P.A.; Hassell, A.M.; Holmes, W.D.; Hunter, R.N.; Knick, V.B.; Lackey, K.; Lovejoy, B.; Luzzio, M.J.; Murray, D.; Parker, P.; Rocque, W.J.; Shewchuk, L.; Veal, J.M.; Walker, D.H.; Kuyper, L.F.: Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK-inhibitors. *Science* **2001**, *291*, 134-137.
- (49) Colas, P.; Cohen, B.; Jessen, T.; Grishina, I.; McCoy, J.; Brent, R.: Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **1996**, *380*, 548-550.
- (50) Thompson, A.M.; Bridges, A.J.; Fry, D.W.; Kraker, A.J.; Denny, W.A.: Tyrosine kinase inhibitors. 7. 7-Amino-4-(phenylamino)- and 7-amino-4-[(phenylmethyl)amino]-pyrido[4,3-*d*]pyrimidines: a new class of inhibitors of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3780-3788.
- (51) Chang, Y.-T.; Gray, N.S.; Rosania, G.R.; Sutherlin, D.P.; Kwon, S.; Norman, T.C.; Sarohia, R.; Leost, M.; Meijer, L.; Schultz, P.G.: Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 361-375.
- (52) Meijer, L.; Kim, S.-H.: Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Methods Enzymol.* **1997**, *283*, 113-128.
- (53) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J.J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D.S.; Kato, J.-Y.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771-786.
- (54) Ducrot, P.; Legraverend, M.; Grierson, D.S.: 3D-QSAR CoMFA on cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4098-4108.
- (55) Gussio, R.; Zaharevitz, D.W.; McGrath, C.F.; Pattabiraman, N.; Kellogg, G.E.; Schultz, C.; Link, A.; Kunick, C.; Leost, M.; Meijer, L.; Sausville, E.A.: Structure-based design modifications of the paullone molecular scaffold for cyclin-dependent kinase inhibition. *Anti-Cancer Drug Des.* **2000**, *15*, 53-66.
- (56) Legraverend, M.; Tunnah, P.; Noble, M.; Ducrot, P.; Ludwig, O.; Grierson, D.S.; Leost, M.; Meijer, L.; Endicott, J.: Cyclin-dependent kinase inhibition by new C-2 alkynylated purine derivatives and

- molecular structure of a CDK2-inhibitor complex. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1282-1292.
- (57) Shewchuk, L.; Hassell, A.; Wisely, B.; Rocque, W.; Holmes, W.; Veal, J.; Kuyper, L.F.: Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 133-138.
- (58) Whiteway, M.; Dignard, D.; Thomas, D.Y.: Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9410-9414.
- (59) Abraham, R.T.; Acquarone, M.; Andersen, A.; Asensi, A.; Belle, R.; Berger, F.; Bergounioux, C.; Brunn, G.; Buquet-Fagot, C.; Fagot, D.; Glab, N.; Goudeau, H.; Goudeau, M.; Guerrier, P.; Houghton, P.; Hendriks, H.; Kloareg, B.; Lippai, M.; Marie, D.; Maro, B.; Meijer, L.; Mester, J.; Mulner-Lorillon, O.; Poulet, S.A.; Schierenberg, E.; Schutte, B.; Vaultot, D.; Verlhac, M.H.: Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell* **1995**, *83*, 105-120.
- (60) De Azevedo, W.F.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Kim, S.-H.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 518-526.
- (61) Gray, N.S.; Wodicka, L.; Thunnissen, A.-M.W.H.; Norman, T.C.; Kwon, S.; Espinoza, F.H.; Morgan, D.O.; Barnes, G.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Kim, S.-H.; Lockhart, D.J.; Schultz, P.G.: Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search of kinase inhibitors. *Science* **1998**, *281*, 533-538.
- (62) Oh, C.-H.; Lee, S.-C.; Lee, K.-S.; Woo, E.-R.; Hong, C.Y.; Yang, B.-S.; Baek, D.J.; Cho, J.-H.: Synthesis and biological activities of G-2, N-9 substituted 6-benzylaminopurine derivatives as cyclin-dependent kinase inhibitor. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 187-190.
- (63) Legraverend, M.; Ludwig, O.; Bisagni, E.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Giocanti, N.; Sadri, R.; Favaudon, V.: Synthesis and in vitro evaluation of novel 2,6,9-trisubstituted purines acting as cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1281-1293.

- (64) Legraverend, M.; Ludwig, O.; Bisagni, E.; Leclerc, S.; Meijer, L.: Synthesis of C2 alkynylated purines, a new family of potent inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 793-798.
- (65) Imbach, P.; Capraro, H.-G.; Furet, P.; Mett, H.; Meyer, T.; Zimmermann, J.: 2,6,9-Trisubstituted purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 91-96.
- (66) Griffin, R.J.; Calvert, A.H.; Curtin, N.J.; Newell, D.R.; Golding, B.T.; Endicott, J.A.; Noble, M.E.M.; Boyle, F.T.; Jewsbury, P.J.: Preparation of cyclohexylmethoxypyrimidineamines and analogs as cyclin dependent kinase inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 99 50,251* **1999**.
- (67) Löffler, G.; Petrides, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**.
- (68) Carlson, B.A.; Dubay, M.M.; Sausville, E.A.; Brizuela, L.; Worland, P.: Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2973-2978.
- (69) Kelley, M.J.; Nakagawa, K.; Dent, B.R. Cyclin dependent kinase (CDK)4 inhibitors and their use for treating cancer. In *PCT Int. Appl. WO 98 49,146*, 1998.
- (70) Hu, M.C.; Wang, Y.P.; Mikhail, A.; Qui, W.R.; Tan, T.H.: Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7095-7102.
- (71) Kumar, S.; McDonnell, P.C.; Gum, R.J.; Hand, A.T.; Lee, J.C.; Young, P.R.: Novel homologues of CSBP / p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 533-538.
- (72) Thompson, A.M.; Murray, D.K.; Ellicott, W.L.; Fry, D.W.; Nelson, J.A.; Showalter, H.D.H.; Roberts, B.J.; Vincent, P.W.; Denny, W.A.: Tyrosine kinase inhibitors. 13. Structure-activity relationships for soluble 7-substituted 4-[(3-bromophenyl)amino]pyrido[4,3-*d*]pyrimidines designed as inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3915-3925.
- (73) Rewcastle, G.W.; Murray, D.K.; Ellicott, W.L.; Fry, D.W.; Howard, C.T.; Nelson, J.A.; Roberts, B.J.; Vincent, P.W.; Showalter, H.D.H.; Winters, R.T.; Denny, W.A.: Tyrosine kinase inhibitors. 14. Structure-activity relationships for methylamino-substituted derivatives of 4-[(3-

- bromophenyl)amino]-6-(methylamino)-pyrido[3,4-*d*]pyrimidine (PD 158780), a potent and specific inhibitor of the tyrosine kinase activity of receptors for the EGF family of growth factors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 742-751.
- (74) Dobrusin, E.M.; Hamby, J.M.; Kramer, J.B.; Schroeder, M.C.; Showalter, H.D.H.; Toogood, P.; Trumpp-Kallmeyer, S.A.: Preparation of oxopyrido- and -pyrimidopyrimidines as cellular proliferation inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 99 61,444* **2000**.
- (75) El-Subbagh, H.I.; Abadi, A.H.; Al-Khawad, I.E.; Al-Rashood, K.A.: Synthesis and antitumor activity of some new substituted quinolin-4-one and 1,7-naphthyridin-4-one analogs. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 19-24.
- (76) Chong, W.K.; Chu, S.S.; Duvadie, R.R.; Li, L.; Xiao, W.: 4-Aminothiazole derivatives, their preparation and their use as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *PCT Int. Appl. WO 99 21845* **1999**.
- (77) Kent, L.L.; Hull-Campbell, N.E.; Lau, T.; Wu, J.C.; Thompson, S.A.; Nori, M.: Characterization of novel inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *260*, 768-774.
- (78) Sun, L.; Tran, N.; Tang, F.; App, H.; Hirth, P.; McMahon, G.; Tang, C.: Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: A novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosin kinases. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2588-2603.
- (79) Grell, W.; Walter, R.; Heckel, A.; Himmelsbach, F.; Wittneben, H.; van Meel, J.; Redemann, N.; Haigh, R.: Preparation of 3-(α -heteroarylaminobenzylidene)-2-indolinones as Cyclin dependent kinase inhibitors. *Ger. Offen. DE 19,815020* **1999**.
- (80) Misra, R.N.; Kimball, S.D.; Rawlines, D.B.; Webster, K.R.; Bursuker, I.: Preparation of benzoylpyrazolo[3,4-*b*]pyridines and analogs as cyclin dependent kinase inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 99 30,710* **1999**.
- (81) Markwalder, J.A.; Seitz, S.P.; Sherk, S.R.: Preparation of 6-substituted pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-ones as cyclin dependent kinase inhibitors. *PCT Int. Appl. WO 00 21,926* **2000**.
- (82) Hoessel, R.; Leclerc, S.; Endicott, J.; Nobel, M.E.M.; Lawrie, A.; Tunnah, P.; Leost, M.; Damiens, E.; Marie, D.; Marko, D.; Niederberger, E.; Tang, W.; Eisenbrand, G.; Meijer, L.: Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 60-67.

- (83) Eisenbrand, G.: Use of indigoid bisindole derivatives for the manufacture of a medicament to inhibit cyclin dependent kinases. *PCT Int. Appl. WO 99 62,503* **2000**.
- (84) Zaharevitz, D.W.; Gussio, R.; Leost, M.; Senderowicz, A.; Lahusen, T.; Kunick, C.; Meijer, L.; Sausville, E.A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566-2569.
- (85) Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1991**, *324*, 579-581.
- (86) Bleeker, C.: [c]-Anellierte 1-Benzazepine - Synthese und antivirale Eigenschaften. *Dissertation Universität Hamburg* **1998**.
- (87) Chen, J.-l.; Steglich, W.: Synthesis of some benzofuronaphthyridines and benzofuronaphthyridine derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 909-912.
- (88) MacPhillamy, H.B.; Dziemian, R.L.; Lucas, R.A.; Kuehne, M.E.: The alkaloids of *Tabernanthe iboga*. Part VI. The synthesis of the selenium dehydrogenation products from ibogamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2172-2178.
- (89) Sucharda, E.: Über eine neue Darstellungsmethode der Chinolinsäure und einiger Derivate derselben. *Chem. Ber.* **1925**, *58*, 1727-1729.
- (90) Oakes, V.; Pascoe, R.; Rydon, H.N.: Polyazanaphthalenes. Part III. Some derivatives of 1:3:5- and 1:3:8-triazanaphthalene. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1045-1054.
- (91) Chen, Q.; Deady, L.W.: Synthesis of some benzo[b][1,8] and [1,5]naphthyridines. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, *29*, 1197-1201.
- (92) Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-d]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.
- (93) Kunick, C.: unveröffentlichte Ergebnisse.
- (94) Da Settimo, A.; Saettone, M.F.: The nitration of some phenyl substituted indoles. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 823-829.
- (95) Hellmann, H.; Opitz, G.: *α -Aminoalkylierungen*, Verlag Chemie, GmbH, Weinheim / Bergstraße, **1969**.
- (96) Tramontini, M.: Advances in the chemistry of Mannich bases. *Synthesis* **1973**, 703-775.

- (97) Mannich, C.; Reichert, B.: Über eine Synthese von Chinolinderivaten mit basischer Seitenkette. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* **1933**, 271, 116-127.
- (98) Nisbet, H.B.: Pyrazoline ring formation. Part I. The action of phenylhydrazine on some saturated and unsaturated β -amino-ketones. *J. Chem. Soc. (London)* **1945**, 126-129.
- (99) Nisbet, H.B.: Pyrazoline local anaesthetics. Part I. Derivatives of benzylidene- and anisylidene-acetone. *J. Chem. Soc.* **1938**, 1237-1241.
- (100) Mannich, C.; Schütz, M.: Über die Synthese von ungesättigten 1,3-Ketobasen und ihre Reduktionsprodukte. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* **1927**, 265, 684-695.
- (101) Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewalt, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.: *Organikum*, Barth, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Leipzig, **1993**, 485.
- (102) Hösch, C.: β -Substituierte γ -Oxosulfone - Darstellung, kinetische und enzymatische Untersuchungen. *Dissertation Universität Hamburg* **1997**.
- (103) Lindsay, B.S.; Christiansen, H.C.; Copp, B.R.: Structural studies of cytotoxic marine alkaloids: Synthesis of novel ring-E analogues of Ascididemin and their in vitro and in vivo biological evaluation. *Tetrahedron* **2000**, 56, 497-505.
- (104) Hulin, B.; Clark, D.A.; Goldstein, S.W.; McDermott, R.E.; Dambeck, P.J.; Kappeler, W.H.; Lamphere, C.H.; Lewis, D.M.; Rizzi, J.P.: Novel thiazolidine-2,4-diones as potent euglycemic agents. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1853-1864.
- (105) Salaski, E.J.: Synthesis of imidazobenzazepinethiones: A new series of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1387-1390.
- (106) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. überarbeitete Auflage, G. Thieme, Stuttgart, **1995**, 152-153.
- (107) Boyd, M.R.; Paull, K.D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91-109.

- (108) Monks, A.; Scudiero, D.A.; Johnson, G.S.; Paull, K.D.; Sausville, E.A.: The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 533-541.
- (109) Paull, K.D.; Shoemaker, R.H.; Hodes, L.; Monks, A.; Scudiero, D.A.; Rubinstein, L.; Plowman, J.; Boyd, M.R.: Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of meangraph and COMPARE algorithm. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1088-1092.
- (110) Robert, J.: Anticancer drug screening with in vitro models. *Drugs Fut.* **1997**, *22*, 739-746.
- (111) Kunick, C.; Leost, M.; Meijer, L. unveröffentliche Resultate.
- (112) SPARTAN Vers. 5.0.1, Wavefunction Inc., Irvine, USA.
- (113) Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.: *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed, Pergamon Press, Oxford, **1988**, 57-371.
- (114) Fox, H.H.: Synthetic tuberculostats. II. Amino- and hydroxy-pyridin carboxylic acid derivatives. *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 547-554.
- (115) Hou, G.; Gravier, D.; Casadebaig, F.; Dupin, J.-P.; Bernard, H.; Boisseau, M.: Pyrido[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives and 1,2,3,4-tetrahydro-pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives: Synthesis and in vitro study of their activity against platelet aggregation. *Pharmazie* **1995**, *50*, 719-722.
- (116) Philips, A.: Untersuchungen in der Pyridinreihe. *Liebigs Ann. Chem.* **1895**, *288*, 253-265.
- (117) Crum, J.D.; Fuchsman, C.H.: The chemistry of heterocycles. IV. 2H-Pyrido[4,3-e]-1,3-oxazine-2,4(3H)-dione, its precursors and some 3-substituted derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1966**, *3*, 252-256.
- (118) Spiessens, L.I.M.; Anteunis, M.J.O.: Preparation and structural assignments of some isomeric 2,3-disubstituted pyridines. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1980**, *89*, 205-231.
- (119) Kirpal, A.: Über den Abbau des Chinolinsäure- β -Esters. *Monatsh.* **1908**, *29*, 227-231.
- (120) Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J.P.J.; Blow, J.J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.-G.; Moulinoux, J.-P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527-536.

(121) Lew, J.; Beaudette, K.; Litwin, C.M.E.; Wang, J.H.: Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13383-13390.

12 Gefahrstoffe

Über die meisten Stoffe, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Da keine toxikologischen Eigenschaften bekannt sind, müssen für den Umgang mit diesen Substanzen die für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

Acetamid: Xn Gesundheitsschädlich; R 40 Irreversibler Schaden möglich; S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Aceton: F Leichtentzündlich- Xi Reizend. R 11-36-66-67 Leichtentzündlich. Reizt die Augen. Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen; S 9-16-26 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Acetonitril: F Leichtentzündlich – T Giftig; R 11-23/24/25 Leichtentzündlich. Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut; S 16-27-45 Von Zündquellen fernhalten – nicht rauchen. Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

3-Aminothiophen-2-carbonsäuremethylester: R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 26-37/39 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

Bernsteinsäurediethylester: Xi Reizend; R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 26-36 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Bernsteinsäureethylesterchlorid: C Ätzend; R 34 Verursacht Verätzungen; S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.

Bernsteinsäuremethylesterchlorid: C Ätzend; R 34-37 Verursacht Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Brom: T+ Giftig – C Ätzend – N Umweltgefährlich; R 26-35-50 Sehr giftig beim Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen. Sehr giftig für Wasserorganismen; S 7/9-26-45-61 Behälter dicht geschlossen, an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Unfall oder Unwohlsein

sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

4-Bromphenylhydraziniumchlorid: T Giftig; R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut; S 36/37-45 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

1-Butanol: Xn Gesundheitsschädlich; R 10-22-37/38-41-67 Entzündlich. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Atmungsorgane und die Haut. Gefahr ernster Augenschäden. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen; S 7/9-13-26-37/39-46 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

4-Chlorphenylhydraziniumchlorid: T Giftig – N Gesundheitsschädlich; ; R 45-E23/24/25-43-50/53 Kann Krebs erzeugen. Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben. S 53-45-60-61 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. –Nur für den berufsmäßigen Verwender-. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Chlorwasserstoff: C Ätzend – T Giftig; R 23-35 Giftig beim Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen; S 9-26-36/37/39-45 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Dichlormethan: Xn Gesundheitsschädlich; R 40 Irreversibler Schaden möglich; S 23.2-24/25-36/37 Dampf nicht einatmen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

N,N-Dimethylformamid (DMF): T Giftig; R 61-E20/21-36 Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und beim Verschlucken. Reizt die Augen; S 53-45 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für berufsmäßigen Verwender-. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

- Dimethylsulfoxid (DMSO):** Xi Reizend; R 36/38 Reizt die Augen und die Haut; S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- 1,4-Dioxan:** F Leichtentzündlich – Xn Gesundheitsschädlich; R 11-19-36/37-40 Leichtentzündlich. Kann explosionsfähige Peroxide bilden. Reizt die Augen und die Atmungsorgane. Irreversibler Schaden möglich; S 16-36/37 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
- Essigsäure 100 % (Eisessig):** C Ätzend; R 10-35 Entzündlich. Verursacht schwere Verätzungen; S 23.2-26-45 Dampf nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Essigsäureanhydrid (Acetanhydrid):** C Ätzend; R 10-20/22-34 Entzündlich. Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Verursacht Verätzungen; S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Ethanol:** F Leichtentzündlich; R 11 Leichtentzündlich; S 7-16 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
- Ethylacetat:** F Leichtentzündlich – Xi Reizend; R 11-36-66-67 Leichtentzündlich. Reizt die Augen. Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen; S 16-26-33 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
- Ethylendiamin:** C Ätzend; R 10-21/22-34-42/43 Entzündlich. Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich; S 23.2-26-36/37/39-45 Dampf nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- n-Hexan:** F Leichtentzündlich – Xn Gesundheitsschädlich – N Umweltgefährlich; R 11-38-48/20-51/53-62-65-67 Leichtentzündlich. Reizt die Haut. Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen. Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben. Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen. Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen; S 9-16-29-33-36/37-61-62 Behälter an einem gut

gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen. Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

Iodethan: Xi Reizend. R 10-36/37/38 Entzündlich. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 23.2-26 Dampf nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Iodmethan: T Giftig; R 21-23/25-37/38-40 Gesundheitsschädlich beim Berühren mit der Haut. Giftig beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Atmungsorgane und die Haut. Irreversibler Schaden möglich; S 36/37-38-45 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Kaliumcarbonat: Xn Gesundheitsschädlich; R 22-36/37/38 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 22-26 Staub nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Kaliumhydrid (Suspension in Paraffinöl): F Leichtentzündlich – C Ätzend; R 15-34 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. Verursacht Verätzungen; S 7/8-26-36/37/39-43.6-45 Behälter trocken und dicht geschlossen halten. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Kaliumhydroxid: C Ätzend; R 22-35 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht schwere Verätzungen; S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Kupfer(I)cyanid: T+ Sehr giftig – N Umweltgefährlich; R 26/27/28-32-50/53 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben; S 7-28.1-29-45-60-61 Behälter dicht geschlossen halten. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Dieser Stoff und/oder seine Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. Freisetzung in die Umwelt

vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Kupfer(II)nitrat: Xn Gesundheitsschädlich; R 22-36/38 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Augen und die Haut.

Methanol: F Leichtentzündlich – T Giftig; R 11-23/24/25-39/23/24/25 Leichtentzündlich. Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken; S 7-16-36/37-45 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

4-Methoxyphenylhydraziniumchlorid: Xi Reizend. R 38 Reizt die Haut.

1-Methyl-2-pyrrolidon (N-Methylpyrrolidon, NMP): Xi Reizend.

Methylvinylketon: F Leichtentzündlich – T+ Sehr giftig; R 11-26/28-34-37-40-43 Leichtentzündlich. Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Irreversibler Schaden möglich. Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich; S 16-26-28.1-36/37/39-45 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Natrium: F Leichtentzündlich – C Ätzend; R 14/15-34 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. Verursacht Verätzungen; S 5.3-8-43.7-45 Unter Petroleum aufbewahren. Behälter trocken halten. Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Natriumcarbonat: Xi Reizend; R 36 Reizt die Augen; S 22-26 Staub nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Natriumcyanid: T+ Sehr giftig – N Umweltgefährlich; R 26/27/28-32-50/53 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben; S 7-28.1-29-45-60-61 Behälter dicht geschlossen halten. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Dieser Stoff und/oder seine Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

- Natriumhydrid** (60-prozentige Suspension in Paraffinöl): F Leichtentzündlich – C Ätzend; R 15-34 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase. Verursacht Verätzungen; S 7/8-26-36/37/39-43.6-45 Behälter trocken und dicht geschlossen halten. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Natriumhydroxid**: C Ätzend; R 35 Verursacht schwere Verätzungen; S 26-37/39-45 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Natriumsulfid**: C Ätzend – N Umweltgefährlich; R 31-34-50 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase. Verursacht Verätzungen. Sehr giftig für Wasserorganismen; S 26-45-61 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- Palladium(II)acetat**: Xi Reizend; R 41 Gefahr ernster Augenschäden. S 22-26-39 Staub nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Paraformaldehyd**: Xn Gesundheitsschädlich; R 20/22-36/37/38-40-43 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut. Irreversibler Schaden möglich. Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich; S 22-26-36/37 Staub nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- Petrolether** (Petroleumbenzin) Siedebereich 40-60 °C: F Leichtentzündlich – Xn Gesundheitsschädlich; R 11-52/53-65 Leichtentzündlich. Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben. Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen; S 9-16-23.2-24-33-62 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Dampf nicht einatmen. Berührung mit der Haut vermeiden. Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen. Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- Phenylhydrazin**: T Giftig – N Umweltgefährlich; R 23/24/25-36-50 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Reizt die Augen. Sehr giftig für Wasserorganismen; S 28.1-45-61 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

- (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- Phosphor(V)-sulfid:** F Leichtentzündlich– Xn Gesundheitsschädlich - N Umweltgefährlich; R 11-20/22-29-50 Leichtentzündlich. Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase. Sehr giftig für Wasserorganismen; S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- Piperidin:** F Leichtentzündlich – T Giftig; R 11-23/24-34 Leichtentzündlich. Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut. Verursacht Verätzungen; S 16-26-27-45 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Piperidiniumchlorid:** T Giftig; R 25 Giftig beim Verschlucken; S 22-45 Staub nicht einatmen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- 2-Propanol:** F Leichtentzündlich – Xi Reizend; R 11-36-67 Leichtentzündlich. Reizt die Augen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. S 7-16-24/25-26 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- Pyridin:** F Leichtentzündlich – Xn Gesundheitsschädlich; R 11-20/21/22 Leichtentzündlich. Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut; S 26-28.1 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
- Pyridin-2,3-dicarbonsäure:** Xi Reizend; R36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- Salzsäure 10-25 %:** C Ätzend; R 34-37 Verursacht Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane; S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Schwefelsäure 96 %:** C Ätzend; R 35 Verursacht schwere Verätzungen; S 26-30-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Niemals Wasser hinzugießen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).
- Schwefelwasserstoff:** F+ Hochentzündlich – T+ Sehr giftig – N Umweltgefährlich; R 12-26-50 Hochentzündlich. Sehr giftig beim Einatmen. Sehr giftig für Wasserorganismen; S 9-16-28.1-36/37-45-61 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei

Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Tetrahydrofuran: F Leichtentzündlich – Xi Reizend; R 11-19-36/37 Leichtentzündlich. Kann explosionsfähige Peroxide bilden. Reizt die Augen und die Atmungsorgane; S 16-29-33 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.

Tetramethylsilan: F+ Hochentzündlich; R 12 Hochentzündlich; S 9-16-29-43.3 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.

Toluol: F Leichtentzündlich – Xn Gesundheitsschädlich; R 11-20 Leichtentzündlich. Gesundheitsschädlich beim Einatmen; S 16-25-29-33 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Berührung mit den Augen vermeiden. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.

p-Tolyldiaziniumchlorid (4-Methylphenylhydrazin Hydrochlorid): T Giftig – N Umweltgefährlich; R 45-23/24/25-43-50/53 Kann Krebs erzeugen. Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben. S 53-45-60-61 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für den berufsmäßigen Verwender-. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen). Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Triethylamin: F Leichtentzündlich – C Ätzend; R 11-20/21/22-35 Leichtentzündlich. Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Verursacht schwere Verätzungen; S 3-16-26-29-36/37/39-45 Kühl aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen).

Triethylsilan: F Leichtentzündlich – Xi Reizend; R 11-36/37/38 Leichtentzündlich. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 8-9-16-26 Behälter trocken halten. Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Trifluoressigsäure: C Ätzend; R20-35-52/53 Gesundheitsschädlich beim Einatmen. Verursacht schwere Verätzungen. Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben; S 9-26-27-28.1-45-61 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

4-(Trifluormethyl)-phenylhydrazin: Xn Gesundheitsschädlich; R 20/21/22-36/37/38 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut; S 26-36 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Triphenylphosphin: Xn Gesundheitsschädlich – N Umweltgefährlich; R 43-48/20/22-50/53 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich. Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben; S 22-24-37 Staub nicht einatmen. Berührung mit der Haut vermeiden. Geeignete Schutzhandschuhe tragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kathrin Lauenroth
Geburtstag: 24. April 1972
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschole Ellerau
1982 – 1991 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Quickborn
31. Mai 1991 Abitur

Studium

Okt. 91 – Juni 97 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
April 96 – Sept. 96 Pharmaziepraktikum in der Feldbergapotheke in Frankfurt am Main
Okt. 96 – März 97 Pharmaziepraktikum bei der Beiersdorf-Lilly GmbH in Hamburg
12. September 97 Approbation zur Apothekerin

Wissenschaftliche Arbeit

Okt. 97 – Mai 01 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. D. Geffken und Priv. Doz. Dr. C. Kunick am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg
Okt. 97 – März 01 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg,

ab April 01 Angestellte Apothekerin in der Schwanen-Apotheke in Hamburg