

# **Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg  
Fachbereich Chemie

vorgelegt von  
**Karen Wieking**  
aus Hamburg

Hamburg 2001

Gutachter: PD Dr. C. Kunick  
Prof. Dr. D. Geffken

Tag der mündlichen Prüfung: 27.September 2001

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1998 bis Juli 2001 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von **Herrn PD Dr. C. Kunick**, dem ich für die Überlassung des Themas sowie seine höchst engagierte Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft herzlich danke.

**Herrn Prof. D. Geffken** gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und seine großzügige Förderung.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von **Herrn Dr. L. Meijer** (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) für die äußerst angenehme Zusammenarbeit bei den Affinitätsuntersuchungen während meiner Forschungsaufenthalte an der Station Biologique sowie für die Durchführung der biologischen Testungen.

Weiterhin sei **Herrn Dr. D. Zaharevitz** und dem National Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA) für die Durchführung des Antitumor-Zelllinien-Screenings gedankt.

Ferner gilt mein Dank **Herrn Abolfasl Golisade** aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. A. Link (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) für die Kooperation bei der Durchführung der Biotinylierungs-Reaktion.

Zudem danke ich **Frau Dr. C. Schultz, Frau T. Pies, Frau Dr. X. Xie** und **Herrn Dr. Th. Lemcke** für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit sowie allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend gilt mein besonderer Dank **Herrn Andreas Ravn** für seine stete Hilfsbereitschaft sowie die Unterstützung beim Lesen der Korrekturen.



## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
akt.	aktiviert
aliph.	aliphatisch
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
br.	breit
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COSY	Correlated Spectroscopy
$\delta$	chemische Verschiebung
$\Delta$	Rückfluss
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
etc.	et cetera
gef.	gefunden
GI <sub>50</sub>	50 % Growth Inhibition
GSK	Glykogensynthase-Kinase
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration for 50 %
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LC <sub>50</sub>	Lethal Concentration for 50 %
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
m	Multipllett
MG_MID	Meangraph Midpoint

MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography
Mr	Molekularmasse
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCI	National Cancer Institute
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
proz.	prozentig
q	Quartett
quart.	quartär
s	Singulett
s.	siehe
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis
sog.	so genannt
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	7,12-Dihydro-indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-one (Paullone) .	1
1.2	Cyclin-abhängige Kinasen.....	2
1.3	Potentielle Anwendungen von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen.....	3
1.4	Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen.....	4
1.5	Problemstellung.....	6
2	Synthesen.....	8
2.1	Synthese von [1]Benzazepin-2,5-dionen.....	8
2.2	Synthese von methoxysubstituierten Indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepinonen .....	14
2.3	Derivatisierung der methoxysubstituierten Indolo[3,2- <i>d</i> ][1]-benzazepinone .....	18
2.3.1	Rosenmund-von-Braun-Reaktionen an methoxysubstituierten Indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepinonen .....	18
2.3.2	Etherspaltungen an methoxysubstituierten Indolo[3,2- <i>d</i> ][1]-benzazepinonen .....	19
2.4	Synthese von Aminobutoxy-indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepinonen ...	20
2.5	Synthese eines an Biotin gekuppelten Paullons .....	24
2.6	Fluoreszenz-Markierung von Paullonen.....	28
2.7	Synthese von potentiellen Alsterpaullon-Metaboliten.....	34
3	Affinitätsuntersuchungen mit Paullonen .....	40
3.1	Ziel und Prinzip der Untersuchungen .....	40
3.2	Grundlagen der Affinitätschromatographie.....	42
3.2.1	Biologische Interaktionen .....	42
3.2.2	Trägermaterialien .....	42
3.2.3	Spacer .....	43
3.2.4	Liganden.....	43

## IV

3.2.5	Immobilisierung von Liganden .....	44
3.3	Proteinidentifizierung.....	45
3.3.1	Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.3.2	Färbemethoden.....	46
3.3.3	Western Blot.....	46
3.4	Affinitätsuntersuchungen mit 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-on-Hydrochlorid .....	49
3.4.1	Auswahl eines geeigneten Trägermaterials.....	49
3.4.1.1	Immobilisierung des Paullons .....	49
3.4.1.2	Referenzmatrices .....	54
3.4.1.3	Inkubation mit Extrakten.....	56
3.4.2	Affinitätsuntersuchungen mit 2-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-on-Hydrochlorid .....	60
3.4.2.1	Immobilisierung des Paullons .....	60
3.4.2.2	Inkubation mit Extrakten.....	61
3.5	Glykogensynthase-Kinase-3 .....	73
4	Biologische Aktivität von Paullonen .....	74
4.1	CDK1/Cyclin B, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorische Aktivitäten von Paullonen.....	74
4.2	In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI.....	82
4.3	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.....	88
4.4	Seeigeloocyten-Inhibitionstest .....	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Summary .....	94
7	Experimenteller Teil .....	96
7.1	Versuche zu Kapitel 2 .....	96
7.1.1	Allgemeines.....	96
7.1.2	Synthese/Analytische Daten .....	98
7.2	Versuche zu Kapitel 3 .....	131



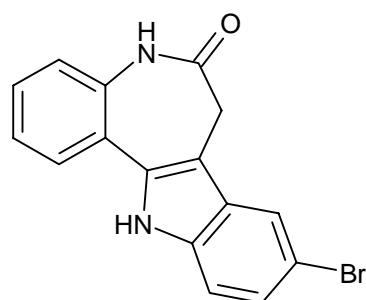
7.2.1	Allgemeines .....	131
7.2.1.1	Verwendete Geräte .....	131
7.2.1.2	Materialien .....	133
7.2.1.3	Lösungen .....	134
7.2.1.4	Biologisches Material.....	135
7.2.2	Methoden.....	136
7.3	Versuche zu Kapitel 4.....	141
7.3.1	Biologische Testsysteme.....	141
7.3.1.1	CDK1/Cyclin B-Testsystem .....	141
7.3.1.2	CDK5/p25-Testsystem .....	142
7.3.1.3	GSK-3 $\beta$ -Testsystem .....	142
7.3.1.4	In vivo Inhibition der Zellteilung von künstlich befruchteten Seeigeloocyten .....	143
7.3.2	In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI .....	144
8	Literaturverzeichnis .....	146
9	Gefahrstoffe .....	154



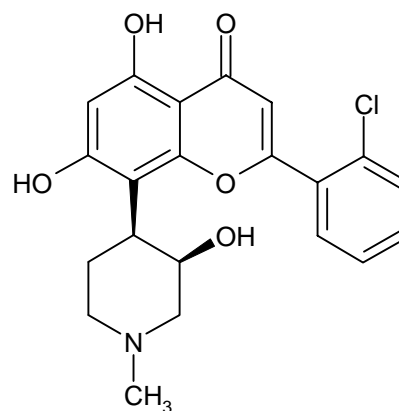
# 1 Einleitung und Problemstellung

## 1.1 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (Paullone)

Paullone stellen eine Substanzklasse von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen dar. Im *in vitro* Tumorzelllinien Screening des National Cancer Institute (NCI, Bethesda, Maryland, USA) wurde das 9-Brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**1**) (Kepaullon) als potentieller Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) entdeckt.<sup>1</sup> Daraufhin wurden die inhibitorischen Aktivitäten von Kepaullon unter anderem gegenüber Cyclin-abhängigen Kinasen getestet.<sup>1</sup> Diese Untersuchungen zeigten, dass Kepaullon gegenüber CDK1/Cyclin B ( $IC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$ ), CDK2/Cyclin A ( $IC_{50} = 0.68 \mu\text{M}$ ) und CDK5/p35 ( $IC_{50} = 0.85 \mu\text{M}$ ) eine inhibitorische Aktivität aufweist. Enzym-kinetische Studien haben gezeigt, dass Kepaullon seine Wirkung durch kompetitive Verdrängung von ATP aus der ATP-Bindungstasche der CDKs entfaltet.<sup>1</sup>



1



2

Im Gegensatz zu Flavopiridol (**2**), einem potenten CDK-Inhibitor, der sich zur Zeit in klinischer Prüfung befindet<sup>2</sup>, zeigt Kepaullon nur eine moderate antiproliferative Wirkung im *in vitro* Tumorzelllinien-Screening des NCI. Daraufhin wurde Kepaullon systematisch modifiziert, um eingehende Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erlangen.<sup>3</sup>

## 1.2 Cyclin-abhängige Kinasen

Cyclin-abhängige Kinasen gehören zur Gruppe der Serin-/Threonin-Kinasen. Sie spielen unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Zellteilung.<sup>4-7</sup> Die Übergänge zwischen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus stehen unter direkter Kontrolle verschiedener CDKs. Die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt in der Regel durch Komplexbildung mit einem Cyclin. Diese Proteine kommen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Reaktionen stellen weitere Mechanismen zur Regulierung der CDK-Aktivität dar und können abhängig vom Ort der Reaktion zu einer Aktivierung oder Inaktivierung führen.

Cyclin-abhängige Kinasen üben zusätzlich zur Regulation des Zellzyklus noch weitere Funktionen aus.<sup>8,9</sup> So haben einige CDKs (CDK7, CDK8, CDK9) einen direkten Einfluss auf die Transkription, während z.B. CDK5 an der Entstehung von Neuriten und der neuronalen Entwicklung beteiligt ist. Des Weiteren wird CDK2 eine bedeutende Rolle bei der Induktion von Apoptose zugeschrieben.<sup>8,9</sup>

### 1.3 Potentielle Anwendungen von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

CDK-Inhibitoren wurden zuerst aufgrund ihrer potentiellen Antitumor-Aktivität entwickelt.<sup>10,11</sup> Es hat sich herausgestellt, dass CDK-Inhibitoren auch bei anderen, nicht Tumor-bedingten, Proliferationsstörungen wie z.B. Atherosklerose, Glomerulonephritis oder Psoriasis von Interesse sind.<sup>12,13</sup>

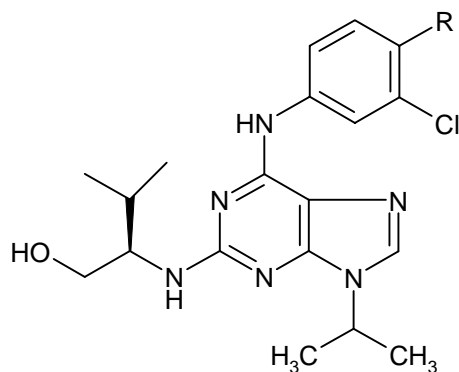
Ebenso wurde entdeckt, dass einige CDK-Inhibitoren antivirale Aktivität aufweisen, indem sie die Replikation von z.B. Herpes-Viren, humanen Cytomegalie-Viren oder Varicella-Zoster-Viren unterdrücken.<sup>8,9</sup>

Auch auf dem Gebiet neurodegenerativer Erkrankungen wird den Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen ein gewisses therapeutisches Potential zugeschrieben. So scheint CDK5 eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Alzheimer zu spielen.<sup>14</sup> Ebenfalls wurde entdeckt, dass Alzheimer-Patienten über erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentrationen im Gehirn verfügen.<sup>8</sup>

Des Weiteren wurde festgestellt, dass einige Parasiten wie z.B. Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi oder Leishmania mexicana ebenfalls über Cyclin-abhängige Kinasen verfügen, die sich jedoch von den menschlichen Homologen unterscheiden.<sup>8</sup> Somit könnten CDK-Inhibitoren, die selektiv die CDKs der Parasiten hemmen, einen interessanten Ansatzpunkt zur Bekämpfung einiger parasitärer Krankheiten bilden.

## 1.4 Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

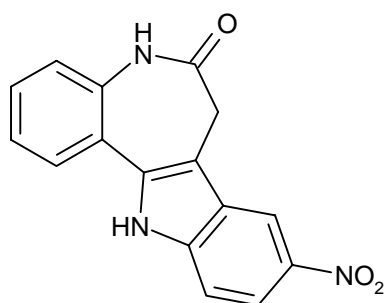
Verschiedene Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen werden in der Literatur beschrieben.<sup>5,13</sup> Mit zu den potentesten Derivaten zählen die Purin-Analoga Purvalanol A (**3a**) (CDK1/Cyclin B:  $IC_{50} = 0.004 \mu\text{M}$ ) und Purvalanol B (**3b**) (CDK1/Cyclin B:  $IC_{50} = 0.006 \mu\text{M}$ ).<sup>15</sup>



**3a** R = H

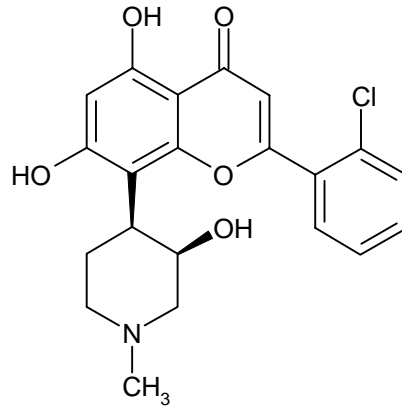
**3b** R = CO<sub>2</sub>H

Das etwas weniger potente 9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**4**) (Alsterpaullon) (CDK1/Cyclin B:  $IC_{50} = 0.035 \mu\text{M}$ ) befindet sich derzeit in der präklinischen Prüfung.<sup>3</sup>



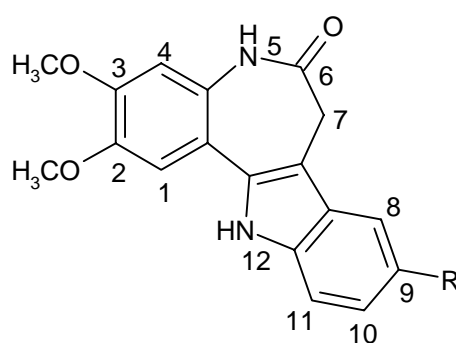
**4**

Eine weitere wichtige Substanz stellt das Flavon Flavopiridol (**2**) (CDK1/Cyclin B:  $IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$ ) dar. Flavopiridol wurde als erster CDK-Inhibitor klinischen Studien unterworfen und befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase II.<sup>2,16</sup>

**2**

## 1.5 Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one synthetisiert werden, die Modifikationen in der 2-/3-Position aufweisen. Der Struktur-Aktivitäts-Vergleich dieser Substanzen mit den 2,3-Dimethoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Derivaten **5a-e** (Tab.1-1), die sich im in vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI als sehr potent erwiesen hatten<sup>3</sup>, sollte Aufschluss über die Variationsmöglichkeit der Substituenten in der 2-/3-Position bringen. Ferner sollte festgestellt werden, welche der beiden Positionen bevorzugt substituiert werden darf.



**5a-e**

Tab. 1-1:

CDK-Inhibitor	R	IC <sub>50</sub> CDK1/ Cyclin B (μM)	log <sub>10</sub> GI <sub>50</sub> HCT-116 (M) <sup>a</sup>	log <sub>10</sub> GI <sub>50</sub> MG_MID (M) <sup>b</sup>
<b>5a</b>	H	4.3	-4.6	-4.5
<b>5b</b>	9-Br	0.2	-5.8/-5.5	-5.2/-5.1
<b>5c</b>	9-NO <sub>2</sub>	0.024	-6.5/-6.1	-5.9/-5.4
<b>5d</b>	9-CF <sub>3</sub>	0.28	-5.7	-5.2/-5.3
<b>5e</b>	9-CN	0.044	-6.3	-5.2

<sup>a</sup> Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Inhibitors, bei der es zu einer 50proz. Wachstumshemmung der Colocarzinom-Zelllinie HCT-116 kommt.

<sup>b</sup> MG\_MID (M): Meangraph Midpoint: Mittelwert der log<sub>10</sub> GI<sub>50</sub>-Werte aller getesteten Zelllinien.



Eine weitere Aufgabe bestand darin, Seitenketten in die 2-/3-Position der 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one einzuführen, die eine Verknüpfung mit Fluoreszenzmarkern, Biotin oder Trägermaterialien wie z.B. Agarose ermöglichen.

Die an den Trägermaterialien immobilisierten Paullone sollten im Rahmen von Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Paullone beitragen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob noch weitere intrazelluläre Angriffspunkte neben Cyclin-abhängigen Kinasen existieren.

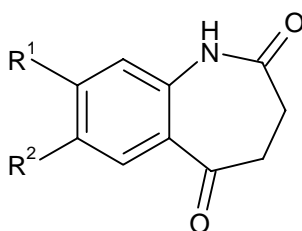
Darüberhinaus sollten potentielle Metabolite des sich in präklinischer Prüfung befindlichen Alsterpaullons (**4**) synthetisiert werden, um festzustellen, ob es sich bei den potentiellen Metaboliten des Alsterpaullons um Substanzen mit CDK-inhibitorischer Aktivität handelt.

## 2 Synthesen

### 2.1 Synthese von [1]Benzazepin-2,5-dionen

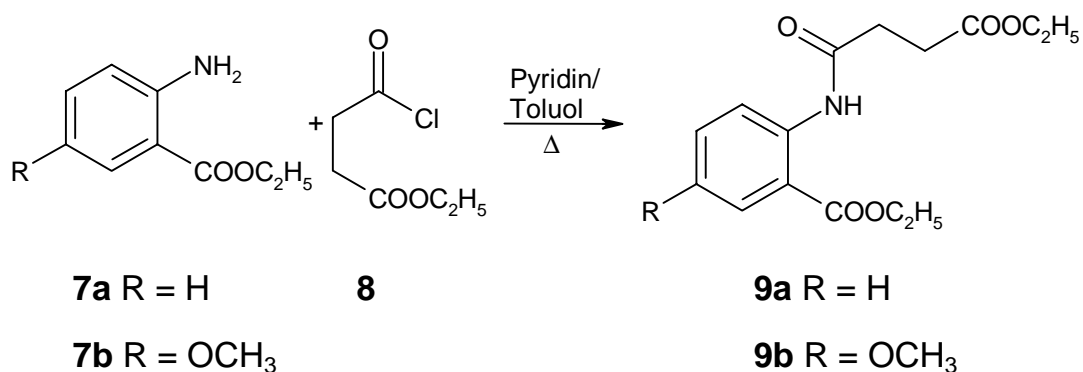
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **6a-c** (Tab. 2-1) wurden auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert.

Tab. 2-1:

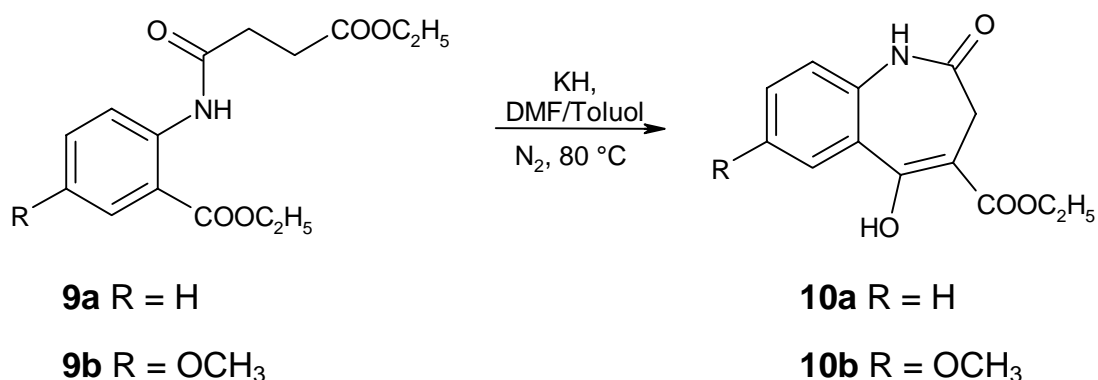


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>6a</b>	H	H
<b>6b</b>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>6c</b>	OCH <sub>3</sub>	H

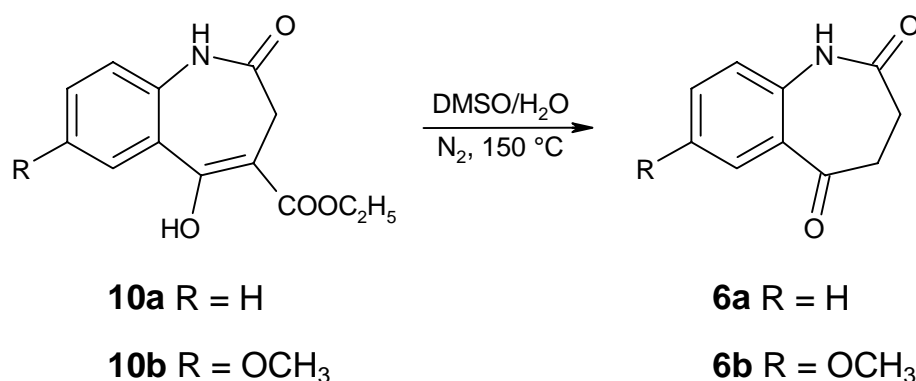
Die Synthese der 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **6a** und **6b** erfolgte nach einer von Kunick<sup>17</sup> erstmals beschriebenen und von Link<sup>18</sup> modifizierten Methode. Dabei wurden die Anthranilsäureethylester **7a** und **7b** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**8**) unter Zusatz von Pyridin zu den entsprechenden 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-benzoesäureethylestern **9a** und **9b** umgesetzt (Schema 2-1).

Schema 2-1:

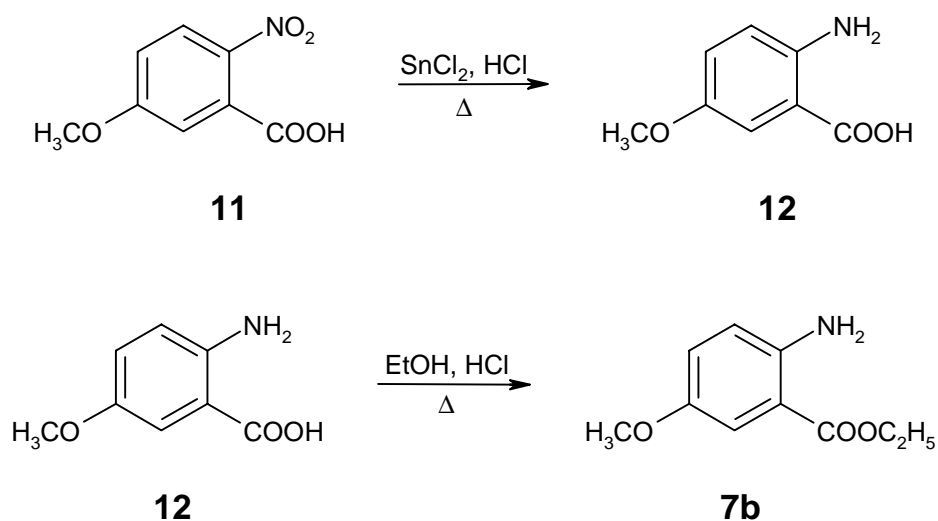
Der anschließende Ringschluss zu den 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylestern **10a** und **10b** erfolgte durch Umsetzung mit Kaliumhydrid unter Stickstoff durch eine Dieckmann-Kondensation (Schema 2-2).

Schema 2-2:

Durch Dealkoxycarbonylierung in wasserhaltigem DMSO gelangte man schließlich zu den 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dionen **6a** und **6b** (Schema 2-3).

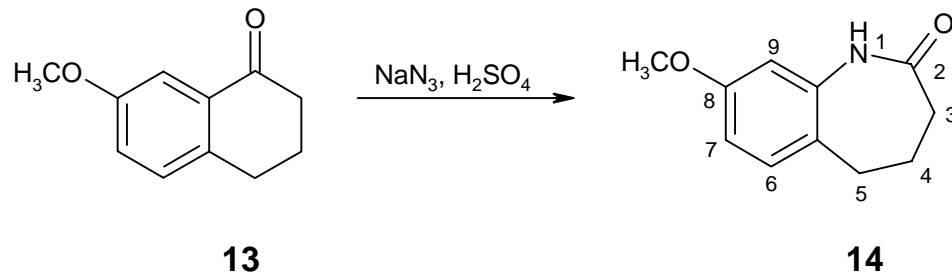
Schema 2-3:

Der in Schema 2-1 verwendete 5-Methoxyanthranilsäureethylester (**7b**) konnte in einer zweistufigen Synthese ausgehend von 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (**11**) gewonnen werden (Schema 2-4). Dabei wurde im ersten Schritt die 5-Methoxyanthranilsäure (**12**) durch Reduktion der Nitro-Gruppe mit Zinn(II)chlorid nach Smith gewonnen.<sup>19</sup> Die nachfolgende Veresterung zu 2-Amino-5-methoxy-benzoesäureethylester (**7b**) erfolgte nach einer von Schultz beschriebenen Methode durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in die ethanolische Lösung.<sup>20</sup>

Schema 2-4:

Die Synthese des 8-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dions (**6c**) erfolgte ausgehend von 7-Methoxytetralon (**13**). Im ersten Reaktionsschritt wurde das 7-Methoxytetralon (**13**) in einer Schmidt-Reaktion nach Tomita zum ringerweiterten 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**14**) umgesetzt (Schema 2-5).<sup>21</sup>

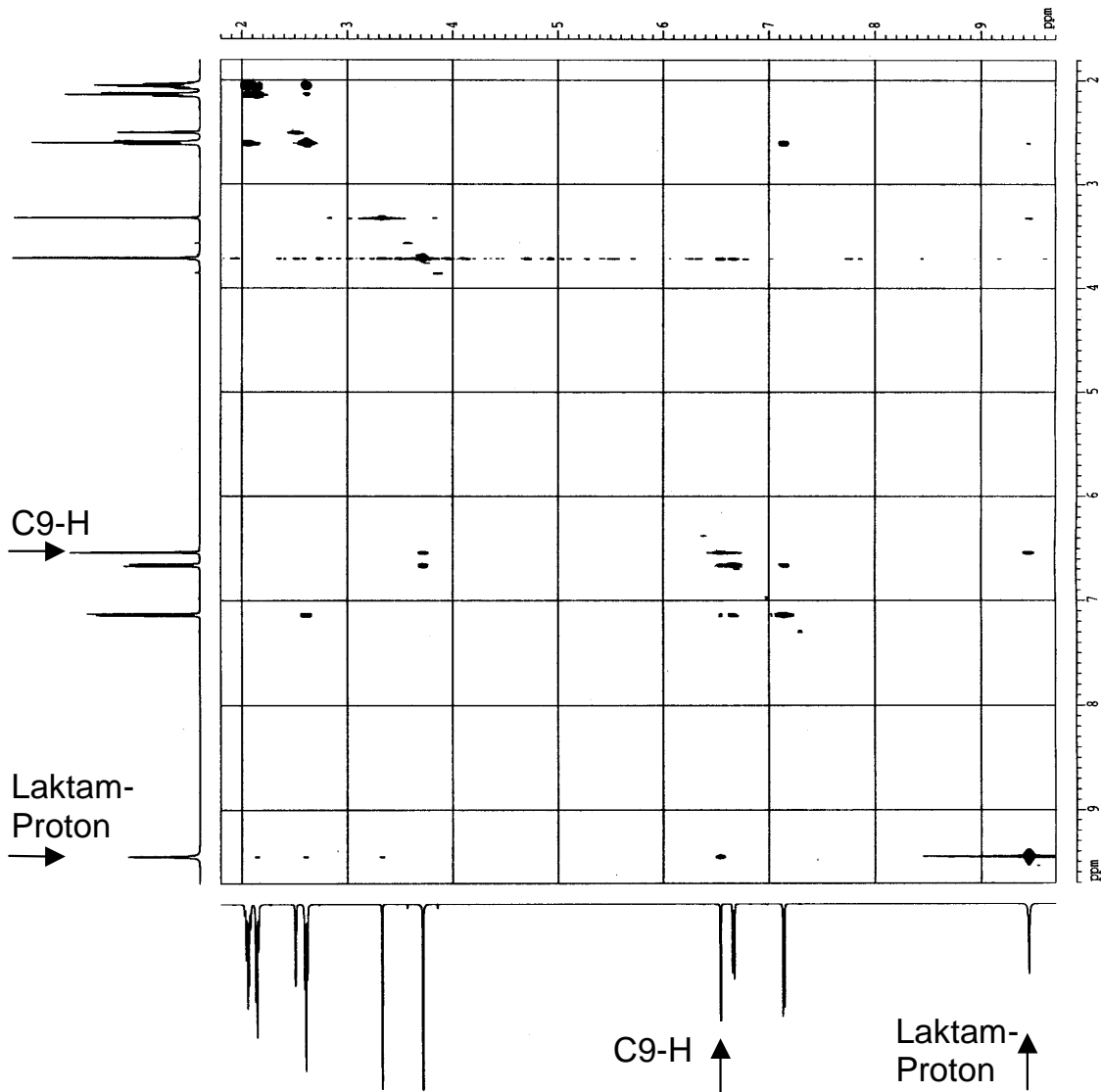
Schema 2-5:



Bei Schmidt-Reaktionen an Tetralonen kann sich sowohl der Alkylrest als auch der Arylrest umlagern. Welche Reaktion bevorzugt abläuft, ist unter anderem abhängig von den gewählten Reaktionsparametern und den Eigenschaften der sich in para- oder ortho-Position zur Carbonyl-Gruppe befindlichen Substituenten des Aromaten.<sup>21</sup>

Die eindeutige Identifizierung des 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-ons (**14**) erfolgte mittels  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und NOESY-Spektren.

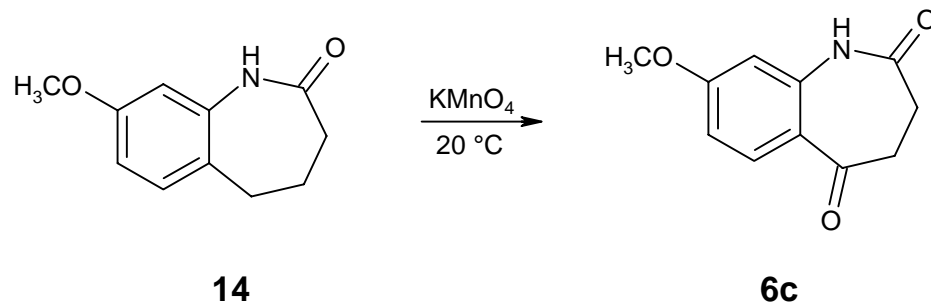
Abb. 2-1: NOESY-Spektrum von 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**14**)



Bei einem NOESY-Spektrum zeigen Wasserstoffkerne, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, einen Kern-Overhauser-Effekt. Dabei kommt es zu Energieübertragungen zwischen räumlich benachbarten Wasserstoffkernen, was im NOESY-Spektrum durch ein Kreuzsignal zu erkennen ist. Beim 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**14**) ist im Noesy-Spektrum (Abb. 2-1) ein deutliches Kreuzsignal zwischen C9-H und dem Lactam-Proton zu erkennen. Somit müssen die beiden Protonen sich in räumlicher Nähe befinden. Dies lässt auf eine bevorzugte Arylwanderung schließen. Die Konstitution des 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-ons (**14**) konnte somit mittels NOE-SY-Spektrum aufgeklärt werden.

Anschließend konnte das 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**14**) durch Oxidation mit Kaliumpermanganat analog einer von Chen beschriebenen Methode in das 8-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6c**) umgewandelt werden (Schema 2-6).<sup>22</sup>

Schema 2-6:

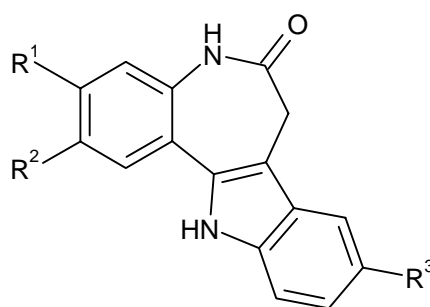


Die in diesem Kap. beschriebenen 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **6a-c** dienen als Edukte der in den folgenden Kapiteln dargestellten Synthesen.

## 2.2 Synthese von methoxysubstituierten Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen

Die nachfolgend beschriebenen monomethoxysubstituierten Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinone **15a-f** (Tab. 2-2) sollten Aufschluss über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen methoxysubstituierter Paullone bringen. Insbesondere sollte die CDK-inhibitorische Aktivität der monomethoxy-substituierten Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinone mit der Aktivität der von Schultz synthetisierten 2,3-Dimethoxy-indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen **5a-e** (s. Tab. 1-1) verglichen werden.<sup>20</sup>

Tab. 2-2:

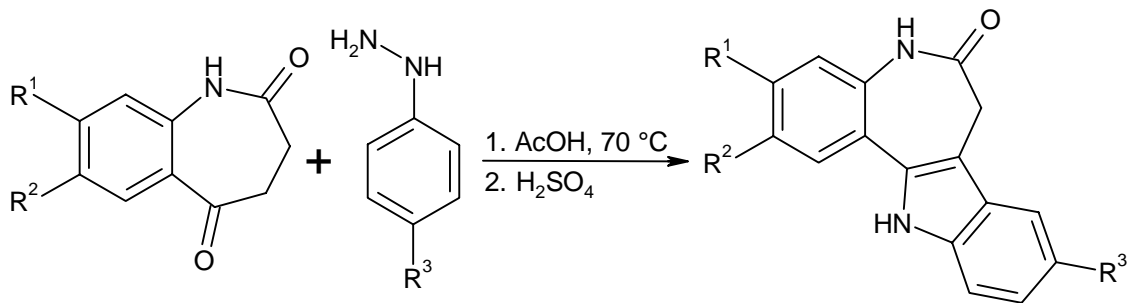


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>15a</b>	OCH <sub>3</sub>	H	Br
<b>15b</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>
<b>15c</b>	OCH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>
<b>15d</b>	H	OCH <sub>3</sub>	Br
<b>15e</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>
<b>15f</b>	H	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>



Die oben beschriebenen methoxysubstituierten Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinone waren auf zwei unterschiedlichen von Schultz beschriebenen Synthesewegen zugänglich.<sup>20</sup> Die Verbindungen **15a**, **b**, **d** und **e** konnten durch Umsetzung der 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dione **6a** und **6b** mit den entsprechenden Phenylhydrazinen **16a** und **16b** durch Säurekatalysierte Fischer-Indol-Synthese gewonnen werden (Schema 2-7).

Schema 2-7:



**6a**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OCH}_3$     **16a**  $R^3 = \text{Br}$

**6b**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$     **16b**  $R^3 = \text{CF}_3$

**15a**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OCH}_3$ ,  $R^3 = \text{Br}$

**15b**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OCH}_3$ ,  $R^3 = \text{CF}_3$

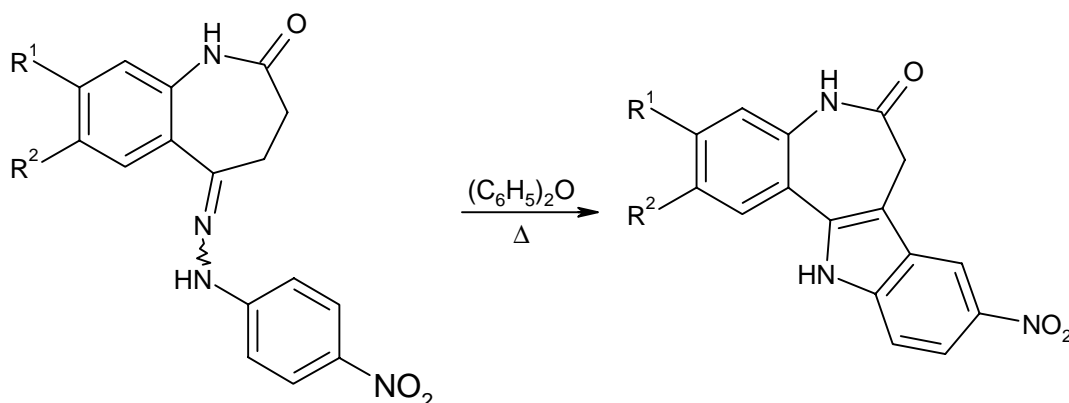
**15d**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{Br}$

**15e**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CF}_3$

Die Darstellung der methoxysubstituierten 9-Nitro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepinone **15c** und **15f** mit dieser Methode gelang nicht.

Die Verbindungen **15c** und **15f** konnten aber ausgehend von den methoxy-substituierten 5-(4-Nitro-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-onen **17c** und **17f** unter Verwendung von Diphenylether als Lösungsmittel durch thermisch induzierte Fischer-Indol-Synthese gewonnen werden (Schema 2-8).

Schema 2-8:



**17c**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OCH}_3$

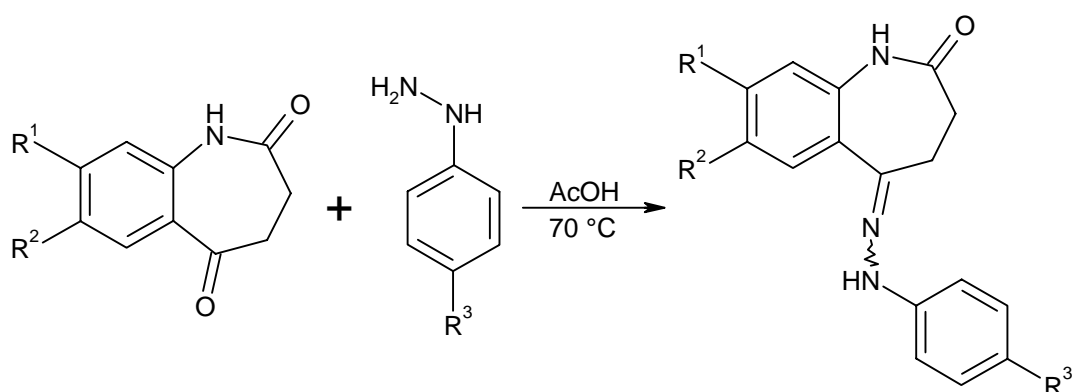
**17f**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

**15c**  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OCH}_3$

**15f**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

Die Isolierung der als Intermediat auftretenden Phenylhydrazone **17a-f** erschien ebenfalls interessant (Schema 2-9). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen sollten sie ebenfalls auf ihre CDK-inhibitorische Aktivität geprüft werden. Für die Synthesen wurden entweder die freien Basen der Phenylhydrazine verwendet, oder die entsprechenden Hydrochloride. Die Freisetzung der Base aus dem Hydrochlorid erfolgte mit äquimolaren Mengen Natriumacetat.

Schema 2-9:



- 6a**  $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OCH}_3$     **16a**  $R^3 = \text{Br}$     **17a**  $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OCH}_3, R^3 = \text{Br}$   
**6b**  $R^1 = \text{OCH}_3, R^2 = \text{H}$     **16b**  $R^3 = \text{CF}_3$     **17b**  $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OCH}_3, R^3 = \text{CF}_3$   
**16c**  $R^3 = \text{NO}_2$     **17c**  $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OCH}_3, R^3 = \text{NO}_2$   
**17d**  $R^1 = \text{OCH}_3, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{Br}$   
**17e**  $R^1 = \text{OCH}_3, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{CF}_3$   
**17f**  $R^1 = \text{OCH}_3, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{NO}_2$

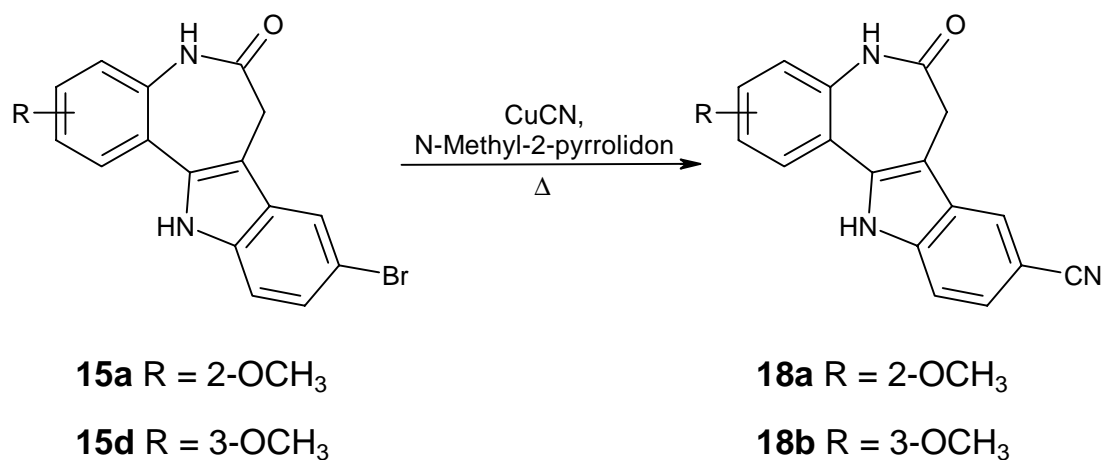
## 2.3 Derivatisierung der methoxysubstituierten Indolo[3,2-d][1]-benzazepinone

### 2.3.1 Rosenmund-von-Braun-Reaktionen an methoxysubstituierten Indolo[3,2-d][1]benzazepinonen

Aufgrund der guten CDK-inhibitorischen Aktivität des 2,3-Dimethoxy-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-9-carbonitrils (**5e**) war es naheliegend, die monosubstituierten Derivate ebenfalls zu synthetisieren und für Testungen zur Verfügung zu stellen.

Die in Schema 2-10 beschriebene Synthese erfolgte durch Umsetzung der methoxysubstituierten Indolo[3,2-d][1]-benzazepinone **4a** und **4b** in N-Methyl-2-pyrrolidon in Gegenwart von Kupfercyanid nach einer von Agarwal<sup>23</sup> beschriebenen und von Schultz<sup>20</sup> modifizierten Methode.

Schema 2-10:



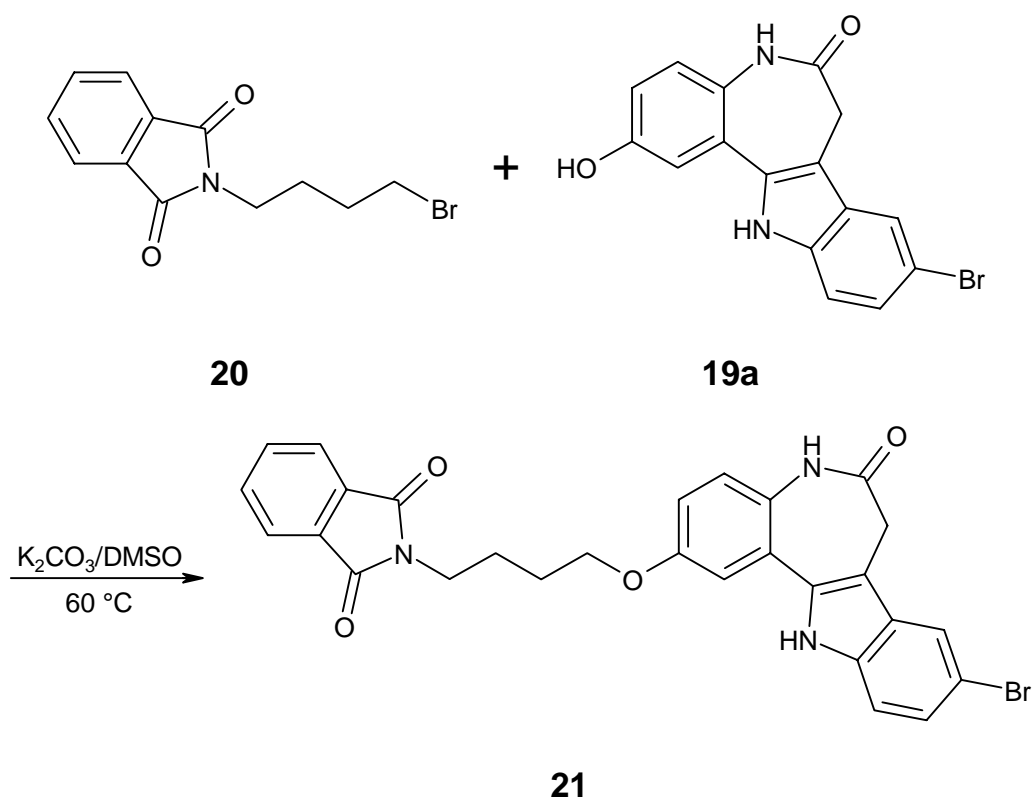
Die Verbindung **18a** konnte aufgrund ihrer schlechten Lösungseigenschaften weder durch Umkristallisation noch durch Säulenchromatographie elementaranalysenrein gewonnen werden und wurde daher nicht für biologische Testungen zur Verfügung gestellt.





Unter Verwendung eines großen Überschusses an Kaliumcarbonat in getrocknetem Dimethylsulfoxid verlief die Reaktion hingegen quantitativ (Schema 2-13).

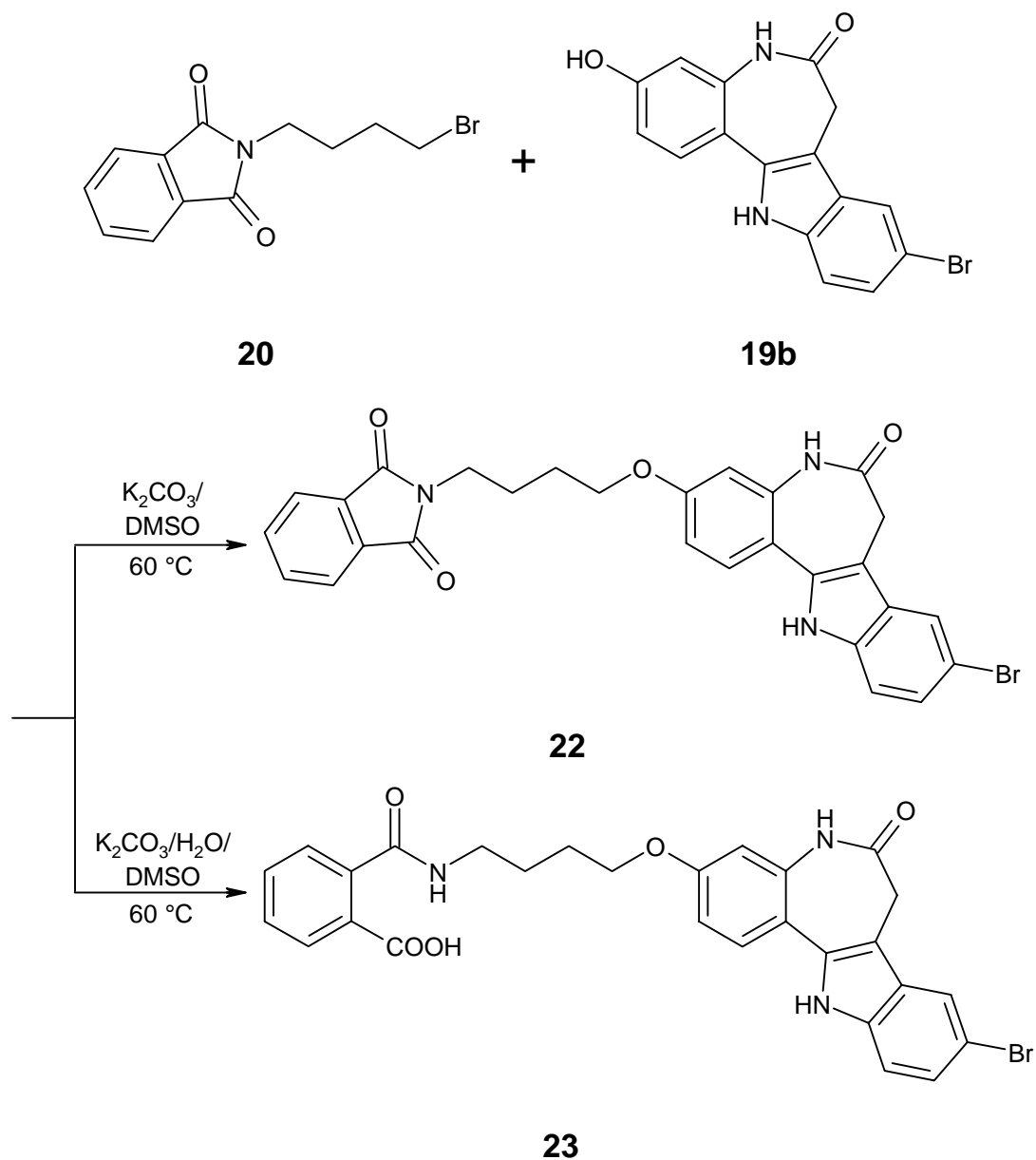
Schema 2-13:



Ebenso erfolgte die Umsetzung von 9-Brom-3-hydroxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**19b**) mit N-(4-Brombutyl)-phthalimid (**20**) in wasserfreiem Dimethylsulfoxid in Gegenwart eines großen Kaliumcarbonat-Überschusses zum Phenolether **22** (Schema 2-14).

Hierbei wurde die Beobachtung gemacht, dass schon geringe Mengen an Wasser zur Bildung eines Nebenproduktes führen (Schema 2-14). Dieses Nebenprodukt konnte als Phthaliminsäure **23** identifiziert werden. Die alkalische Hydrolyse von Phthalimiden zu den entsprechenden Phthaliminsäuren wurde schon früher von Gibson beschrieben.<sup>26</sup>

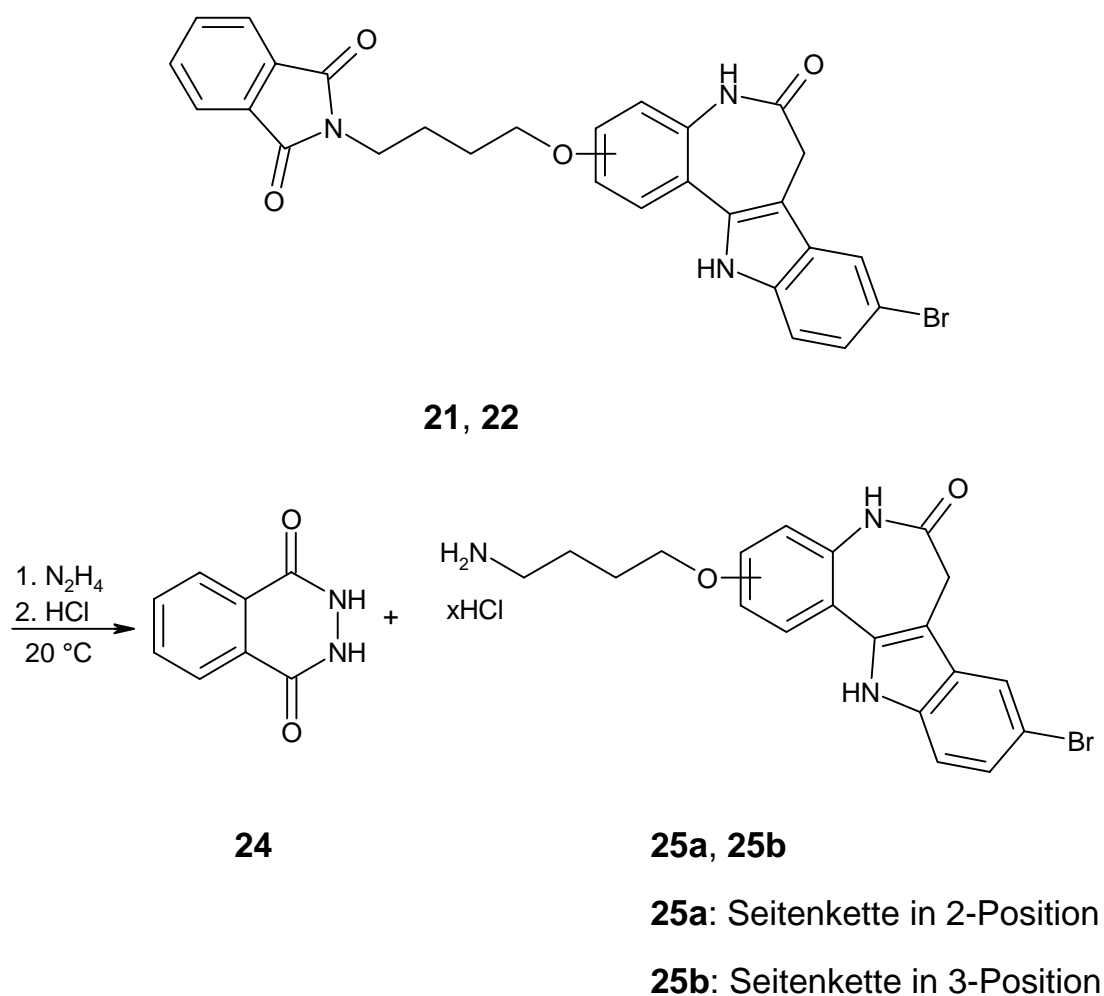
Schema 2-14:





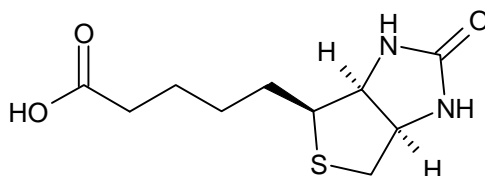
Die anschließende Hydrazinolyse erfolgte nach einer von Boden beschriebenen Methode (Schema 2-15).<sup>27</sup> Dabei wurde das Phthalhydrazid (**24**) abgespalten und die 2- bzw. 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochloride (**25a**) und (**25b**) gewonnen. Die Verbindung **25b** zeichnet sich durch eine bessere Wasserlöslichkeit gegenüber der freien Base aus.

Schema 2-15:



## 2.5 Synthese eines an Biotin gekoppelten Paullons

Biotin (**26**) gehört zur Gruppe der Vitamine und wird u.a. auch als Vitamin H bezeichnet. Sein Vorkommen erstreckt sich vor allem auf Eigelb, Milch, Leber und Niere. Biotin ist im Stoffwechsel als Coenzym an Carboxylierungsreaktionen beteiligt. Ein Mangel an Biotin kann unter anderem zu Hauterkrankungen und Haarausfall führen.<sup>28</sup>



**26**

An Biotin gekoppelte Verbindungen konnten eine große Bedeutung in der Bioanalytik erlangen. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass sowohl nieder-, als auch höhermolekulare an Biotin gekoppelte Substanzen eine hohe Affinität zu den Biotin-bindenden Proteinen Avidin und Streptavidin aufweisen. Diese Eigenschaft wird in der Bioanalytik vielfach genutzt. Da nur der Bicyclus des Biotins für die Bindungsaffinität der Proteine verantwortlich zu sein scheint, bietet sich die Pentansäure-Seitenkette für Modifikationen an.

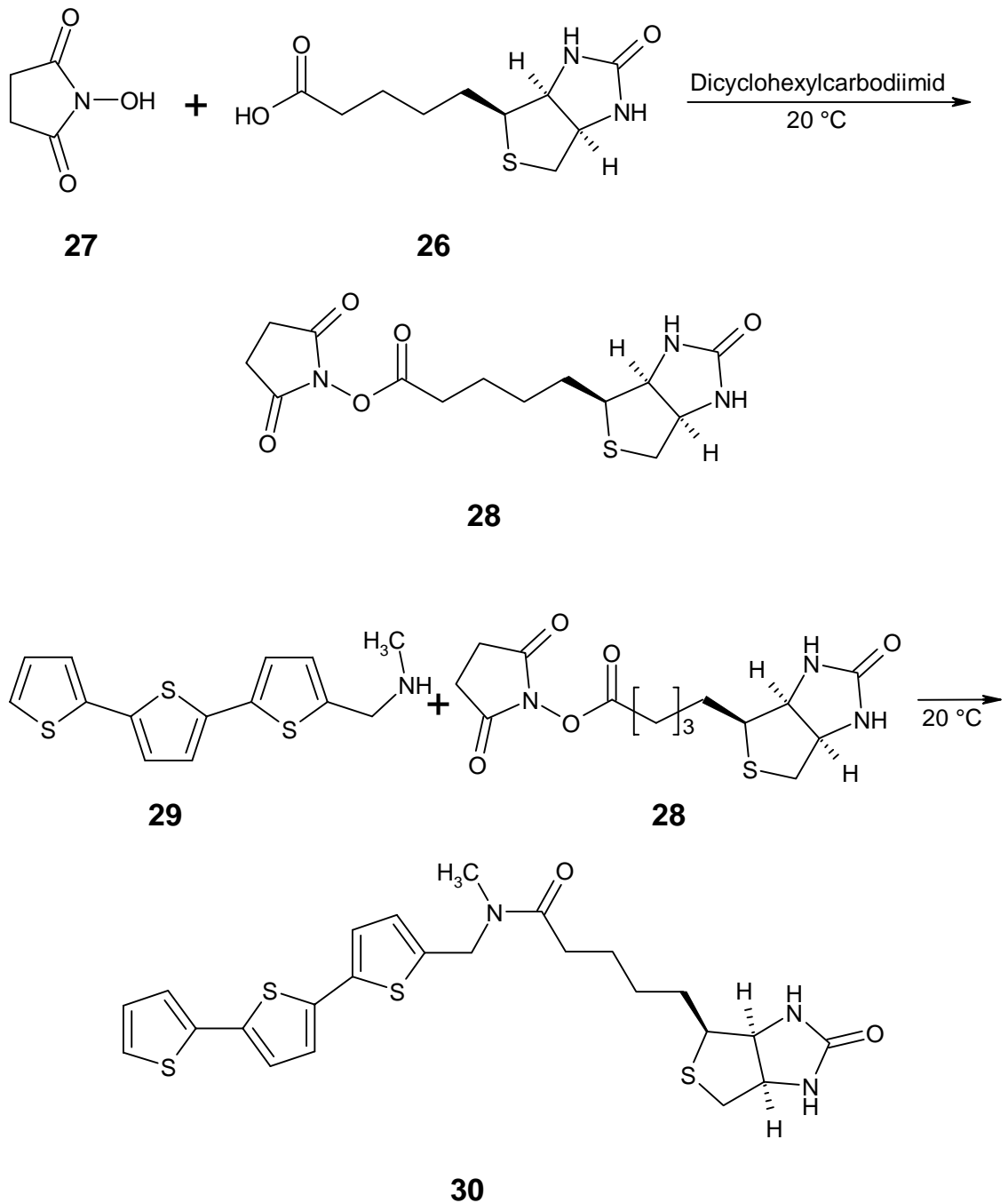
So werden Biotin-gelabelte Substanzen z.B. in der Affinitätschromatographie, Affinitätszytochemie und in Immunoassays eingesetzt.<sup>29</sup> Des Weiteren finden an Biotin gekoppelte Verbindungen in der Biacore-Analytik Anwendung.<sup>30</sup> Dabei wird ebenfalls die Affinität von Biotin zu Streptavidin ausgenutzt.

Das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte an Biotin gekoppelte Paullon soll in der Biacore-Analytik eingesetzt werden und zur Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der Affinität von Paullonen zu verschiedenen Proteinen genutzt werden.

Derzeit existieren verschiedene Methoden zur Durchführung von Biotinylierungs-Reaktionen an Aminen, Alkoholen, Imidazolen, Phenolen und Aldehyden. Eine gängige Methode ist z.B. die von Cosimelli beschriebene und in Schema 2-16 dargestellte Reaktion.<sup>31</sup> Dabei wird in einem ersten

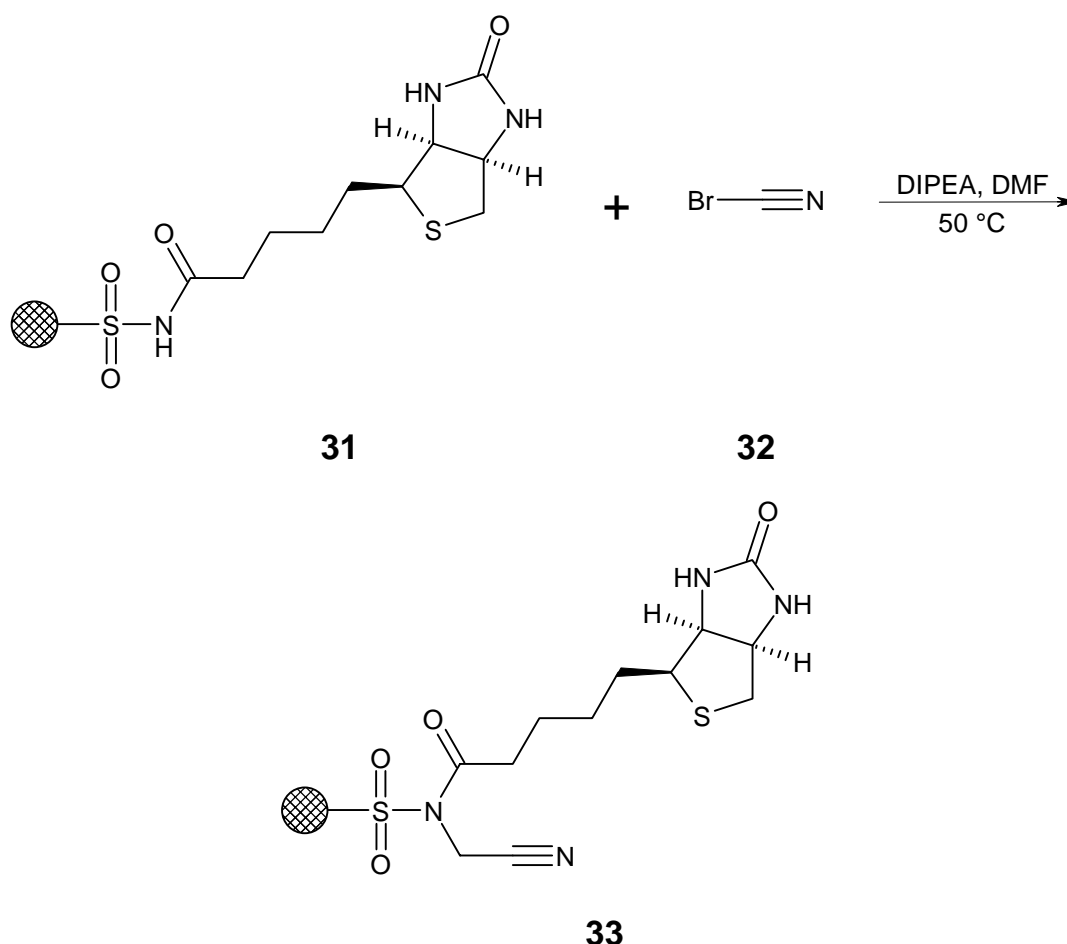
Reaktionsschritt das Biotin (**26**) durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid (**27**) und Dicyclohexylcarbodiimid zur aktivierten Verbindung **28** umgesetzt, um anschließend mit dem Amin **29** zu dem entsprechenden Amid **30** weiterzureagieren. Ein Nachteil dieser Methode ist die häufig zeitaufwendige Abtrennung der bei der Reaktion entstehenden Nebenprodukte.

Schema 2-16



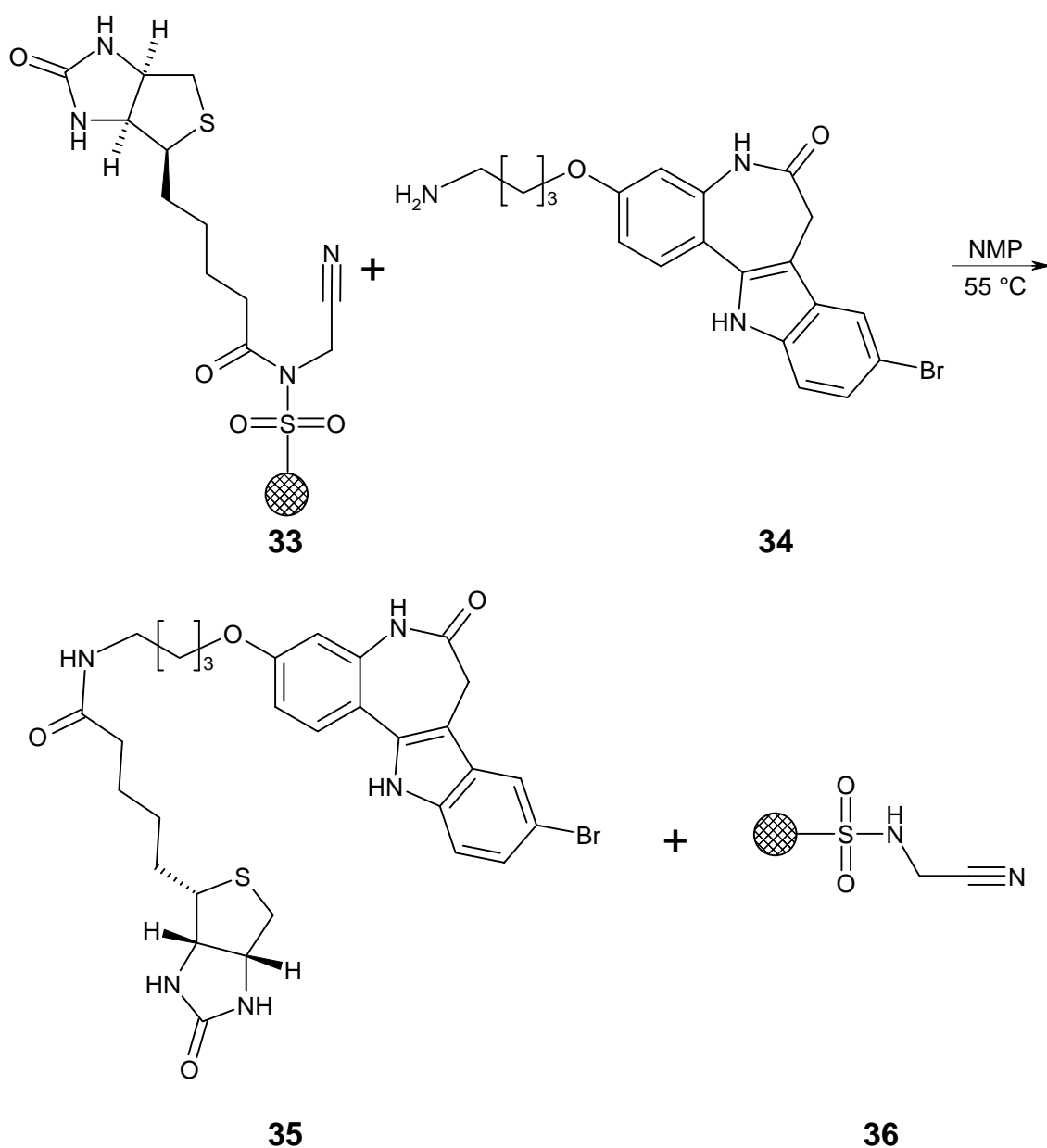
Im Arbeitskreis von Link wurde daher eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, primäre aliphatische Amine mit Biotin unter Umgehung aufwendiger Reinigungsmethoden zu verknüpfen.<sup>32</sup> Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verwendung eines Safety-Catch-Linkers. Dabei wird die Carbonsäure des Biotins mit einer Sulfonamid-Gruppe des Safety-Catch-Linkers unter Zusatz von Carbonyldiimidazol und Diisopropylethylamin verknüpft. Die Verbindung **31** wird anschließend durch Zugabe des Alkylierungsreagenzes Bromacetonitril **32** in das aktivierte Biotinylierungsreagenz **33** übergeführt (Schema 2-17). Diese Verbindung zeichnet sich durch eine hohe Chemoselektivität bezüglich Acylierungsreaktionen von Aminen aus.

Schema 2-17:



Zur Darstellung des biotinylierten Paullons **35** wurde die Verbindung **33** mit dem 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) in N-Methyl-2-pyrrolidon umgesetzt (Schema 2-18).

Schema 2-18:



Die Isolierung des biotinylierten Paullons **35** aus dem Reaktionsansatz erfolgte durch Filtration. Dabei verblieben die Harzpartikel **36** als Rückstand, während sich das biotinylierte Paullon **35** im Filtrat befand. Nicht umgesetztes 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) konnte durch MPLC abgetrennt werden.

## 2.6 Fluoreszenz-Markierung von Paullonen

Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Synthese von Fluoreszenz-markierten Paullonen, die ebenfalls zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Paullone beitragen sollen. Fluoreszenz-markierte Substanzen finden derzeit häufig innerhalb pharmakologischer und pharmakokinetischer Studien Anwendung. So werden Fluoreszenz-markierte Substanzen z.B. für Rezeptor-Bindungs-Studien<sup>33-37</sup>, Membran-Fusions-Studien<sup>38</sup>, Enzym-Assays<sup>39-41</sup> sowie für Enzym-Lokalisations-Studien<sup>42</sup> eingesetzt.

Gegenüber den ebenfalls häufig verwendeten radioaktiv markierten Substanzen weisen Fluoreszenz-markierte Verbindungen einige entscheidende Vorteile auf.<sup>34,35</sup> Zum einen sind neben der Durchführung von Echtzeit-Bindungsstudien auch Verdrängungsstudien mit nicht Fluoreszenz-markierten Liganden möglich. Zum anderen ist sowohl das gesundheitsschädigende Risiko als auch die Umweltbelastung durch Fluoreszenz-markierte Verbindungen gegenüber der Verwendung von radioaktiven Verbindungen vermindert. Ein Nachteil kann allerdings die unter Umständen durch die Einführung des Fluorophors bedingte veränderte Affinität zu den Zielstrukturen darstellen. Dieses ist besonders bei voluminösen Fluorophoren zu beobachten. Ebenso kann es durch Autofluoreszenz des biologischen Materials zu Problemen bei der Durchführung der Untersuchungen kommen.

Als Ausgangsverbindung zur Darstellung Fluoreszenz-markierter Paullone bot sich 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) an, da diese Verbindung in Form der Aminoalkyl-Seitenkette über eine geeignete Position zur Anknüpfung eines Fluorophors verfügt.

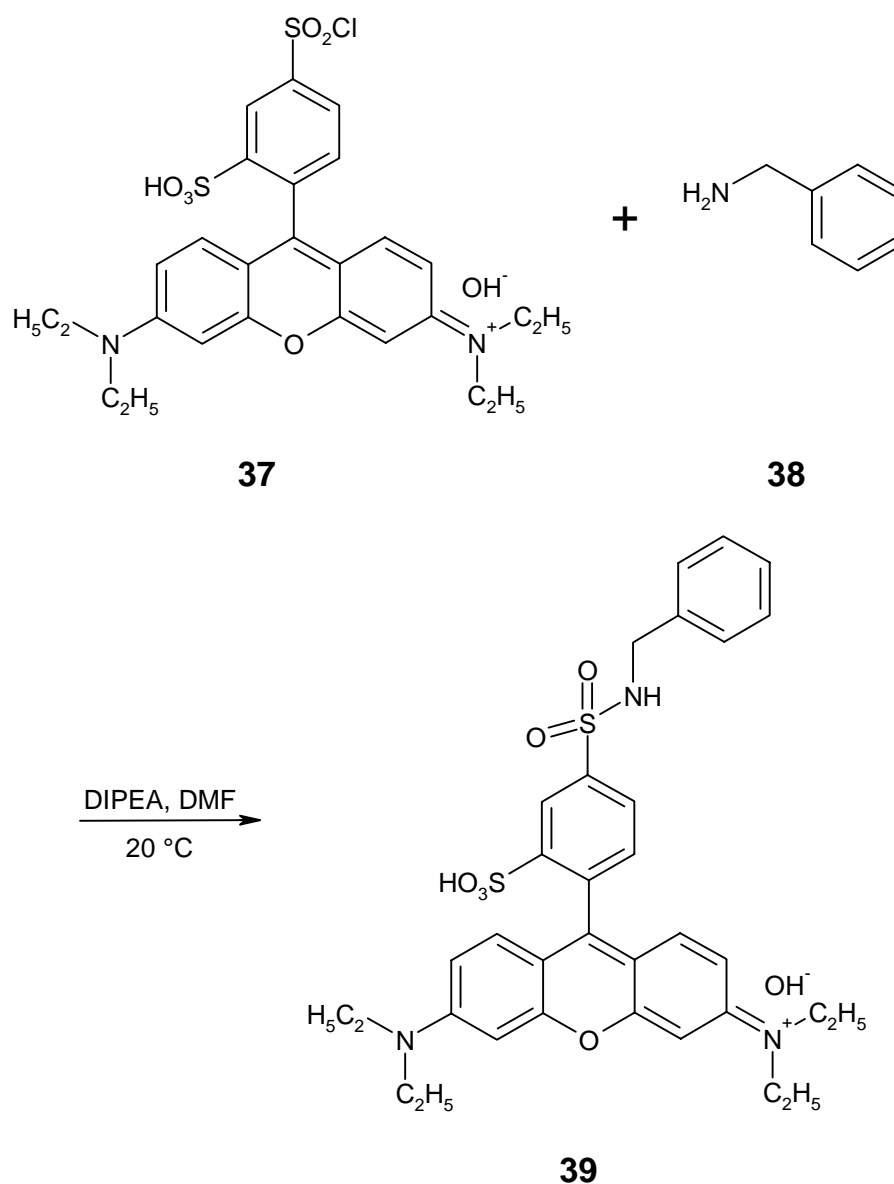
Derzeit sind eine Vielzahl aktivierter Fluoreszenzmarker kommerziell erhältlich. Unter anderem finden modifizierte Fluorescein-Derivate<sup>33,36,40,43</sup>, Cumarine<sup>35</sup>, Dansylchlorid<sup>35</sup>, 7-Chlor-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol<sup>35,38,39,44</sup>, Rhodamin-Derivate<sup>42</sup> sowie Bordifluordipyrromethen-Derivate<sup>34,35,37,41,45</sup> Anwendung. Um zwischen Autofluoreszenz-Artefakten des biologischen Materials und den Fluoreszenz-markierten Liganden differenzieren zu können, ist es sinnvoll, einen Fluorophor zu verwenden, der in einem anderen Wellenlängenbereich Licht emittiert. Besonders geeignet sind da-

her Substanzen, die in einem relativ hohen Wellenlängenbereich (> 500 nm) Licht emittieren. Neben den sehr teuren Bordifluorpyrromethen-Derivaten verfügen Rhodamine ebenfalls über diese Eigenschaft. Daher wurde das Rhodamin B-Säurechlorid (**37**) als Reagenz zur Einführung des Fluorophors ausgewählt.

In einer Modellreaktion wurden die optimalen Reaktionsbedingungen unter Verwendung von Benzylamin (**38**) evaluiert, um das relativ aufwendig zu synthetisierende 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) nicht unnötig zu verbrauchen. Benzylamin (**38**) wurde gewählt, da es ebenfalls über eine Aminoalkyl-Seitenkette verfügt und relativ kostengünstig ist.

Die Umsetzung des Rhodamin B-Säurechlorids **37** mit Benzylamin (**38**) erfolgte in N,N-Dimethylformamid in Gegenwart von Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur (Schema 2-19). Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, dass neben dem Hauptprodukt auch ein Nebenprodukt gebildet wurde, dessen Struktur jedoch nicht aufgeklärt wurde. Das entstandene Sulfonamid **39** zeichnet sich durch eine intensive rosa Fluoreszenz aus.

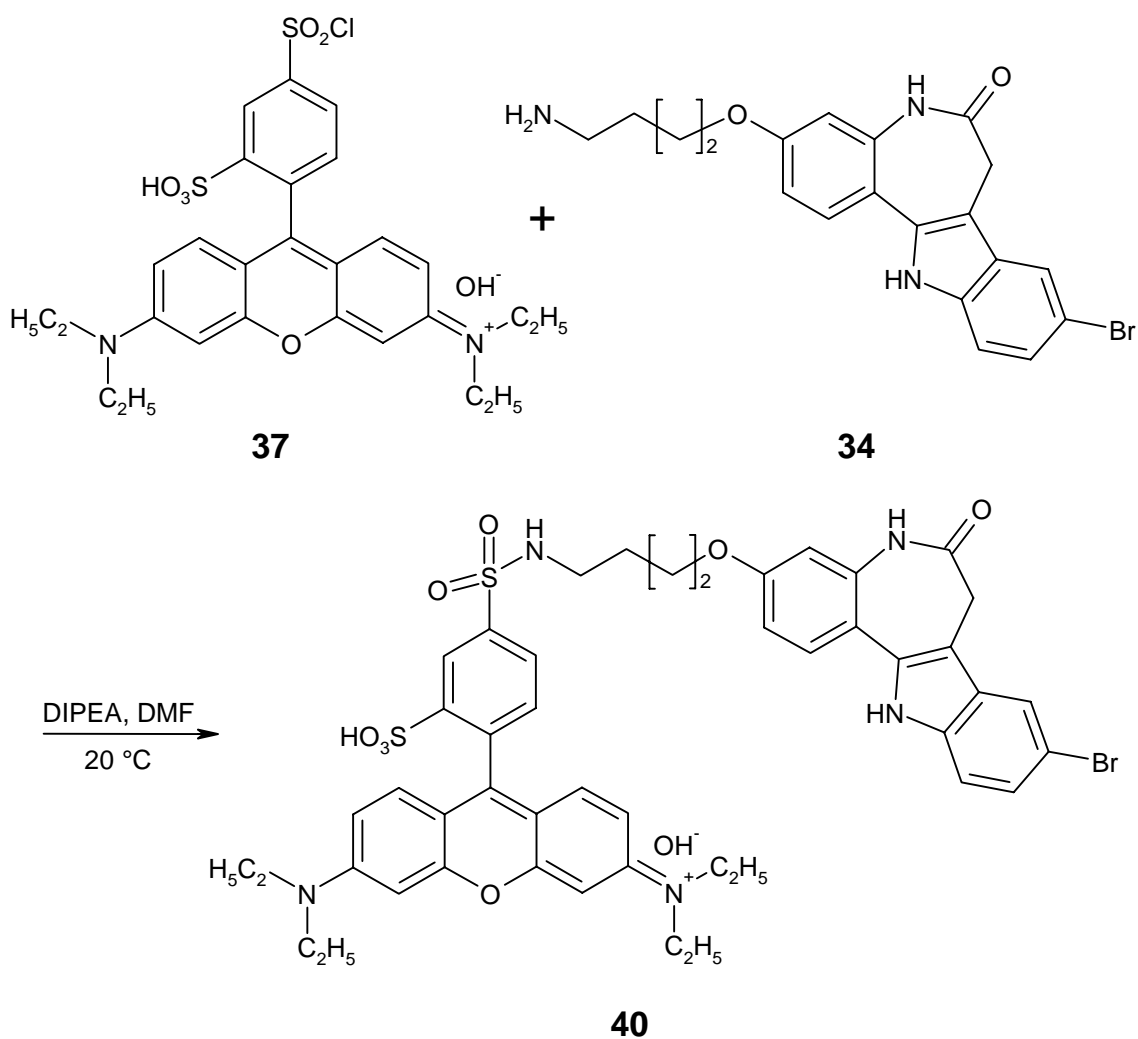
Schema 2-19:



Die Umsetzung des 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5*H*)-ons (**34**) mit dem Rhodamin B-Säurechlorid **37** erfolgte ebenfalls in N,N-Dimethylformamid in Gegenwart von Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur (Schema 2-20). Auch hier wurde die Bildung eines bisher nicht identifizierten Nebenproduktes beobachtet. Das Sulfonamid **40** zeigt ebenfalls eine intensive rosa Fluoreszenz.



Schema 2-20:

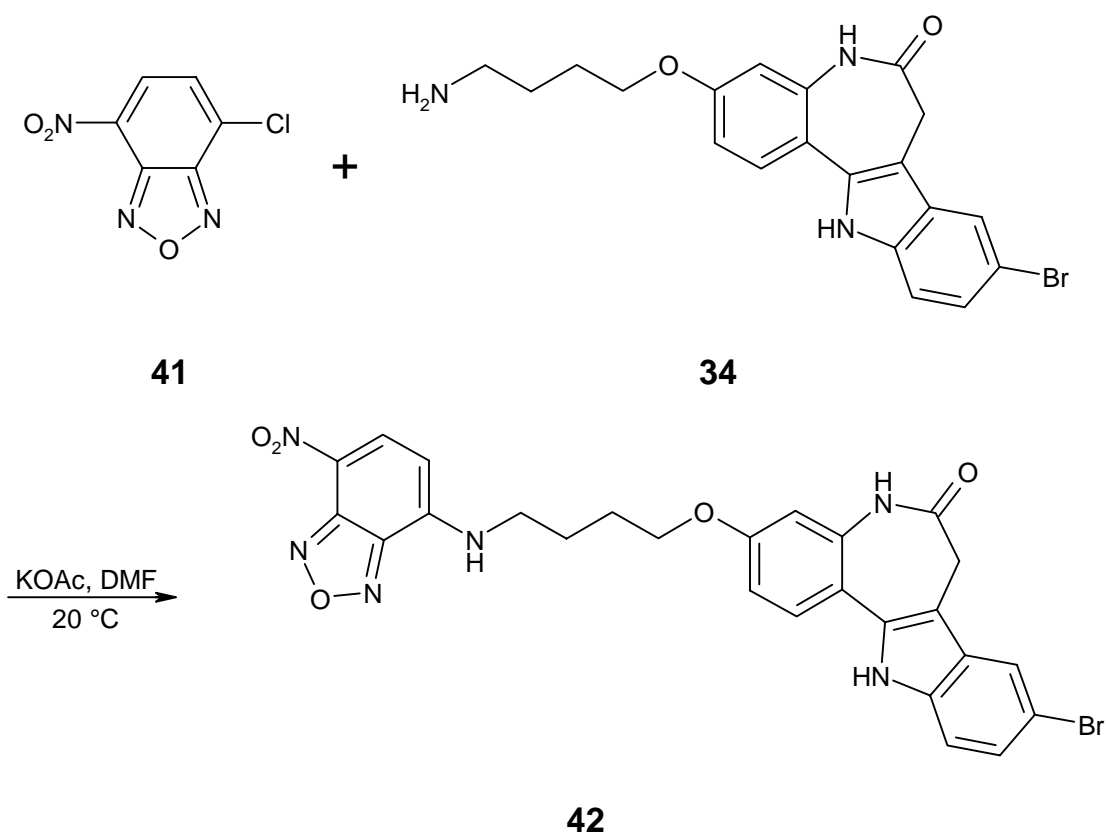


Da voluminöse Fluorophore häufig Probleme bezüglich der Affinität zu den Zielstrukturen verursachen, sollte noch ein anderer, kleinerer Fluoreszenzmarker mit der Verbindung 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) verknüpft werden.

7-Chlor-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (**41**) stellt einen weniger voluminösen Fluoreszenzmarker dar, für dessen Produkte Emissions-Wellenlängen größer 500 nm beschrieben werden.<sup>44</sup>

7-Chlor-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (**41**) konnte in Gegenwart von Kaliumacetat mit 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) analog einer von Gosh<sup>44</sup> beschriebenen Methode zur gelb fluoreszierenden Verbindung **42** umgesetzt werden, wobei N,N-Dimethylformamid anstelle von Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt wurde (Schema 2-21).

Schema 2-21:



Um die Paullone **40** und **42** innerhalb Analysenmethoden unter Ausnutzung ihrer fluoreszierenden Eigenschaft verwenden zu können, muss zur Detektion der Fluoreszenz die jeweilige Emissionswellenlänge bekannt sein. Für die Fluoreszenz-markierten Paullone **40** und **42** wurden daher sowohl Absorptions- als auch Emissions-Spektren aufgenommen. Die nachfolgend dargestellten Abbildungen 2-2 und 2-3 zeigen das Absorptions-Spektrum sowie das Emissions-Spektrum der Verbindung **42**.

Abb. 2-2: UV-Vis-Spektrum des Fluoreszenz-markierten Paullons 42

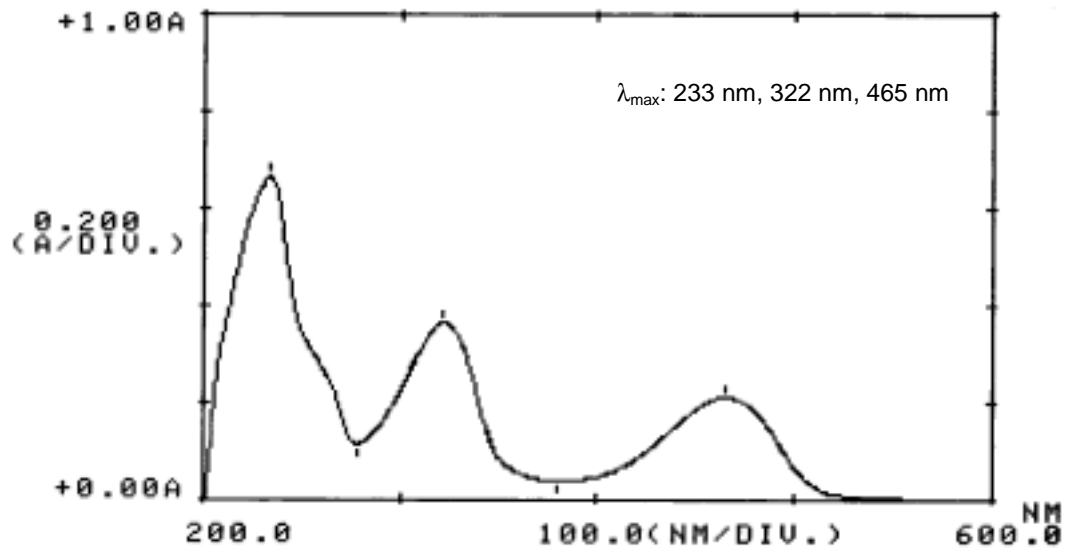
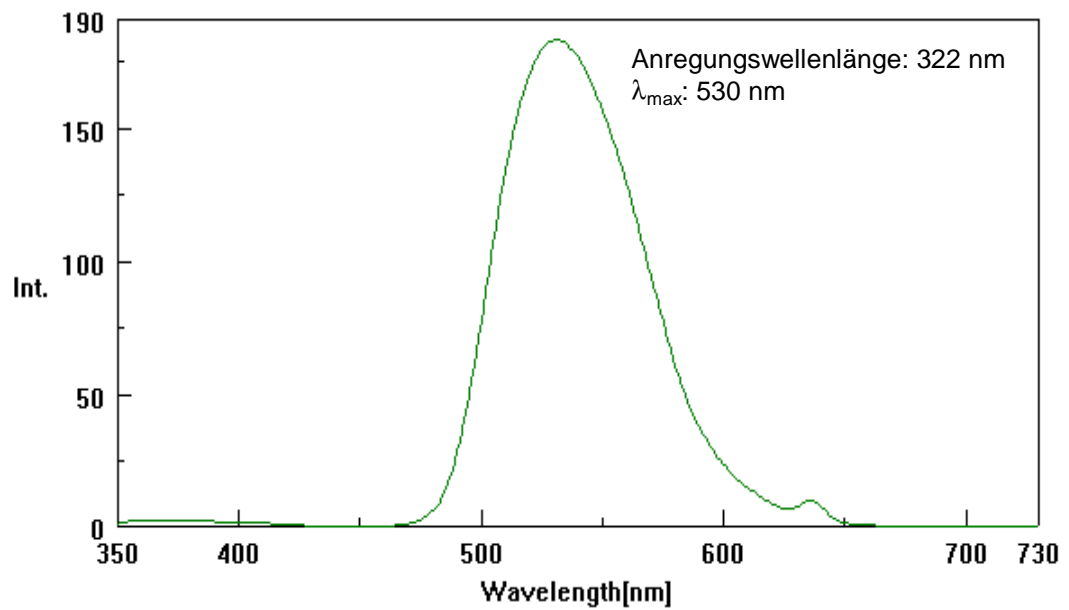


Abb. 2-3: Emissions-Spektrum des Fluoreszenz-markierten Paullons 42

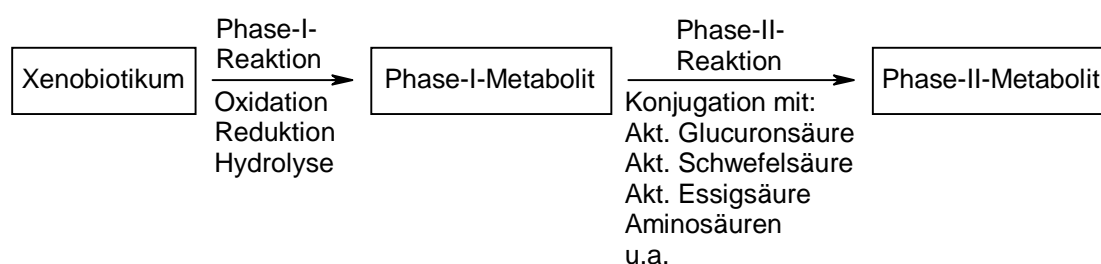


## 2.7 Synthese von potentiellen Alsterpaullon-Metaboliten

Derzeit befindet sich Alsterpaullon **4** in präklinischer Prüfung, wobei auch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz in Versuchstieren untersucht werden. Dabei kommt der Aufklärung des Metabolisierungsmusters einer Substanz besondere Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang war es notwendig, potentielle Metabolite des Alsterpaullons zu synthetisieren und für Vergleichszwecke zur Verfügung zu stellen.

Bei der Metabolisierung von Xenobiotika unterscheidet man prinzipiell zwei Phasen im Verlauf der Biotransformation. Während der Phase I erfolgt ein enzymatischer Abbau der Substanzen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. Innerhalb der Phase II werden die Phase-I-Metabolite mit körpereigenen Substanzen wie z.B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Aminosäuren, etc. konjugiert, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen und somit die Elimination zu beschleunigen (Schema 2-22).<sup>46</sup>

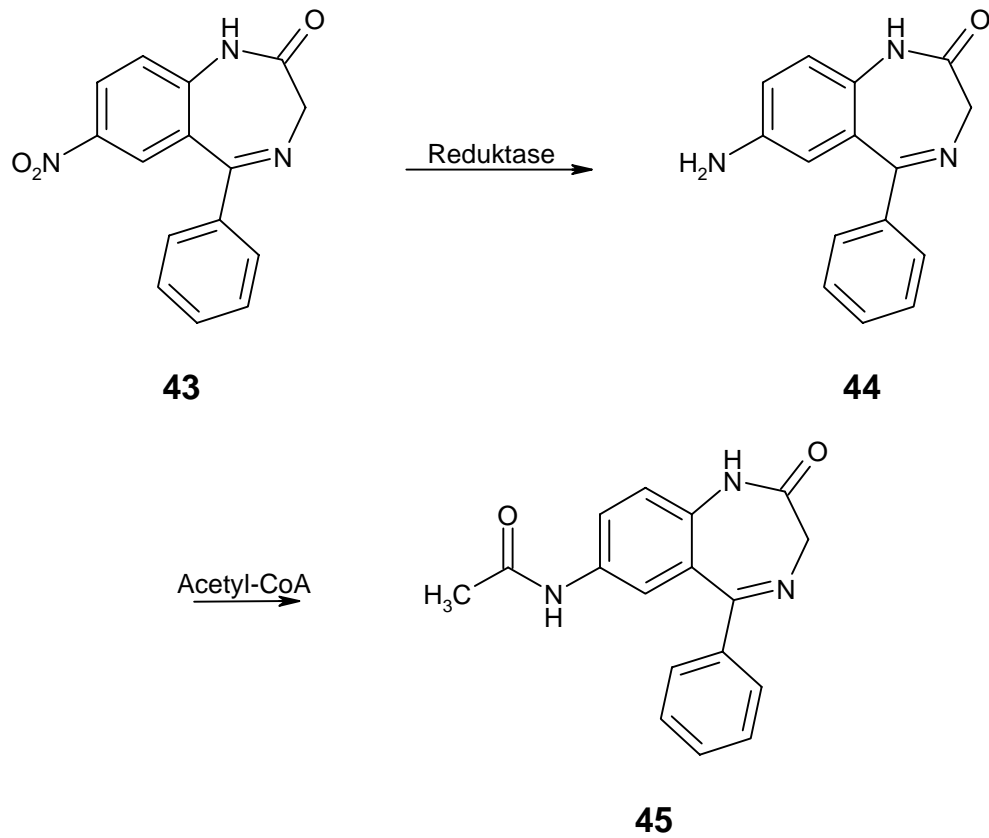
Schema 2-22: Metabolisierung von Xenobiotika



Aromatische Nitroverbindungen werden in der Regel zuerst in einer Phase-I-Reaktion zu dem entsprechenden Amin reduziert. An der Reaktion scheint unter anderem die mikrosomale NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase beteiligt zu sein. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch nicht aufgeklärt. In der Phase-II-Reaktion erfolgt dann die Kupplung desamins mit Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA).<sup>46</sup>

In Schema 2-23 ist die Metabolisierung der aromatischen Nitro-Gruppe des Arzneistoffs Nitrazepam (**43**) dargestellt. Die Biotransformation erfolgt über eine Reduktion der Nitro-Gruppe zum Amin **44** und anschließender Konjugation mit Acetyl-CoA zum Acetamid **45**.<sup>47</sup>

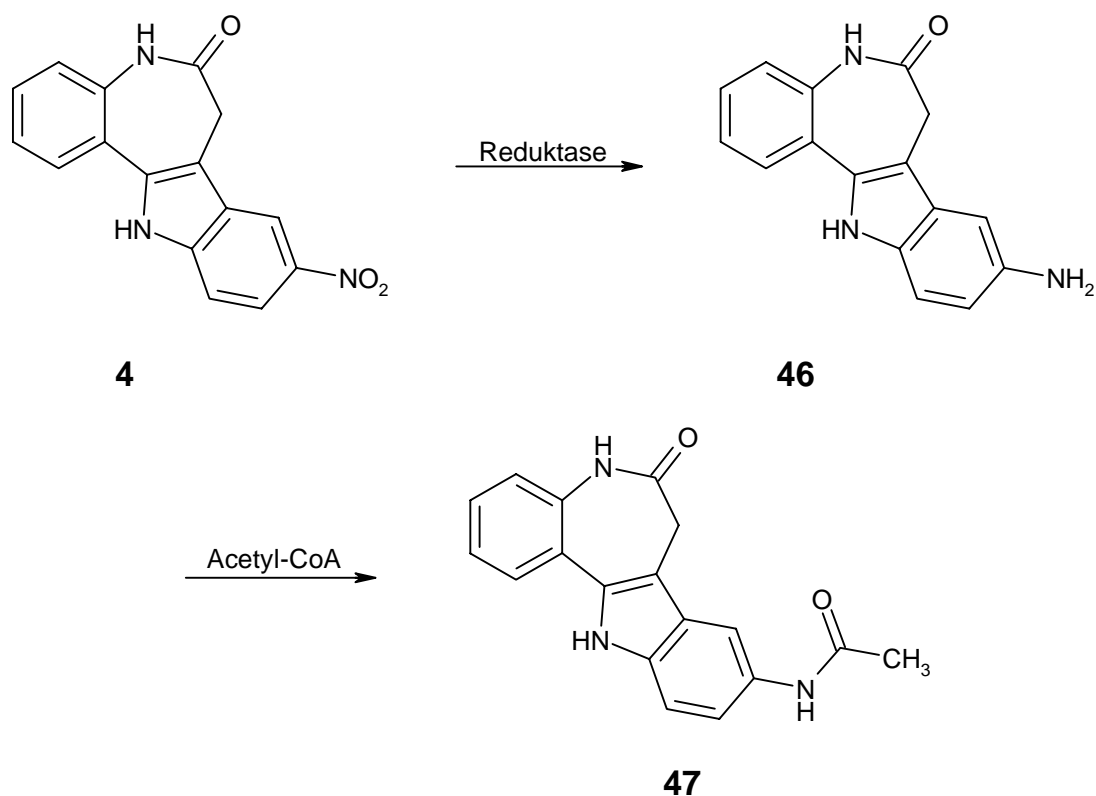
Schema 2-23: Metabolisierung von Nitrazepam unter Beteiligung der Nitrogruppe



Es erschien naheliegend, dass Alsterpaullon (**4**) ebenfalls durch Reduktion der Nitro-Gruppe und anschließender Kupplung mit Acetyl-CoA metabolisiert wird (Schema 2-24).

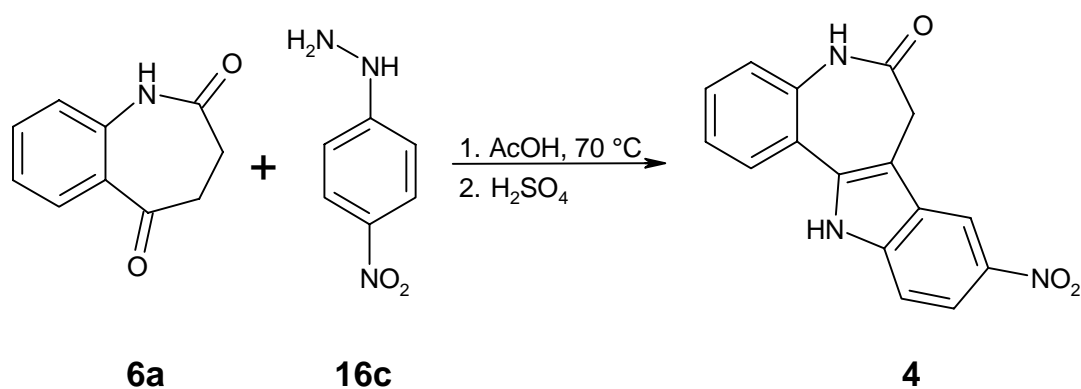
Somit stellen das 9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**46**) und das entsprechende Acetamid **47** potentielle Alsterpaullon-Metaboliten dar, die dem NCI für pharmakokinetische Studien zur Verfügung gestellt werden sollten.

Schema 2-24: Potentieller Metabolisierungsweg bei Alsterpaullon (4)



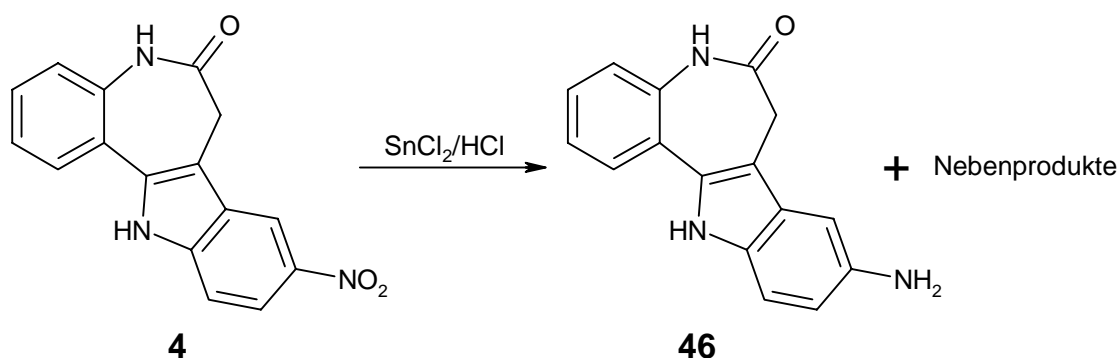
Die Synthese von Alsterpaullon (**4**) erfolgte nach publizierten Methoden durch Säure-katalysierte Fischer-Indol-Synthese (Schema 2-25).<sup>3</sup> Dabei wurde 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6a**) mit 4-Nitrophenylhydrazin (**16c**) zum 9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**4**) umgesetzt.

Schema 2-25:



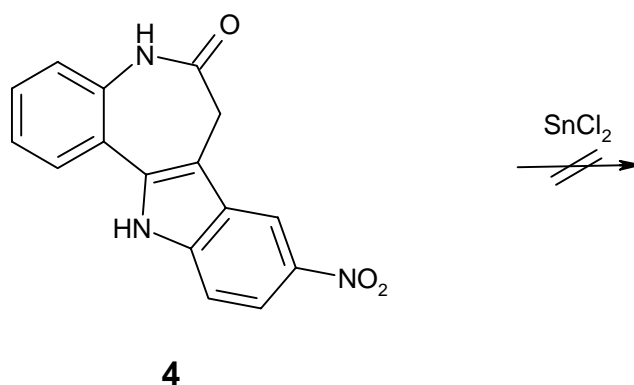
Bei der Umsetzung von Alsterpaullon (**4**) mit Zinn(II)chlorid in konzentrierter Salzsäure nach Smith<sup>19</sup> (Schema 2-26) kam es neben dem gewünschten 9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**46**) zur Bildung von nicht identifizierten Nebenprodukten, deren säulenchromatographische Abtrennung nicht gelang.<sup>19</sup>

Schema 2-26:



Mit der von Bellamy<sup>48</sup> beschriebenen milden Reduktion mit Zinn(II)chlorid im wasserfreien neutralen Milieu (Schema 2-27) konnte Alsterpaullon (**4**) nicht zu dem entsprechenden 9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**46**) umgesetzt werden. Es kam zu keiner Reaktion.<sup>48</sup>

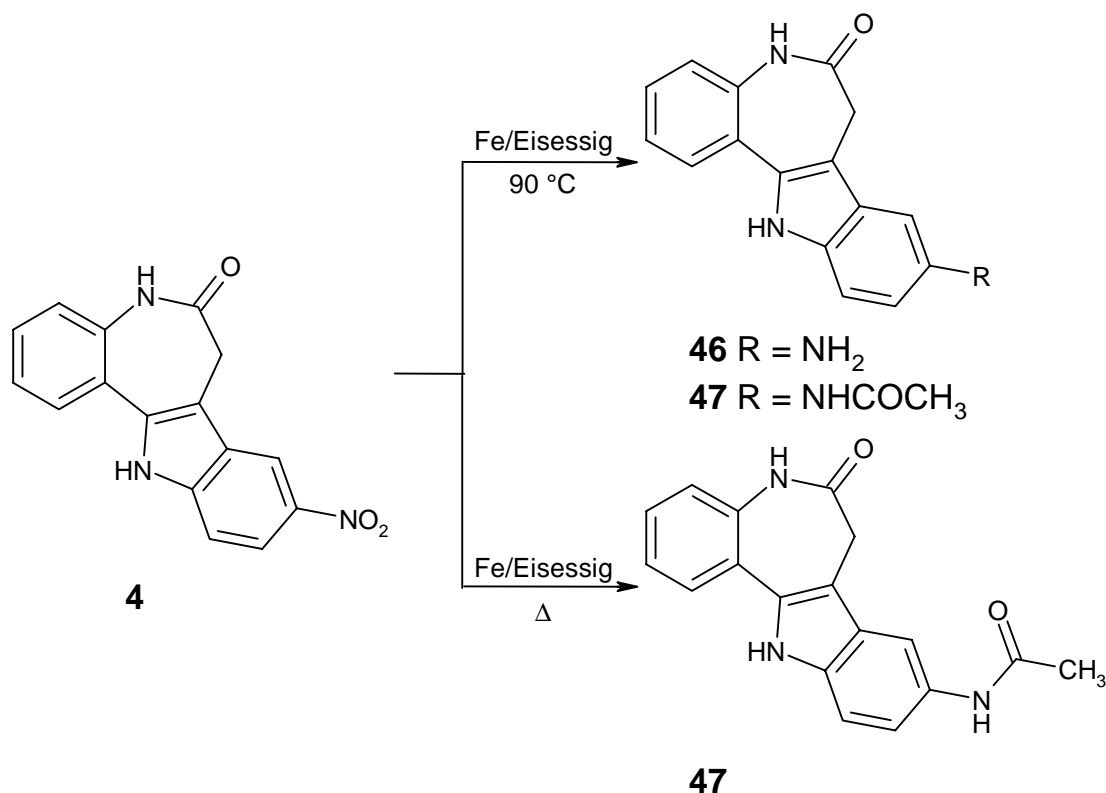
Schema 2-27:



Dahingegen führte die Umsetzung des Alsterpaullons (**4**) mit Eisen in Eisessig nach Simpson<sup>49</sup> in Abhängigkeit von der Temperatur zu unterschiedlichen Ergebnissen (Schema 2-28). Bei der Erwärmung des Reaktionsgemisches auf 90 °C kam es sowohl zur Bildung des 9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons (**46**), als auch zur Bildung des entsprechenden Acetamids **47**. Die säulenchromatographische Trennung der beiden Produkte war möglich, führte jedoch zu geringen Ausbeuten.

Erhitzen des Reaktionsansatzes unter Rückfluss führte dagegen zur ausschließlichen Bildung des Acetamids **47**.

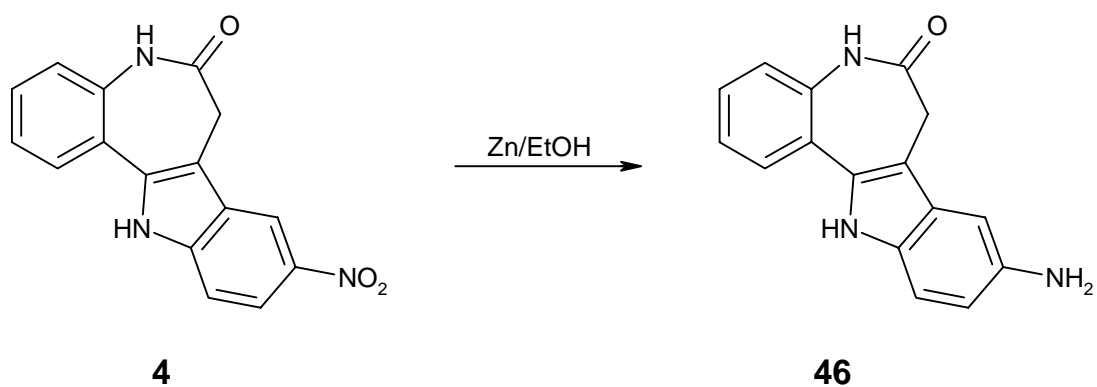
Schema 2-28:





Um die Bildung des Amids **47** zu vermeiden, wurde nach weiteren Methoden unter Umgehung von Eisessig gesucht. Eine bessere Methode zur Synthese des 9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**46**) stellte die Umsetzung des Alsterpaullons (**4**) mit Zink in Ethanol dar (Schema 2-29).<sup>50</sup> Die Reaktion verlief ohne Bildung von Nebenprodukten.

Schema 2-29:



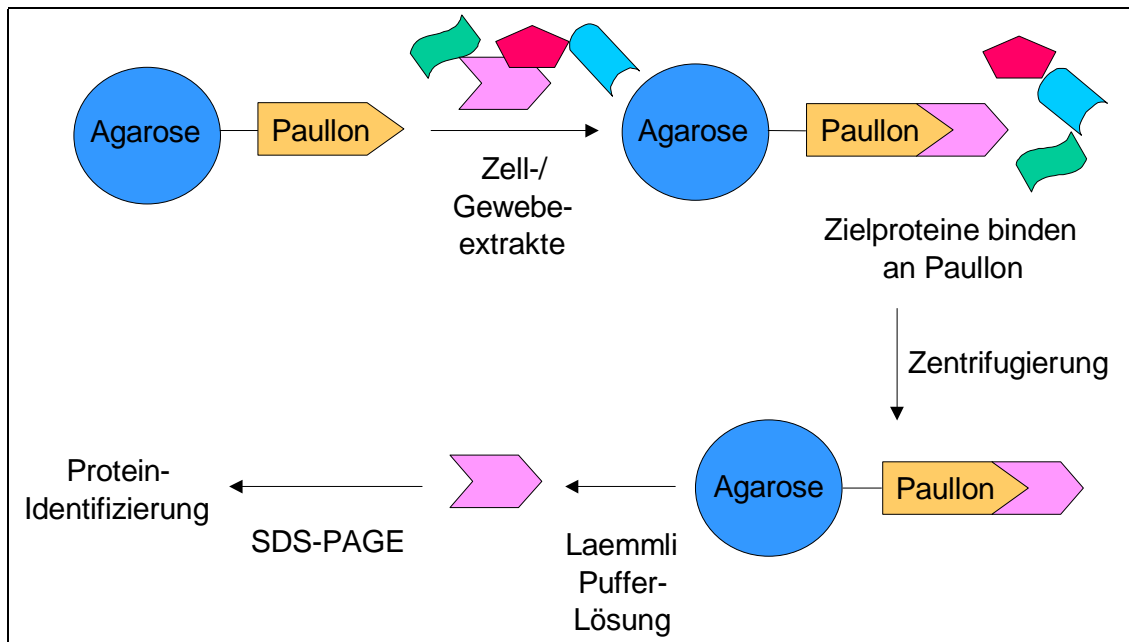
### **3 Affinitätsuntersuchungen mit Paullonen**

#### **3.1 Ziel und Prinzip der Untersuchungen**

Paullone stellen eine Substanzklasse von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen dar. Insbesondere vermögen Paullone CDK1/Cyclin B und CDK5 zu hemmen.<sup>51</sup> Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Affinitätsuntersuchungen war die Auffindung weiterer intrazellulärer Zielproteine von Paullonen neben Cyclin-abhängigen Kinasen. Des Weiteren sollten Ergebnisse aus den Affinitätsuntersuchungen dazu beitragen, den Wirkmechanismus von Paullonen weiter aufzuklären und Voraussagen über potentielle Nebenwirkungen machen zu können.

Zur Durchführung der Affinitätsuntersuchungen wurde ein mit einem Linker versehenes Paullon an ein Trägermaterial geknüpft. Als Trägermaterial wurde aktivierte Agarose verwendet. Dieses immobilisierte Paullon wurde innerhalb verschiedener Versuche mit diversen Zell- bzw. Gewebeeextrakten inkubiert. Proteine, die eine Affinität zu dem immobilisierten Paullon aufwiesen, wurden an dieses adsorbiert, während die anderen in Lösung verblieben. Die Abtrennung der nicht gebundenen Proteine erfolgte durch Zentrifugieren. Die gebundenen Proteine wurden mit der ein Tensid und ein Reduktionsmittel enthaltenden Laemmli-Pufferlösung und durch Hitze denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgrund unterschiedlicher Molekularmassen getrennt. Die Proteine wurden anschließend durch Silber- oder Amidoschwarz-Färbung sichtbar gemacht und mittels Western Blot oder Mikrosequenzanalyse identifiziert (Abb.3-1).

Abb. 3-1:



## **3.2 Grundlagen der Affinitätschromatographie<sup>52</sup>**

### **3.2.1 Biologische Interaktionen**

In der Affinitätschromatographie werden häufig natürliche biologische Interaktionen ausgenutzt. Diese können z.B. Antikörper-Antigen-, Enzym-Substrat-, Lektin-Polysaccharid- oder Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen sein. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, einen der beiden an der Interaktion beteiligten Partner, den Liganden, an einer festen Phase zu immobilisieren, während der Gegenligand aus dem die Säule passierenden Extrakt adsorbiert wird. Besondere Beachtung muss dabei die Assoziationsstärke zwischen Ligand und Gegenligand finden. Ist die Assoziationsstärke zu schwach, so findet keine Adsorption statt, während eine zu große Assoziationsstärke zu Schwierigkeiten bei der Elution des adsorbierten Gegenliganden führen kann.

### **3.2.2 Trägermaterialien**

In der Affinitätschromatographie sind Trägermaterialien mit einer großen Oberfläche von Vorteil, da diese über eine bessere Bindungskapazität verfügen. Daher eignen sich insbesondere hydrophile Gele mit einem großen Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Für die Durchführung affinitätschromatographischer Untersuchungen sollte das Gelmaterial über folgende Eigenschaften verfügen: Die Gele sollten makroporös sein, um Interaktionen des Liganden mit höhermolekularen Substanzen, wie z.B. Proteinen, zu ermöglichen. Des Weiteren sollten die Gele zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen mit den Proteinen hydrophil und neutral sein. Um eine Immobilisierung des Liganden zu ermöglichen, muss das Trägermaterial über funktionelle Gruppen verfügen, die eine Derivatisierung erlauben. Das Trägermaterial sollte außerdem chemisch sowie physikalisch stabil sein, um z.B. den Bedingungen bei der Derivatisierung, hydrodynamischem Stress in gepackten Säulen oder eventuellem Autoklavieren standzuhalten. Über die genannten Eigenschaften verfügt beispielsweise quervernetzte Agarose, die deshalb häufig als Trägermaterial in der Affinitätschromatographie eingesetzt wird. Neben Agarose werden auch Cellulose, quervernetzte Dextrane und Polyacrylamide verwendet.

### 3.2.3 Spacer

Insbesondere bei der Verwendung von niedermolekularen immobilisierten Liganden ist die Adsorption des Gegenliganden häufig aufgrund sterischer Gegebenheiten verringert, während derartige Phänomene bei höhermolekularen Liganden seltener beobachtet werden. Durch die Einführung eines Spacers zwischen Ligand und Trägermaterial können solche sterischen Probleme vermindert werden. Als Spacer werden z.B. lineare Kohlenwasserstoffketten oder Polyoxyethylenketten verwendet, die über endständige funktionelle Gruppen mit dem Trägermaterial bzw. dem Liganden verknüpft werden. Ein Nachteil der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten stellt das eventuelle Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen dar. Diese treten bei hydrophileren Polyoxyethylenketten seltener auf. Da Vorhersagen über die Eignung eines Spacers für eine bestimmte Methode schwierig sind, empfiehlt es sich, die Auswahl eines geeigneten Spacers empirisch zu ermitteln.

### 3.2.4 Liganden

Substanzen, die als immobilisierte Liganden in der Affinitätschromatographie Verwendung finden sollen, müssen über bestimmte Eigenschaften verfügen. Die Kompatibilität des Liganden mit den im Kupplungsprozess verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln muss gewährleistet sein. Außerdem müssen die Liganden in der Lage sein, spezifische reversible Komplexe mit den zu isolierenden Gegenliganden zu formen. Die Dissoziation des gebildeten Komplexes sollte durch eine einfache Veränderung des Mediums, z.B. dessen pH-Wert, und ohne irreversible Veränderung der zu isolierenden Substanz bzw. des immobilisierten Liganden möglich sein. Des Weiteren muss der Ligand über mindestens eine funktionelle Gruppe (z.B. Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Thiol- oder Aldehydgruppe) verfügen, die eine Immobilisierung an Trägermaterialien erlaubt. Diese funktionelle Gruppe darf nicht essentiell für die Bildung des Komplexes mit dem Gegenliganden sein.

### **3.2.5 Immobilisierung von Liganden**

Die Immobilisierung von Liganden verläuft normalerweise in drei Schritten. Zuerst muss das Trägermaterial aktiviert werden, um gegenüber den funktionellen Gruppen des Liganden reaktiv zu sein. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Kupplung des Liganden mit dem Trägermaterial. Um unspezifische Wechselwirkungen zu vermindern, werden dann im letzten Arbeitsgang verbliebene aktivierte Gruppen des Trägermaterials deaktiviert. Die Immobilisierung des Liganden kann entweder direkt an dem Trägermaterial erfolgen, oder das Trägermaterial wird zuerst mit einem Spacer versehen, an den der Ligand nachfolgend geknüpft wird.

### 3.3 Proteinidentifizierung

#### 3.3.1 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)<sup>53</sup>

Durch SDS-PAGE lassen sich Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekularmassen trennen. Die Methode beruht auf einer Kombination aus thermischer und Tensid-induzierter Denaturierung der zu trennenden Proteine und anschließender Gelelektrophorese. Das Tensid Natriumlaurylsulfat lagert sich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an die Proteine an. Infolgedessen wird die Quartär- bis Sekundärstruktur aufgebrochen und es entstehen Partikel mit nahezu konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Eine weitere Aufspaltung der Proteine erfolgt durch Zerstörung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken durch Zusatz von Reduktionsmitteln, wie z.B. Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die negativ geladenen Proteine wandern in Abhängigkeit ihrer relativen Molekularmasse innerhalb des Gels von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Zur Bestimmung der relativen Molekularmasse eines Proteins vergleicht man die zu einer bestimmten Zeit relativ zur Elektrophoresefront zurückgelegte Wanderungstrecke ( $R_f$ -Wert) mit den  $R_f$ -Werten bekannter Proteine, den sog. Markerproteinen. Diese Proteine definierter Molekularmassen werden bei jeder Gelelektrophorese als Standard in eine der Geltaschen des Polyacrylamid-Gels injiziert. Aus der Darstellung der Beziehung  $R_f=f(\lg M_r)$  lassen sich die Molekularmassen unbekannter Proteine ableiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sog. Laemmli-System verwendet. Dabei erfolgt die Trennung der Proteine durch SDS-PAGE unter Verwendung eines bestimmten Gradientensystems, bei dem neben der Polyacrylamidkonzentration und der Pufferkonzentration auch der pH-Wert verändert wird. Das Polyacrylamid-Gel besteht dabei aus zwei unterschiedlich zusammengesetzten Gel-Phasen, dem „spacer gel“ und dem „separating gel“. Durch die Gradiententechnik lassen sich Proteine mit stark unterschiedlichen Molekularmassen gut trennen, da die durchschnittlichen Laufgeschwindigkeiten der einzelnen Proteinspezies nicht zu stark differieren. Proteine mit niedrigeren Molekularmassen weisen dabei eine höhere Laufgeschwindigkeit auf als Proteine mit höheren Molekularmassen.

### 3.3.2 Färbemethoden<sup>54</sup>

Die mittels Gelelektrophorese getrennten Proteine lassen sich durch unterschiedliche Färbemethoden visualisieren. Zuvor müssen jedoch die Proteinbanden im Gel fixiert werden, um Diffusionsvorgänge und damit eine Verbreiterung der Banden zu verhindern. Die Fixierung der Proteinbanden erfolgt durch Inkubation des Polyacrylamid-Gels mit z.B. einem Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch oder nach einer von Steck<sup>55</sup> beschriebenen Methode unter Zusatz von Formaldehyd. Die Fixierung erfolgt dabei durch Denaturierung und Fällung der Proteine.

Eine gängige Anfärbemethode stellt die Silberfärbung dar. Dabei kommt es zur Komplexbildung der Silberionen mit den Proteinen. Anschließend werden die Silberionen mit Formaldehyd im alkalischen Milieu zu elementarem Silber reduziert. Dabei entstehen je nach Reaktionsbedingungen braun-orange bis schwarze Banden. Durch die Methode lassen sich noch sehr geringe Konzentrationen an Proteinen nachweisen, die Nachweisgrenze liegt bei 5-30 ng pro 0.5 cm Bande.

Eine in der Durchführung sehr einfache Färbemethode stellt die Amidoschwarz-Färbung dar. Die Empfindlichkeit der Methode ist geringer als die der Silberfärbung. Das Prinzip der Färbemethode beruht auf Komplexbildung der Proteine mit dem organischen Farbstoff.

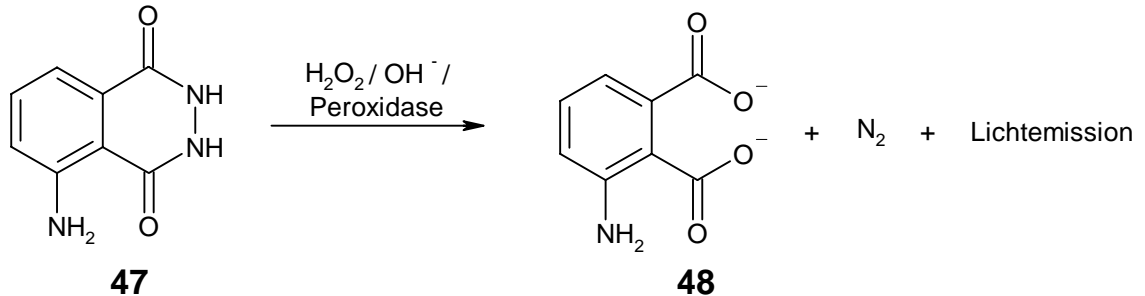
### 3.3.3 Western Blot<sup>56</sup>

Eine gängige Methode zur Identifizierung von Proteinen stellt der Western Blot dar. Zur Durchführung des Western Blots werden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Da Nitrocellulose über eine starke Bindungsaffinität für Proteine im Allgemeinen verfügt, müssen zur Erhöhung der Spezifität verbleibende potentielle Proteinbindungsstellen mit unspezifischen Proteinen gesättigt werden. Dafür werden z.B. Gelatine, Rinderserumalbumin oder fettarme Milch verwendet. Western Blot-Analysen basieren auf der hohen Spezifität von Antikörper-Antigen-Bindungen. In einem ersten Reaktionsschritt wird die Nitrocellulose-Membran mit einem für das zu analysierende Protein spezifischen primären Antikörper inkubiert. Die spezifischen Antikörper werden gewonnen, indem das zu detektierende Protein



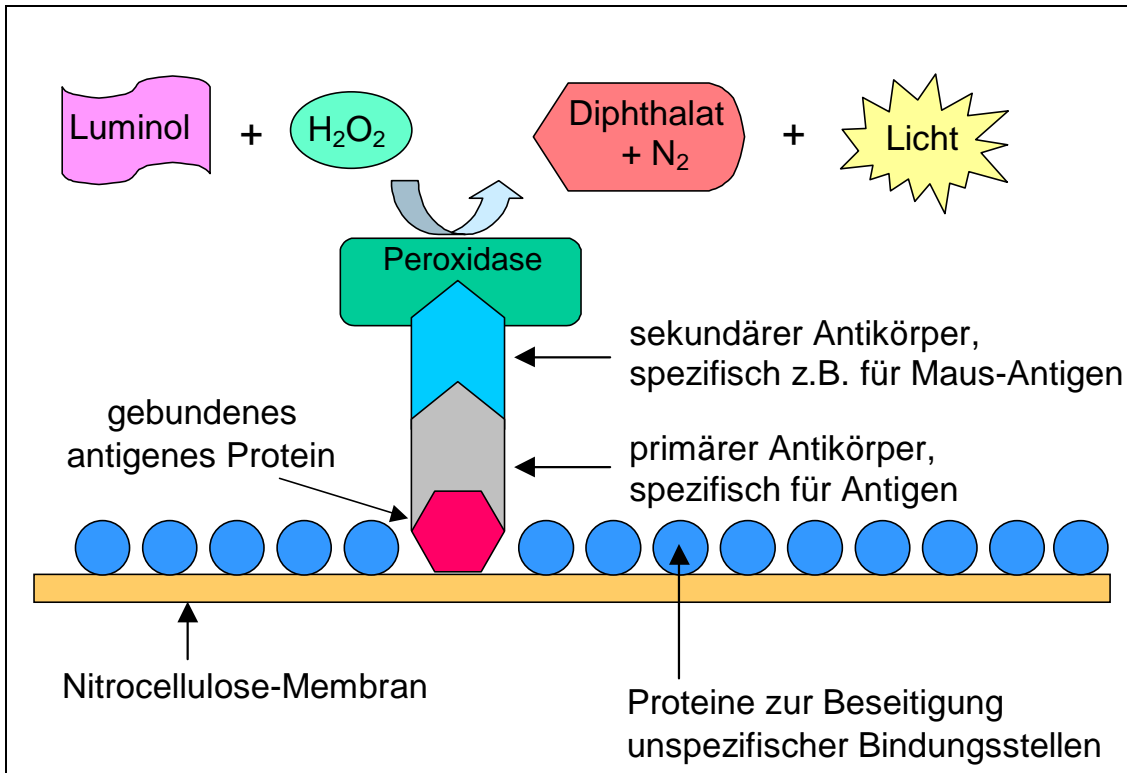
Kaninchen oder Mäusen injiziert wird. Das Immunsystem des behandelten Tieres reagiert auf das Fremdprotein mit der Bildung spezifischer Antikörper, die aus dem Tiereserum isoliert werden können. Die mit diesem primären Antikörper behandelte Nitrocellulosemembran wird anschließend mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an Antikörper einer bestimmten Tierart. Wurde der primäre Antikörper z.B. aus Mäuseserum gewonnen, so wird ein sekundärer anti-Maus-Antikörper verwendet. An den sekundären Antikörper ist zusätzlich ein physiko-chemischer Marker gekuppelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, an die eine Peroxidase gebunden ist. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol (**47**) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in alkalischem Milieu. Dabei kommt es neben der Bildung von entsprechendem Diphthalat **48** und Stickstoff zu einer Lichtemission, die durch Zusatz von Phenolen noch erheblich verstärkt wird (Schema 3-1 und Abb. 3-2).

Schema 3-1:



Diese Chemilumineszenz wird bei dieser Methode zur Detektion der Proteinbanden ausgenutzt. Dazu wird ein Film über die Nitrocellulose gelegt, welcher über die Lichtemission der durch die Peroxidase katalysierten Reaktion belichtet wird. Die spezifische Erkennung der antigenen Proteine auf der Nitrocellulose durch den primären Antikörper führt im Endeffekt zur Bildung schwarzer Banden auf dem Film.

Abb. 3-2: Detektion antigener Proteine durch Western Blot



### 3.4 Affinitätsuntersuchungen mit 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid

#### 3.4.1 Auswahl eines geeigneten Trägermaterials

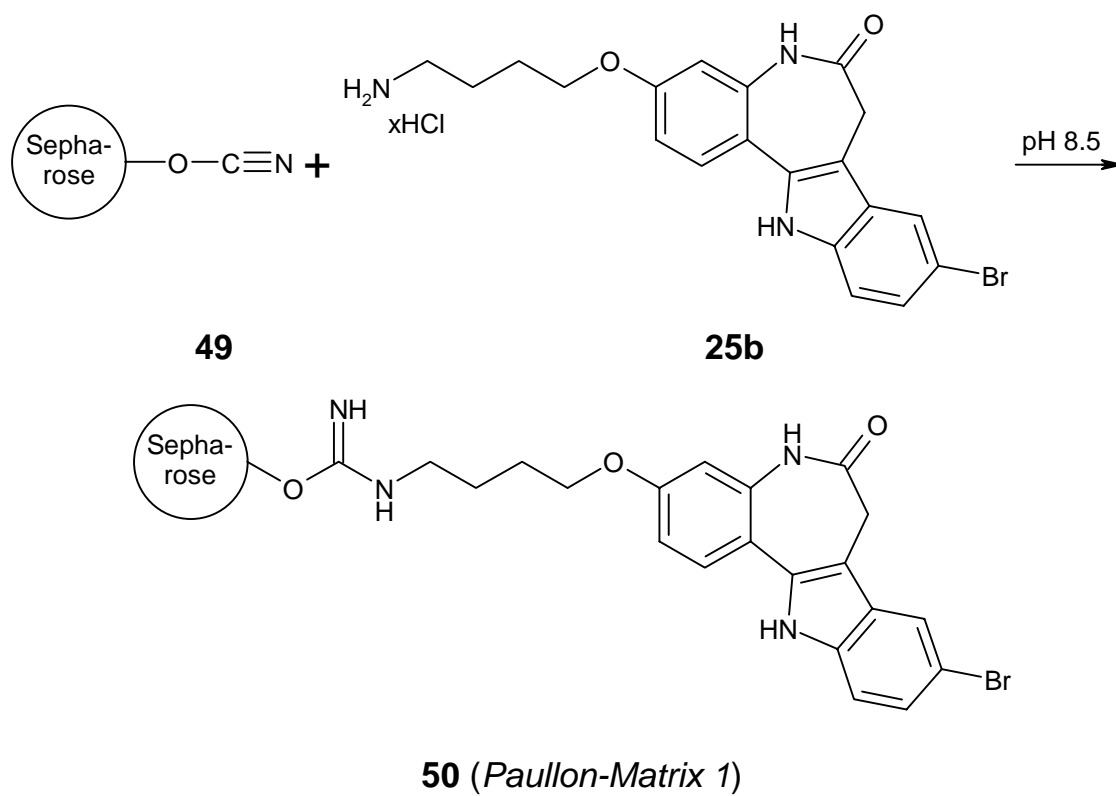
Zur Ermittlung eines für die nachfolgend beschriebenen Versuche idealen Trägermaterials wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche Trägermaterialien getestet. Sämtliche Trägermaterialien waren in aktiviertem Zustand erhältlich, so dass die Aktivierung des Trägermaterials entfiel. Die vier Trägermaterialien unterschieden sich hauptsächlich in der Art der Aktivierung und durch die An- bzw. Abwesenheit eines Spacers. Verwendet wurden eine Cyanobromid-aktivierte Sepharose **49**, eine Ester-aktivierte Agarose **51**, eine mit einem zwölffatomigen Spacer versehene Epoxy-aktivierte Sepharose **53** sowie eine Carbonyldiimidazol-aktivierte Agarose **55**.

##### 3.4.1.1 Immobilisierung des Paullons

Die Immobilisierung des Paullons **25b** an den verschiedenen Trägermaterialien erfolgte nach einem einheitlichen Schema. Das in Kupplungspufferlösung suspendierte aktivierte Trägermaterial wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit einer 1 mM Lösung des Paullons in DMSO inkubiert. Dabei erwiesen sich 400 µmol Paullon pro ml Trägermaterial-Suspension (s. Experimententeil) als günstig. Bei der Verwendung von niedrigeren Paullon-Konzentrationen während der Kupplungsreaktion binden die Proteine in den anschließenden Affinitätsuntersuchungen schlechter an die Matrix (Abb. 3-3 und Abb. 3-4). Bei höheren Konzentrationen kommt es hingegen zur Niederschlagsbildung während der Kupplungsreaktion. Nach der Kupplung noch vorhandene aktivierte Gruppen des Trägermaterials wurden anschließend mit Ethanolamin deaktiviert. Die bei der Immobilisierung des Paullons an die verschiedenen Trägermaterialien ablaufenden Reaktionen sind in den Schemata 3-2 bis 3-5 zusammengefasst.

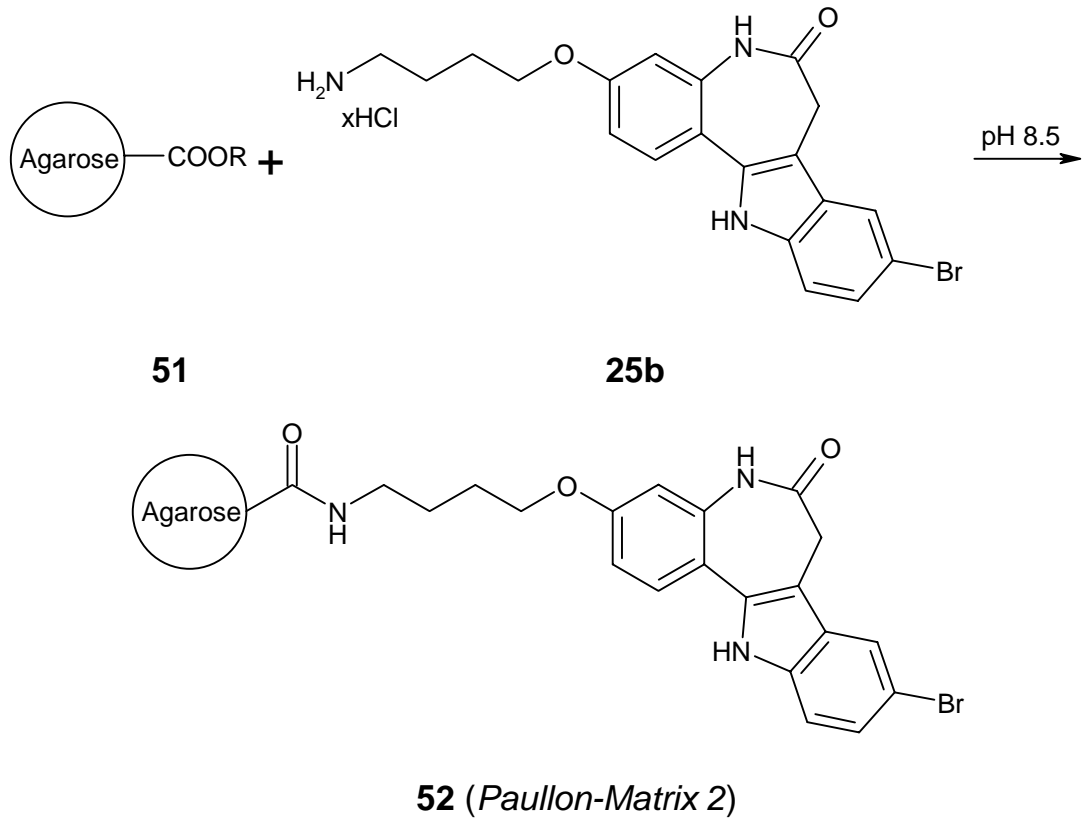
In Schema 3-2 ist die Immobilisierung durch Reaktion der primären Aminofunktion des Paullons **25b** mit der Cyanat-Gruppe des Trägermaterials **49** zum Isoharnstoffderivat **50** dargestellt.

Schema 3-2:



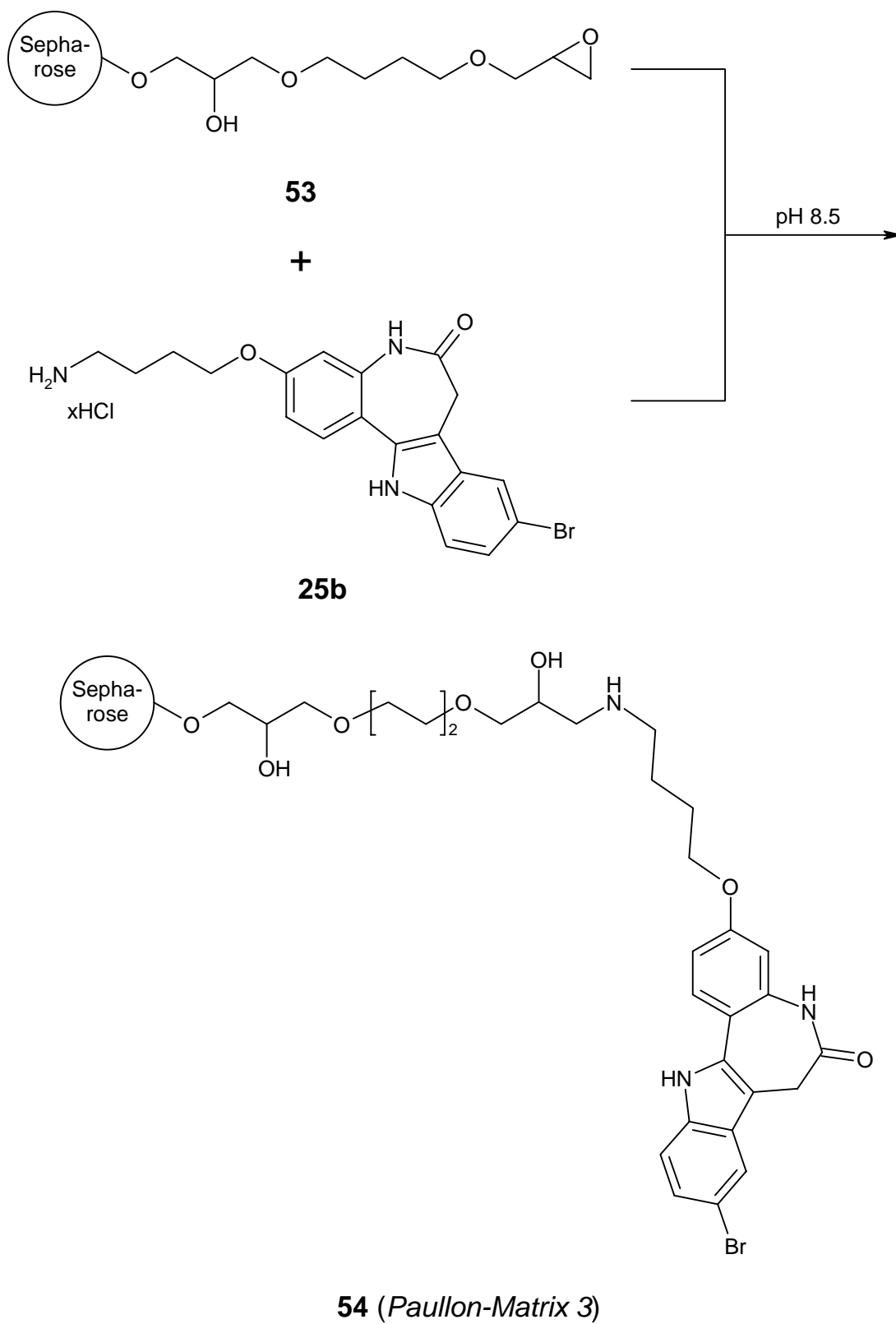
Schema 3-3 zeigt die Verknüpfung des Paullons **25b** mit dem Ester des Trägermaterials **51** unter Bildung des Amids **52**.

Schema 3-3:



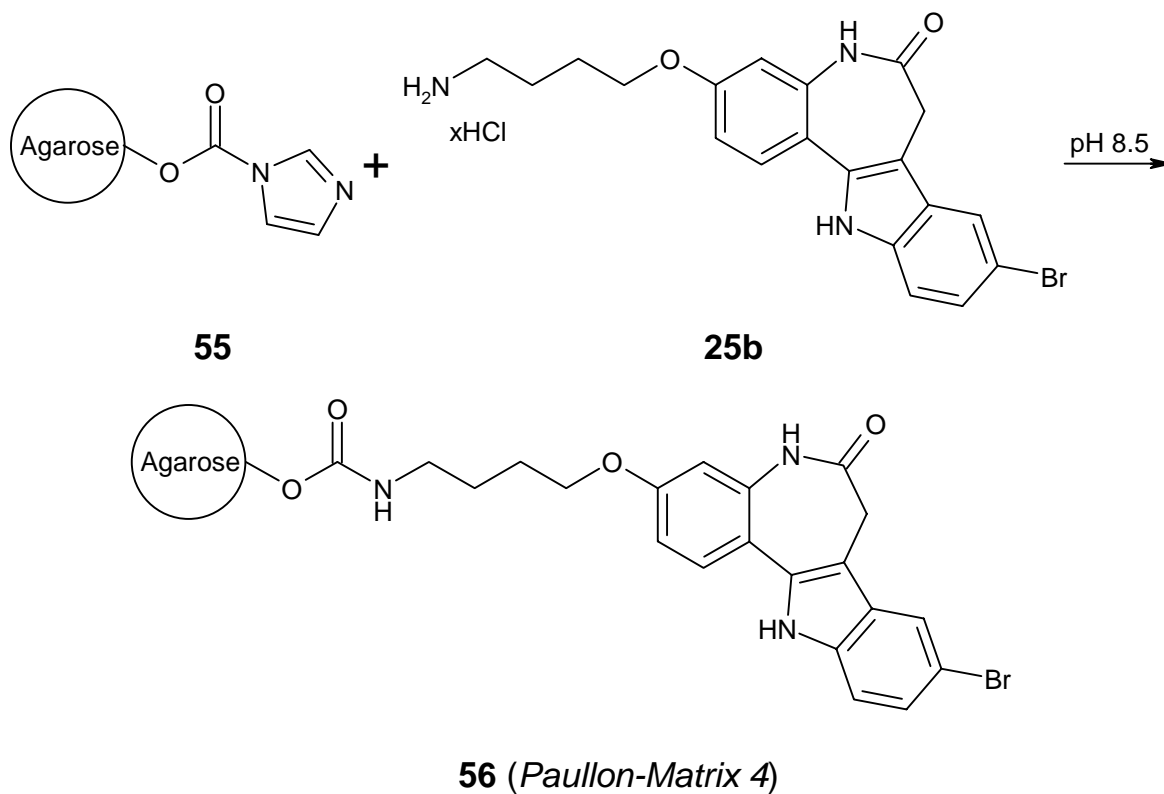
In Schema 3-4 erfolgt die Immobilisierung durch einen nukleophilen Angriff der primären Aminofunktion des Paullons **25b** an der Epoxygruppe des Trägermaterials **53** unter Bildung des sekundären Amins **54**.

## Schema 3-4:



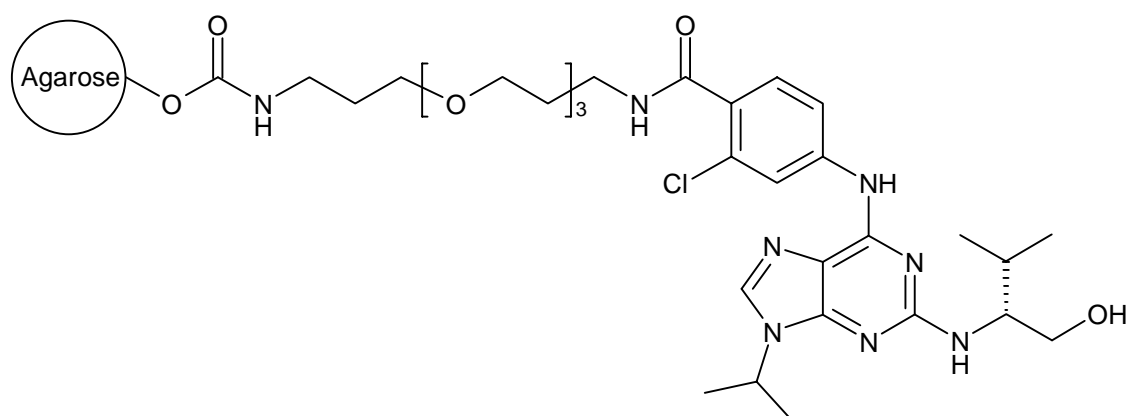
Die im Schema 3-5 dargestellte Kupplung des Paullons **25b** mit der mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol-aktivierten Agarose **55** erfolgte unter Bildung des Urethans **56**.

Schema 3-5:

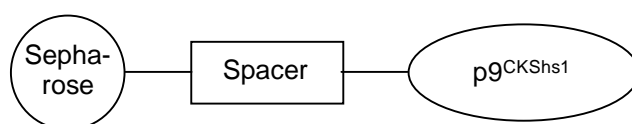


### 3.4.1.2 Referenzmatrices

Im Rahmen der durchgeführten Affinitätsuntersuchungen wurden zu Vergleichszwecken drei verschiedene Referenz-Matrices verwendet, die sich durch eine hohe Affinität zu bestimmten Proteinen auszeichnen. Als Referenzmatrix **57** diente Agarose mit daran immobilisiertem Purvalanol B (**3b**). Purvalanol B gehört zu einer Substanzklasse von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen. Dieses so immobilisierte Purvalanol B weist u.a. eine hohe Affinität zu CDK1 und CDK2 auf.<sup>57</sup> Als zweite Referenzmatrix **58** wurde eine Sepharose-Matrix mit immobilisiertem Protein  $p9^{CKShs1}$  verwendet.  $p9^{CKShs1}$  ist ein Protein mit großer Affinität zu CDK1/Cyclin B. Als dritte Referenzmatrix **59** wurde an Sepharose gekoppeltes Axin verwendet. Axin ist ein Protein mit hoher Affinität zu GSK-3. Die Referenzmatrices wurden nach publizierten Methoden hergestellt und vom Arbeitskreis Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) für die nachfolgend beschriebenen Affinitätsuntersuchungen zur Verfügung gestellt.<sup>57,58</sup>

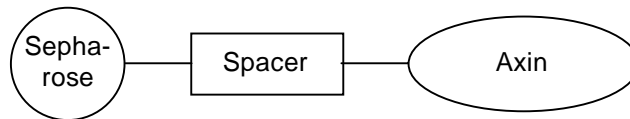


**57** (Purvalanol-Matrix)



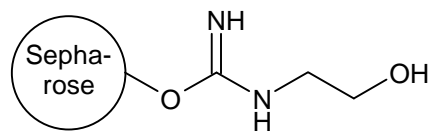
**58** ( $p9^{CKShs1}$ -Matrix)



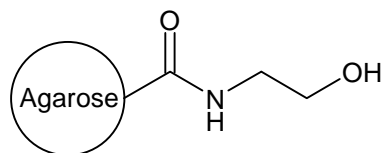


**59** (*Axin-Matrix*)

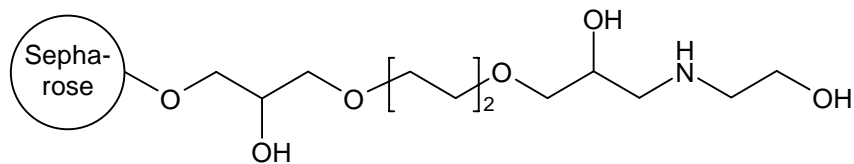
Als Blindproben wurden die Matrizes **60-63** verwendet, die anstelle des Paullons mit Ethanolamin behandelt worden waren.



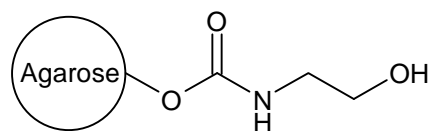
**60** (*Ethanolamin-Matrix 1*)



**61** (*Ethanolamin-Matrix 2*)



**62** (*Ethanolamin-Matrix 3*)



**63** (*Ethanolamin-Matrix 4*)

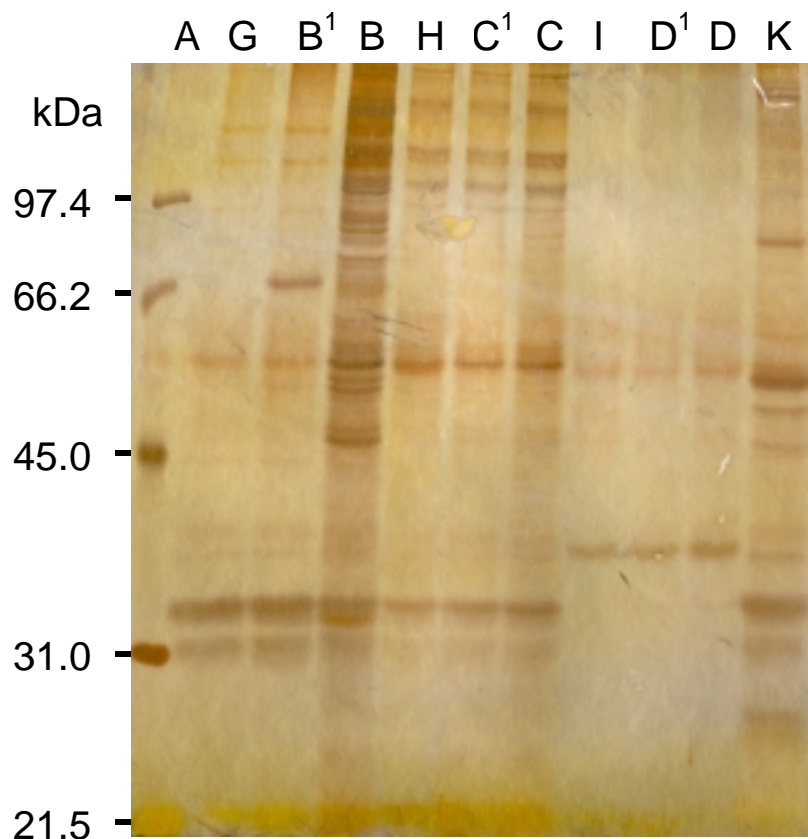
### 3.4.1.3 Inkubation mit Extrakten

Die *Paullon-Matrices 1-4* wurden zum einen mit Seesternocytenextrakt und zum anderen mit Schweinehirnextrakt inkubiert. Seesternocyten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an CDK1 und CDK2 aus. Die in diesem Versuch verwendeten Seesternocyten befanden sich in der Metaphase des Zellzyklus. In der Metaphase liegt CDK1 in seiner aktivierten Form vor. Als Referenzmatrices kamen bei diesem Versuch die *Purvalanol-Matrix* sowie das an Sepharose immobilisierte  $p9^{CKShs1}$  zum Einsatz.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Silberfärbung. Es zeigte sich, dass an die *Paullon-Matrix 1* eine Vielzahl von Proteinen gebunden hatte, während bei den *Paullon-Matrices 2 und 3* kein Unterschied zu den als Blindprobe verwendeten *Ethanolamin-Matrices 2 und 3* feststellbar war. Anhand des Ergebnisses der Silberfärbung (Abb. 3-3) ließ sich daher bei den *Matrices 1-3* zunächst kein weiteres Targetprotein als Bindungspartner des Paullons **25b** identifizieren. Deshalb wurde durch Western Blot-Analysen untersucht, ob eine Bindung Cyclin-abhängiger Kinasen stattgefunden hatte. Die mit spezifischen Antikörpern für CDK1/CDK2 und CDK5 durchgeführten Tests ergaben jedoch, dass für keine der genannten Cyclin-abhängigen Kinasen eine Affinität zum immobilisierten Paullon nachgewiesen werden konnte.

Abb. 3-3: Silberfärbung nach Inkubation mit Seesternoocytenextrakt

### Seesternoocytenextrakt

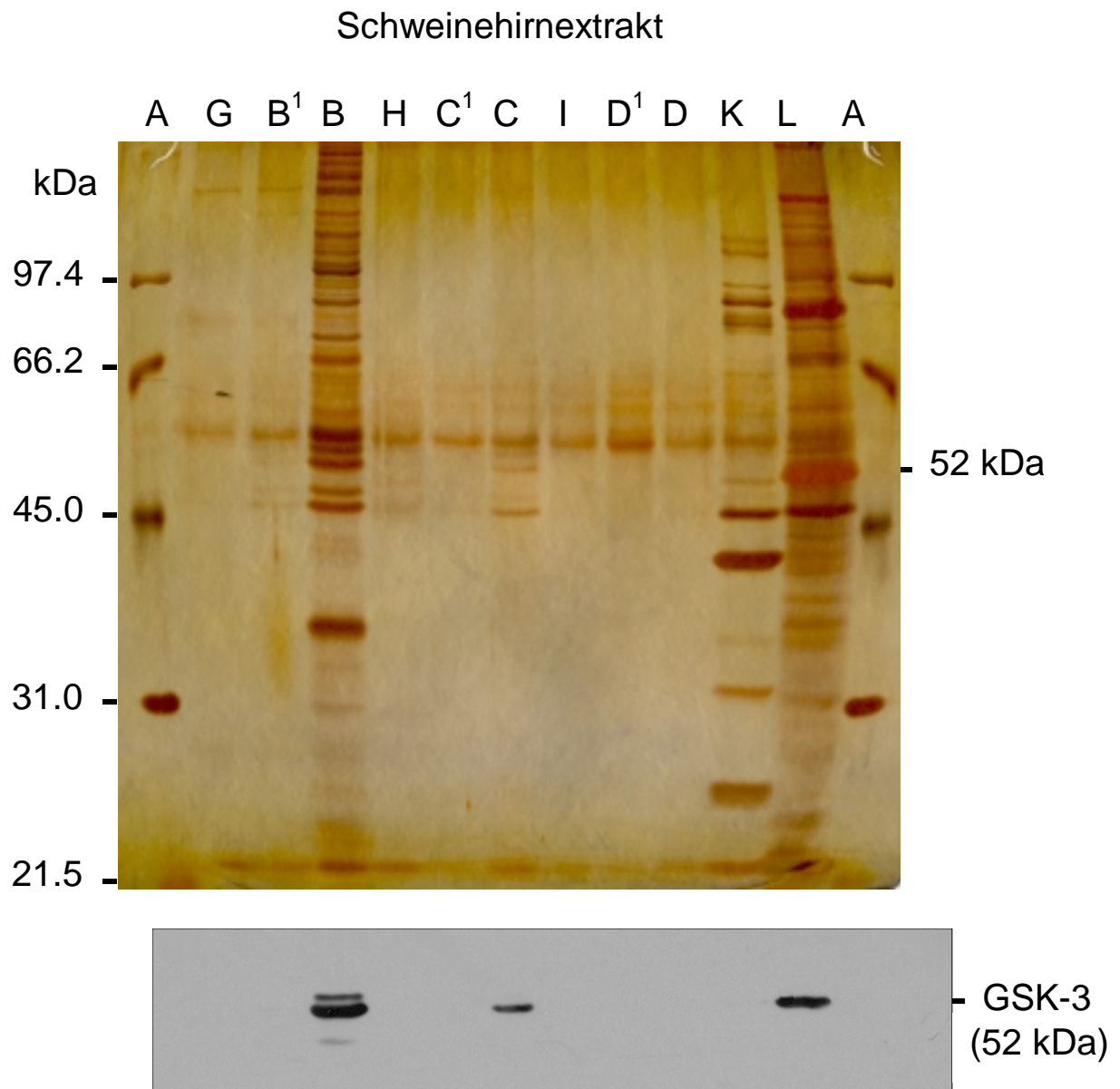


<sup>1</sup> Immobilisierung erfolgte unter Verwendung von 40  $\mu$ mol Paullon pro ml Trägermaterial-Suspension.

A:	Molekularmassenmarker	G:	<i>Ethanolamin-Matrix 1</i>
B:	<i>Paullon-Matrix 1</i>	H:	<i>Ethanolamin-Matrix 2</i>
C:	<i>Paullon-Matrix 2</i>	I:	<i>Ethanolamin-Matrix 3</i>
D:	<i>Paullon-Matrix 3</i>	K:	<i>Purvalanol-Matrix</i>

Die Matrices wurden in einem zweiten Versuch mit einem Extrakt aus Schweinehirn inkubiert, das hohe Konzentrationen an CDK5 aufweist. Hier wurde ebenfalls die *Purvalanol-Matrix* als Referenzmatrix verwendet. Bei der *Paullon-Matrix 2* konnte nach Inkubation des Schweinehirnextraktes und anschließender Silberfärbung eine schwache Proteinbande mit einer Molekularmasse von 52 kDa detektiert werden (Abb. 3-4).

**Abb. 3-4:** Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit Schweinehirnextrakt



<sup>1</sup> Immobilisierung erfolgte unter Verwendung von 40  $\mu$ mol Paullon pro ml Trägermaterial-Suspension.

- |                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|
| A: Molekularmassenmarker       | H: <i>Ethanolamin-Matrix 2</i> |
| B: <i>Paullon-Matrix 1</i>     | I: <i>Ethanolamin-Matrix 3</i> |
| C: <i>Paullon-Matrix 2</i>     | K: <i>Purvalanol-Matrix</i>    |
| D: <i>Paullon-Matrix 3</i>     | L: <i>Axin-Matrix</i>          |
| G: <i>Ethanolamin-Matrix 1</i> |                                |

Um das zugehörige Protein zu identifizieren, war es naheliegend, nach Proteinen zu recherchieren, die eine hohe Homologie zu Cyclin-abhängigen Kinasen aufweisen. Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase mit einer großen Übereinstimmung mit Cyclin-abhängigen Kinasen. GSK-3 weist zwei verschiedenen Isoformen auf, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Western Blot-Untersuchungen ergaben, dass es sich bei der 52 kDa-Proteinbande tatsächlich um GSK-3 handelt. Als Referenzmatrix wurde hierbei immobilisiertes Axin verwendet, das eine hohe Affinität zu GSK-3 aufweist (Abb. 3-4).

Der Western Blot zeigte, dass GSK-3 auch eine Affinität zu der *Paullon-Matrix 1* aufweist.

Dagegen konnte bei der *Paullon-Matrix 3* GSK-3 mittels Western Blot nicht detektiert werden. Diese Matrix zeigte auch bei der Silberfärbung keine Unterschiede in Anzahl und Intensität der Proteinbanden im Vergleich zu der als Blindprobe verwendeten *Ethanolamin-Matrix 3*.

Auf der Grundlage dieses Befundes wurde nun auch die *Paullon-Matrix 4* mittels Western Blot auf gebundene GSK-3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch an der *Paullon-Matrix 4* GSK-3 nachgewiesen werden konnte, wobei die entsprechende Proteinbande sogar deutlich stärker als bei der *Paullon-Matrix 2* ausgeprägt war.

Die nachfolgend in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Versuche wurden alle mit Carbonyldiimidazol-aktivierter Agarose als Trägermaterial durchgeführt. Die aus diesem Trägermaterial synthetisierte *Paullon-Matrix 4* zeichnete sich durch weniger unspezifische Proteinbindungen im Vergleich mit den *Paullon-Matrices 1* und *2* aus.

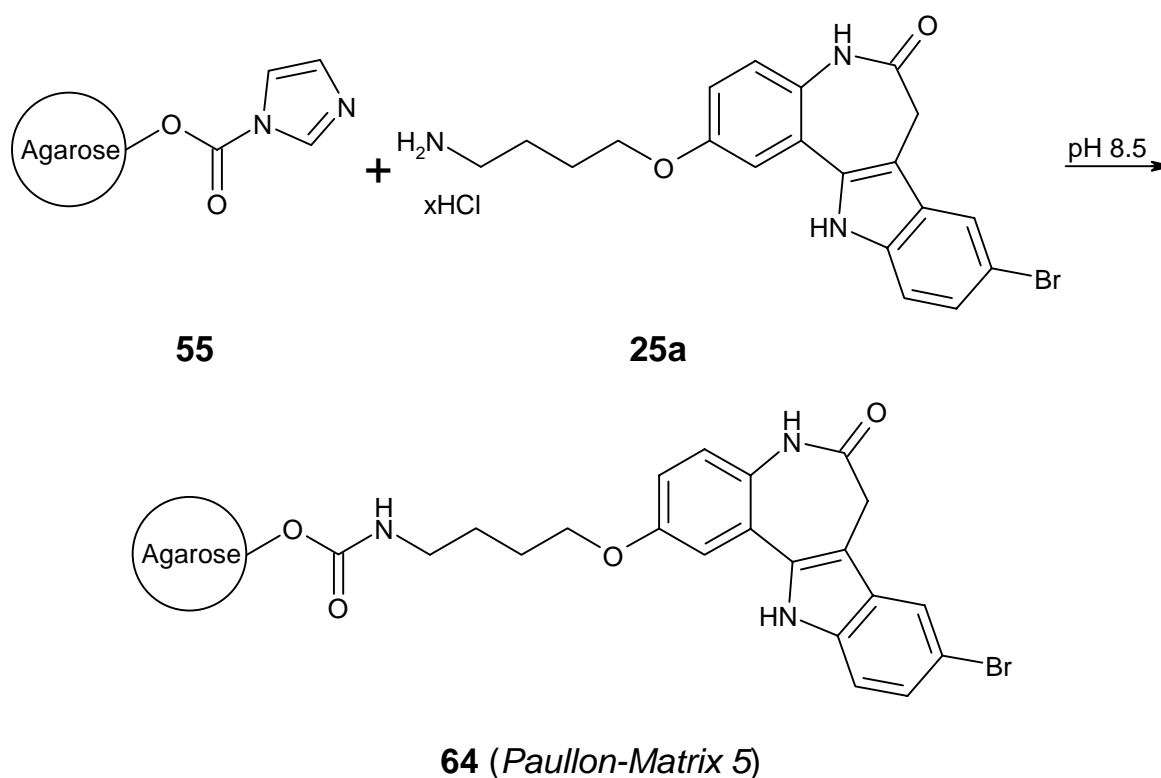
### 3.4.2 Affinitätsuntersuchungen mit 2-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on-Hydrochlorid

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Affinitätsuntersuchungen unter Verwendung von 2-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on-Hydrochlorid (**25a**) als Liganden durchgeführt. Als Trägermaterial wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol-aktivierte Agarose **55** verwendet.

#### 3.4.2.1 Immobilisierung des Paullons

Die in Schema 3-6 dargestellte Immobilisierung des Paullons **25a** an das mit 1,1'-Carbonyldiimidazol-aktivierte Trägermaterial **55** erfolgte unter Bildung des Urethans **64**. Nach der Kupplung noch vorhandene aktivierte Gruppen des Trägermaterials wurden anschließend mit Ethanolamin deaktiviert.

Schema 3-6:



### 3.4.2.2 Inkubation mit Extrakten

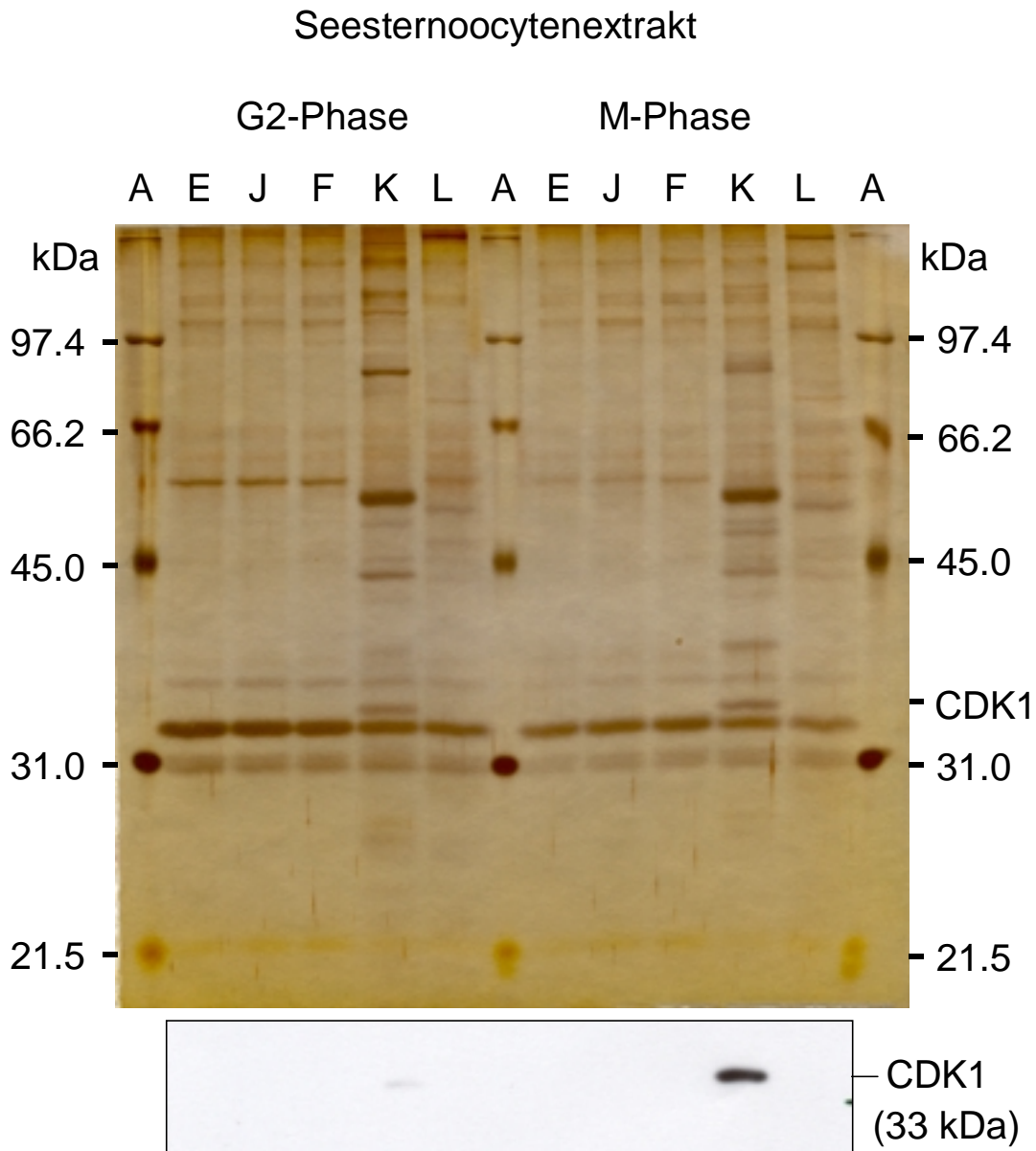
Die mit dem Paullon **25a** gekuppelte *Paullon-Matrix 5* wurde ebenfalls mit verschiedenen Zell- und Gewebeextrakten inkubiert. Dabei wurden Seesternoozyten-, Schweinehirn-, Seeigeloocyten- und diverse Rattengewebeextrakte sowie Zellen der Hamsterzelllinie CCL 39 verwendet.

Die nach Inkubation der *Paullon-Matrix 5* mit den verschiedenen Extrakten, Denaturierung der gebundenen Proteine und gelelektrophoretischer Auftrennung erhaltenen Gele zeigten nach erhaltenen Silberfärbungen deutlich weniger unspezifische Proteinbindungen als bei der Verwendung von 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (**25b**) als immobilisiertem Paullon (*Paullon-Matrices 1-4*).

Zuerst wurden zwei verschiedene Seesternoozytenextrakte verwendet. Seesternoozyten enthalten hohe Konzentrationen an CDK1 und CDK2. Der eine Extrakt wurde aus sich in der G2-Phase des Zellzyklus befindlichen Seesternoozyten gewonnen, während der andere Extrakt aus sich in der M-Phase des Zellzyklus befindlichen Seesternoozyten erhalten wurde. Der Unterschied der beiden Extrakte besteht im Aktivierungszustand von CDK1. In der G2-Phase liegt CDK1 größtenteils in seiner inaktiven Form vor, während es in der M-Phase aktiviert ist. Der Aktivierungszustand des Enzyms kann einen Einfluss auf das Bindungsvermögen von Substanzen haben. So vermag z.B. Purvalanol B (**3b**) nur die aktive Form der CDK1 zu inhibieren.

Nach Inkubation mit den genannten Seesternoozytenextrakten zeigte die in Abb. 3-5 dargestellte Silberfärbung keine Unterschiede zwischen der *Ethanolamin-Matrix 4* und den beiden *Paullon-Matrices 4* und *5*, während das als Referenzmatrix verwendete immobilisierte Purvalanol B eine deutliche Bande für CDK1 bei der Behandlung mit M-Phasen-Seesternoozytenextrakt aufweist. Die im vorangegangenen Kap. 3.4.1.3 beschriebenen unspezifischen Proteinbindungen sind weniger stark ausgeprägt, wodurch die Silberfärbung an Aussagefähigkeit gewinnt. Die in diesem Versuch ermittelten Ergebnisse konnten durch Western Blot (Abb. 3-5) unter Verwendung von monoklonalen anti-PSTAIRE Antikörpern verifiziert werden. Anti-PSTAIRE Antikörper binden spezifisch an bestimmte Proteinsequenzen von CDK1 und CDK2.

Abb. 3-5: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit Seesternooocytenextrakt

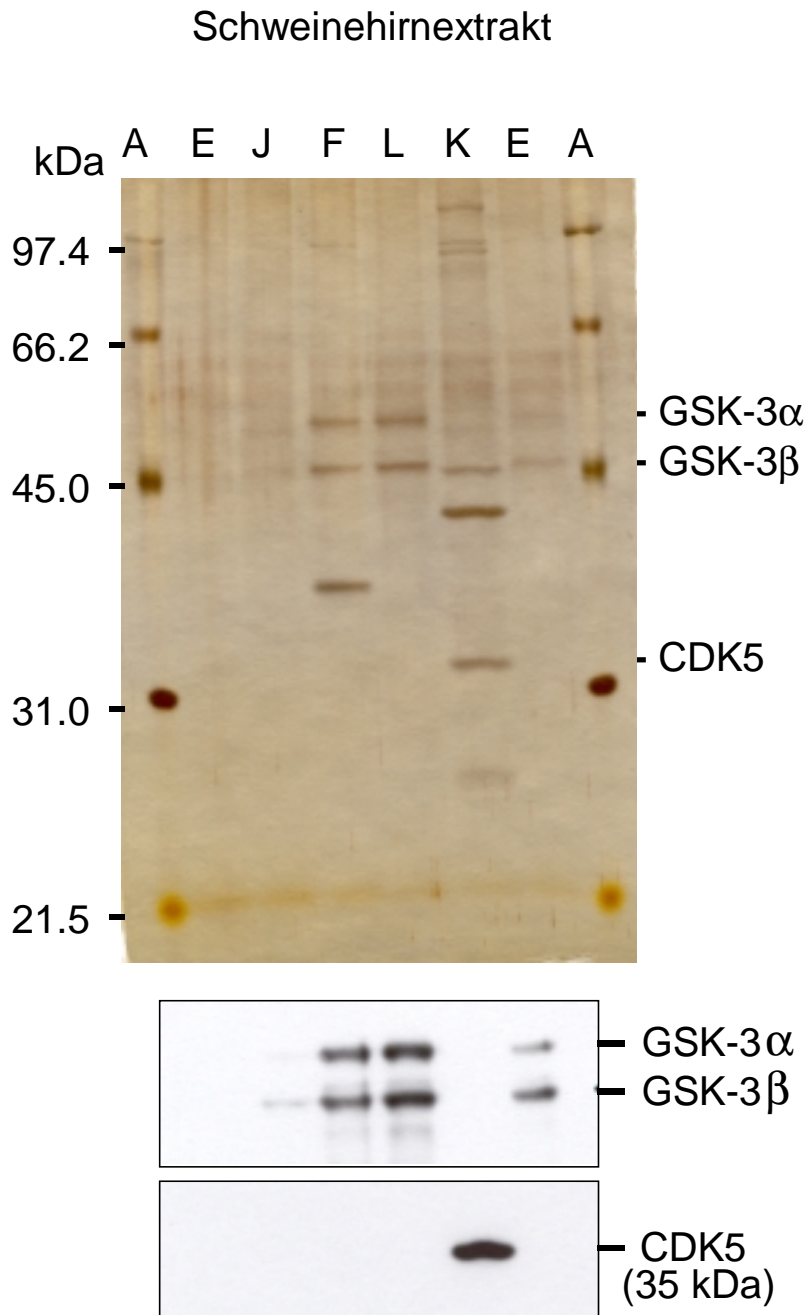


- A: Molekularmassenmarker
- E: *Paullon-Matrix 4*
- F: *Paullon-Matrix 5*
- J: *Ethanolamin-Matrix 4*
- K: *Purvalanol-Matrix*
- L: *Axin-Matrix*



In einem weiteren Versuch wurden die immobilisierten Paullone (*Paullon-Matrices 4* und *5*) mit Schweinehirnextrakt behandelt, der hohe CDK5-Konzentrationen enthält. Da es denkbar schien, dass immobilisiertes 2-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benz-azepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (**25a**) wie das in Kap. 3.4.1.3 beschriebene 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (**25b**) GSK-3 bindet, wurde zum Vergleich jeweils auch die *Axin-Matrix* mit den jeweiligen Zell- und Gewebeextrakten inkubiert. Die in Abb. 3-6 dargestellte Silberfärbung zeigt tatsächlich für die *Paullon-Matrix 5* deutlich zwei mit der *Axin-Matrix* vergleichbare Proteinbanden. Diese Proteinbanden sind bei der *Paullon-Matrix 4* ebenfalls vorhanden, jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt. Mittels Western Blot-Analyse konnten die beiden Proteinbanden als GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  identifiziert werden. Durch Silberfärbung und durch die mit für CDK5 spezifischen polyklonalen anti-CDK5 Antikörpern durchgeführte Western Blot-Analyse war für CDK5 keine Affinität zu den immobilisierten Paullonen nachweisbar. Des Weiteren ließ sich in diesen Untersuchungen mit Schweinehirnextrakt bei Verwendung der *Paullon-Matrix 5* eine Proteinbande bei 37 kDa deutlich detektieren. Die Identität dieser Proteinbande konnte bisher nicht durch Western Blot-Analysen aufgeklärt werden. Das dieser Proteinbande zu Grunde liegende Protein soll daher jetzt durch Mikrosequenzierung identifiziert werden.

Abb. 3-6: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit Schweinehirnextrakt



A: Molekularmassenmarker

E: *Paullon-Matrix 4*

F: *Paullon-Matrix 5*

J: *Ethanolamin-Matrix 4*

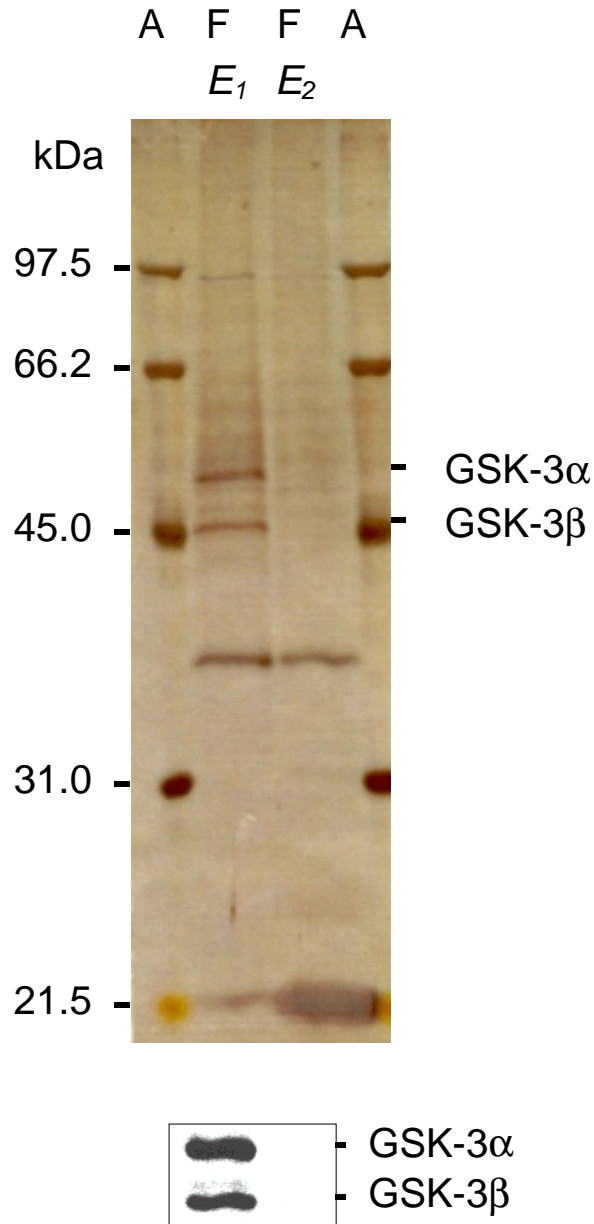
K: *Purvalanol-Matrix*

L: *Axin-Matrix*

In einem weiteren Versuch wurde GSK-3 aus dem Schweinehirnextrakt vor Inkubation der *Paullon-Matrix 5* eliminiert. Dafür wurde der Schweinehirnextrakt auf eine Matrix mit immobilisiertem Axin (*Axin-Matrix*) gegeben, um vorhandene GSK-3 zu entfernen. Axin ist ein Protein mit hoher Affinität zu GSK-3 und daher besonders für diesen Zweck geeignet. Mit Hilfe dieses Versuches sollte festgestellt werden, ob das immobilisierte Paullon (*Paullon-Matrix 5*) bei Abwesenheit von GSK-3 eventuell andere Proteine aus dem Schweinehirnextrakt zu binden vermag. Die in Abb. 3-7 dargestellte Silberfärbung zeigt deutlich, dass keine zusätzliche Bande nach Eliminierung von GSK-3 aus dem Schweinehirnextrakt auftritt. Der ebenfalls in Abb. 4-3 dargestellte Western Blot zeigt, dass das mit dem Axin-behandelten Schweinehirnextrakt versetzte immobilisierte Paullon (*Paullon-Matrix 5*) kein GSK-3 mehr bindet, die Eliminierung von GSK-3 also erfolgreich war.

Abb. 3-7: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit GSK-3-haltigen bzw. GSK-3-freiem Schweinehirnextrakt

GSK-3-haltiger bzw. GSK-3-freier Schweinehirnextrakt

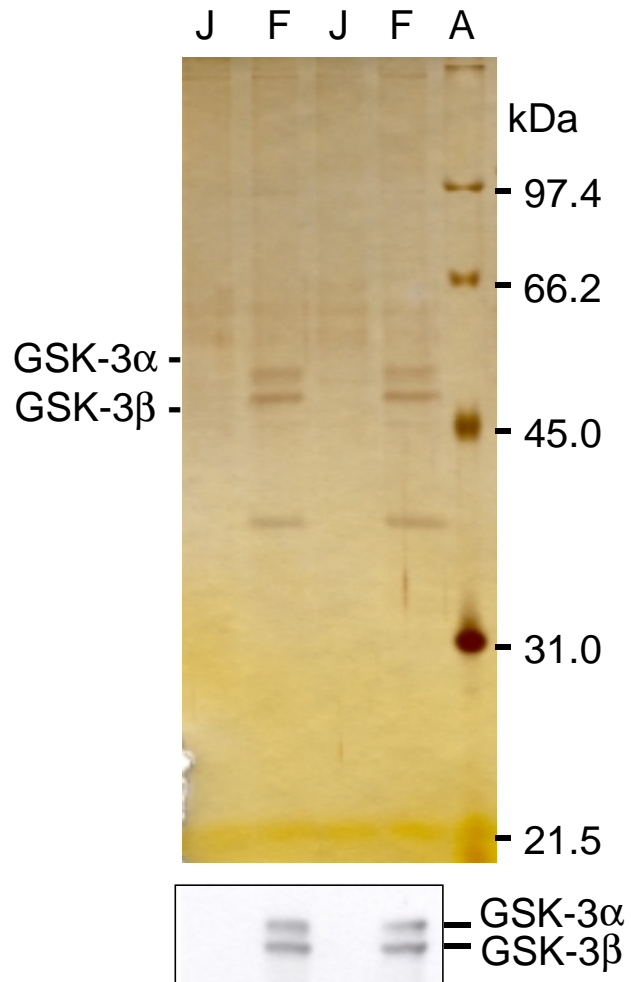


- A: Molekularmassenmarker  
 F: *Paullon-Matrix 5*  
 E<sub>1</sub> GSK-3-haltiger Schweinehirnextrakt  
 E<sub>2</sub> GSK-3-freier Schweinehirnextrakt

In dem nachfolgend beschriebenen Versuch wurden zwei verschiedene Arten Hamsterzellen der Zelllinie CCL 39 verwendet. Zum einen wurde das immobilisierte Paullon (*Paullon-Matrix 5*) mit unbehandelten CCL 39-Zellen inkubiert, und zum anderen wurden mit Nocodazol behandelte Zellen verwendet. Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit Nocodazol führt zu einer Blockade des Zellzyklus zwischen G2 und M-Phase. Dadurch reichern die Zellen vermehrt CDK1/Cyclin B an. Die Silberfärbung in Abb. 3-8 zeigt, dass beide Zellarten drei Hauptbanden aufweisen und kein Unterschied zwischen den beiden Zellarten erkennbar ist. Die beiden Proteinbanden mit der höheren Molekularmasse konnten mittels Western Blot als GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  identifiziert werden. Die Proteinbande bei 37 kDa konnte bisher noch nicht identifiziert werden, weist aber die gleiche Molekularmasse wie das nicht identifizierte Protein des Schweinehirnextraktversuches auf.

Abb. 3-8: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit CCL 39-Zellen

Hamsterzelllinie CCL 39-Extrakt

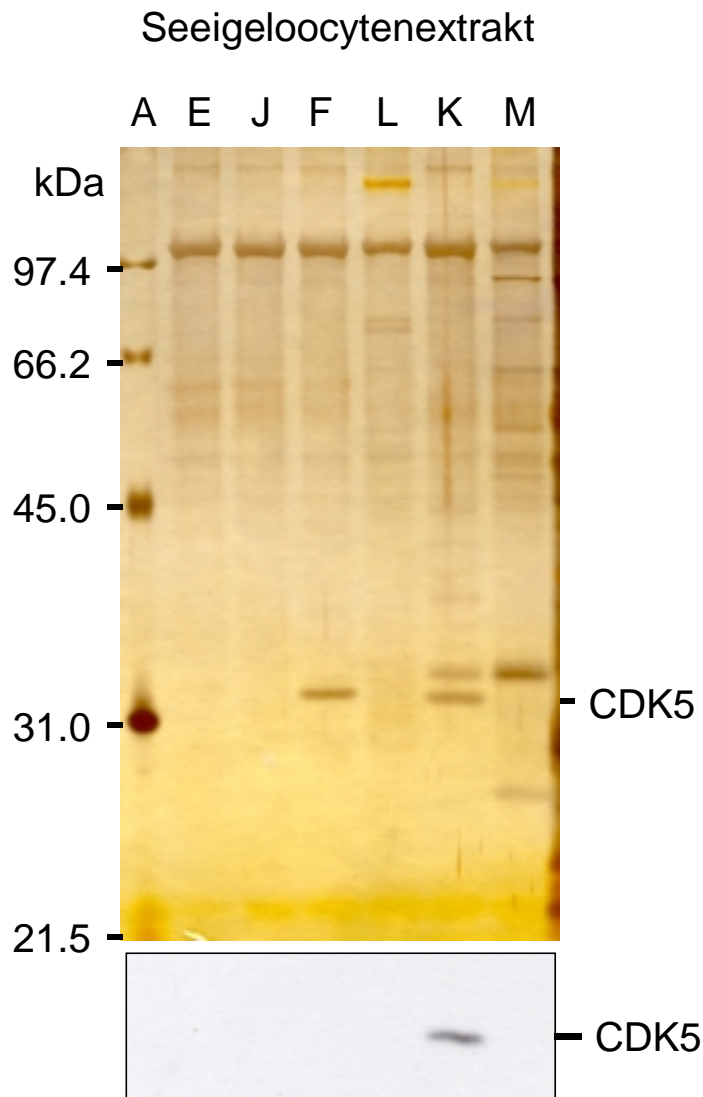


- A: Molekularmassenmarker  
 F: *Paullon-Matrix 5*  
 J: *Ethanolamin-Matrix 4*

Schließlich wurde die *Paullon-Matrix 5* mit einem Extrakt aus unbefruchteten Seeigelocyten behandelt, der relativ hohe Konzentrationen an CDK1 und CDK5 aufweist. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der gebundenen Proteine ergab die Silberfärbung eine Hauptbande, deren Molekularmasse annähernd der von CDK5 entsprach (Abb. 3-9). Der anschließend durchgeführte Western Blot zeigte jedoch, dass es sich bei

diesem Protein nicht um CDK5 handelt, sondern um ein anderes Protein mit großer Affinität zu dem immobilisierten Paullon (*Paullon-Matrix 5*). Die Identifizierung dieses Proteins soll ebenfalls, wie weiter unten beschrieben, durch Mikrosequenzierung der Proteinbande erfolgen.

Abb. 3-9: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) nach Inkubation mit Extrakt aus unbefruchteten Seeigeloocyten



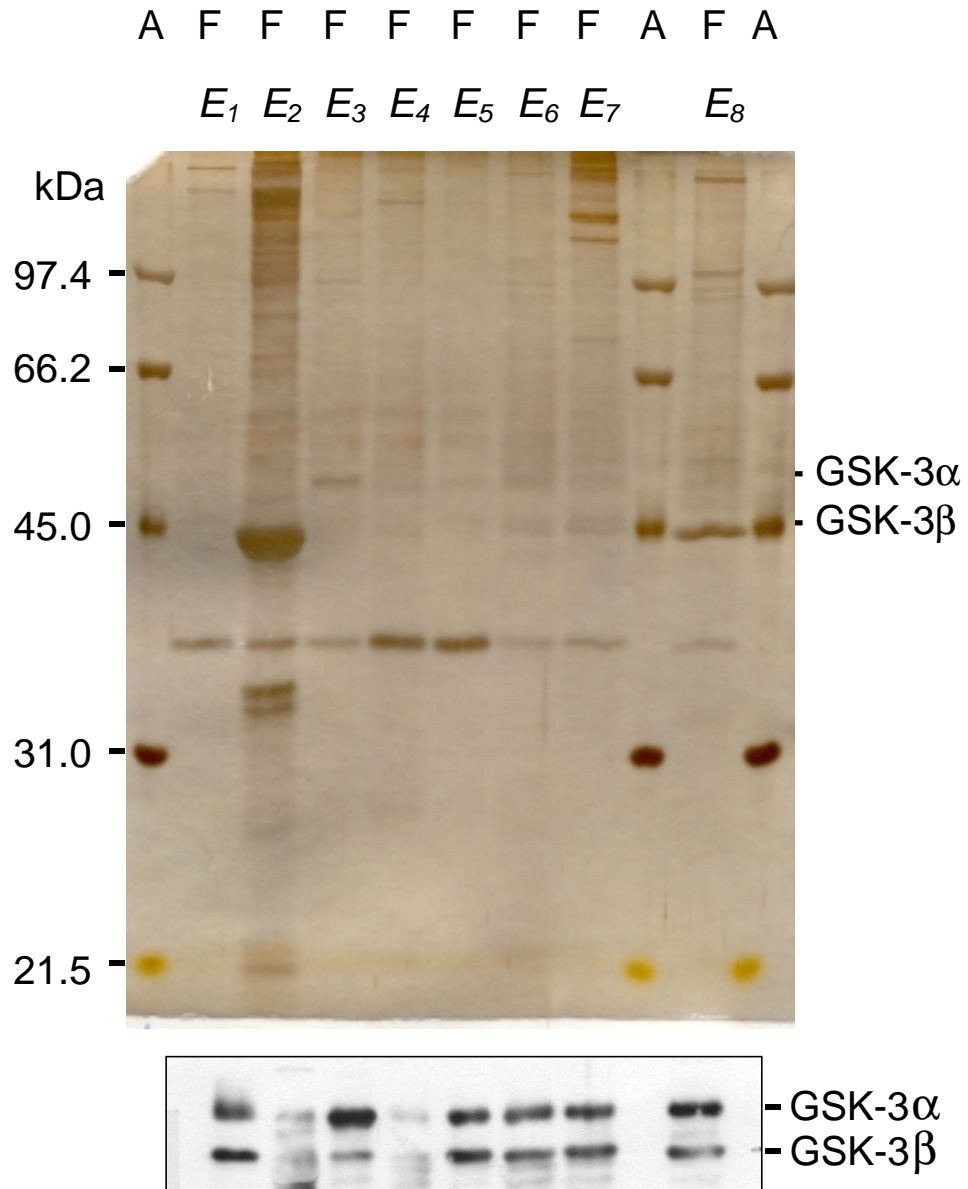
A:	Molekularmassenmarker	K:	<i>Purvalanol-Matrix</i>
E:	<i>Paullon-Matrix 4</i>	L:	<i>Axin-Matrix</i>
F:	<i>Paullon-Matrix 5</i>	M:	<i>p9-Matrix</i>
J:	<i>Ethanolamin-Matrix 4</i>		

In einem weiteren Versuch wurde die Paullon-Matrix (*Paullon-Matrix 5*) mit verschiedenen Rattengewebeextrakten sowie mit Schweinethymusextrakt versetzt. Die verschiedenen Rattengewebe waren Muskel-, Nieren-, Hoden-, Leber-, Herz-, Milz- und Lungengewebe. Bei allen Rattengewebeextrakten und dem Schweinethymusextrakt konnte bei der Silberfärbung (Abb. 3-10) eine Proteinbande mit einer Molekularmasse von 37 kDa detektiert werden. Diese Proteinbande ist besonders stark ausgeprägt bei der Verwendung des Leber- und des Herzgewebeextraktes. Die Molekularmasse des Proteins entspricht der Molekularmasse der nicht identifizierten Proteinbanden aus dem Schweinehirnextrakt und dem Extrakt aus der Hamsterzelllinie CCL 39. Anschließend durchgeführte Western Blot-Untersuchungen ergaben, dass das immobilisierte Paullon (*Paullon-Matrix 5*) GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  auch aus den diversen Rattengewebeextrakten und Schweinethymusextrakt zu binden vermag.



Abb. 3-10: Silberfärbung nach Inkubation von Rattengewebeextrakten sowie von Schweinethymusextrakt

Rattengewebeextrakte/Schweinethymusextrakt



$E_1$ : Muskelgewebeextrakt (Ratte)

$E_2$ : Nierengewebeextrakt (Ratte)

$E_3$ : Hodengewebeextrakt (Ratte)

$E_4$ : Lebergewebeextrakt (Ratte)

$E_5$ : Herzgewebeextrakt (Ratte)

$E_6$ : Milzgewebeextrakt (Ratte)

$E_7$ : Lungengewebeextrakt (Ratte)

$E_8$ : Thymusgewebeextrakt (Schwein)

A: Molekularmassenmarker

F: *Paullon-Matrix 5*

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  als Proteine mit hoher Affinität zu den immobilisierten Paullonen (*Paullon-Matrix 4* und *5*) identifiziert werden konnten. Bei Inkubation mit den Schweinehirn-, Schweinethymus-, Rattengewebe- und Hamsterzelllinienextrakten konnte bei Verwendung der *Paullon-Matrix 5* eine Proteinbande mit einer Molekularmasse von 37 kDa durch Silberfärbung detektiert werden. Weiterhin konnte ebenfalls bei Verwendung der *Paullon-Matrix 5* nach Inkubation des Seeigeloocytenextraktes ein Protein mit einer Molekularmasse von 32 kDa mittels Silberfärbung detektiert werden. Die Identifizierung dieser beiden Proteine soll durch Mikrosequenzanalysen erfolgen. Das 37 kDa Protein wurde aus Schweinehirnextrakt gewonnen, während das 32 kDa Protein aus den Seeigeloocytenextrakt isoliert wurde. Dafür wurden die Proteine nach Inkubation der *Paullon-Matrix 5* mit den Extrakten und anschließender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt und aus den Gelen herausausgeschnitten. Nach anschließender Trocknung im Vakuum wurden die Proteine zum Institut Pasteur, Paris, Frankreich, zur Mikrosequenzierung weitergeleitet. Die Ergebnisse der Analysen stehen noch aus.

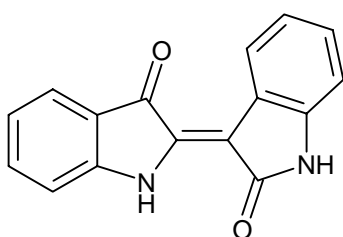
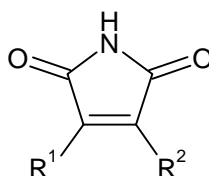
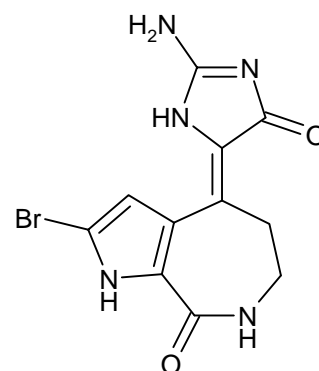
### 3.5 Glykogensynthase-Kinase-3

Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) ist eine Serin-/Threonin-Protein-Kinase und ein Bestandteil der Wnt-Signaltransduktions-Kaskade.<sup>59-61</sup> Bei Säugetieren existieren zwei Isoformen des Enzyms, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , die eine hohe Homologie bezüglich der katalytischen Domäne aufweisen. Ursprünglich wurde GSK-3 als eine Kinase identifiziert, die Glykogensynthase phosphoryliert und dadurch inaktiviert. GSK-3 übt somit einen Einfluss auf den Glykogen-Metabolismus aus, indem die Inhibition von GSK-3 zu einer gesteigerten Synthese von Glykogen führt.<sup>62,63</sup>

Neben der Beteiligung am Glykogen-Metabolismus wurden noch weitere zelluläre und physiologische Funktionen von GSK-3 entdeckt. So wird GSK-3 ein Einfluss auf neuronale Funktionen zugeschrieben. Die typischerweise bei Morbus Alzheimer-Patienten auftretenden gepaarten helixförmigen Filamente entstehen durch Phosphorylierung des sog. Tau-Proteins. Diese Phosphorylierungsreaktion wird ebenfalls durch GSK-3 katalysiert.<sup>64,65</sup> Des Weiteren spielt GSK-3 unter anderem eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus<sup>58</sup>, der Gentranskription<sup>62</sup>, der Proteinbiosynthese<sup>63</sup> und der dorsoventralen Entwicklung von Embryonen<sup>66</sup>.

Somit könnten GSK-3-Inhibitoren interessante therapeutische Ansatzpunkte für die Behandlung von Morbus Alzheimer<sup>64,65</sup>, Diabetes<sup>62,63</sup> und Zellproliferationsstörungen wie z.B. Krebserkrankungen<sup>58,67</sup> liefern.

Weitere in der Literatur beschriebene Glykogensynthase-Kinase-Inhibitoren sind Derivate des Indirubins (**65**)<sup>64</sup>, Derivate des Maleinimids (**66**)<sup>62</sup> sowie der Naturstoff Hymenialdisin (**67**)<sup>68</sup>.

**65****66****67**

## 4 Biologische Aktivität von Paullonen

### 4.1 CDK1/Cyclin B, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorische Aktivitäten von Paullonen

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden im Arbeitskreis von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) bezüglich ihrer CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorischen Aktivität getestet.

Die CDK1/Cyclin B- und CDK5/p25-Kinase-Aktivität wurde durch die von diesen Enzymen katalysierte Phosphorylierung von Histon H1, einem in eukaryotischen Organismen vorkommenden basischen Protein des Zellkerns, ermittelt. Dazu wurde die nach zehnminütiger Inkubation in das Histon H1 inkorporierte Menge an radioaktivem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in An- und Abwesenheit des Inhibitors gemessen.

Zur Bestimmung der GSK-3 $\beta$ -Kinase-Aktivität wurde Glycogen-Synthase-1-Peptid (GS-1-Peptid) anstelle des Histon H1 als Substrat verwendet. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten.

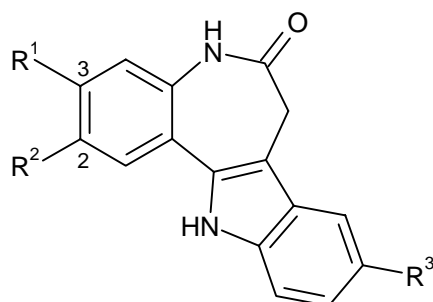
Für alle getesteten Verbindungen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um IC<sub>50</sub>-Werte daraus abzuleiten. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

In Tab. 4-1 sind die Testergebnisse der in 2- bzw. 3-Position methoxy-substituierten Paullone **15a-f**, **18b**, **19a** und **19b** sowie der von Schultz<sup>51</sup> synthetisierten 2,3-Dimethoxypaullone **5a-e** und der mit Ausnahme von Kenpaullon<sup>69</sup> (**1**) ebenfalls von Schultz<sup>51</sup> synthetisierten in 2- und 3-Position unsubstituierten Derivate **4**, **68** und **69** aufgeführt. Die dimethoxysubstituierten Paullone **5a-e** erweisen sich dabei als ähnlich potent wie die entsprechenden in 2- und 3-Position unsubstituierten Paullone **1**, **4**, **68** und **69**. Im Gegensatz dazu zeigen die dimethoxysubstituierten Verbindungen **5a-e** im Allgemeinen eine größere Enzym-inhibitorische Aktivität als die monomethoxysubstituierten Derivate **15a-f**, **18b**, **19a** und **19b**. Eine Ausnahme stellt das 9-Brom-2-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**15a**) im Bezug auf die GSK-3 $\beta$ -Hemmung dar. Diese ist beim 9-Brom-2-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**15a**) etwa zehnfach stärker ausgeprägt als

beim entsprechenden dimethoxysubstituierten Derivat **5b**. Bei den monomethoxysubstituierten Verbindungen **15a-f**, **18b**, **19a** und **19b** führt die Substitution in der 2-Position in der Regel zu einer stärkeren Enzym-Inhibition als die Substitution in der 3-Position. Abweichend verhalten sich jedoch die in 9-Position trifluormethylsubstituierten Paullone **15b** und **15e**. Bei diesen Verbindungen erweist sich das in 3-Position methoxysubstituierte Derivat **15e** bezüglich der CDK1/Cyclin B-Inhibition im Vergleich zu der in 2-Position methoxysubstituierten Verbindung **15b** als potenter.

Eine bemerkenswert hohe Selektivität für GSK-3 $\beta$  weisen die in 3-Position methoxysubstituierten 9-Nitro- bzw. 9-Cyano-Paullone **15f** und **18b** auf. Sowohl das in 2-Position methoxysubstituierte 9-Nitropaullon **15c**, die Dimethoxyderivate **5c** und **5e** als auch die in 2- und 3-Position unsubstituierten Derivate **4** und **69** verfügen über eine deutlich geringere Selektivität.

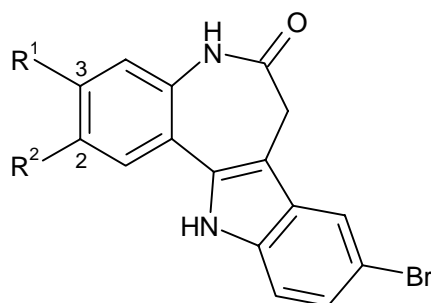
**Tab. 4-1:** Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch methoxysubstituierte Paullone



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> CDK1/Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>15</b>	OCH <sub>3</sub>	H	Br	1.7	3.0	0.35
<b>15a</b>	H	OCH <sub>3</sub>	Br	0.4	1.3	0.015
<b>5b</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Br	0.2	0.5	0.100
<b>1</b>	H	H	Br	0.400	0.850	0.023
<b>15e</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>	0.7	2.2	0.24
<b>15b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	1.4	1.8	0.13
<b>5d</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	0.28	0.43	0.075
<b>68</b>	H	H	CF <sub>3</sub>	0.400	0.600	0.030
<b>15f</b>	OCH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	1.0	0.63	0.07
<b>15c</b>	H	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	0.08	0.07	0.022
<b>5c</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	0.024	0.021	0.013
<b>4</b>	H	H	NO <sub>2</sub>	0.035	0.040	0.004
<b>18b</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CN	1.2	1.0	0.13
<b>5e</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CN	0.044	0.060	0.018
<b>69</b>	H	H	CN	0.024	0.044	0.010
<b>5a</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	4.300	5.400	0.900

Die Tab. 4-2 beschreibt die Testergebnisse der in 9-Position bromsubstituierten Monohydroxypaullone **19a** und **19b**, des von Schultz<sup>3</sup> synthetisierten Dihydroxypaullons **69** sowie von Kenpaullon (**1**). Im Gegensatz zu den methoxysubstituierten Derivaten führt bei den hydroxysubstituierten Verbindungen eine Monosubstitution zu einer stärkeren Enzymhemmung als eine Disubstitution. Die Unterschiede der inhibitorischen Aktivität der beiden Monohydroxypaullone **19a** und **19b** sind nur gering und mit der von Kenpaullon (**1**) vergleichbar.

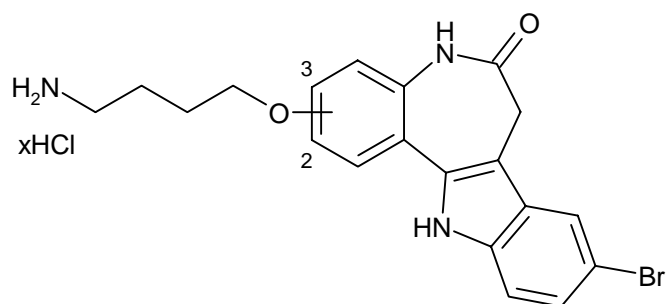
Tab. 4-2: Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch hydroxysubstituierte Paullone



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> CDK1/Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>19b</b>	OH	H	0.6	0.83	0.018
<b>19a</b>	H	OH	0.22	0.5	0.035
<b>70</b>	OH	OH	3.0	8.0	0.120
<b>1</b>	H	H	0.400	0.850	0.023

Die in Tab. 4-3 aufgeführten 2- bzw. 3-(4-Aminobutoxy)-paullone **25a** und **25b** zeigen keine gravierenden Unterschiede bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivitäten, die mit den für Kenpaullon (**1**) ermittelten Werten vergleichbar sind.

Tab. 4-3: Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch 2- bzw. 3-(4-Aminobutoxy)-paullone



		IC <sub>50</sub> CDK1/Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>25a</b>	Seitenkette in 2-Position	0.500	1.0	0.04
<b>25b</b>	Seitenkette in 3-Position	0.640	0.900	0.030
<b>1</b>	Kenpaullon	0.400	0.850	0.023



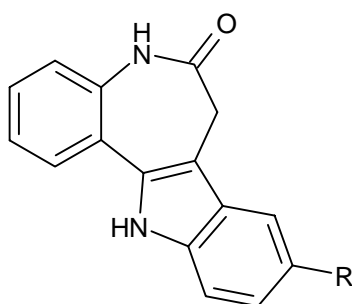
Die in Tab. 4-4 aufgelisteten Paullone **35**, **40** und **42** zeigen abgesehen von einer schwachen CDK1/Cyclin B-Hemmung keine Kinase-inhibitorischen Eigenschaften.

**Tab. 4-4:** Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch in 2-Position substituierte Paullone

	R	IC <sub>50</sub> CDK1/ Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/ p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>35</b>		4.6	> 10	> 0.1
<b>40</b>		9.2	> 10	> 0.1
<b>42</b>		10.0	> 10	> 0.1

In der Tab. 4-5 sind die Testergebnisse der potentiellen Alsterpaullon-Metabolite **46** und **47** und des von Schultz<sup>3</sup> synthetisierten Alsterpaullons (**4**) dargestellt. Die potentiellen Metabolite **46** und **47** zeigen einen deutlichen Aktivitätsverlust gegenüber Alsterpaullon<sup>51</sup> (**4**), wobei das Acetamid **47** bezüglich der CDK1/Cyclin B- und CDK5/p25-Inhibition noch über eine geringe Restaktivität verfügt. Die Reduktion von Alsterpaullon (**4**) zum 9-Aminopaullon **46** führt hingegen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust.

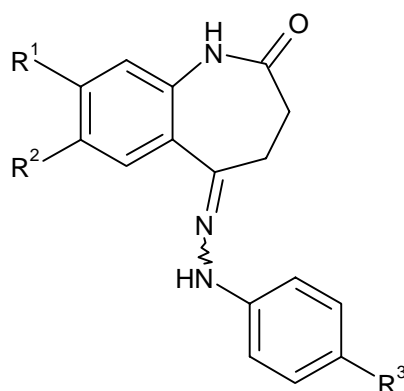
Tab. 4-5: Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch potentielle Alsterpaullon-Metabolite



	R	IC <sub>50</sub> CDK1/Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>4</b>	NO <sub>2</sub>	0.004	0.035	0.040
<b>46</b>	NH <sub>2</sub>	20	30	12
<b>47</b>	NHCOCH <sub>3</sub>	1.3	5.5	45

Die Testergebnisse der Phenylhydrazone **17a-f**, die im Rahmen der Synthese von Paullonen als Intermediate dargestellt wurden, sind in der Tab. 4-6 zusammengefasst. Keine der getesteten Verbindungen weist eine nennenswerte inhibitorische Aktivität gegenüber CDK1/Cyclin B, CDK5/p25 oder GSK-3 $\beta$  auf.

Tab.4-6: Inhibition der CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch Phenylhydrazone



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> CDK1/Cyclin B [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> CDK5/p25 [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ [ $\mu$ M]
<b>17d</b>	OCH <sub>3</sub>	H	Br	320	800	> 1000
<b>17a</b>	H	OCH <sub>3</sub>	Br	200	300	> 1000
<b>17e</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>	320	1000	800
<b>17b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	220	> 1000	> 1000
<b>17f</b>	OCH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	1000	> 1000	> 1000
<b>17c</b>	H	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	430	1000	> 1000

## 4.2 In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI

Die Untersuchungen auf in vitro Antitumoraktivität wurden innerhalb des in vitro Tumorzelllinien-Screenings<sup>70-74</sup> des National Cancer Institutes, Bethesda, USA, durchgeführt. Nachfolgend sind jeweils zwei Untersuchungsergebnisse für jede der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit synthetisierten Substanzen aufgeführt. Dabei handelt es sich zum einen um den  $\log_{10}$  GI<sub>50</sub>-Wert der Colon-Krebszelllinie HCT-116. Diese wurde ausgewählt, da sie eine besondere Empfindlichkeit gegenüber der Leitstruktur der Paullone, Kenpaullon (**1**), aufweist. Zum anderen werden die  $\log_{10}$  GI<sub>50</sub> MG\_MID-Werte der einzelnen Substanzen beschrieben. Hierbei handelt es sich um den Mittelwert der  $\log_{10}$  GI<sub>50</sub>-Werte aller getesteter Zelllinien und somit um einen Wert, der eine mittlere in vitro Antitumoraktivität beschreibt.

Die höchste verwendete Inhibitor-Konzentration betrug  $10^{-4}$  M. Bei Substanzen, bei denen diese Konzentration nicht zu einer 50proz. Wachstumshemmung der getesteten Zelllinie führte, wurde die maximal verwendete Konzentration ( $10^{-4}$  M) zur Berechnung der mittleren Antitumoraktivität ( $\log_{10}$  GI<sub>50</sub> MG\_MID) herangezogen. Ein  $\log_{10}$  GI<sub>50</sub> MG\_MID-Wert von -4 drückt demnach aus, dass bei keiner der 60 verschiedenen im in vitro Tumorzelllinien Screening verwendeten Zelllinien eine 50proz. Inhibition erreicht werden konnte.

In der nachfolgenden Tabelle 4-7 sind die Ergebnisse der Testung der in 2- bzw. 3-Position methoxysubstituierten Paullone **15a-f**, **18b**, **19a** und **19b** sowie der von Schultz<sup>51</sup> synthetisierten 2,3-Dimethoxypaullone **5a-e** und der mit Ausnahme von Kenpaullon<sup>69</sup> (**1**) ebenfalls von Schultz<sup>51</sup> synthetisierten in 2- und 3-Position unsubstituierten Derivate **4**, **68** und **69** aufgeführt. Die dimethoxysubstituierten Paullone **5a-e** zeigen in der Regel eine etwas stärkere Zellproliferations-inhibierende Wirkung als die entsprechenden in 2- und 3-Position unsubstituierten Paullone **1**, **4**, **68** und **69**. Auch hier lässt sich, wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, die Tendenz erkennen, dass prinzipiell eine Dimethoxysubstitution im Vergleich zu einer Monomethoxysubstitution zu potenteren Verbindungen führt.

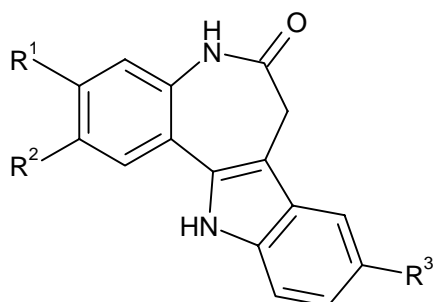
Besonders bemerkenswert ist der totale Aktivitätsverlust des in 3-Position monomethoxysubstituierten 9-Cyano-Derivates **18b**.

Ebenso scheint bei den in 9-Position trifluormethylsubstituierten Derivaten **5d**, **15b**, **15e** und **68** die Dimethoxysubstitution von Vorteil zu sein. Das in 3-Position methoxysubstituierte Paullon **15e** weist eine zehnfach schwächere Zellproliferations-inhibierende Wirkung auf als das dimethoxysubstituierte Derivat **5d**, während das in 2-Position methoxysubstituierte Paullon **15b** einen völligen Wirkungsverlust erleidet. Interessanterweise verfügt jedoch das in 2- und 3-Position unsubstituierte 9-Trifluormethylpaullon **68** über eine moderate Zellproliferations-inhibierende Aktivität.

Die Monomethoxysubstitution der 9-Brom-Derivate **15a** und **15b** geht ebenfalls mit einem Aktivitätsverlust im Vergleich zu dem dimethoxysubstituierten Derivat **5b** einher. Hier zeigt das in 2-Position monomethoxysubstituierte Derivat **15a** eine größere verbleibende Restaktivität. Diese entspricht in etwa der Zellproliferations-inhibierenden Wirkung von Kenpaullon (**1**).

Lediglich die Methoxyderivate der in 9-Position nitrosubstituierten Verbindungen **15c**, **15f** und **5c** unterscheiden sich nur geringfügig bezüglich ihrer Zellproliferations-hemmenden Eigenschaften. Das in 3-Position monomethoxysubstituierte Derivat **15f** ist etwas schwächer wirksam als die beiden anderen 9-Nitro-Derivate **15c** und **5c**. Im Vergleich mit dem sich in präklinischer Prüfung befindlichen Alsterpaullon (**4**) erweisen sich die methoxysubstituierten Derivate **15c**, **15f** und **5c** insbesondere im Bezug auf den Meangraph Midpoint als weniger potent.

**Tab. 4-7:** In vitro Antitumoraktivität  $\log_{10} GI_{50}$  [M] von methoxy-substituierten Paullonen

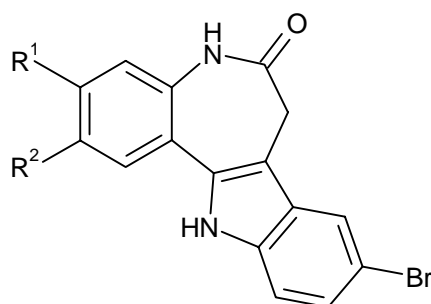


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ HCT-116 [M] <sup>a</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ MG_MID [M] <sup>a</sup>
<b>15d</b>	OCH <sub>3</sub>	H	Br	> -4.0	-4.3
<b>15a</b>	H	OCH <sub>3</sub>	Br	-5.4	-4.5
<b>5b</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Br	-5.8/-5.5	-5.2/-5.1
<b>1</b>	H	H	Br	-5.7/-5.7	-4.4/-4.3
<b>15e</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>	-4.8	-4.5
<b>15b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	> -4.0	-4.0
<b>5d</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	-5.8	-5.2/-5.3
<b>68</b>	H	H	CF <sub>3</sub>	-5.4	-4.1
<b>15f</b>	OCH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	-6.08	-5.3/-5.2
<b>15c</b>	H	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	-6.5/-6.4	-5.9/-5.9
<b>5c</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	-6.5/-6.1	-5.9/-5.4
<b>4</b>	H	H	NO <sub>2</sub>	-6.7/-7.4	-6.4/-6.5
<b>18b</b>	OCH <sub>3</sub>	H	CN	> -4.0	-4.0
<b>5e</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CN	-6.3	-5.2
<b>69</b>	H	H	CN	-4.7	-4.1
<b>5a</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	-4.6	-4.5

<sup>a</sup> Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

In Tab. 4-8 sind die in vitro Antitumoraktivitäten der in 2- bzw. 3-Position hydroxysubstituierten Paullone **19a**, **19b** und **69**, sowie von Kenpaullon (**1**) dargestellt. Hier zeigt sich eine Dihydroxysubstitution als nachteilig gegenüber der Monohydroxysubstitution. Dabei ist das in 3-Position hydroxysubstituierte Derivat **19b** annähernd zehnfach potenter bezogen auf die mittlere Antitumoraktivität  $\log_{10} GI_{50}$  MG\_MID als das in 2-Position hydroxysubstituierte Paullon **19a**. Das in 3-Position monohydroxysubstituierte Paullon **19b** zeigt sich auch im Vergleich mit Kenpaullon (**1**) als das potentere Derivat.

Tab. 4-8: In vitro Antitumoraktivität  $\log_{10} GI_{50}$  [M] von hydroxysubstituierten Paullonen

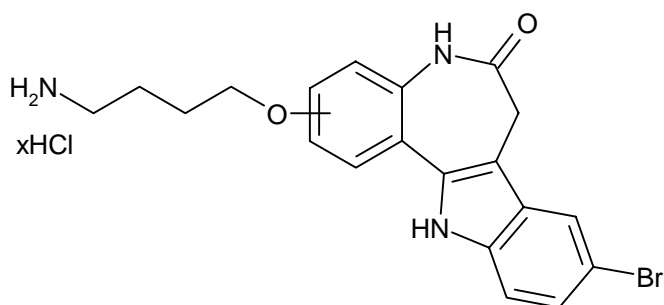


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ HCT-116 [M] <sup>a</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ MG_MID [M] <sup>a</sup>
<b>19b</b>	OH	H	-5.6	-5.5
<b>19a</b>	H	OH	-5.3	-4.6
<b>70</b>	OH	OH	> -4.0	-4.0
<b>1</b>	H	H	-5.7/-5.7	-4.7/-4.3

<sup>a</sup> Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

In Tab. 4-9 sind die Testergebnisse der in 2- bzw. 3-Position 4-aminobutoxy-substituierten Verbindungen **25a** und **25b** dargestellt. Eine Substitution in 2-Position führt zu einer geringfügig stärkeren Wachstumshemmung. Allerdings ist die Zellproliferations-inhibitorische Wirkung im Vergleich zu Kenpaullon (**1**) insbesondere für die Zelllinie HCT-116 vermindert. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Kenpaullon aus.

Tab. 4-9: In vitro Antitumoraktivität  $\log_{10} GI_{50}$  [M] von 2- bzw 3-(4-Aminobutoxy)-paullonen



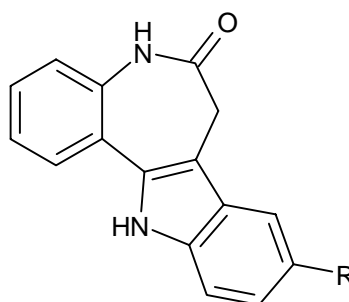
		$\log_{10} GI_{50}$ HCT-116 [M] <sup>a</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ MG_MID [M] <sup>a</sup>
<b>25a</b>	Seitenkette in 2-Position	-4.9	-4.9
<b>25b</b>	Seitenkette in 3-Position	-4.7	-4.7
<b>1</b>	Kenpaullon	-5.7/-5.7	-4.7/-4.3

<sup>a</sup> Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.



In der nachfolgenden Tabelle 4-10 werden die Antitumoraktivitäten von Alsterpaullon (**4**) und dessen potentiellen Metaboliten **46** und **47** dargestellt. Sowohl die Reduktion zum Amin **46** als auch die Bildung des Acetamids **47** führt zu einem fast vollständigen Verlust der antiproliferativen Aktivität.

**Tab. 4-10:** In vitro Antitumoraktivität  $\log_{10} GI_{50}$  [M] von potentiellen Alsterpaullon-Metaboliten



	R	$\log_{10} GI_{50}$ HCT-116 [M] <sup>a</sup>	$\log_{10} GI_{50}$ MG_MID [M] <sup>a</sup>
<b>4</b>	NO <sub>2</sub>	-6.9/-7.4	-6.4/-6.5
<b>46</b>	NH <sub>2</sub>	-4.1	-4.1
<b>47</b>	NHCOCH <sub>3</sub>	> -4.0	-4.0

<sup>a</sup> Ergebnisse aus zwei Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

### 4.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Unter Berücksichtigung der in den beiden vorangegangenen Kapiteln dargestellten CDK1/Cyclin B, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorischen Aktivitäten sowie der Ergebnisse des in vitro Antitumor-Screenings des National Cancer Institutes lassen sich folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten.

Generell führt eine Monomethoxysubstitution in 2- oder 3-Position der Paullone zu einer im Vergleich mit den in 2- und 3-Position dimethoxysubstituierten Derivaten zu einem Aktivitätsverlust. Die in 2-Position monomethoxysubstituierten Verbindungen weisen in der Regel noch eine stärkere Aktivität als ihre in der 3-Position substituierten Konstitutionsisomere auf.

Die dimethoxysubstituierten Paullone zeigen ähnliche CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorische Aktivitäten wie die entsprechenden unsubstituierten Derivate. Bei ebenfalls annähernd gleichen  $\log_{10}$  GI<sub>50</sub>-Werten für die Krebszelllinie HCT-116 verfügen die Dimethoxyderivate über eine um den Faktor zehn erhöhte mittlere Antitumoraktivität ( $\log_{10}$  GI<sub>50</sub> MG\_MID). Eine Ausnahme stellt das in 2- und 3-Position unsubstituierte 9-Cyano-Paullon **69** dar. Diese Verbindung erwies sich sowohl bei den Enzymtests als auch im in vitro Antitumor-Screening des NCI als wenig potent.

Bei den hydroxysubstituierten Derivaten führt die Bildung der Monohydroxyderivate interessanterweise zu einer erheblichen Steigerung der antiproliferativen und der Enzym-inhibitorischen Aktivität gegenüber dem dihydroxysubstituierten Derivat **70**, wobei die Substitution der Hydroxy-Gruppe sowohl in der 2- als auch in der 3-Position erfolgen kann.

Die Einführung einer Aminobutoxyseitenkette erbringt im Vergleich mit dem unsubstituierten Kenpaullon (**1**) keinen Aktivitätsgewinn. Bei der für Kenpaullon besonders empfindlichen Krebszelllinie HCT-116 weisen die Verbindungen eine annähernd zehnfach schwächere Wirkung auf.

Voluminöse Reste in der 3-Position führen zu einem Verlust an CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorischer Aktivität.

Ebenso verfügen die potentiellen Alsterpaullon-Metabolite **46** und **47** über keine nennenswerte Restaktivität. Sie erweisen sich sowohl in den Unter-

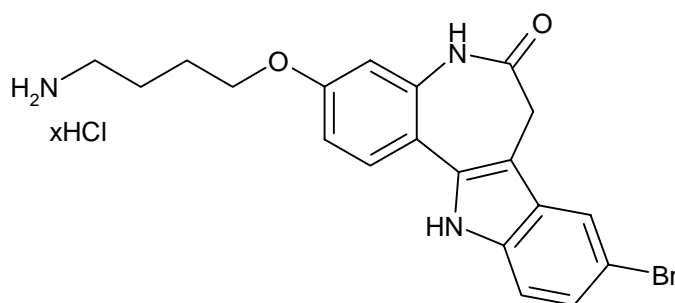
suchungen auf CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorische Aktivität, als auch im in vitro Antitumor-Screening, als unwirksam.

Die getesteten Monomethoxy- und Monohydroxyverbindungen **15a-f**, **19a** und **19b** zeigen keine besondere Selektivität zwischen der CDK1/Cyclin B- und der CDK5/p25-inhibitorischen Wirkung. Die in 3-Position methoxy-substituierten Derivate **15d-f** verfügen jedoch über eine bemerkenswerte GSK-3 $\beta$ -inhibitorische Aktivität im Vergleich zur CDK-inhibitorischen Aktivität. Diese Selektivität ist bei den anderen getesteten Verbindungen weniger stark ausgeprägt.

#### 4.4 Seeigeloocyten-Inhibitionstest

Eine einfache *in vivo* Methode zur Ermittlung der Proliferationsinhibitorischen Eigenschaften einer Substanz stellt der Seeigeloocyten-Inhibitionstest dar. Dabei wird ausgenutzt, dass Seeigeloocyten nach künstlicher Befruchtung den Zellzyklus synchron durchlaufen. Die Zellteilung kann unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Zellteilungsrate wird durch Zählung der Anzahl geteilter und nicht geteilter Oocyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen des Inhibitors bestimmt. Aus den ermittelten Werten kann anschließend der  $IC_{50}$ -Wert abgeleitet werden. Der  $IC_{50}$ -Wert ist diejenige Konzentration der untersuchten Substanz, bei der die Zellteilung zu 50% inhibiert wird.

Die Verbindung **25b** wurde mittels des Seeigeloocyten-Inhibitionstest auf ihre *in vivo* proliferationshemmende Aktivität untersucht. Die Testergebnisse sind in Tab. 4-11 zusammengefasst.



**25b**

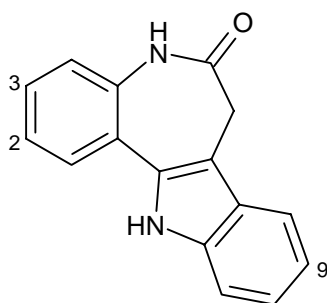
**Tab 4-11:** Zellteilungsrate nach Inkubation verschiedener Konzentrationen des Paullons **25b**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Anzahl geteilter Zellen	Anzahl ungeteilter Zellen
0	193	7
0.01	193	7
0.03	196	4
0.1	197	3
0.3	198	2
1	197	3
3	195	5
10	189	11

Das Versuchsergebnis zeigt, dass die Verbindung **25b** die Zellteilung der künstlich befruchteten Seeigeloocyten nicht zu hemmen vermag. Daher ist eine Berechnung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für diese Verbindung nicht möglich. Die im Rahmen dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse könnten z.B. durch eine verminderte Permeation des Paullons **25b** durch die Zellmembran bedingt sein.

## 5 Zusammenfassung\*

Paullone sind eine Gruppe von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) mit der Grundstruktur des 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons (**1**). Zur Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Paullone mit variierter Substitution in 2-, 3- und 9-Position synthetisiert und für biologische Testungen zur Verfügung gestellt. Die Darstellung konzentrierte sich auf Derivate mit elektronenziehende Substituenten in 9-Position (Br, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>). Da sich Verbindungen mit 2,3-Dimethoxysubstitution als besonders aktiv erwiesen hatten, wurden auch entsprechende Monomethoxy- und Monohydroxyderivate synthetisiert.



**1**

Variationen in der 2-Position: OCH<sub>3</sub>, OH, H

Variationen in der 3-Position: OCH<sub>3</sub>, OH, H

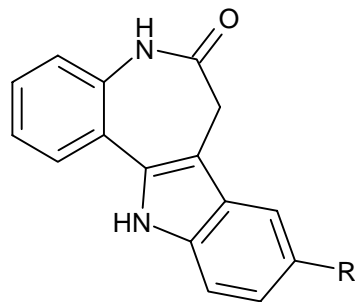
Variationen in der 9-Position: Br, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>

Die Auswertung der biologischen Testung zeigte, dass 2,3-dimethoxysubstituierte Derivate den monosubstituierten Verbindungen im Bezug auf CDK-inhibitorische Aktivität überlegen sind.

---

\* Die Nummerierung der Zusammenfassung weicht von den in den anderen Kapiteln der Arbeit verwendeten Nummern ab

Die Verbindungen **2** und **3** wurden als potentielle Metabolite des sich in präklinischer Prüfung befindlichen Alsterpaullons (**4**) synthetisiert.



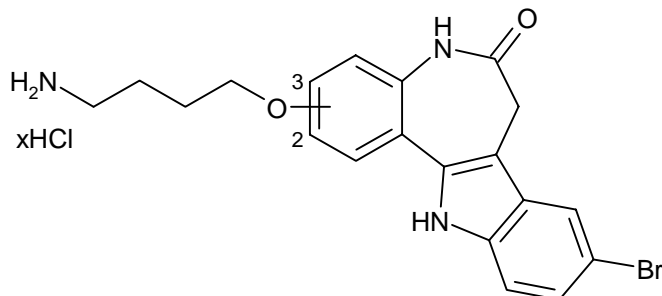
**2** R = NH<sub>2</sub>

**3** R = NHCOCH<sub>3</sub>

**4** R = NO<sub>2</sub>

**2, 3, 4**

Die Einführung von Aminobutoxyseitenketten in 2- bzw. 3-Position des Kenpaullons ergab die Intermediate **5a** bzw. **5b**, die anschließend mit Kupplungspartnern wie Biotin, Fluoreszenzmarkern oder polymeren Trägermaterialien (Agarose) verknüpft werden konnten.



**5a** Seitenkette in  
2-Position

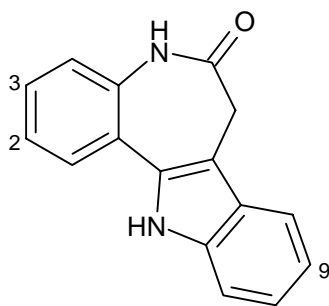
**5b** Seitenkette in  
3-Position

**5a, 5b**

Die an den Trägermaterialien immobilisierten Paullone wurden bei Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen verwendet. Dabei wurden immobilisierte Paullone mit diversen Zell- und Gewebeextrakten inkubiert. Mit Hilfe dieser Affinitätsuntersuchungen konnte Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) als Protein mit hoher Affinität zu Paullonen identifiziert werden. Kinase-Inhibitionstests ergaben, dass Paullone eine neue Klasse potenter GSK-3-Inhibitoren darstellen.

## 6 Summary\*

Paullones, 7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on derivatives (**1**), represent a class of Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors. For the evaluation of structure-activity relationships paullones with modified substituents in 2-, 3-, and 9-position were synthesized and provided for biological tests. The synthesis was focussed on derivatives bearing electron-withdrawing substituents in 9-position (Br, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>). Since Paullones with a 2,3-dimethoxy substitution proved to show excellent inhibitory activity, corresponding monomethoxy and monohydroxy derivatives were synthesized, too.



**1**

variations of the 2-position: OCH<sub>3</sub>, OH, H

variations of the 3-position: OCH<sub>3</sub>, OH, H

variations of the 9-position: Br, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>

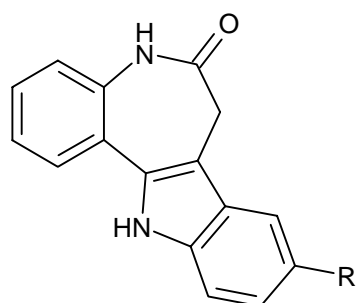
The test results showed that the 2,3-dimethoxysubstituted derivatives are superior to the monosubstituted derivatives with respect to CDK inhibition.

---

\* The numeration of the summary does not correspond to the numbers used in the other chapters of this work.



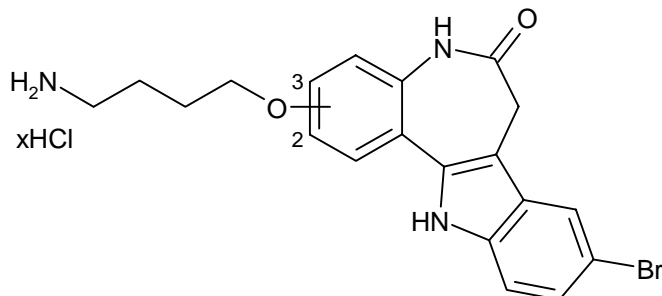
Compounds **2** and **3** were synthesized as potential metabolites of alsterpaullon (**4**), which has already entered preclinical trials.



- 2** R = NH<sub>2</sub>  
**3** R = NHCOCH<sub>3</sub>  
**4** R = NO<sub>2</sub>

**2, 3, 4**

The introduction of an aminobutoxy sidechain into the 2- or 3-position of kenpaullone led to the intermediates **5a** and **5b**, which were subsequently coupled with biotin, fluorescent labels or polymer supports, namely agarose.



- 5a** sidechain in 2-position  
**5b** sidechain in 3-position

**5a, 5b**

The agarose bound paullones were used in the course of affinity studies to elucidate the mechanism of action of paullones. The immobilized paullones were incubated with extracts from diverse cell types and organisms. As a result of this experiment, glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) was identified as a protein with high affinity to paullones. Kinase inhibition assays proved that paullones represent a novel class of potent GSK-3 inhibitors.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Versuche zu Kapitel 2

#### 7.1.1 Allgemeines

##### **Schmelzpunkte:**

Electrothermal IA 9100

##### **IR-Spektren:**

Vermessung als KBr-Pressling

Philips PU 9712 Infrared Spectrophotometer

##### **<sup>1</sup>H-NMR-Spektren:**

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Bruker AMX 500 (500 MHz)

Lösungsmittel: [D<sub>6</sub>]-DMSO

Innerer Standard: Tetramethylsilan

Angabe der chemischen Verschiebung mit  $\delta$ -Werten (ppm)

Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: (s) = Singulett, (d) = Dublett, (t) = Triplett, (q) = Quartett, (m) = Multipllett; der Zusatz „br.“ bedeutet, dass das vorliegende Signal verbreitert auftritt.

##### **<sup>13</sup>C-NMR-Spektren:**

Bruker AMX 400 (100.6 MHz)

Lösungsmittel: [D<sub>6</sub>]-DMSO

Innerer Standard: Tetramethylsilan

Angabe der chemischen Verschiebung mit  $\delta$ -Werten (ppm)

Die Spektren wurden <sup>1</sup>H-breitbandenkoppelt und zusätzlich als DEPT-Spektrum bzw. als PENDANT-Spektren aufgenommen.

**Elementaranalysen:**

C, H, N: Heraeus CHN-O-Rapid  
Br: Titration des Halogenids mit 0.005 M  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ -Lösung  
gegen Diphenylcarbazon nach Verbrennung in der  
„Mikroverbrennungsapparatur nach Schöninger“

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

**Massenspektren:**

VG 70-250S  
VG Analytical, Manchester, U.K.  
Xenon-FAB-Kanone

**Dünnschichtchromatographie:**

DC-Mikrokarten Polygram Sil G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel  
Laufmittel: Ethylacetat

**Säulenchromatographie:**

Adsorption der Substanzen an Kieselgel 100-200 aktiv, 60 Å, ICN  
Säulenfüllung: Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Merck  
Säulendurchmesser: 2 cm  
Füllhöhe: 10 cm

**Anionenaustauscher:**

Dowex<sup>TM</sup> 1X2-200 Anionenaustauscherharz, Aldrich  
Säulendurchmesser: 2 cm  
Füllhöhe: 7 cm

**Reinigung von Lösungsmitteln:**

Die Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte nach publizierten Methoden.<sup>75</sup>

**UV-Vis-Spektren:**

UV-Vis Recording Spektrophotometer UV-160A, Shimadzu

**Emissions-Spektren:**

FP-750 Spektrofluorometer, Jasco

### 7.1.2 Synthese/Analytische Daten

#### AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **4**, **15a**, **b**, **d** und **e**

1 mmol 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion wird mit 1.5 mmol Phenylhydrazin (bzw. 1.5 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat) in 10 ml Eisessig 1 h bei 70 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.1 ml konzentrierter Schwefelsäure wird für eine weitere Stunde bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 20 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

#### AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **15c** und **15f**

1 mmol 5-(4-Nitro-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on wird in 40 ml Diphenylether unter Stickstoff 2 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 60 ml Hexan versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Hexan gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Ethylacetat als Elutionsmittel und anschließender Umkristallisation aus Ethanol/Toluol.

#### AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 5-Phenylhydrazono-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-one **17a-f**

1 mmol 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion wird mit 1.5 mmol Phenylhydrazin (bzw. 1.5 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat) in 10 ml Eisessig 1 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 20 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonitrile **18a** und **18b**

1 mmol bromsubstituiertes 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on und 179 mg (2 mmol) Kupfer(I)-cyanid werden in 10 ml N-Methyl-2-pyrrolidon 2 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 30 ml Wasser versetzt und gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, anschließend in 10 ml Wasser und 2.5 ml Ethylendiamin aufgenommen und für 15 min gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 10proz. Natriumcyanid-Lösung und Wasser gewaschen. Der Rückstand wird mit Ethylacetat als Elutionsmittel säulenchromatographiert und anschließend aus Ethanol/Toluol umkristallisiert.

AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der hydroxylierten 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one durch Etherspaltung **19a** und **19b**

2 mmol methoxysubstituiertes 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on wird in 20 ml getrocknetem Dichlormethan vorgelegt, mit 2004 mg (8 mmol) Bortribromid versetzt und bei 20 °C gerührt, bis im Dünnschichtchromatogramm keine Fluoreszenzminderung durch das Edukt mehr zu detektieren ist. Anschließend werden 20 ml Wasser vorsichtig hinzugegeben und 1 h bei 20 °C gerührt. Die entstandene Suspension wird mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

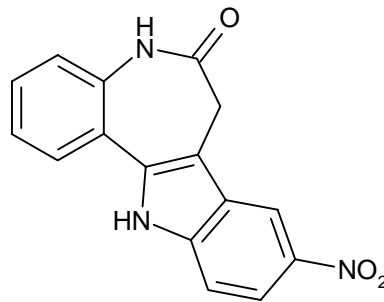
AAV 6: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der (Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **21** und **22**

1 mmol hydroxysubstituiertes 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on wird mit 2004 mg (14.5 mmol) Kaliumcarbonat in 10 ml getrocknetem DMSO suspendiert. Die Suspension wird unter Stickstoff bei 60 °C gerührt und eine Lösung von 282 mg (1.13 mmol) N-(4-Brombutyl)-phthalimid in 10 ml getrocknetem DMSO langsam innerhalb von 3 h hinzugegeben. Das Rühren wird fortgesetzt, bis im Dünnschichtchroma-

togramm keine Fluoreszenzminderung durch das Edukt mehr zu detektieren ist. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch ohne vorheriges Abkühlen in 50 ml Wasser gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

AAV 7: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 4-Aminobutoxy-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on-Hydrochloride **25a** und **25b**

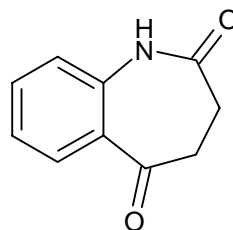
1 mmol (Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on wird in 5 ml Ethanol suspendiert, mit 2 mmol Hydrazinhydrat versetzt und 2 h unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit konzentrierter Salzsäure ein pH-Wert von 1 eingestellt. Der resultierende Niederschlag wird abgesaugt und verworfen. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und anschließend in 5 ml 6 N Natronlauge aufgenommen. Der resultierende Niederschlag wird abermals abgesaugt und in Ethanol gelöst. Die Lösung wird mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 1 gebracht und für die säulenchromatographische Reinigung auf Kieselgel adsorbiert. Als Elutionsmittel wird zuerst Ethylacetat verwendet, um unpolare Verunreinigungen abzutrennen. Das Produkt wird anschließend mit einer Mischung aus Ethylacetat/Ethanol im Verhältnis 1:1 eluiert. Umkristallisation aus Ethanol.

9-Nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (4)

Nach AAV 1 aus 175 mg (1 mmol) 1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6b**), 284 mg (1,5 mmol) 4-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat. Umkristallisation aus Ethanol/Toluol.

Man erhält 62 mg (21%) gelber Kristalle.

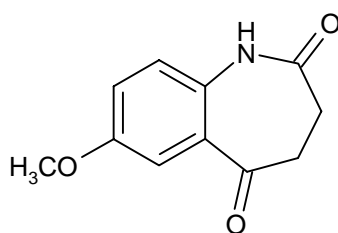
Schmp.: > 330 °C (Lit.<sup>20</sup>: > 330 °C)

1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (6a)

3.7 g (15 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**10a**) werden mit 0.5 ml Wasser in 40 ml Dimethylsulfoxid unter Stickstoff bei 150 °C gerührt. Nach 1 h und 3 h werden abermals 0.5 ml Wasser zugegeben. Nach insgesamt 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 300 ml Wasser. Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten Kristalle werden abgesaugt, erst mit Wasser und dann mit Petrolether gewaschen und anschließend unter vermindertem Druck über Blaugel getrocknet.

Man erhält 2.5 g (95%) farblose Kristalle.

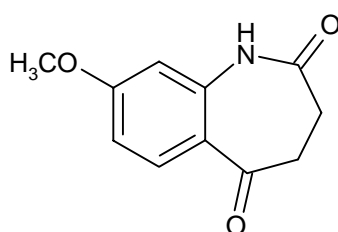
Schmp.: 187 °C (Lit.<sup>76</sup>: 187 - 188 °C)

7-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (6b)

277 mg (1 mmol) 5-Hydroxy-7-methoxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**10b**) werden mit 0.5 ml Wasser in 2.7 ml DMSO unter Rühren unter Stickstoff auf 150 °C erhitzt. Nach 1 h und 3 h werden abermals 0.5 ml Wasser hinzugegeben. Nach insgesamt 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 20 ml Wasser. Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten Kristalle werden abgesaugt, erst mit Wasser und dann mit Petrolether gewaschen und anschließend unter vermindertem Druck über Blaugel getrocknet.

Man erhält 189 mg (92%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 181 °C; IR (KBr): 3180 cm<sup>-1</sup> (NH), 3080 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2950 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1640 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.61-2.64 und 2.89-2.92 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.11 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.18 (dd, 1H, 8.7/3.1 Hz, arom. H), 7.26 (d, 1H, 3.1 Hz, arom. H), 9.92 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 29.1, 38.4 (CH<sub>2</sub>), 112.5, 121.3, 123.4 (tert. C-Atome), 127.6, 132.8, 155.0, 173.2, 198.5 (quart. C-Atome); C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (205.21); Ber. C 64.38, H 5.40, N 6.83; Gef. C 64.36, H 5.45, N 6.95.

8-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (6c)

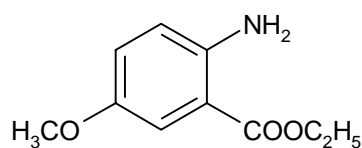


Zu einer Lösung von 1600 mg (10 mmol) 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**14**) in 25 ml *t*-Butanol werden 75 ml Wasser, 7880 mg (50 mmol) Kaliumpermanganat und 12.8 g (50 mmol) Magnesiumnitrat hexahydrat hinzugefügt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einem Wasserbad für 20 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird unter Kühlung mit 50 ml 10proz. Salzsäure versetzt. Anschließend wird solange Natriumbisulfit hinzugefügt, bis sich der Ansatz von braun nach hellgelb verfärbt, und die Bildung eines Niederschlags beginnt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 5 °C aufbewahrt. Anschließend wird der Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält 907 mg (44 %) eines weißen Pulvers.

Schmp.: 205 °C; IR (KBr): 1700 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.63-2.66 und 2.82-2.85 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.72 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 6.77 (dd, 1H, 9.1/2.5 Hz, arom. H), 7.85 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 10.02 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 29.4, 37.6 (CH<sub>2</sub>), 105.4, 110.0, 132.6 (tert. C-Atome), 119.5, 141.3, 163.5, 173.5, 196.6 (quart. C-Atome); C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (205.21); Ber. C 64.38, H 5.40, N 6.83; Gef. C 64.14, H 5.38, N 6.76.

### 2-Amino-5-methoxybenzoesäureethylester (7b)

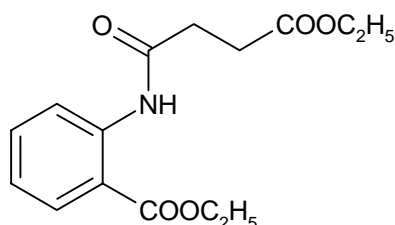


167 mg (1 mmol) 2-Amino-5-methoxybenzoesäure (**12**) werden in 7 ml absolutem Ethanol gelöst. Es wird solange Chlorwasserstoffgas eingeleitet, bis sich ein deutlicher Bodensatz des Hydrochlorids gebildet hat (ca. 30 min). Anschließend wird unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen, mit 5proz. Natriumacetat-Lösung neutralisiert und fünfmal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5proz. Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

Man erhält 178 mg (91%) eines gelblichen Öls, das nicht weiter gereinigt wird.

IR (NaCl):  $3430\text{ cm}^{-1}$  (NH),  $3330\text{ cm}^{-1}$  (NH),  $2945\text{ cm}^{-1}$  (CH aliph.),  $1670\text{ cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.26 (q, 2H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 6.8 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.75 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 6.98 (dd, 1H, 8.7/3.1 Hz, arom. H), 7.19 (d, 1H, 3.0 Hz, arom. H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 59.8 ( $\text{CH}_2$ ), 112.3, 118.1, 123.1 (tert. arom. C-Atome), 108.6, 146.1, 149.0, 167.1 (quart. arom. C-Atome);  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$  (195.22).

### 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-benzoesäureethylester (9a)

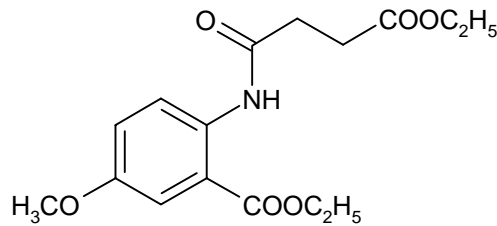


Zu einem Gemisch aus 58 g (0.34 mol) Anthranilsäureethylester, 40 ml Pyridin und 150 ml Toluol wird unter Rühren und Kühlen eine Lösung von 68 g (0.41 mol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 50 ml Toluol getropft. Die entstandene Suspension wird 2 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 50 ml Wasser versetzt und in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird nacheinander mit 50 ml 10proz. Salzsäure und 50 ml 5proz. Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Es resultiert ein Öl, das nach Aufkochen mit 40 ml Ethanol auskristallisiert.

Man erhält 59.0 g (59%) farblose Kristalle.

Schmp.:  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (Lit.<sup>77</sup>:  $60\text{ }^\circ\text{C}$ )

2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-5-methoxy-benzoesäureethylester  
(9b)

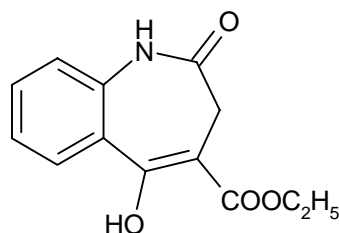


Zu einem Gemisch von 4685 mg (24 mmol) 2-Amino-5-methoxybenzoesäureethylester (**7b**), 2.6 ml Pyridin und 10.5 ml Toluol wird unter Rühren und Kühlen im Eisbad eine Lösung von 4608 mg (28 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 3.5 ml Toluol getropft. Danach wird die entstandene Suspension 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 3.5 ml Wasser wird die wässrige Phase mit Hilfe eines Scheidetrichters abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird mit 3.5 ml 10proz. Salzsäure und anschließend mit 3.5 ml 5proz. Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält 5644 mg (73%) durchsichtige Nadeln.

Schmp.: 68 °C; IR (KBr): 3290  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2950  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliph.), 1715  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.17 (t, 3H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.32 (t, 3H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2.56-2.64 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.05 (q, 2H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_2$ ) 4.30 (q, 2H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_2$ ) 7.20 (dd, 1H, 8.7/3.1 Hz, arom. H), 7.35 (d, 1H, 3.0 Hz, arom. H) 7.98 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 10.25 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 13.9, 14.0 (prim. C-Atome), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 28.7, 31.2, 59.8, 61.1 (sek. C-Atome), 114.3, 119.4, 123.5 (tert. arom. C-Atome), 120.3, 132.3, 154.6, 166.6, 169.5, 172.1 (quart. arom. C-Atome);  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_6$  (323.35); Ber. C 59.43, H 6.55, N 4.33; Gef. C 59.37, H 6.52, N 4.26.

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester  
(10a)

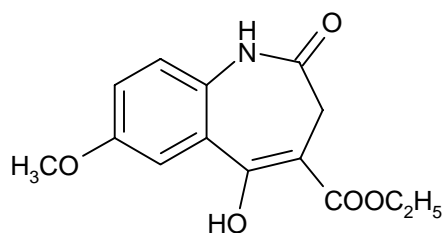


10 g einer 35proz. Suspension von Kaliumhydrid in Mineralöl (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) werden in einem mit Metallkühler, Tropftrichter und Gaszu- und -ableitung ausgerüstetem Dreihalskolben unter Stickstoff mit dreimal 75 ml Toluol gewaschen und dann in 75 ml Toluol suspendiert. 14.7 g (0.05 mol) 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-benzoesäureethylester (**9a**) werden in 22 ml N,N-Dimethylformamid und 150 ml Toluol gelöst und über den Tropftrichter in die unter Stickstoff im vorgekühlten Siliconbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird 3 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden vorsichtig zunächst 15 ml Eisessig und dann 150 ml Wasser zugetropft. Die neutrale bis schwach saure, weiße Suspension wird 15 min im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält 9.3 g (75%) farblose Kristalle.

Schmp.: 210 °C (Lit.<sup>17</sup>: 210-213 °C)

5-Hydroxy-7-methoxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**10b**)



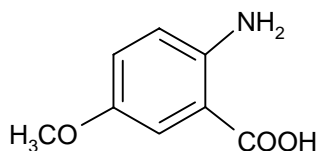
5 g einer 35proz. Suspension von Kaliumhydrid in Mineralöl (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuch-

tigkeit!) werden in einem mit Metallkühler, Tropftrichter und Gaszu- und -ableitung ausgerüstetem Dreihalskolben unter Stickstoff mit dreimal 37.5 ml Toluol gewaschen und dann in 37.5 ml Toluol suspendiert. 8084 mg (25 mmol) 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-5-methoxy-benzoesäureethylester (**9b**) werden in 11 ml N,N-Dimethylformamid und 75 ml Toluol gelöst und über den Tropftrichter in die unter Stickstoff im vorgekühltem Siliconbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird 3 h bei 70 °C Badtemperatur gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden zunächst vorsichtig 5 ml Eisessig und dann 75 ml Wasser dazugetrofft. Die neutrale bis schwach saure, weiße Suspension wird 15 min im Eisbad gerührt, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält 4298 mg (62%) weiße Nadeln.

Schmp.: 191-193 °C (Zers.); IR (KBr): 3200  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3090  $\text{cm}^{-1}$  (CH arom.), 2960  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliph.), 1670  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.30 (t, 3H, 6.9 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2.91 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.28 (q, 2H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.10 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.15 (dd, 1H, 8.9/2.8 Hz, arom. H), 7.24 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 10.11 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 30.6, 61.3 ( $\text{CH}_2$ ), 110.8, 119.2, 123.2 (tert. C-Atome), 96.1, 125.8, 131.5, 155.0, 166.0, 170.5, 171.7 (quart. C-Atome);  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_5$  (277.28); Ber. C 60.64, H 5.45, N 5.05; Gef. C 60.33, H 5.34, N 5.21.

### 2-Amino-5-methoxybenzoesäure (12)



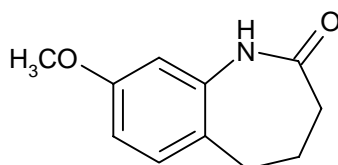
14.78 g (65.5 mmol) Zinn(II)chloriddihydrat werden in 15 ml konzentrierter Salzsäure gelöst. Nach Zugabe von 2957 mg (15 mmol) 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure wird die Lösung vorsichtig auf 80 °C erwärmt. Nach 15 min werden 7.5 ml konzentrierte Salzsäure hinzugefügt und die Lösung 20 min im Eisbad gerührt. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit konzentrierter Salzsäure gewaschen und abermals gründlich abgesaugt. Der Rückstand wird unter Rühren nach und nach mit 10proz. Natriumcar-

bonat-Lösung versetzt, bis er gelöst ist. Nach Alkalisierung der Lösung tritt ein gräulicher Niederschlag auf, der abfiltriert und verworfen wird. Das gelbliche Filtrat wird unter Kühlung im Eisbad mit 10proz. Salzsäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und anschließend mit fünfmal 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt.

Man erhält 1471 mg (59%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 148 °C (Lit.<sup>19</sup>: 149-150.5) °C; IR (KBr): 3420 cm<sup>-1</sup> (NH), 3340 cm<sup>-1</sup> (NH), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.71 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 6.94 (dd, 1H, 8.7/3.1 Hz, arom.H), 7.19 (d, 1H, 3.1 Hz, arom. H), 8.38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 112.8, 117.8, 122.7 (tert. C-Atome), 109.3, 146.1, 148.9, 169.2 (quart. C-Atome); C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (167.16); Ber. C 57.48, H 5.43, N 8.38; Gef. C 57.11, H 5.44, N 8.32.

#### 8-Methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (14)

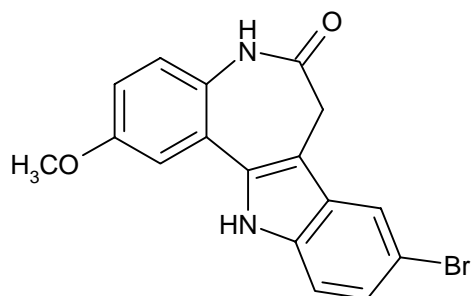


In einem Dreihalskolben mit Rührwerk, Thermometer und Gasableitung werden 4400 mg (25 mmol) 7-Methoxytetralon in 17.5 ml Eisessig gelöst. Bei dauernd laufendem Rührwerk trägt man erst 3190 mg Natriumazid ein und lässt dann, im Laufe einer Stunde, 5.6 ml konzentrierte Schwefelsäure in die Suspension eintropfen, wobei die Temperatur durch Außenkühlung mit Wasser auf 25-30 °C zu halten ist. Anschließend wird das Gemisch auf 50-60 °C erwärmt und nachdem es sich wieder abgekühlt hat vorsichtig in 185 ml 10proz. Natriumcarbonat-Lösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus Aceton umkristallisiert.

Man erhält 2.63 g (55%) farblose Kristalle.

Schmp.: 132 °C (Lit.<sup>21</sup>: 132 -134 °C)

9-Brom-2-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on  
(15a)

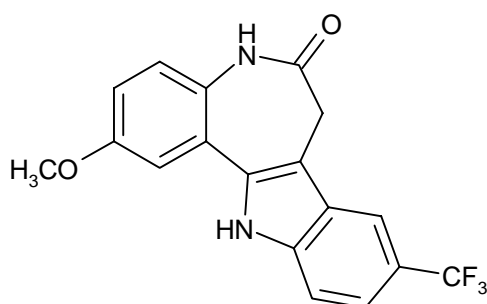


Nach AAV 1 aus 308 mg (1.5 mmol) 7-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6b**), 503 mg (2.25 mmol) 4-Bromphenylhydrazin-HCl und 185 mg (2.25 mmol) Natriumacetat. Umkristallisation aus Ethanol.

Man erhält 169 mg (32%) eines lachsfarbenden Pulvers.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3300 cm<sup>-1</sup> (NH), 3180 cm<sup>-1</sup> (NH), 3050 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2950 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1630 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.00 (dd, 1H, 8.9/2.8 Hz, arom. H), 7.18 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.27-7.29 (m, 2H, arom. H), 7.41 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.91 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 9.92 (s, 1H, NH), 11.80 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 110.5, 113.3, 115.2, 120.4, 123.2, 124.5 (tert. C-Atome), 107.4, 111.6, 123.7, 128.2, 129.1, 133.9, 135.8, 155.3, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (357.21); Ber. C 57.16, H 3.67, N 7.84, Br 22.37; Gef. C 57.07, H 3.78 N 7.74, Br 21.65.

2-Methoxy-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on  
(15b)

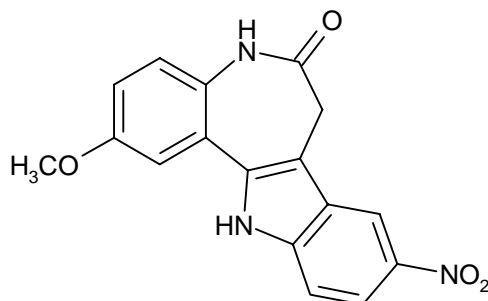


Nach AAV 1 aus 308 mg (1.5 mmol) 7-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6b**) und 396 mg (2.25 mmol) 4-Trifluorphenylhydrazin. Umkristallisation aus Ethanol.

Man erhält 139 mg (27%) hellbraune Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3380 cm<sup>-1</sup> (NH), 3060 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2950 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1640 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.03 (dd, 1H, 9.2/3.0 Hz, arom. H), 7.20 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.31 (d, 1H, 2.5 Hz, arom. H), 7.47 (dd, 1H, 8.6/1.5 Hz, arom. H), 7.63 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 8.13 (s, 1H, arom. H), 9.97 (s, 1H, NH), 12.07 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 110.6, 112.1, 115.4, 115.9 (q, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz), 118.3 (q, *J*<sub>CF</sub> = 3 Hz), 123.8 (tert. C-Atome), 108.6, 120.0 (q, *J*<sub>CF</sub> = 31 Hz), 123.2, 125.5 (q, *J*<sub>CF</sub> = 270 Hz), 125.8, 129.3, 134.7, 138.6, 155.4, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (346.31); Ber. C 62.43, H 3.78, N 8.09; Gef. C 61.79, H 3.86, N 8.08.

2-Methoxy-9-nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**15c**)



Nach AAV 2 aus 170 mg (0.5 mmol) 7-Methoxy-5(4-nitrophenylhydrazono)-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**17c**).

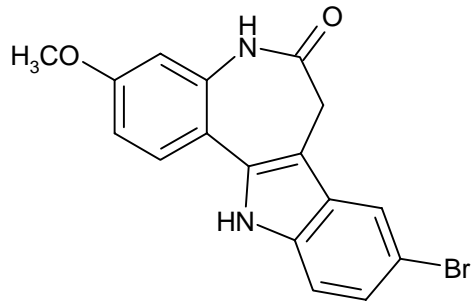
Man erhält 37 mg (23%) dunkelbrauner Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3220 cm<sup>-1</sup> (NH), 3060 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2940 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.06 (dd, 1H, 8.9/2.8 Hz, arom. H), 7.22 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.32 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 7.61 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 8.08 (dd, 1H, 9.2/2.0 Hz, arom. H), 8.76 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 10.03 (s, 1H, NH), 12.41 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.9 (CH<sub>3</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 111.1, 112.2,



115.8, 116.2, 117.8, 124.3 (tert. C-Atome), 110.4, 123.1, 126.2, 129.9, 136.5, 140.6, 141.3, 155.8, 171.3 (quart. C-Atome);  $C_{17}H_{13}N_3O_4$  (323.31); Ber. C 63.16, H 4.05, N 13.00; Gef. C 62.55, H 4.42, N 12.62.

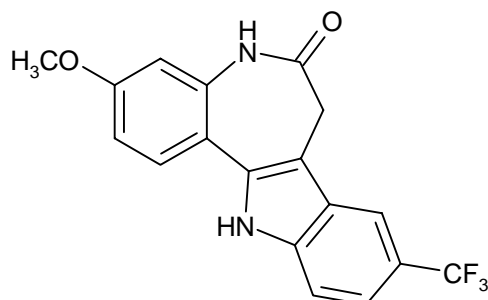
9-Brom-3-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on  
(15d)



Nach AAV 1 aus 308 mg (1.5 mmol) 8-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6c**) und 503 mg (2.25 mmol) 4-Bromphenylhydrazin-HCl und 185 mg (2.25 mmol) Natriumacetat. Umkristallisation aus Ethanol. Man erhält 198 mg (37%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: >330°C; IR (KBr): 3200  $cm^{-1}$  (NH), 1630  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ([ $D_6$ ]-DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.49 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 6.84 (d, 1H, 2.5 Hz, arom. H), 6.92 (dd, 1H, 8.5/2.5 Hz, arom. H), 7.23 (dd, 1H, 8.5/1.9 Hz, arom. H), 7.36 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.66 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.84 (d, 1H, 1.6 Hz, arom. H), 10.02 (s, 1H, NH), 11.68 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ([ $D_6$ ]-DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.2 ( $OCH_3$ ), 31.3 ( $CH_2$ ), 105.3, 110.3, 113.1, 120.0, 123.9, 128.1 (tert. C-Atome), 106.8, 111.5, 115.3, 128.4, 134.2, 135.8, 136.9, 159.3, 171.1 (quart. C-Atome);  $C_{17}H_{13}N_2O_2Br$  (357.21); Ber. C 57.16, H 3.67, N 7.84; Gef. C 56.79, H 3.44, N 7.75.

3-Methoxy-9-trifluormethyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (15e)

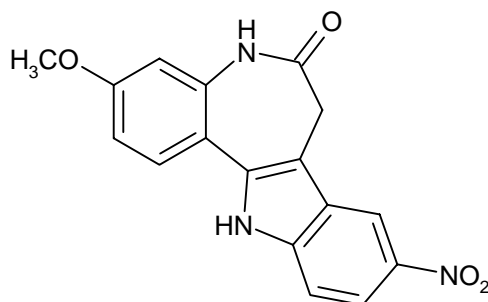


Nach AAV 1 aus 308 mg (1.5 mmol) 8-Methoxy-1*H*-[1]benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6c**) und 396 mg (2.25 mmol) 4-Trifluorphenylhydrazin. Umkristallisation aus Ethanol.

Man erhält 130 mg (25%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3230 cm<sup>-1</sup> (NH), 1630 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.85 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 6.95 (dd, 1H, 8.9/2.3 Hz, arom. H), 7.43 (m, 1H, arom. H), 7.59 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.70 (d, 1H, 8.7 Hz, arom. H), 8.09 (s, 1H, arom. H), 10.01 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 106.9, 110.3, 111.8, 115.4 (q, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz), 117.8 (q, *J*<sub>CF</sub> = 4 Hz), 128.1 (tert. C-Atome), 106.5, 115.1, 119.9, (q, *J*<sub>CF</sub> = 32 Hz), 125.5 (q, *J*<sub>CF</sub> = 271 Hz), 126.0, 134.9, 137.1, 138.5, 159.4, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (346.31); Ber. C 62.43, H 3.78, N 8.09; Gef. C 62.25, H 4.12, N 7.98.

3-Methoxy-9-nitro-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (15f)

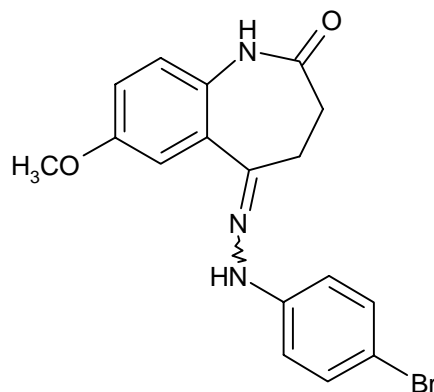


Nach AAV 2 aus 255mg (0.75 mmol) 8-Methoxy-5(4-nitrophenylhydrazono)-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**17f**).

Man erhält 33mg (13%) dunkelbrauner Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3080 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2930 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1665 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.86 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 6.96 (dd, 1H, 8.9/2.3 Hz, arom.H), 7.56 (d, 1H, 9.1 Hz, arom. H), 7.70 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 8.04 (dd, 1H, 9.2/2.0, arom. H), 8.69 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.13 (s, 1H, NH), 12.29 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 106.9, 110.4, 111.5, 114.8, 116.9, 128.2 (tert. C-Atome), 107.7, 114.6, 128.2, 136.4, 137.3, 140.2, 140.7, 159.7, 170.9 (quart. C-Atome); C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (323.31); HRFAB-MS [M]: Ber. 323.0906; Gef. 323.0909.

5-(4-Brom-phenylhydrazono)-7-methoxy-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (17a)



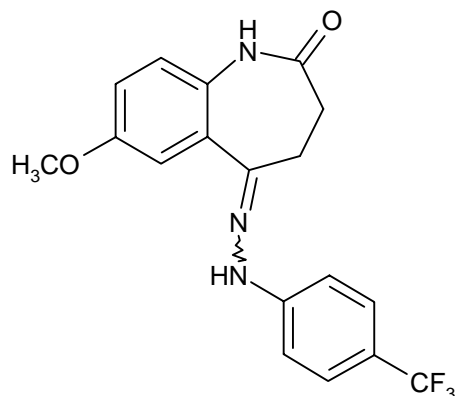
Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 7-Methoxy-1H-(1)benzazepin-2,5(3H,4H)-dion (**6b**), 335 mg (1.5 mmol) 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat.

Man erhält 59 mg (16%) hellbeige Kristalle.

Schmp.: 270 °C (Zers.); IR (KBr): 3260 cm<sup>-1</sup> (NH), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.93-2.96 und 2.50-2.53 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.94 (s, 2H, arom. H), 7.12-7.16 (m, 3H, arom. H), 7.37 (d, 2H, 8.7 Hz, arom. H), 9.36 (s, 1H, NH), 9.55 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 29.7, 30.6 (CH<sub>2</sub>), 113.8, 114.5, 114.9, 123.2, 131.5 (tert. C-Atome), 110.2, 130.3, 132.0, 144.0, 145.0, 155.7, 172.9 (quart. C-Atome);

$C_{17}H_{16}BrN_3O_2$  (374.24); Ber. C 54.56, H 4.31, N 11.23; Gef. C 54.23, H 4.28, N 10.97.

7-Methoxy-5-(4-trifluormethyl-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (17b)

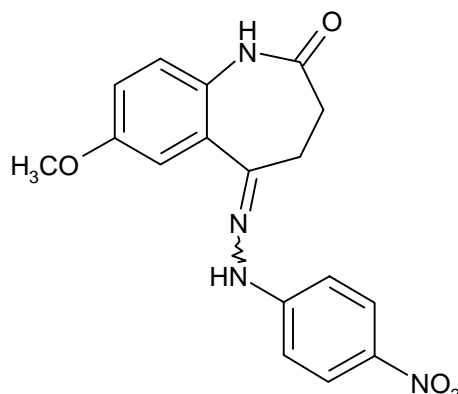


Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 7-Methoxy-1H-(1)benzazepin-2,5(3H,4H)-dion (**6b**) und 264 mg (1.5 mmol) 4-Trifluormethylphenylhydrazin.

Man erhält 139 mg (38%) eines beigen Pulvers.

Schmp.: 270 °C; IR (KBr): 3240  $cm^{-1}$  (NH), 1645  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.50-2.53 und 2.98-3.00 (m, AA'XX', 4H,  $CH_2-CH_2$ ), 3.79 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 6.95-6.96 (m, 2H, arom. H), 7.139-7.142 (m, 1H, arom. H), 7.33 (d, 2H, 6.8 Hz, arom. H), 7.54 (d, 2H, 7.1 Hz, arom. H), 9.55 (s, 1H, NH), 9.66 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.2 ( $OCH_3$ ), 29.8, 30.6 ( $CH_2$ ), 112.7, 114.0, 114.8, 123.3, 126.2 (q,  $J_{CF} = 4$  Hz) (tert. C-Atome), 119.1 (q,  $J_{CF} = 32$  Hz), 125.0 (q,  $J_{CF} = 272$  Hz), 130.5, 131.9, 145.6, 148.7, 155.8, 172.9 (quart. C-Atome);  $C_{18}H_{16}F_3N_3O_2$  (363.34); Ber. C 59.50, H 4.44, N 11.56; Gef. C 59.42, H 4.36, N 11.48.

7-Methoxy-5-(4-nitro-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (17c)

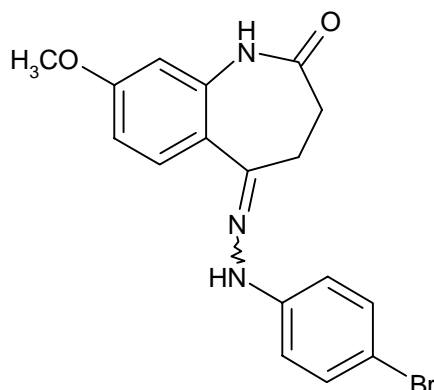


Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 7-Methoxy-1H-(1)benzazepin-2,5(3H,4H)-dion (**6b**), 335 mg (1.5 mmol) 4-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat.

Man erhält 204 mg (60%) eines orangenen Pulvers.

Schmp.: 274 °C (Zers.); IR (KBr): 3330 cm<sup>-1</sup> (NH), 3240 cm<sup>-1</sup> (NH), 1655 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.51-2.55 und 3.01-3.05 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.98-6.99 (m, 2H, arom. H), 7.150-7.153 (m, 1H, arom. H), 7.33 (d, 2H, 9.2 Hz, arom. H), 8.15 (d, 2H, 9.7 Hz, arom. H), 9.60 (s, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 30.0, 30.5 (CH<sub>2</sub>), 112.3, 114.0, 115.2, 123.3, 125.8 (tert. C-Atome), 130.6, 138.9, 148.4, 151.0, 155.7, 172.8 (quart. C-Atome); C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (340.34); Ber. C 60.00, H 4.74, N 16.46; Gef. C 60.00, H 4.85, N 16.47.

5-(4-Brom-phenylhydrazono)-8-methoxy-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (17d)

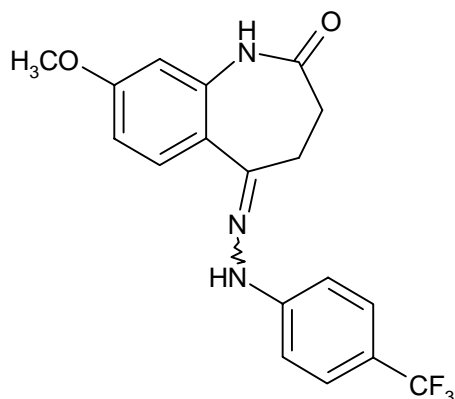


Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 8-Methoxy-1*H*-(1)benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6c**), 335 mg (1.5 mmol) 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat.

Man erhält 41 mg (11%) hellbeige Kristalle.

Schmp.: 258 °C (Zers.); IR (KBr): 3260 cm<sup>-1</sup> (NH), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.51-2.54 und 2.91-2.94 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.57 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 6.76 (dd, 1H, 8.6/2.5 Hz, arom. H), 7.12 (d, 2H, 8.6 Hz, arom. H), 7.35 (d, 2H, 8.6 Hz, arom.H), 7.57 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H.), 9.23 (s, 1H, NH), 9.69 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.1 (OCH<sub>3</sub>), 29.5, 30.9 (CH<sub>2</sub>), 106.7, 110.2, 114.7, 130.7, 131.4 (tert. C-Atome), 109.9, 123.4, 138.1, 144.3, 145.2, 159.7, 173.0 (quart. C-Atome); C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (374.24); Ber. C 54.56, H 4.31, N 11.23; Gef. C 54.66, H 4.06, N 11.14.

8-Methoxy-5-(4-trifluormethyl-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (17e)

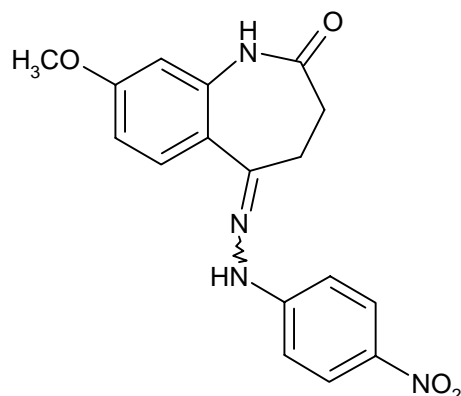


Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 8-Methoxy-1*H*-(1)benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**6c**) und 264 mg (1.5 mmol) 4-Trifluormethylphenylhydrazin.

Man erhält 84 mg (23%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 269 °C (Zers.); IR (KBr): 3250 cm<sup>-1</sup> (NH), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.53-2.56 und 2.96-2.99 (m, AA'XX', 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.59 (d, 1H, 2.5 Hz, arom. H), 6.78 (dd, 1H, 8.6/2.5 Hz, arom. H), 7.30 (d, 2H, 8.6 Hz, arom. H), 7.53 (d, 2H, 8.6 Hz, arom. H), 7.59 (d, 2H, 8.6 Hz, arom. H), 9.56 (s, 1H, NH), 9.71 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 29.6, 30.9 (CH<sub>2</sub>), 106.8, 110.2, 112.5, 126.1 (q, J<sub>CF</sub> = 4 Hz), 130.8 (tert. C-Atome), 118.9 (q, J<sub>CF</sub> = 32 Hz), 123.3, 125.0 (q, J<sub>CF</sub> = 272 Hz), 138.4, 145.8, 148.9, 159.9, 173.0 (quart. C-Atome); C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (363.34); Ber. C 59.50, H 4.44, N 11.56; Gef. C 59.14, H 4.54, N 11.28.

8-Methoxy-5-(4-nitro-phenylhydrazono)-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (17f)

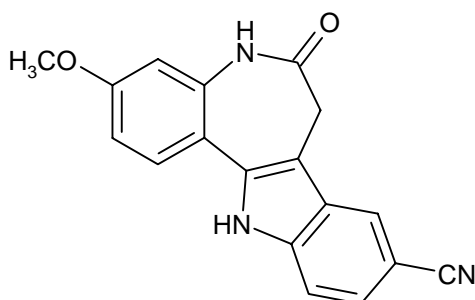


Nach AAV 3 aus 205 mg (1 mmol) 8-Methoxy-1H-(1)benzazepin-2,5(3H,4H)-dion (**6c**), 335 mg (1.5 mmol) 4-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid und 123 mg (1.5 mmol) Natriumacetat.

Man erhält 217 mg (64%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 283-284 °C (Zers.); IR (KBr): 3230  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1670  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.54-2.57 und 3.00-3.03 (m, AA'XX', 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.60 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 6.79 (dd, 1H, 8.9/2.3 Hz, arom. H), 7.29 (d, 2H, 9.2 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 8.13 (d, 2H, 9.1 Hz, arom. H), 9.74 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 29.8, 30.8 ( $\text{CH}_2$ ), 106.8, 110.3, 112.0, 125.8, 131.0 (tert. C-Atome), 122.8, 138.6, 148.7, 151.2, 160.2, 172.9 (quart. C-Atome, ein Signal fehlt aufgrund von Peaküberlappung);  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$  (340.34); Ber. C 60.00, H 4.74, N 16.46; Gef. C 59.64, H 4.65, N 16.34.

3-Methoxy-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-9-carbonitril (18b)



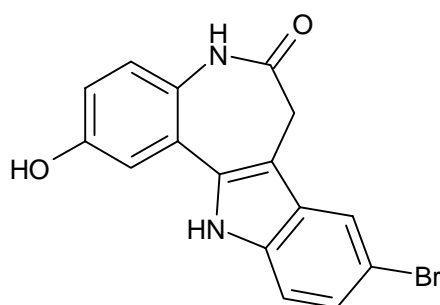


Nach AAV 4 aus 357 mg (1 mmol) 9-Brom-3-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**15d**).

Man erhält 76 mg (25%) dunkelbraune Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3080 cm<sup>-1</sup> (CH arom.), 2950 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 2210 cm<sup>-1</sup> (CN), 1665 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.85 (d, 1H, 2.52 Hz, arom. H), 6.94 (dd, 1H, 8.64/2.56 Hz, arom. H), 7.48 (dd, 1H, 8.36/1.26 Hz, arom. H), 7.56 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.69 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 8.27 (s, 1H, arom. H), 10.10 (s, 1H, NH), 12.13 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 106.9, 110.3, 112.3, 123.4, 124.2, 128.2 (tert. C-Atome), 101.0, 106.3, 114.8, 120.6, 126.5, 135.2, 137.2, 138.7, 159.6, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (303.32); HRFAB-MS [M<sup>+</sup>]: Ber. 303.1008; Gef. 303.1012.

9-Brom-2-hydroxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on  
(**19a**)



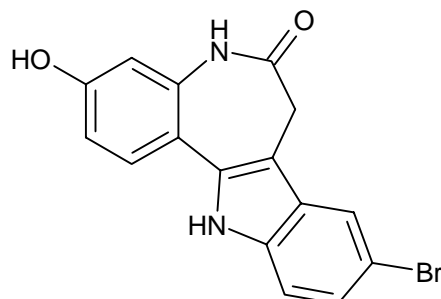
Nach AAV 5 aus 357 mg (1 mmol) 9-Brom-2-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**15a**). Reaktionszeit: 12 h.

Man erhält 101 mg (17%) eines beiges Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Zers.); IR (KBr): 3420 cm<sup>-1</sup> (OH), 1620 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.84 (dd, 1H, 8.6/2.5 Hz, arom. H), 7.07-7.09 (m, 2H, arom. H), 7.26 (dd, 1H, 8.4/1.8 Hz, arom. H), 7.38 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.88 (d, 1H, 1.5 Hz, arom. H), 9.61 (s, 1H, OH), 9.80 (s, 1H, NH), 11.75 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.2 (CH<sub>2</sub>), 112.3, 113.3, 116.0, 120.3, 123.7, 124.3 (tert. C-Atome), 107.2, 111.6, 123.5, 127.9, 128.2, 134.1,

135.8, 153.5, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (343.18); Ber. C 56.00, H 3.23, N 8.16; Gef. C 55.61, H 3.12, N 8.10.

9-Brom-3-hydroxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on  
(19b)

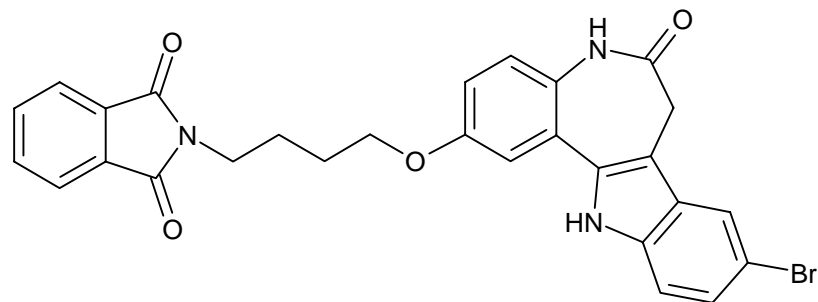


Nach AAV 5 aus 357 mg (1 mmol) 9-Brom-3-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**15d**). Reaktionszeit: 12 h.

Man erhält 192 mg (60%) hellbraune Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3340 cm<sup>-1</sup> (OH), 3310 cm<sup>-1</sup> (NH), 3160 cm<sup>-1</sup> (NH), 1630 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.67 (d, 1H, 2.4 Hz, arom. H), 6.71 (dd, 1H, 8.4/2.3 Hz, arom. H), 7.21 (dd, 1H, 8.6/1.5 Hz, arom. H), 7.34 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.54 (d, 1H, 8.1 Hz, arom. H), 7.83 (d, 1H, 1.0 Hz, arom. H), 9.88 (s, 1H, OH), 9.99 (s, 1H, NH), 11.62 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.3 (CH<sub>2</sub>), 108.1, 111.8, 113.0, 119.8, 123.6, 128.1 (tert. C-Atome), 104.8, 111.4, 113.9, 128.4, 134.7, 135.6, 137.0, 157.7, 171.1 (quart. C-Atome); C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (343.18); Ber. C 56.00, H 3.23, N 8.16; Gef. C 55.66, H 3.23, N 8.03.

2-(Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (21)

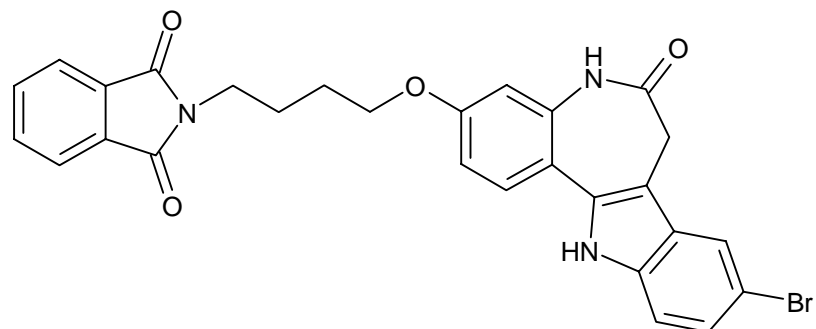


Nach AAV 6 aus 343 mg (1 mmol) 9-Brom-2-hydroxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**19a**).

Man erhält 515 mg mit Kaliumcarbonat verunreinigtes Rohprodukt, das nicht weiter gereinigt wird.

$^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.79 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 3.47 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.08 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.98 (dd, 1H, 8.9/2.8 Hz, arom. H), 7.15 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.25 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 7.27 (dd, 1H, 8.4/1.8 Hz, arom. H), 7.39 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.82-7.88 (m, 5H, arom. H), 7.90 (s, 1H, arom. H), 9.90 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH);  $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}_4$  (544.41).

3-(Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (22)

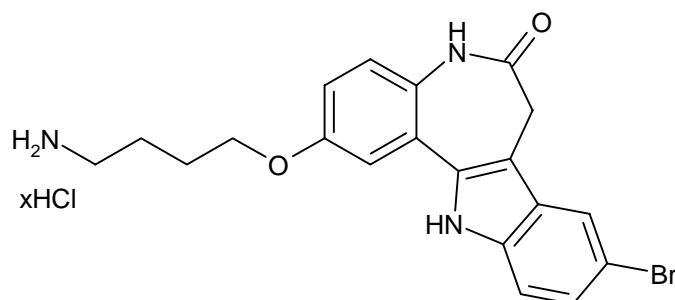


Nach AAV 6 aus 343 mg (1 mmol) 9-Brom-3-hydroxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**19b**).

Man erhält 470 mg mit Kaliumcarbonat verunreinigtes Rohprodukt, das nicht weiter gereinigt wird.

$^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.60-1.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.80-1.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.48 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.29 (t, 2H, 6.10 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.06 (t, 2H, 6.62 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 6.91 (dd, 1H, 8.64/2.52 Hz, arom. H), 6.94 (d, 1H, 2.04 Hz, arom. H), 7.21-7.40 (m, 3H, arom. H), 7.29-7.40 (m, 3H, arom. H), 7.64 (d, 1H, 8.16 Hz, arom. H), 7.75 (dd, 1H, 7.64/1.00 Hz, arom. H), 7.84 (d, 1H, 1.52 Hz, arom. H), 10.25, (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 25.5, 26.2, 31.3, 38.6, 67.4 ( $\text{CH}_2$ ), 107.2, 111.0, 113.1, 119.9, 123.8, 126.0, 128.0, 128.5, 128.9, 129.3 (tert. C-Atome), 105.2, 111.4, 115.1, 128.4, 131.0, 134.4, 135.8, 137.0, 143.2, 158.7, 167.3, 171.0, 172.4 (quart. C-Atome);  $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}_4$  (544.41).

2-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on-Hydrochlorid (25a)

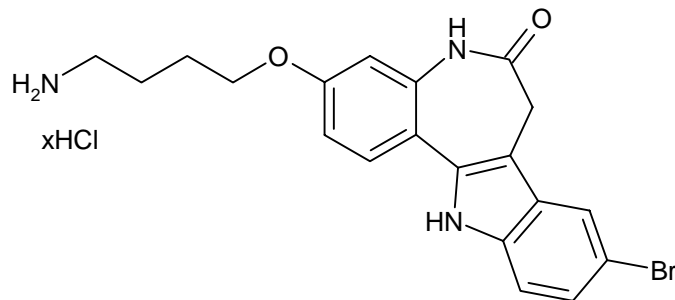


Nach AAV 7 aus 544 mg (1 mmol) 2-(Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**21**).

Man erhält 258 mg (54 %) eines beigen Pulvers.

Schmp.: 169 °C (Zers.); IR (KBr): 1620  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.73-1.82 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.87-2.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.47 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.07-4.11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.70 (dd, 1H, 8.7/2.5 Hz, arom. H), 7.18 (d, 1H, 9.2 Hz, arom. H), 7.28 (dd, 1H, 8.4/1.8 Hz, arom. H), 7.30 (d, 1H, 2.6 Hz, arom. H), 7.41 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.87 (s, 3H,  $\text{NH}_2\text{xHCl}$ ), 7.90 (s, 1H, arom. H), 9.93 (s, 1H, NH), 11.90 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 23.8, 25.7, 31.23, 55.9, 67.4 ( $\text{CH}_2$ ), 111.4, 113.4, 115.7, 120.3, 123.7, 124.4 (tert. C-Atome), 107.1, 111.5, 123.3, 128.1, 129.1, 134.0, 135.9, 154.6, 171.0 (quart. C-Atome);  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClBrN}_3\text{O}_2 \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$  (477.79); Ber. C 50.28, H 5.06, N 8.80; Gef. C 50.35, H 4.64, N 8.63.

3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (25b)

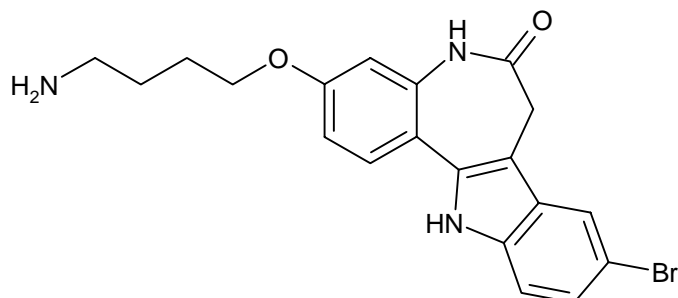


Nach AAV 7 aus 544 mg (1 mmol) 3-(Phthalimidobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**22**).

Man erhält 167 mg (35 %) eines beigen Pulvers.

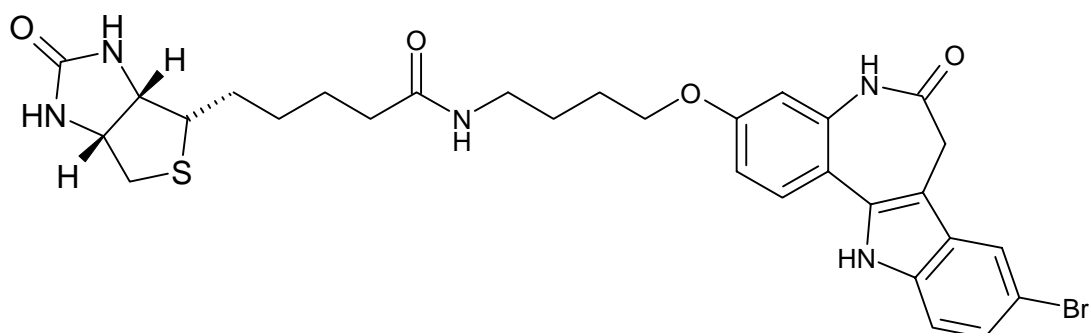
Schmp.: 229 °C (Zers.); IR (KBr): 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.75-1.81 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.71-2.95 (br. m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.49 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.04 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.83 (s, 1H, arom. H), 6.92 (d, 1H, 8.16 Hz, arom. H), 7.23 (d, 1H, 8.16 Hz, arom. H), 7.38 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.68 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.85 (s, 1H, arom. H), 8.06 (s, 3H,  $\text{NH}_2\text{xHCl}$ ), 10.05 (s, 1H, NH), 11.82 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 23.8, 25.6, 31.3, 38.4, 67.1 ( $\text{CH}_2$ ), 107.4, 110.6, 113.1, 119.9, 123.9, 128.1 (tert. C-Atome), 105.2, 111.4, 115.3, 128.3, 134.2, 135.7, 136.9, 158.5, 171.1 (quart. C-Atome);  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClBrN}_3\text{O}_2 \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$  (477.79); Ber. C 50.28, H 5.06, N 8.80; Gef. C 49.75, H 5.16, N 8.73.

3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (34)



477.79 mg (1 mmol) 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (**25b**) werden in Methanol gelöst und mittels einer mit einem basischen Anionenaustauscherharz gepackten Säule in die freie Base übergeführt. Die Elution der freien Base erfolgt mit Methanol. Anschließend wird die Lösung im Vakuum bis zur Trockene eingengt und die resultierende freie Base **34** wird direkt, ohne weitere Aufarbeitungsschritte, umgesetzt.

N-[9-Brom-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-3-yl)-oxybutyl]-5-([3a*S*,4*S*,6a*R*]2-oxo-hexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentansäureamid (35)



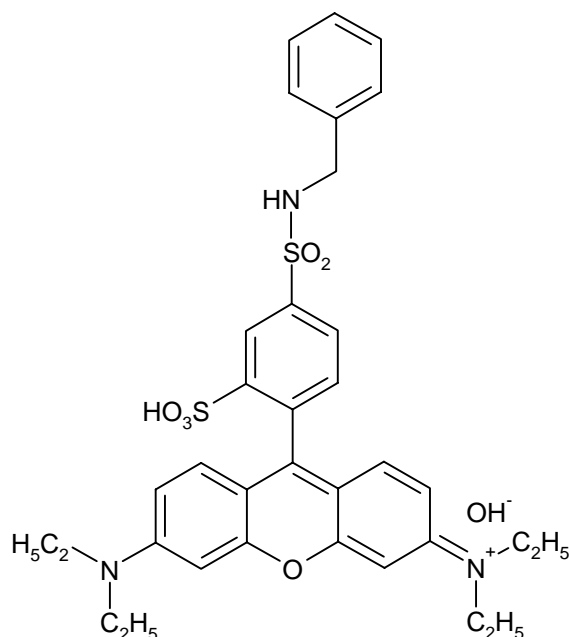
500 mg an Polystyrenharz gebundenes Biotin<sup>32</sup> (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt vom Arbeitskreis Dr. Link, Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) werden in 4 ml N-Methyl-2-pyrrolidon suspendiert und mit 640 µl Bromacetonitril und 340 µl Diisopropylethylamin versetzt und 12 h bei 50 °C leicht geschüttelt. Anschließend wird das Polystyrenharz auf einem Glassinterfilter abgesaugt und mit 50 ml DMSO und 50 ml Tetrahydrofuran gewaschen. 13 mg (0.03 mmol) 3-(4-Aminobutoxy)-9-

brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) werden in 1 ml N-Methyl-2-pyrrolidon gelöst und zum Reaktionsansatz hinzugegeben und bei 55 °C für 10 h geschüttelt. Nach Vollendung der Reaktion wird das Polyesterharz durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt und mittels MPLC unter Verwendung eines Methanol-/Wasser-Gemisches im Verhältnis 60:40 gereinigt.

Man erhält 15 mg (80%) eines hellbeigen Pulvers.

Schmp.: 197 °C; IR (KBr): 3220 cm<sup>-1</sup> (NH), 2900 cm<sup>-1</sup> (CH aliph.), 1660 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.28-1.35 (m, 2H, aliph. H), 1.41-1.64 (m, 6H, aliph. H), 1.70-1.77 (m, 2H, aliph. H), 2.05 (t, 2H, 7.12 Hz, aliph. H), 2.56 (d, 1H, 12.72 Hz, aliph. H), 2.80 (dd, 1H, 12.72/5.08 Hz, aliph. H), 3.06-3.12 (m, 3H, aliph. H), 3.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.02 (t, 2H, 6.34 Hz, aliph. H), 4.27-4.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 6.36 (s, 1H, NH), 6.42 (s, 1H, NH), 6.80 (d, 1H, 2.04 Hz, arom. H), 6.91 (dd, 1H, 8.90/2.30 Hz, arom. H), 7.23 (dd, 1H, 8.66/2.02 Hz, arom. H), 7.36 (d, 1H, 8.12 Hz, arom. H), 7.64 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.82 (t, 1H, 5.60 Hz, NH), 7.85 (d, 1H, 1.52 Hz, arom. H), 10.02 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 25.2, 25.7, 26.0, 27.9, 28.1, 31.3, 35.1, 37.9, 67.3, 88.5 (CH<sub>2</sub>), 55.3, 59.1, 60.9, 107.3, 110.6, 113.1, 120.0, 123.9, 128.0 (tert. C-Atome), 105.2, 111.5, 115.1, 128.3, 134.2, 135.7, 136.9, 158.6, 162.6, 171.1, 171.8 (quart. C-Atome); C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S (640.60); HRFAB-MS [M+H]<sup>+</sup>: Ber. 640.1593; Gef. 640.1646.

N-[9-(4-(Benzylsulfamoyl)-2-sulfophenyl)-6-diethylamino-3*H*-xanthen-3-yliden]-N-ethylethanaminiumhydroxid (39)



54 mg (0.5 mmol) Benzylamin werden zusammen mit 289 mg (0.5 mmol) Rhodamin B Säurechlorid in einem Zweihalskolben in 3 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens Diisopropylethylamin wird der Reaktionsansatz unter Stickstoff und Lichtschutz bei Raumtemperatur bis zur Vollendung der Reaktion gerührt. Anschließend wird N,N-Dimethylformamid im Hochvakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt. Zuerst wird mit Dichlormethan eluiert, um verbliebenes N,N-Dimethylformamid zu entfernen. Die Elution des Produktes erfolgt unter Verwendung eines Dichlormethan/Ethanol-Gemisches im Verhältnis 95:5.

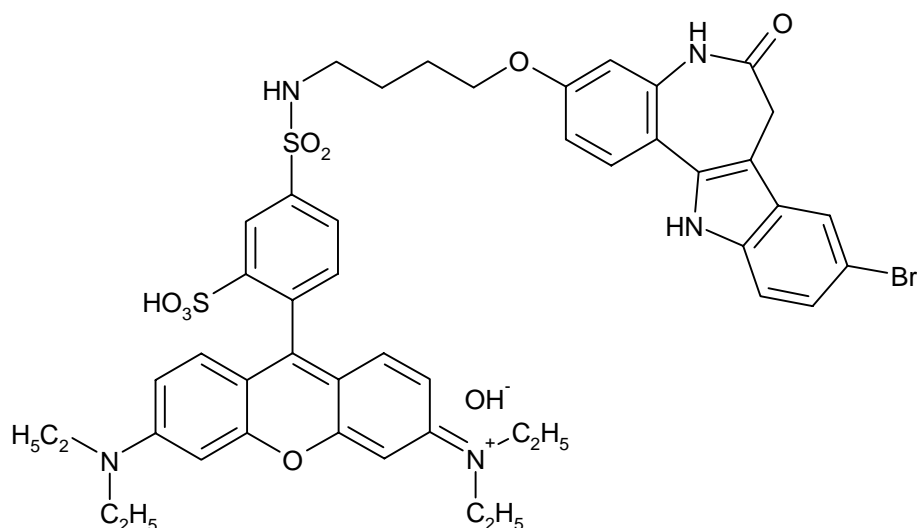
Man erhält 14 mg (4%) violette Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 2940  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliph.), 1630  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1580  $\text{cm}^{-1}$  (C=C);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.22 (t, 12H, 6.86 Hz, 4xCH<sub>3</sub>), 3.59-3.72 (m, 8H, 4x CH<sub>2</sub>), 4.15 (d, 2H, 5.08Hz, CH<sub>2</sub>), 6.94-6.96 (m, 4H, arom. H), 7.05 (dd, 2H, 9.66/2.54 Hz, arom. H), 7.24-7.34 (m, 5H, arom. H), 7.37 (d, 1H, 7.64 Hz, arom. H), 7.85 (dd, 1H, 8.12/2.04 Hz, arom. H), 8.43 (d, 1H, 1.56 Hz, arom. H), 8.53 (br. t, 1H, 5.08 Hz, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 12.4 (CH<sub>3</sub>), 45.1, 46.1 (CH<sub>2</sub>), 95.3, 113.5, 125.6, 126.4, 127.1, 127.6, 128.2, 130.3, 132.6 (tert. C-Atome), 113.4, 132.8, 137.3, 141.8, 147.8, 154.9, 157.0,



157.4 (quart. C-Atome);  $C_{34}H_{37}N_3O_6S_2 \times H_2O$  (665.83); Ber. C 63.04, H 5.76, N 6.49; HRFAB-MS  $[M+H]^+$ : Ber. 648.2202; Gef. 648.2238.

N-[9-(4-(9-Brom-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-3-yl-oxybutylsulfamoyl)-2-sulfophenyl)-6-diethylamino-3*H*-xanthen-3-yliden]-N-ethylethanaminiumhydroxid (40)



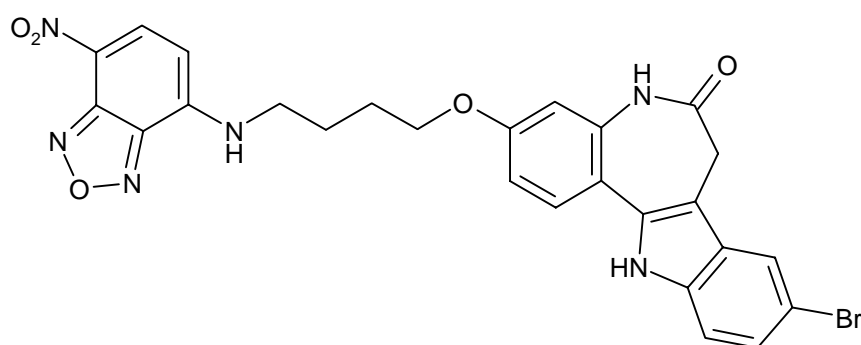
66 mg (0.16 mmol) 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**34**) werden zusammen mit 93 mg (0.16 mmol) Rhodamin B Säurechlorid in einem Zweihalskolben in 3 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens Diisopropylethylamin wird der Reaktionsansatz unter Stickstoff und Lichtschutz bei Raumtemperatur bis zur Vollendung der Reaktion gerührt. Anschließend wird N,N-Dimethylformamid im Hochvakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt. Zuerst wird mit Dichlormethan eluiert, um verbliebenes N,N-Dimethylformamid zu entfernen. Die Elution des Produktes erfolgt unter Verwendung eines Dichlormethan/Ethanol-Gemisches im Verhältnis 95:5.

Man erhält 7 mg (5%) violette Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 2940  $cm^{-1}$  (CH aliph.), 1630  $cm^{-1}$  (C=O), 1575  $cm^{-1}$  (C=C);  $^1H$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.18 (t, 12H, 6.86 Hz, 4xCH<sub>3</sub>), 1.60-1.68 (br. m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.72-1.81 (br. m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.97 (br. m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.61 (q, 8H, 6.60 Hz, 4xCH<sub>2</sub>), 6.81 (d, 1H, 2.56 Hz, arom. H), 6.89-6.97 (m, 7H, arom. H), 7.23 (dd, 1H, 8.64/1.52 Hz, arom. H), 7.32 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.47 (d,

1H, 8.12 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 8.88 Hz, arom. H), 7.83 (d, 1H, 1.56 Hz, arom. H), 7.95 (dd, 1H, 8.12/2.04 Hz, arom. H), 7.98 (t, 1H, 5.08 Hz, NH), 8.44 (d, 1H, 1.76 Hz, arom. H), 9.96 (s, 1H, NH), 11.63 (s, 1H, NH);  $C_{48}H_{50}BrN_5O_8S_2 \times H_2O$  (987.01) UV-Vis (Methanol, 200-600 nm):  $\lambda_{max} = 228$  nm, 308 nm, 560 nm; Emissions-Spektrum (Methanol, Anregungswellenlänge = 228 nm):  $\lambda_{max} = 583$  nm.

3-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (42)



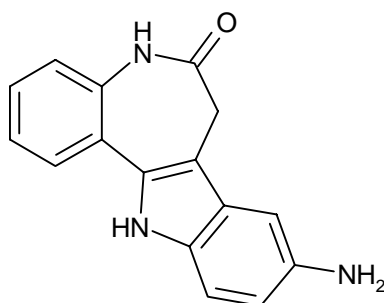
56 mg (0.14 mmol) 3-(4-Aminobutoxy)-9-brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**34**) werden zusammen mit 28 mg (0.14 mmol) 7-Chlor-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol in einem Zweihalskolben in 3 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens Diisopropylethylamin wird der Reaktionsansatz unter Stickstoff und Lichtschutz bei Raumtemperatur bis zur Vollendung der Reaktion gerührt. Anschließend wird N,N-Dimethylformamid im Hochvakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt. Zuerst wird mit Dichlormethan eluiert, um verbliebenes N,N-Dimethylformamid zu entfernen. Die Elution des Produktes erfolgt unter Verwendung von Ethylacetat.

Man erhält 20 mg (25 %) eines orangenen Pulvers

Schmp.: 201° C; IR (KBr): 3300  $cm^{-1}$  (NH), 3060  $cm^{-1}$  (CH arom.), 2910  $cm^{-1}$  (CH aliph.), 1650  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.88 (br. m, 4H,  $CH_2-CH_2$ ), 3.49 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.53-3.62 (br. m, 2H,  $CH_2$ ), 4.05-4.11 (br. m, 2H,  $CH_2$ ), 6.46 (d, 1H, 9.16 Hz, arom. H.), 6.80 (d, 1H, 2.32 Hz, arom. H), 6.91 (dd, 1H, 8.64/2.36 Hz, arom. H), 7.23 (dd, 1H, 8.64/1.76 Hz, arom. H), 7.36 (d, 1H, 8.64 Hz, arom. H), 7.63 (d, 1H, 8.88 Hz, arom. H), 7.71 (d, 1H, 1.76 Hz, arom. H), 8.53 (d, 1H, 8.12

Hz, arom. H), 9.58 (t, 1H, 5.60 Hz, NH), 10.00 (s, 1H, NH), 11.66 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 26.0, 31.3, 67.2 ( $\text{CH}_2$ ; zwei Signale fehlen aufgrund von Peaküberlappungen), 99.1, 107.4, 110.6, 113.1, 120.0, 123.9, 128.0, 137.8 (tert. C-Atome), 105.3, 111.5, 115.2, 128.4, 134.2, 135.7, 136.9, 158.6, 171.1 (quart. C-Atome; vier Signale fehlen aufgrund von Peaküberlappungen);  $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{BrN}_6\text{O}_5$  (577.40); UV-Vis (Methanol, 200-600 nm):  $\lambda_{\text{max}}$  = 234 nm, 322 nm, 465 nm; Emissions-Spektrum (Methanol, Anregungswellenlänge = 322 nm):  $\lambda_{\text{max}}$  = 530 nm.

9-Amino-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (46)

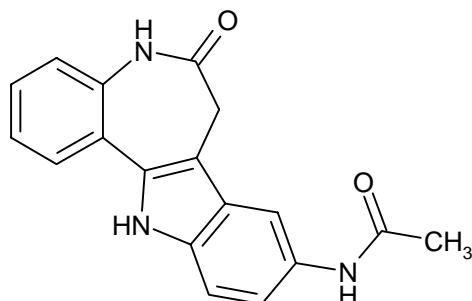


293 mg (1 mmol) Alsterpaullon (**4**) werden in 10 ml Ethanol suspendiert. Zu dieser Suspension wird eine Suspension bestehend aus 70 mg Calciumchlorid, 2.1 g Zink-Pulver und 1.8 ml Wasser hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss bis zur Vollendung der Reaktion erhitzt. Anschließend wird das Gemisch filtriert. Das Filtrat wird mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingedunstet. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 93 mg (35%) rötlich-braune Kristalle.

Schmp.: 254 °C (Zers.); IR (KBr): 3180  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1625  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.33 (br. s. 2H; Azepin- $\text{CH}_2$ ; überlagert durch  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal), 4.58 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) 6.57 (dd, 1H, 8.4/1.8 Hz, arom. H), 6.72 (m, 1H, arom. H), 7.13 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.20-7.34 (m, 3H, arom. H), 7.68 (d, 1H, 7.6 Hz, arom. H), 10.01 (s, 1H, NH), 11.06 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.7 ( $\text{CH}_2$ ), 100.5, 111.6, 112.9, 122.1, 123.5, 126.5, 127.4 (tert. C-Atome), 106.2, 123.2, 127.3, 131.3, 132.1, 135.0, 141.5, 171.5 (quart. C-Atome);

$C_{16}H_{13}N_3O \times 1H_2O$  (263.30); Ber. C 68.31, H 5.37, N 14.94; Gef. C 68.21, H 5.37, N 13.31.

9-Acetamido-7,12-dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (47)



Eine Lösung von 220 mg (0.75 mmol) Alsterpaullon (**4**) in 10 ml Eisessig wird im Ölbad bei 120 °C unter Rückfluss erhitzt. Im Laufe von 75 min werden 229 mg Eisenpulver in 10-12 Portionen hinzugegeben. Zu Beginn der Reaktion und nach 45 min werden je 0.35 ml Wasser zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach Vollendung der Reaktion wird mit Wasser verdünnt und danach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit jeweils 10 ml Wasser, 10proz. Natriumcarbonatlösung und abermals mit Wasser gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Umkristallisation aus Ethanol.

Man erhält 84 mg (37%) eines hellgrauen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3310  $cm^{-1}$  (NH), 3210  $cm^{-1}$  (NH), 3040  $cm^{-1}$  (CH arom.), 1655  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.24-7.38 (m, 5H, arom. H), 7.72 (d, 1H, 7.1 Hz, arom. H), 7.94 (s, 1H, arom. H), 9.81 (s, 1H, NH), 10.10 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO, 100.6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 23.8 (CH<sub>3</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 108.0, 111.3, 115.8, 122.2, 123.6, 126.7, 127.9 (tert. C-Atome), 107.3, 122.8, 126.2, 131.7, 133.0, 134.1, 135.3, 167.6, 171.4 (quart. C-Atome);  $C_{18}H_{15}N_3O_2$  (305.34); Ber. C 70.81, H 4.95, N 13.76; Gef. C 70.30, H 5.26, N 13.42.

## **7.2 Versuche zu Kapitel 3**

### **7.2.1 Allgemeines**

#### **7.2.1.1 Verwendete Geräte**

##### **Zentrifugen**

Eppendorf Centrifuge 5417

Jouan GR 412

Labofuge 300, Heraeus

2K15, Bioblock Scientific

##### **pH-Meter**

Denver Instrument basic

##### **Mikroskop**

Wild Heerbrugg

##### **Waagen**

Mettler PJ 3600 DeltaRange (5-3100g)

Mettler AJ 150 (0.050-150g)

##### **Schüttelapparatur für Bäder**

Kika Labortechnik KS 250 basic

##### **Schüttelapparatur für Eppendorf-vials**

Heidolph Top Mix 94323, Bioblock Scientific

##### **Vakuumtrockner für Gele**

Gel Dryer Model 583, Biorad

RC 10.10, Jouan

##### **Wasserbad**

Bioblock Scientific Code 92607

##### **Spannungsquellen**

Elektrophoresis Power Supply EPS 500/40, Pharmacia

Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia

**Elektrophorese-Kammer**

Hoefer Scientific Instruments SE 600 89-0057

**Transfer der Proteine auf Nitrocellulose**

W.E.P. Company, Inc., MilliBlot™ Graphite, Elektrobloetter I 00922

### 7.2.1.2 Materialien

#### Aktivierte Trägermaterialien

Cyanobromid-aktivierte Sepharose 4B, Sigma

Bio-Rad 10 Gel, Ester-aktivierte Agarose, Bio-Rad

Epoxy-aktivierte Sepharose 6B, Spacer bestehend aus 12 Atomen, Sigma

Reacti-Gel™ 6X, 1,1'-Carbonyldiimidazol-aktivierte 6% crosslinked Agarose, Pierce

#### Molekularmassenstandards

SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range, Biorad

Prestained SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range, Biorad

#### Chemilumineszenz-Reagenz

ECL™ (Enhanced Chemiluminescence), Amersham Pharmacia Biotech

#### Film

ECL Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech

#### Entwickler-Lösung für Western Blot

Kodak LX 24

#### Fixier-Lösung für Western Blot

Kodak AL 4

#### Primäre Antikörper

anti-PSTAIRE (CDK1/CDK2), monoklonal, Sigma

anti-CDK5 (CDK5), polyklonal, Santa Cruz

anti-GSK-3β (GSK-3β), polyklonal, Stressgen Transduction Laboratories

#### Sekundäre Antikörper

anti-mouse (CDK1/CDK2), monoklonal, horseradish peroxidase linked F(ab)<sub>2</sub> fragment, Amersham

anti-rabbit (CDK5/GSK-3β), polyklonal, horseradish peroxidase linked F(ab)<sub>2</sub> fragment, Amersham

### 7.2.1.3 Lösungen

#### Kupplungs-Pufferlösung pH 8.5

16.8 g Natriumhydrogencarbonat, 11.68 g Natriumchlorid, Aqua dem. ad 1 l, konz. Salzsäure zur Einstellung des pH-Wertes

#### Matrix-Pufferlösung pH 7.4

12.114 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan A (pH 7.4), 0.420 g Natriumfluorid, 29.2 g Natriumchlorid, 2.92 g Edetinsäure, 3.856 g Ethylenglycolbis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 2 ml NP-40, 2 ml Leupeptin 10 mg/ml, 2 ml Aprotinin 10 mg/ml, 2 ml Sojabohnen Trypsin-Inhibitor 10 mg/ml, 2 ml Benzamidin (0.0873 g/5 ml), Aqua dem. ad 2 l, konz. Salzsäure zur Einstellung des pH-Wertes

#### Homogenisierungs-Pufferlösung

12.96 g  $\beta$ -Glycerolphosphat, 5.6 g Nitrophenylphosphat, 5.24 g 3-(n-Morpholino)-propansulfonsäure, 5.70 g Ethylenglycolbis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 1.428 g Magnesiumchlorid, 0.308 g Dithiothreitol, 0.184 g Natriumvanadat, 0.042 g Natriumfluorid, 0.218 g Dinatriumphosphat, 1 ml Leupeptin 10 mg/ml, 1 ml Aprotinin 10 mg/ml, 1 ml Sojabohnen Trypsin-Inhibitor 10 mg/ml, 1 ml Benzamidin (0.0873 g/5 ml), Aqua dem. ad 1 l, konz. Salzsäure zur Einstellung des pH-Wertes

#### Laemmlipufferlösung

20 ml 0.5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl pH 6.8, 40 ml Natriumlaurylsulfat-Lösung 10%, 20 ml Glycerol, 5 ml Bromphenolblau-Lösung 0.1%, 4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, Aqua dem. ad 100 ml

#### Gelelektrophorese-Lösung

30 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 144 g Glycin, 10 g Natriumlaurylsulfat, Aqua dem. ad 10 l

#### Anoden-Lösung 1

36.34 Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 800 ml Aqua dem., Methanol ad 1 l



**Anoden-Lösung 2**

3.02 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 800 ml Aqua dem., Methanol ad 1l

**Kathoden-Lösung**

3.02 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 3 g Glycin, 800 ml Aqua dem., Methanol ad 1l

**Tris Pufferlösung Saline Tween 20 pH 7.4 (TBST)**

87.66 g Natriumchlorid, 78.8 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 10 ml Tween 20, 45 ml konz. Salzsäure, Aqua dem. ad 10 l

**Lösungen für Silber-Färbung****Fixier-Lösung**

500 ml Methanol, 500 ml Aqua dem., 1 ml Formaldehyd-Lösung 35%

**Quell-Lösung**

90 µl Dithiothreitol 0.1M (15.424 g/l), 250 ml Aqua dem.

**Silbernitrat-Lösung**

200 mg Silbernitrat, 200 ml Aqua dem.

**Entwickler-Lösung**

12 g Natriumcarbonat, 200 µl Formaldehyd-Lösung 35%, 400 ml Aqua dem.

**7.2.1.4 Biologisches Material**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Seesternooocyten-, Seeigelooocyten-, Schweinehirn-, Schweinethymus-, und Rattengewebeextrakte sowie die verwendeten Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Meijer, Station Biologique de Roscoff, Frankreich, nach publizierten Methoden gewonnen und für die Durchführung der Testungen zur Verfügung gestellt.<sup>57</sup>

## 7.2.2 Methoden

### AAV 8: Immobilisierung von Paullonen an aktivierten Trägermaterialien

1.0 ml Trägermaterial-Suspension wird für 30 sek bei 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis das resultierende Zentrifugat ein Volumen von 0.5 ml erreicht hat. Der Überstand wird verworfen und die 0.5 ml Trägermaterial werden mit 250 ml 1 mM Salzsäure gewaschen. Anschließend wird die Matrix mit 10 ml Kupplungspufferlösung pH 8.5 gewaschen und dann in 6 ml dieser Lösung suspendiert. Nach Zugabe von 1.25 ml einer 1 mM Lösung des Paullons in DMSO wird die Suspension bei 4°C über Nacht geschüttelt. Anschließend wird die Suspension 30 sek bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 10 ml 1 M Ethanolamin-Lösung pH 10.5 versetzt. Nach 2 h wird erneut 30 sek bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand zuerst zweimal 5 min mit 0.1 M Natriumacetat/0.5 M Natriumchlorid/Essigsäure-Lösung pH 4 und danach dreimal mit Matrix-Puffer gewaschen. Die Matrix wird bei 4 °C als 20%ige Suspension in Matrix-Puffer aufbewahrt.

### AAV 9: Gewebe- und Zellextrakte

Die verschiedenen Gewebe werden in Homogenisierungspufferlösung suspendiert (1 g/2 ml), homogenisiert und im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird die Suspension für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird direkt für die Inkubation der Matrices verwendet. Zellen werden ebenfalls in Homogenisierungspufferlösung suspendiert (1 g/2 ml) und ohne vorangehende Homogenisierung direkt im Ultraschallbad behandelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog der Aufarbeitung der Gewebeextrakte.

### AAV 10: Inkubation der Matrices mit Gewebe-/Zellextrakten

10 µl bzw. 20 µl der jeweiligen Matrix werden mit 1 ml Matrix-Pufferlösung gewaschen und anschließend in 0.6 ml Matrix-Pufferlösung suspendiert. Nach Zugabe der jeweiligen Extrakte wird 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wird viermal 1 ml Matrix-Puffer gewaschen. Nach Zugabe

von 65 µl Laemmli-Pufferlösung wird die Probe für 3 min im Wasserbad auf 95°C erwärmt. Danach wird die Suspension zuerst gründlich geschüttelt und anschließend bei 10000 rpm zentrifugiert. Der nach dem Zentrifugieren resultierende Überstand wird zur Durchführung der Gelelektrophorese in die Geltaschen überführt.

### AAV 11: SDS-PAGE

Die Trennung der an die Matrix gebundenen Proteine erfolgt durch 10% SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter Verwendung eines bestimmten Gradientensystems, bei dem neben der Polyacrylamidkonzentration und der Pufferkonzentration auch der pH-Wert verändert wird. Das Polyacrylamid-Gel besteht dabei aus zwei unterschiedlich zusammengesetzten Gel-Phasen, dem „spacer gel“ und dem „separating gel“. Zur Herstellung des „separating gel“ werden 6.885 ml Aqua dem. vorgelegt und 4.375 ml 1.5 M Tris-Puffer pH 8.8, 5.835 ml Polyacrylamid, 0.350 ml SDS 10% (Natriumlaurylsulfat), 0.030 ml Ammoniumpersulfat-Lösung 10% und 0.030 ml TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) nacheinander hinzugefügt. Die Ammoniumpersulfat-Lösung und TEMED werden erst direkt vor dem Gießen des Gels hinzugefügt, um eine vorzeitige Polymerisation des Polyacrylamid-Gels zu verhindern. Nachdem das Gel gegossen worden ist, wird die Oberseite des Gels mit ein paar Tropfen Butanol egalisiert und gleichzeitig dadurch vor Sauerstoff geschützt. Nach einer Polymerisationszeit von 1 h wird die Butanol-Schicht durch dreimaliges Waschen mit Aqua dem. entfernt. Für das „spacer gel“ werden 4.275 ml Wasser vorgelegt und mit 1.25 ml Polyacrylamid, 1.875 ml 0.5 M Tris-Puffer pH 6.8, 0.075 ml SDS 10%, 0.025 ml Ammoniumpersulfat-Lösung 10% und 0.0125 ml TEMED versetzt. Die Ammoniumpersulfat-Lösung und TEMED werden abermals erst direkt vor Gebrauch hinzugefügt. Die Lösung wird auf das „separating gel“ gegossen und der Platzhalter für die Geltaschen platziert. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 30 min wird der Platzhalter entfernt und die entstandenen Geltaschen gut mit Aqua dem. gewaschen und das Aqua dem. anschließend entfernt. Das Gel wird in die mit Gelelektrophorese-Lösung gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt.

Die Geltaschen werden mit den nach AAV 10 erhaltenen Untersuchungslösungen mittels einer Spritze beschickt. Die Menge an Lösung richtet sich nach der Empfindlichkeit des nachgeschalteten Analysenverfahrens. Für Silberfärbungen werden die Geltaschen mit 40 µl der Untersuchungslösung beschickt. Für nachfolgende Western Blot-Analysen sind 10 µl der Untersuchungslösung ausreichend. Zur Detektion der Molekularmasse der einzelnen Proteinbanden wird in mindestens eine der Geltaschen anstelle der Untersuchungslösung ein Molekularmassenmarker injiziert. Bei anschließenden Western Blot-Untersuchungen werden 10 µl eines gefärbten SDS-PAGE Molekularmassenstandards verwendet. Zur Durchführung einer Silberfärbung nach der Gelelektrophorese sind 3-4 µl eines regulären SDS-PAGE Molekularmassenstandards ausreichend. Die Migration der Proteine erfolgt über Nacht bei einer Spannung von ca. 42 V. Um die Migration zu beschleunigen, kann die Spannung auf bis zu 200 V erhöht werden. Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgt die Detektion der Proteine durch Western Blot oder Silber-Färbung.

#### AAV 12: Western Blot

Für den Western Blot werden die Proteine von den durch die vorangegangene Gelelektrophorese erhaltenen Gelen auf eine 0.1 µm Nitrocellulose-Membran elektrophoretisch transferiert. Dafür wird zuerst die mit der Anoden-Lösung 2 getränkte Nitrocellulose-Membran und anschließend drei Lagen Whatman Filterpapier auf das Gel gelegt. Das erste Filterpapier wird vorher mit Anoden-Lösung 2, die anderen beiden mit Anoden-Lösung 1 getränkt. Die andere Seite des Gels wird mit drei Lagen in Kathoden-Lösung getränktem Whatman Filterpapier bedeckt. Die für die Transferierung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran notwendige Stromstärke beträgt 1.5 mA/cm<sup>2</sup>. Daher muss die Fläche des Gels vermessen und diese mit dem Faktor 1.5 multipliziert werden, um die benötigte Stromstärke zu errechnen. Um nach dem Transfer der Proteine verbleibende unspezifische Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran zu eliminieren, wird die Membran 1-2 h in einer 5%igen Lösung von Milchpulver in TBST-Lösung geschwenkt. Die Milchpulver-Lösung wird verworfen und die Nitrocellulose-Membran gründlich mit TBST-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Nitrocellulose-Membran für 1-2 h mit

25 ml einer Lösung des entsprechenden primären Antikörpers versetzt. Dafür wird eine 1/2500 Verdünnung des Antikörpers in TBST-Lösung hergestellt. Nach Beendigung der Antikörper-Inkubation wird die Nitrocellulose-Membran viermal 15 min gründlich mit TBST-Lösung gewaschen. Anschließend werden 25 ml einer 1/1000 Verdünnung des zu verwendenden sekundären Antikörpers in TBST-Lösung für 1-2 h auf die Nitrocellulose-Membran gebracht. Danach wird die Nitrocellulose-Membran erneut viermal 15 min mit TBST-Lösung gründlich gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt nach Einwirkung von 6 ml ECL-Lösung durch Belichtung eines ECL Hyperfilms in der Dunkelkammer. Als Entwickler-Lösung wird 1 l Kodak LX 24 verwendet. Zur Beendigung der Entwicklung wird der Film in 1 l 7%ige Essigsäure-Lösung überführt und anschließend in 1 l Kodak AL 4-Lösung fixiert. Die Belichtungszeiten schwanken je nach Intensität der Banden zwischen 1-5 min. Abschließend werden die Filme mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### AAV 13: Silber-Färbung

Das zu färbende Gel wird 3 h in der Fixier-Lösung gewaschen. Diese wird anschließend verworfen und das Gel in der Quell-Lösung 30 min quellen gelassen. Danach wird die Quell-Lösung ebenfalls verworfen und die Silbernitrat-Lösung vorsichtig über das Gel gegossen. Nach einer Belichtungszeit von 10 min wird das Gel weitere 25 min in der Silbernitrat-Lösung geschwenkt. Die Silbernitrat-Lösung wird verworfen und das Gel einmal mit 300 ml Aqua dem. und zweimal mit je 100 ml Entwickler-Lösung gewaschen. Danach wird das Gel mit 200 ml Entwickler-Lösung versetzt und die Farbentwicklung der Proteinbanden beobachtet. Wenn die Proteinbanden die gewünschte Farbtintensität erreicht haben, wird die Farbentwicklung durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure gestoppt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird das Gel gründlich mit Aqua dem. gewaschen und im Vakuum bei 70 °C 3 h lang getrocknet.

#### AAV 14: Vorschrift zur Gewinnung der Proteine für die Mikrosequenzanalysen

Die Proben werden mittels 10% SDS-PAGE unter Verwendung von Gelen mit einer Schichtdicke von 1.5 mm getrennt. Die Herstellung der Gele erfolgt analog der in AAV 11 beschriebenen Vorschrift für Gele der Schichtdicke 0.75 mm (s.o.), jedoch unter Verwendung der doppelten Volumina der einzelnen Bestandteile. Die Menge an injizierter Untersuchungs-Lösung beträgt 100 µl. Zur Detektion der Molekularmassen der nach der Gelelektrophorese erhaltenen Proteinbanden werden 3-4 µl regulärer SDS-PAGE Molekularmassenstandard anstelle der Untersuchungs-Lösung in eine der Geltaschen injiziert. Nach Vollendung der Gelelektrophorese werden die Gele zweimal 20 min in 100 ml eines Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisches (50/10/40) fixiert und anschließend mit 200 ml einer Amidoschwarz-Lösung (3 mg/100 ml) versetzt. Nach mehrstündiger Inkubation und Erreichen der gewünschten Farbintensität wird das Gel dreimal 15 min mit Aqua dem. gewaschen. Die gefärbten Banden werden aus dem Gel herausgeschnitten und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

## 7.3 Versuche zu Kapitel 4

### 7.3.1 Biologische Testsysteme

Die in diesem Kapitel beschriebenen Testsysteme wurden im Arbeitskreis von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) für die Testung der Paullone bezüglich ihrer CDK1/Cyclin B-, CDK5/p25- und GSK-3 $\beta$ -inhibitorischen Aktivität verwendet.

#### 7.3.1.1 CDK1/Cyclin B-Testsystem<sup>78</sup>

CDK1/Cyclin B wird aus sich in der M-Phase befindlichen Oocyten des Seesterns *Marthasterias glacialis* gewonnen. Die Reinigung erfolgt mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von p<sup>9CKhs1</sup>-Sepharose-Kügelchen. Die Elution erfolgt durch freies p<sup>9CKhs1</sup>. Die CDK1-Untersuchungslösung (Endvolumen 30  $\mu$ l) enthält 0.5-1  $\mu$ l gereinigtes Enzym, 5  $\mu$ l Histon H1 (5 mg/ml), 5  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (15  $\mu$ M, 3000 Ci/mmol, 1mCi/ml) und 3  $\mu$ l des Inhibitors in Puffer-Lösung C (60 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 30 mM p-Nitrophenylphosphat, 25 mM MOPS (pH 7.2), 5 mM EGTA, 15 mM Magnesiumchlorid, 1mM Dithiothreitol, 1mM Natriumvanadat und 1 mM Phenylphosphat). Zur Bestimmung der maximalen Enzymaktivität wurde Puffer-Lösung C anstelle des Inhibitors verwendet. Unspezifische Bindungen werden durch Abwesenheit von Histon H1 in der Analysenlösung ermittelt und von den jeweiligen Werten der Untersuchungslösungen subtrahiert. Die Versuche werden durch Zugabe von radioaktivem ATP gestartet und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30 °C werden 25  $\mu$ l des Lösungsüberstandes auf 2.5 x 3.0 cm Whatman P81 Phosphocellulose-Papier getupft. Nach 20 s werden die Filter fünfmal (für jeweils mindestens fünf Minuten) mit 0.1proz. Phosphorsäure gewaschen. Die nassen Filter werden anschließend in 1 ml ACS Szintillationsmischung (Amersham) überführt. Nach dem Mischen wird die <sup>32</sup>P Radioaktivität mittels eines Packard Tri-Carb-Zählers bestimmt. Kontrollanalysen werden mit entsprechenden DMSO-Verdünnungen durchgeführt, da der Inhibitor in Form einer 100 mM Stammlösung in DMSO verwendet wird. Die Endkonzentration an DMSO beträgt jedoch niemals mehr als 1%. Die Kinase-Aktivität wird ausgedrückt in pmol inkorporierter

Phosphatgruppen in Histon H1 nach einer Inkubationszeit von 10 min oder in Prozent der maximalen Kinase-Aktivität. Für alle getesteten Verbindungen werden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um  $IC_{50}$ -Werte daraus abzuleiten. Alle Messungen erfolgen als Dreifachbestimmungen.

### 7.3.1.2 CDK5/p25-Testsystem

CDK5/p25 wird durch Mischen gleicher Teile rekombinanter Säugetier-CDK5 und in *E. coli* exprimiertem p25 gewonnen. p25 wird als GST (Glutathion S-Transferase) Fusionsprotein exprimiert und anschließend affinitätschromatographisch unter Verwendung von Glutathion-Agarose gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität wird in Puffer-Lösung C (60 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 30 mM p-Nitrophenylphosphat, 25 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM EGTA, 15 mM Magnesiumchlorid, 1mM Dithiotreitol, 1mM Natriumvanadat und 1 mM Phenylphosphat.) unter Verwendung von 1 mg/ml Histon H1 in Gegenwart von 15  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol, 1mCi/ml) durchgeführt. Das Endvolumen der Untersuchungslösung beträgt 30  $\mu$ l. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30 °C werden 25  $\mu$ l des Lösungsüberstandes auf 2.5 x 3.0 cm Whatman P81 Phosphocellulose-Papier getupft und wie beim CDK1/Cyclin B-Testsystem beschrieben weiter analysiert.

### 7.3.1.3 GSK-3 $\beta$ -Testsystem

GSK-3 $\beta$  wird in Sf9 Insektenzellen exprimiert und anschließend gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgt in Puffer-Lösung A (10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EGTA, 1mM Dithiotreitol, 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 50  $\mu$ g/ml Heparin). Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wird eine 1/100 Verdünnung in 1 mg/ml BSA/10 mM Dithiothreitol verwendet und mit 5  $\mu$ l 40  $\mu$ M Glutathion-Synthase-1-Peptid (GS-1-Peptid) als Substrat versetzt. Die Messung der Kinaseaktivität erfolgt in Gegenwart von 15  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol, 1mCi/ml). Das Endvolumen der Untersuchungslösung beträgt 30  $\mu$ l. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C werden 25  $\mu$ l des Lösungsüberstandes auf 2.5 x 3.0 cm Whatman P81



Phosphocellulose-Papier getupft und wie beim CDK1/Cyclin B-Testsystem beschrieben weiter analysiert.

#### **7.3.1.4 In vivo Inhibition der Zellteilung von künstlich befruchteten Seeigeloocyten**

Gewinnung der Eizellen und Spermien:

0.2 ml einer 0.2 molaren Acetylcholin-Lösung werden durch die Peribuccalmembran in den Seeigel injiziert. Wenn es sich um einen männlichen Seeigel handelt, wird dieser umgedreht über einer Petrischale geschüttelt. Die Spermien werden mittels Pipette in ein Eppendorf-vial überführt und bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Wenn es sich um einen weiblichen Seeigel handelt, wird dieser umgedreht auf ein Becherglas gesetzt. Die erhaltene Eizellen werden durch Filtration durch eine Gaze gereinigt und anschließend 30 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Eizellen dreimal mit filtriertem Meerwasser gewaschen worden sind, wird eine 10proz. Suspension in Meerwasser hergestellt.

Künstliche Befruchtung:

10 ml der Eizellen-Suspension werden mit 0.1 ml einer 10proz. Lösung von Glycin in filtriertem Meerwasser versetzt. Anschließend werden zwei Tropfen Spermien in 10 ml filtriertes Meerwasser gegeben. Die künstliche Befruchtung der Eizellen erfolgt durch Zugabe eines Tropfens der Spermien-Lösung zu 10 ml der Eizellen-Suspension. Zur Kontrolle wird das Fortschreiten der Befruchtung unter dem Mikroskop beobachtet. Zwei Minuten nach der Befruchtung wird die Suspension eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert, um überflüssige Spermien zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und der Rückstand dreimal mit filtriertem Meerwasser gewaschen.

Testung der Substanzen auf ihre inhibitorische Aktivität:

Zuerst wird eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Substanz in DMSO hergestellt. 10 µl dieser Verdünnungen werden jeweils zu einer Lösung bestehend aus 890 µl filtriertem Meerwasser und 100 µl der Suspension von befruchteten Eizellen gegeben. Für die Blindprobe werden

10 µl DMSO anstelle der zu untersuchenden Substanz verwendet. Nach zwei Stunden wird der Fortschritt der Zellteilung unter dem Mikroskop beobachtet. Es werden je Verdünnungsstufe zweihundert Zellen untersucht. Die Anzahl derer, bei denen eine Zellteilung stattgefunden hat, sowie die Anzahl derer, bei der keine Zellteilung stattgefunden hat, wird dokumentiert. Aus den ermittelten Daten kann der  $IC_{50}$ -Wert abgeleitet werden. Der  $IC_{50}$ -Wert ist diejenige Konzentration der untersuchten Substanz, bei der die Zellteilung zu 50% inhibiert wird.

### **7.3.2 In vitro Tumorzelllinien-Screening des NCI**

Die Untersuchung auf Antitumoraktivität der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Substanzen erfolgte im Rahmen des in vitro Tumorzelllinien-Screenings des National Cancer Institutes, Bethesda, USA.

Die zu untersuchenden Substanzen werden dabei an 60 verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien bezüglich ihrer Zellproliferationshemmenden Wirkung getestet. Die 60 Tumorzelllinien leiten sich von 9 unterschiedlichen Krebsarten ab. Diese beinhalten Leukämie, Melanom, Krebs des Zentralnervensystems sowie Lungen-, Darm-, Nieren-, Eierstock-, Prostata- und Brustkrebs.

Die Tumorzelllinien werden auf Mikrotiterplatten mit fünf verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-8}$  M bis  $10^{-4}$  M) der zu testenden Substanzen versetzt. Nach 48 h wird das Medium entfernt, die Zellen fixiert, gewaschen und anschließend mit dem Farbstoff Sulforhodamin B versetzt. Dieser Farbstoff vermag an basische Aminosäurereste in Proteinen zu binden. Dies ermöglicht eine spektralphotometrische Bestimmung der Zellmasse und damit auch der prozentualen Zellproliferationsinhibition durch Messung des angefärbten, solubilisierten Rückstandes in den Kavitäten der Mikrotiterplatten.

Die Ergebnisse werden in Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt und die molaren Konzentrationen der Testsubstanzen als dekadischer Logarithmus angegeben, die eine 50proz. Wachstumshemmung ( $GI_{50}$ ), eine totale Wachstumshemmung (TGI) oder ein Absterben der Hälfte der Tumorzellen ( $LC_{50}$ ) hervorruft. Für jeden dieser drei Parameter errechnet das NCI

einen sog. Meangraph Midpoint (MG\_MID) als Mittelwert der dekadischen Logarithmen über die Gesamtheit der 60 Tumorzelllinien.

Zusätzlich erfolgt eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen. Diese Diagramme veranschaulichen die Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber den jeweiligen Testsubstanzen in Bezug auf den Meangraph Midpoint. Die drei Meangraph Midpoint-Werte bilden dabei die zentrale Achse der Balkendiagramme. Die Länge der Balken stellt die Empfindlichkeit einer Zelllinie gegenüber der Testsubstanz dar und ist proportional zur relativen Empfindlichkeit der Zelllinie im Vergleich mit dem Meangraph Midpoint-Wert. Zelllinien, die eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Testsubstanz als die durch den Meangraph Midpoint-Wert ausgedrückten aufweisen, werden durch einen Balken nach rechts im Balkendiagramm dargestellt. Zelllinien mit einer geringeren Empfindlichkeit erhalten einen Balken nach links. Da die Angabe der Werte logarithmisch erfolgt, bedeutet eine Erniedrigung des Meangraph Midpoint Wertes um 1, dass eine zehnfach niedrigere Konzentration der Testsubstanz zur Erzielung des antiproliferativen Effektes ausreichend ist.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) 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.
- (2) Kelland, L. R.: Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2903-2911.
- (3) 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.
- (4) Webster, K. R.: The therapeutic potential of targeting the cell cycle. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1998**, *7*, 865-887.
- (5) Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, A.; Trainor, G. T.: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Useful Targets in Cell Cycle Regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1-18.
- (6) Pavletich, N. P.: Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of CDKs, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 821-828.
- (7) Morgan, D. O.: Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
- (8) Gray, N.; Detivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L.: ATP-site Directed Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 859-875.
- (9) Meijer, L.; Leclerc, S.; Leost, M.: Properties and Potential Applications of Chemical Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 279-284.
- (10) Kamb, A.: Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *227*, 139-148.

- (11) Garrett, M. D.; Fattaey, A.: CDK inhibition and cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 104-111.
- (12) 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.
- (13) Rosania, G. R.; Chang, Y.-T.: Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1-13.
- (14) Mandelkow, E.: The tangled tale of tau. *Nature* **1999**, *402*, 588-589.
- (15) 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.
- (16) Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A.: Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 376-387.
- (17) Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, *324*, 579-581.
- (18) Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-d]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.
- (19) Smith, M. E.; Elisberg, E.; Sherrill, M. L.: Qiazoline Derivatives. II. Synthesis of 4-(4'-Diethylamino-1'-methylbutylamino)-6-methoxyquinazoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1301-1303.
- (20) Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.
- (21) Tomita, M.; Minami, S.; Uyeo, S.: The Schmidt Reaction with Benzocycloalkenones. *J. Chem. Soc.* **1969**, 183-188.
- (22) Chen, W.-Y.; Gilman, N. W.: Synthesis of 7-phenylpyrimido[5,4-d][1]benzazepin-2-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20*, 663-666.
- (23) Agarwal, A.; Jalluri, R. K.; Dewitt Blanton Jr., C.; Will Taylor, E.: A New Synthesis of the Potent 5-HT<sub>1</sub> Receptor Ligand, 5-

- Carboxyamidotryptamine (5-CT). *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1101-1110.
- (24) McOmie, J. F. W.; Watts, M. L.; West, D. E.: Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.
- (25) Meerwein, H.: *Äther*; in E. Müller (Hersg.): *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Bd. VI/3, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **1965**, 1-198.
- (26) Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W.: Gabriel-Synthese primärer Amine. *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 986-996.
- (27) Boden, N.; Bushby, R. J.; Clarkson, S.; Evans, S. D.; Knowles, P. F.; Marsh, A.: The Design and Synthesis of Simple Molecular Tethers for Binding Biomembranes to a Gold Surface. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10939-10952.
- (28) Mutschler, E.: *Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1991**, 543-557.
- (29) Wilchek, M.; Bayer, E. A.: The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- (30) Sakai, T.; Naidenko, O. V.; Iijima, H.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.: Syntheses of Biotinylated  $\alpha$ -Galactosylceramids and Their Effects on the Immune System and CD1 Molecules. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1836-1841.
- (31) Cosimelli, B.; Neri, D.; Roncucci, G.: A New Synthetic Route to 2,2':5',2''-Terthiophene-5-derivatives to Conjugate with Proteins and Monoclonal Antibodies. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11281-11290.
- (32) Golisade, A.; Herforth, C.; Wieking, K.; Kunick, C.; Link, A.: Biotin labelling of amines by polymer-assisted solution-phase synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1783-1786.
- (33) Schreiber, A. B.; Haimovich, J.: Quantitative Fluorometric Assay for Detection and Characterization of Fc Receptors. *Methods Enzymol.* **1983**, *93*, 147-155.

- (34) McGrath, J. C.; Arribas, S.; Daly, C. J.: Fluorescent ligands for the study of receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 393-399.
- (35) Janssen, M. J.; Hulst, R.; Kellogg, R. M.; Hendriks, M. M. B. W.; Ensing, K.; de Zeeuw, R. A.: Part 1: Fluorescent-labeled ligands for the benzodiazepine receptor. *Pharmazie* **2000**, *55*, 42-48.
- (36) Janssen, M. J.; Ensing, K.; de Zeeuw, R. A.: Part 2: Fluorescent-labeled ligands for the benzodiazepine receptor. *Pharmazie* **2000**, *55*, 102-106.
- (37) Heithier, H.; Hallmann, D.; Boege, F.; Reiländer, H.; Dees, C.; Jaeggi, K. A.; Arndt-Jovin, D.; Jovin, T. M.; Helmreich, E. J. M.: Synthesis and Properties of Fluorescent  $\beta$ -Adrenoceptor Ligands. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9126-9134.
- (38) Chattopadhyay, A.: Chemistry and biology of N-(7-nitro-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 1-15.
- (39) Ricci, G.; Caccuri, A. M.; Bello, M. L.; Pastore, A.; Piemonte, F.; Federici, G.: Colorimetric and Fluorimetric Assays of Glutathione Transferase Based on 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 463-465.
- (40) Dubowchik, G. M.; Ditta, J. L.; Herbst, J. J.; Bollini, S.; Vitnitsky, A.: Fluoresceinated FKBP12 Ligands for a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 559-562.
- (41) Jones, L. J.; Upson, R. H.; Haugland, R. P.; Panchuk-Voloshina, N.; Zhou, M.; Haugland, R. P.: Quenched BODIPY Dye-Labeled Casein Substrates for the Assay of Protease Activity by Direct Fluorescence Measurement. *Anal. Biochem.* **1997**, *251*, 144-152.
- (42) Chen, C.-S.; Poenie, M.: New Fluorescent Probes for Protein Kinase C; Synthesis, Characterization, and Application. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15812-15822.
- (43) Delmotte, C.; Delmas, A.: Synthesis and Fluorescence Properties of Oregon Green 514 Labeled Peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2989-2994.

- (44) Ghosh, B. P.; Whitehouse, M. W.: 7-Chloro-4-nitro-2-oxa-1,3-diazole: a New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and other Amines. *Biochem. J.* **1968**, *108*, 155-156.
- (45) Storms, R. W.; Trujillo, A. P.; Springer, J. B.; Shah, L.; Colvin, O. M.; Ludeman, S. M.; Smith, C.: Isolation of primitive human hepatopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9118-9123.
- (46) Mutschler, E.: *Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1991**, 3-49.
- (47) Pfeifer, S.: *Biotransformation von Arzneimitteln Bd. 4*, Verlag Chemie, Weinheim, **1981**; 493-496.
- (48) Bellamy, F. D.; Ou, K.: Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 839-842.
- (49) Simpson, J. C. E.; Atkinson, C. M.; Schofield, K.; Stephenson, O.: o-Amino-ketones of Acetophenone and Benzophenone Types. *J. Chem. Soc.* **1945**, 646-657.
- (50) Schröter, R.; Möller, F.: Amine durch Reduktion, in E. Müller (Hersg.): *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Bd. XI/1, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **1957**, 341-731.
- (51) Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.-H.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A.; Kunick, C.; Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1-13.
- (52) Carlsson, J.; Janson, J.-C.; Sparrman, M.: Affinity Chromatography, in J.-C. Janson; L. Rydén (Hersg.): *Protein Purification Principles, High Resolution Methods, and Applications*, VCH Publishers, Inc., New York, **1989**, 275-329.
- (53) Holtzhauer, M.: Elektrophoretische Techniken, in M. Holtzhauer (Hrsg.): *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer Verlag, Berlin, **1996**, 356-378.



- (54) Rehm, H.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1996**; 13-16.
- (55) Steck, G.: Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polyacrylamide gels by formaldehyde fixation. *Anal. Biochem.* **1980**, *107*, 21-24.
- (56) Copeland, R. A.: Protein Architecture and Analysis, in R. A. Meyers, *Molecular Biology and Molecular Medicine Vol. 5*; VCH Publishers, Inc., New York, **1996**; 115-127.
- (57) Knockaert, M.; Gray, N.; Damiens, E.; Chang, Y.-T.; Grellier, P.; Grant, K.; Fergusson, D.; Mottram, J.; Soete, M.; Dubremetz, J.-F.; Le Roch, K.; Doerig, C.; Schultz, P. G.; Meijer, L.: Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 411-422.
- (58) Primot, A.; Baratte, B.; Gompel, M.; Borgne, A.; Liabeuf, S.; Romette, J.-L.; Jho, E.; Constantini, F.; Meijer, L.: Purification of GSK-3 by Affinity Chromatography on Immobilized Axin. *Protein Expression Purif.* **2000**, *20*, 394-404.
- (59) Woodgett, J. R.; Plyte, S. E.; Pulverer, B. J.; Mitchell, J. A.; Hughes, K.: Roles of glycogen synthase kinase-3 in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 905-907.
- (60) Ferkey, D. M.; Kimelman, D.: GSK-3: New Thoughts on an Old Enzyme. *Dev. Biol.* **2000**, *225*, 471-479.
- (61) Kim, L.; Kimmel, A. R.: GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10*, 508-514.
- (62) Coghlan, M. P.; Culbert, A. A.; Cross, D. A. E.; Corcoran, S. L.; Yates, J. W.; Pearce, N. J.; Rausch, O. L.; Murphy, G. J.; Carter, P. S.; R., C. L.; Mills, D.; Brown, M. J.; Haigh, D.; Ward, R. W.; Smith, D. G.; Murray, K. J.; Reith, A. D.; Holder, J. C.: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 793-803.

- (63) Cohen, P.; Alessi, D. R.; Cross, D. A. E.: PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* **1997**, *410*, 3-10.
- (64) 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 $3\beta$  and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 251-260.
- (65) Hong, M.; R., C. D. C.; Klein, P. S.; Lee, V. M.-Y.: Lithium Reduces Tau Phosphorylation by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25326-25332.
- (66) Emily-Fenouil, F.; Ghiglione, C.; Lhomond, G.; Lepage, T.; Gache, C.: GSK $3\beta$ /shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo. *Development* **1998**, *125*, 2489-2498.
- (67) Rubinfeld, B.; Robbins, P.; El-Gamil, M.; Albert, I.; Porfiri, E.; Polakis, P.: Stabilization of  $\beta$ -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines. *Science* **1997**, *275*, 1790-1792.
- (68) 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-3b and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
- (69) 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)* **1992**, *325*, 297-299.
- (70) Weinstein, J. N.; Myers, T. G.; O'Connor, P. M.; Friend, S. H.; Fornace Jr., A. J.; Kohn, K. W.; Fojo, T.; Bates, S. E.; Rubinstein, L. V.; Anderson, N. L.; Buolamwini, J. K.; van Osdol, W. W.; Monks, A. P.; Scudiero, D. A.; Sausville, E. A.; Zaharevitz, D. W.; Bunow, B.; Viswanadhan, V. N.; Johnson, G. S.; Wittes, R. E.; Paull, K. D.: An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* **1997**, *275*, 343-349.
- (71) Boyd, M. R.: Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles Practice Oncol.* **1989**, *3*, 1-12.

- (72) Grever, M. R.; Schepartz, S. A.; Chabner, B. A.: The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622-638.
- (73) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.
- (74) Robert, J.: Anticancer screening with in vitro models. *Drugs Fut.* **1997**, *22*, 739-746.
- (75) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.: *Purification of Laboratory Chemicals*; 3<sup>rd</sup> ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**, 57-371.
- (76) Moriconi, E. J.; Maniscalco, I. A.:  $\pi$ -Equivalent heterocyclic congeners of tropone. Azatropones. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 208-215.
- (77) Balasubramanian, V.; Argade, N.: Reactions of cyclic anhydrides: Part XIII - Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyridazino[6,1-b]quinazoline-2,10-diones. *Indian J. Chem.* **1988**, *27B*, 906-908.
- (78) 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.

## 9 Gefahrstoffe

Über die toxikologischen Eigenschaften der meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und dargestellten Verbindungen liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Gefährliche Eigenschaften können nicht ausgeschlossen werden. Sie sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu handhaben.

Nachfolgende im Rahmen dieser Arbeit verwendete gefährliche Stoffe und Zubereitungen sind im Anhang der Gefahrstoffverordnung eingestuft:

Aceton:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>R 11 Leichtentzündlich</p> <p>S 2-9-16-23-33 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten-Nicht Rauchen – Dampf nicht einatmen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen</p>
Bortribromid:	<p>T+ Sehr giftig</p> <p>C Ätzend</p> <p>R 14-26/28-35 Reagiert heftig mit Wasser – Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken – Verursacht schwere Verätzungen</p> <p>S 1/2-9-26-28-36/37/39-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylen 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)</p>
1-Butanol:	<p>Xn Gesundheitsschädlich</p> <p>R 10-22-37/38-41-67 Entzündlich – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Reizt die Atmungsorgane und die Haut – Gefahr ernster Augenschäden –</p>

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 abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen

*tert.*-Butanol:

F Leichtentzündlich

Xn Gesundheitsschädlich

R 11-20 Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich beim Einatmen

S 2-9-16 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten-Nicht rauchen

Chlorwasserstoff:

C Ätzend

R 35-37 Verursacht schwere Verätzungen – Reizt die Atmungsorgane

S 1/2-7/9-26-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Behälter dicht geschlossen und an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)

Cyanide:

T+ Sehr giftig

R 26/27/28-32 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase

S 1/2-7-28-29-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – 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)

Dichlormethan:	Xn Gesundheitsschädlich R 40 Irreversibler Schaden möglich S 2-23-24/25-36/37 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Dampf nicht Einatmen – Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
N,N-Dimethylformamid:	T Giftig R 61-20/21-36 Kann das Kind im Mutterleib schädigen – Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut – Reizt die Augen S 53-45 Exposition vermeiden-Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)
Essigsäure > 90 %:	C Ätzend R 10-35 Entzündlich – Verursacht schwere Verätzungen S 1/2-23-26-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Dampf/Aerosol nicht einatmen – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)
Ethanol:	F Leichtentzündlich R 11 Leichtentzündlich S 2-7-16 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Behälter dicht geschlossen halten – Von Zündquellen fernhalten-Nicht rauchen
Ethanolamin:	Xn Gesundheitsschädlich R 20-36/37/38 Gesundheitsschädlich beim Einatmen – Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut

Ethylacetat:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>R 11 Leichtentzündlich</p> <p>S 2-16-23-29-33 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Von Zündquellen fernhalten-Nicht rauchen – Dampf nicht einatmen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen</p>
Ethylendiamin:	<p>C Ätzend</p> <p>R 10-21/22-34-43 Entzündlich – Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken – Verursacht Verätzungen – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich</p> <p>S 1/2-9-26-36/37/39-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – 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)</p>
Formaldehyd-Lösung 35%:	<p>T giftig</p> <p>R: 23/24/25-34-40-43 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Irreversibler Schaden möglich – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich</p> <p>S: 26-36/37/39-45-51 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) – Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden</p>

- Hexan: F Leichtentzündlich  
 Xn Gesundheitsschädlich  
 R11-48/20 Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen  
 S 2-9-16-24/25-29-51 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten-Nicht rauchen – Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- Hydraziniumhydroxid: T Giftig  
 N Umweltgefährlich  
 R 45-23/24/25-34-43-50/53 Kann Krebs erzeugen – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben  
 S53-26-36/37/39-45-60-61 Exposition vermeiden-Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- 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 sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren



Kaliumhydrid:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>C Ätzend</p> <p>R 14/15-34 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase – Verursacht Verätzungen</p> <p>S 8-26-36/37/39-43.12 Behälter trocken 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 Spezialpulver für Metallbrände verwenden-Kein Wasser verwenden</p>
Kaliumpermanganat:	<p>O Brandfördernd</p> <p>Xn Gesundheitsschädlich</p> <p>R 8-22 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken</p> <p>S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen</p>
2-Mercaptoethanol:	<p>T giftig</p> <p>N Umweltgefährlich</p> <p>R 22-23/24-34-51/53 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben</p> <p>S 26-36/37/39-45-61 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) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen</p>

Methanol:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>T Giftig</p> <p>R 11-23/24/25-39/23/24/25 Leicht entzündlich – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und Verschlucken</p> <p>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)</p>
Natriumazid:	<p>T+ Sehr giftig</p> <p>N Umweltgefährlich</p> <p>R 28-32-50/53 Sehr giftig beim Verschlucken – Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben</p> <p>S 28-45-60-61 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen</p>
Natriumlaurylsulfat:	<p>Xn Gesundheitsschädlich</p> <p>R 22-36/38 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Reizt die Augen und die Haut</p> <p>S 26-36 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen</p>

- Phenylhydrazin: T Giftig  
 R 23/24/25-36 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut – Reizt die Augen  
 S 1/2-28-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)
- Pyridin: F Leichtentzündlich  
 Xn Gesundheitsschädlich  
 R 11-20/21/22 Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut  
 S 2-26-28 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
- Salzsäure > 25 %: C Ätzend  
 R 34-37 Verursacht Verätzungen – Reizt die Atmungsorgane  
 S 1/2-26-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)
- Salzsäure 10-25 %: Xi Reizend  
 R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut  
 S1/2-26-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)

Schwefelsäure > 15 %:	<p>C Ätzend</p> <p>R 35 Verursacht schwere Verätzungen</p> <p>S 1/2-26-30-45 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren – Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Niemals Wasser hinzugießen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen)</p>
Silbernitrat	<p>C Ätzend</p> <p>N Umweltgefährlich</p> <p>R 34-50/53 Verursacht Verätzungen – Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben</p> <p>S26-45-60-61 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen</p>
Toluol:	<p>F Leichtentzündlich</p> <p>Xi Reizend</p> <p>R 11-20 Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich beim Einatmen</p> <p>S 2-16-25-29-33 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen – Von Zündquellen fernhalten-Nicht rauchen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen</p>

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name: Karen Wieking  
Geburtsdatum: 08.05.1973  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig

## Ausbildung

1979 - 1983 Grundschule Marschweg, Hamburg  
1983 - 1992 Gymnasium Rissen, Hamburg  
Abschluss: Abitur  
1992 - 1998 Studium der Pharmazie,  
Universität Hamburg  
Abschluss: Approbation

## Praktika

1993 Famulatur, Holthof-Apotheke, Hamburg  
05/1997 - 10/1997 Apotheke AK Barmbek, Hamburg  
10/1997 - 04/1998 Apotheke am Bahnhofsplatz, Hamburg  
06/1998 - 09/1998 Bayer Corp., West Haven (CT), USA

## Wissenschaftliche Arbeit

10/1998 - 07/2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertations,  
Arbeitskreis PD Dr. C. Kunick, Institut für Pharmazie,  
Universität Hamburg  
seit 10/1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für  
Pharmazie, Universität Hamburg