

# Entwicklung niedermolekularer Sonden als pharmakologische Werkzeuge

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Jens Hagenow**

aus

**Berlin**

Düsseldorf, März 2021

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Dr. h.c. Holger Stark
2. Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2021

„Der Müßiggänger ist ein Abenteurer im Angesicht des Todes,  
ein Kreuzritter wider das Diktat der Eile“

- Amadeu de Prado

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Holger Stark für die Stellung des interessanten Themas und die Möglichkeit in den gut ausgestatteten Laboren zu forschen.

Ebenso wusste ich zu schätzen, dass ich mit Dr. Aleksandra Zivkovic stets eine erfahrene Chemikerin für Fragen und Anregungen zur Verfügung hatte.

Dem technischen Personal der Universität Düsseldorf danke ich für Ihre tatkräftige Unterstützung. Sei es das Vermessen von NMR-Proben (Frau Breuer) oder Elementaranalysen (Frau Zerta), die Vorbereitung von biologischen Versuchen (Frau Grau), die Wartung von Laborequipment (Herr Hänig) oder das Bereitstellen von Chemikalien und das Entsorgen von Abfällen (ZCL-Team); ohne diese Tätigkeiten ist ein produktives Arbeiten nicht möglich.

Ich danke meinen Mitassistenten im Praktikum für Quantitative Analytik für eine gelungene Zusammenarbeit und die kollegiale Stimmung während der Studentenbetreuung.

Special thanks goes to Carmelo Dario Agnello for his contributions to my scientific work during his Erasmus exchange and the lively atmosphere he generated in the lab.

Für die Durchführung der biologischen Testungen danke ich meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden für ihre hervorragende Arbeit in den Zelllaboren.

Ich habe die Zeit, die ich im Labor mit meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden verbracht habe sehr genossen und möchte mich bei den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen für ihre Beteiligung daran herzlich bedanken.

Ich danke meiner Schwiegermutter Karin Kassel für die vielen Kommata, mit denen sie diese Arbeit bereichert hat und entdeckten Tippfehler, die nur durch ihr aufmerksames Lektorat ausgemerzt werden konnten

Überhaupt erst ermöglicht diese Arbeit anzufertigen, hat mir meine Familie im Allgemeinen und meine Eltern im Speziellen. Für ihre Unterstützung, Rückhalt und Antrieb bin ich sehr dankbar.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Steffi, die mich nicht nur wissenschaftlich bei meiner Dissertation unterstützte und meine Arbeit maßgeblich beeinflusste, sondern mir bei allen Lebenslagen zur Seite stand und ich stets auf Ihre Hilfe zählen konnte.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Synthese niedermolekularer chemischer Sonden für die Untersuchung des Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptors (H<sub>4</sub>R) sowie der Monoaminoxidasen (MAO) A und B.

Die Entwicklung neuer H<sub>4</sub>R-Liganden konzentrierte sich auf die Bereitstellung fluoreszenter Sonden. In der Vergangenheit konnten Fluoreszenzliganden bereits erfolgreich zur Markierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren genutzt werden. Die Markierung von humanen H<sub>4</sub>R mit fluoreszenten chemischen Sonden könnte unter anderem die Untersuchung des Expressionsmusters der H<sub>4</sub>R unterstützen. Die Struktur der generierten Sonden wurde unter anderem spektroskopisch charakterisiert und deren H<sub>4</sub>R-Affinität mittels Radioliganden-Verdrängungsexperimenten bestimmt. Den Ausgangspunkt der Synthesepaltung stellten bekannte Pharmakophore dar, die über eine hohe H<sub>4</sub>R-Affinität verfügten und auf ihre Möglichkeiten zur Derivatisierung mit Fluorophoren untersucht wurden. Dabei wurden Fälle betrachtet, die sowohl eine integrative Kopplung des Fluorophors einschlossen, als auch die Verknüpfung mit oder ohne Linker.

Die integrative Kopplung erbrachte mit Verbindung **19** einen H<sub>4</sub>R-Liganden, der über eine moderate Affinität verfügte ( $K_i = 400$  nM), dessen Emissionsmaximum ( $\lambda_{\text{maxEm}} = 400$  nm) jedoch zu nahe am Autofluoreszenzbereich von Zell- und Gewebematerial lag und sich daher nicht zur Rezeptormarkierung eignet. Die Grundstruktur dieser Verbindung orientierte sich dabei an borhaltigen Fluorophoren und Aminopyrimidinen, die für ihre hohe H<sub>4</sub>R-Affinität bekannt sind.

Die Chalconderivate **10** und **11**, bei denen eine Kopplung ohne Linker realisiert wurde, zeigten gute Fluoreszenzeigenschaften, jedoch waren die H<sub>4</sub>R-Affinitäten zu gering, um diese als pharmakologische Werkzeuge einzusetzen.

Bei den Verbindungen **21** – **29** wurde unter Verwendung von unterschiedlichen Linkern Fluorophore an H<sub>4</sub>R-affine Aminopyrimidine gekoppelt. Dabei wurde zunächst mit dem Modellfluorophor 2,4-Dinitrobenzol die optimale Linker-Anbindung evaluiert. Es ging Verbindung **26** als Leitstruktur mit einem Butyl-Linker hervor. Die Variation des Fluorophors erbrachte Verbindung **30** ( $K_i = 428$  nM), bei der eine biologisch aktive Substanz mit dem BOPPY-Fluorophor verknüpft wurde. BOPPY zeichnet sich durch geeignete Absorptions- und Emissionseigenschaften sowie eine gute Quantenausbeute aus, was eine Rezeptormarkierung in Zell- und Gewebeproben erlaubt.

Bei der Bereitstellung der chemischen Sonden zur Untersuchung der MAO-Isoformen wurden aromatische Amide erzeugt, die als Ausgangspunkte für ein Design von *multitargeting ligands* (MTLs) genutzt werden können. Die Verbindungen (**31\***, **33\***, **34\***, **55\*** und **65\***) inhibierten präferierend MAO B im nanomolaren Konzentrationsbereich und Dockingexperimente zeigten eine gute Oberflächen-komplementarität zwischen den chemischen Sonden und der MAO B-Bindetasche. Weiterführende Untersuchungen der aktivsten Verbindung **55\*** zeigten ein reversibles und kompetitives Bindungsverhalten gegenüber MAO B auf.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit sowohl Fluoreszenzliganden für den H<sub>4</sub>R als auch Inhibitoren für MAO A und MAO B erzeugt. Die hier präsentierten fluoreszenz-markierten Aminopyrimidinderivate (**21** - **30**) wurden als erfolgsversprechendste Substanzklasse identifiziert, von denen Verbindung **26** ( $K_i = 149$  nM) die höchste Affinität aufwies. Somit wurden erstmalig fluoreszente Liganden mit H<sub>4</sub>R-Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich synthetisiert, die den Grundstein für weitere Strukturoptimierungen legen.

## Summary

The present work deals with the development and synthesis of small chemical probes for investigation of the histamine-H<sub>4</sub>-receptor (H<sub>4</sub>R) and the monoamine oxidases (MAO) A and B. The development of new H<sub>4</sub>R ligands focused on the preparation of fluorescent ligands. In the past, fluorescent ligands have already been used to successfully label G protein-coupled receptors. The labeling of human H<sub>4</sub>R with fluorescent chemical probes could be an additional support to the study of the expression patterns of the H<sub>4</sub>R. The structure of the herein generated probes were characterized spectroscopically among other methods and their H<sub>4</sub>R affinity was determined by means of radioligand displacement experiments.

The plan of synthesis started from known pharmacophores, showing a high affinity towards the H<sub>4</sub>R and were investigated for possible derivatization sites for fluorescent groups. Different strategies were applied either by integrating the fluorophore into the pharmacophore or by coupling it directly or via a linker to the pharmacophore.

Integrative coupling resulted in compound **19**, showing moderate H<sub>4</sub>R-affinity ( $K_i = 400$  nM) but its emission maximum ( $\lambda_{max}Em = 400$  nm) is too close to the autofluorescence of cell and tissue material. The structure of this compound originated from H<sub>4</sub>R affine aminopyrimidines and boron-containing fluorophores.

The direct coupled Chalcone derivatives **10** and **11** exhibited good fluorescence properties but with only low to moderate H<sub>4</sub>R-affinity, thus limiting their utilization as pharmacological tools. Using a variety of linkers, different fluorophores were coupled to aminopyrimidines resulting in compounds **21** – **29**. Initially, 2,4-dinitrobenzene was used as a reference-fluorophore to evaluate the optimal nature of the linker. Compound **26** containing a butyl linker showed the highest affinity and was established as a lead structure for subsequent fluorophore variations. Compound **30** ( $K_i = 428$  nM) represents a biologically active compound containing the BOPPY fluorophore. BOPPY shows promising absorption and emission properties as well as a high quantum yield enabling it for H<sub>4</sub>R labelling in cells and tissue.

Providing chemical probes for the investigation of the MAO isoforms, aromatic amides were generated which can be used as starting material for the design of multitargeting ligands (MTLs). The compounds (**31\***, **33\***, **34\***, **55\*** and **65\***) inhibited MAO B preferentially in the nanomolar concentration range and docking experiments showed good surface complementarity between the chemical probes and the MAO B binding pocket. Further

investigations of the most active compound **55\*** showed a reversible and competitive binding behavior towards MAO B.

In summary, both fluorescent ligands for the H<sub>4</sub>R and inhibitors for MAO A and MAO B were generated in this work. The fluorescence-labeled aminopyrimidine derivatives (**21 - 30**) presented here were identified as the most promising class of substances with compound **26** ( $K_i = 149$  nM) as the most active one. Fluorescent ligands with H<sub>4</sub>R affinity in the nanomolar concentration range were thus synthesized for the first time, laying the foundation for further structural optimization.

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Oktober 2013 bis September 2019 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Holger Stark angefertigt.

## Kumulativer Teil

In Kapitel 5: der vorliegenden Dissertation ist ein kurzer Überblick über eine im Rahmen der Promotion verfassten Publikation gegeben (Zielsetzung und Zusammenfassung). Kapitel 5.3: beinhaltet die originale Veröffentlichung sowie eine Darlegung des beigetragenen Anteils des Autors zu der Publikation.

Teile dieser Dissertation sind daher bereits veröffentlicht:

Kapitel 5.3: Publikation „Potent reversible small molecule inhibitors of MAO A and MAO B with anilide motifs“

Hagenow J, Hagenow S, Grau K, Khanfar M, Hefke L, Proschak E, Stark H. Potent Reversible Small Molecule Inhibitors of MAO A and MAO B With Anilide Motifs. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:371-393.

Weitere Deklarationen von bereits veröffentlichten Teilen dieser Dissertation:

Einige Teile der Arbeit (Daten zu den Verbindungen **25**, **26**, **28** und **29**) wurden bereits im Rahmen der folgenden und von mir mitbetreuten Masterarbeit veröffentlicht:

Agnello CD. Synthesis of Potentially Brain Blood Barrier Penetrating Histamine H2 Receptor Ligands and Fluorescent H4 Receptor Ligands. *Università degli studi di Catania*. Juli 2019.

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT <sub>x</sub> R	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor X
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
BODIPY	4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BOPPY	Hydrazinverknüpfter Pyrrol-Picolinoyl-bis-(bisdifluorid) Komplex
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB <sub>x</sub> R	Cannabinoid-Rezeptor X
CCL	CC-Chemokinligand
CDI	Carbonyldiimidazol
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DEA	<i>N,N</i> -Diethylanilin
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-Pyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EP <sub>x</sub> R	Prostaglandin-EP <sub>x</sub> -Rezeptor
Eq	Äquivalent
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinasen
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FcεRI	antigen-spezifische IgE Rezeptoren
FRET	Förster Energieresonanztransfer
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
hH <sub>4</sub> R	humaner H <sub>4</sub> R
H <sub>x</sub> R	Histamin-HX-Rezeptor
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-γ-induzierten Protein 10
ISC	<i>Intersystem-Crossing</i>
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun- <i>N</i> -terminale Kinase
KI	Konfidenzintervall

$k_{ns}$	strahlungsloser Übergang
$k_s$	strahlender Übergang
LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien-B4
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mH <sub>4</sub> R	muriner H <sub>4</sub> R
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MTL	<i>multitargeting ligands</i>
MT <sub>x</sub> R	Melatoninrezeptor X
M <sub>x</sub> R	Muskarin-M <sub>x</sub> -Rezeptor
NFκB	nuklearer Faktor κ aktivierter B-Zellen
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
NPY	Neuropeptid Y
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis-Toxin
Rac	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RANTES	<i>regulated and normal T-cell expressed and secreted</i>
R.T.	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
S <sub>0</sub>	elektronischer Grundzustand
S <sub>n</sub>	angeregter elektronischer Zustand
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
TEA	Triethylamin
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor
THC	Tetrahydrocannabinol
THF	Tetrahydrofuran
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TM	transmembranäre Helix
T <sub>n</sub>	Triplettzustand
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Wenn nicht anders vermerkt, werden Aminosäuren im Dreibuchstabencode angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach dem Ballesteros-Weinstein Schema.

# Inhaltsverzeichnis

1: Theoretische Grundlagen	1
1.1: Chemische Sonden	1
1.2: Monoaminoxidasen	2
1.3: Histamin-H <sub>4</sub> -Rezeptoren	3
1.4: Fluoreszenzmarkierung von GPCRs	28
2: Zielsetzung	43
3: Ergebnisse	45
3.1: Syntheseplanung von Histamin-H <sub>4</sub> -Rezeptor-Liganden	45
3.2: Synthese von Strukturanaloga bekannter H <sub>4</sub> R-Liganden	47
3.3: Synthese von fluoreszenten H <sub>4</sub> R-Liganden	51
3.4: Photophysikalische Untersuchungen	64
3.5: Biologische Evaluation	69
4: Diskussion	80
4.1: Strukturanaloga bekannter H <sub>4</sub> R-Liganden	80
4.2: Fluoreszente H <sub>4</sub> R-Liganden	82
5: Synthese von niedermolekularen MAO-Inhibitoren	90
5.1: Zielsetzung	90
5.2: Zusammenfassung der Publikation	91
5.3: Publikation	92
6: Experimenteller Teil	131
6.1: Material und Methoden	131
6.2: Allgemeine Vorschriften	132
6.3: Synthesevorschriften	142
6.4: Bestimmung der Quantenausbeute	233
6.5: Pharmakologische Experimente	234



# 1: Theoretische Grundlagen

## 1.1: Chemische Sonden

Chemische Sonden sind niedermolekulare Verbindungen, mit denen sich die Lokalisation und Funktion von Zielproteinen in gesunden und erkrankten Zellen sowie Geweben erforschen lassen. Um mechanistische und phenotypische Fragestellungen zu beantworten, finden chemische Sonden in vereinfachten Modellen (z.B. Proteinassays oder zellbasierte Experimente) Anwendung, die den Grad der Komplexität von biologischen Systemen reduzieren. Betrachtet man in biologischen Assays die Aktivität von Enzymen oder Rezeptoren als beobachtbare Größe, stellen Effektoren und Liganden die chemischen Sonden für diese biologischen Strukturen dar.<sup>1</sup>

Gensequenzierungen führten zur Entdeckung einer Vielzahl neuer biologischer Strukturen, dessen Funktionen mit der Bereitstellung von chemischen Sonden charakterisiert werden können. Chemische Sonden binden meist schnell und reversibel an die jeweiligen Strukturen, sind mit nahezu allen Zelltypen kompatibel und können auch temporäre Effekte der Zielstrukturen aufzeigen. Daher ist ihre Nutzung als komplementäre Ergänzung zu *Knockout*-Experimenten zu betrachten, bei denen gezielt Gene durch genetische Manipulation dauerhaft und irreversibel deaktiviert werden, um biologische Mechanismen oder (patho)physiologische Vorgänge zu untersuchen.

Das Anforderungsprofil an chemische Sonden unterscheidet sich drastisch von dem niedermolekularer Therapeutika. Für Letztere sind Kriterien wie pharmakokinetische Eigenschaften (z.B. orale Bioverfügbarkeit) oder geringe Toxizität relevant, die für chemische Sonden nahezu vernachlässigbar sind, wenn man von der Verwendung in Tiermodellen absieht. Dafür müssen chemische Sonden eine hohe Affinität und Selektivität gegenüber den Zielstrukturen aufweisen, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern.<sup>1</sup>

Die molekularen Zielstrukturen, für die im Rahmen dieser Arbeit chemische Sonden entwickelt und synthetisiert wurden, sind zum einen der Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptor (H<sub>4</sub>R) und zum anderen die Monoaminoxidasen (MAO) A und B. Dabei wurden für den H<sub>4</sub>R fluoreszenzmarkierte Sonden entwickelt, die zur weiteren Aufklärung der Rezeptor-Lokalisation oder aber zur Entwicklung neuartiger Screeningmethoden eingesetzt werden können. Für MAO A und

MAO B hingegen war das Ziel möglichst kleine Moleküle zu synthetisieren, die sich als Grundbausteine für neuartige selektive oder polyfunktionale Inhibitoren eignen.

Die Entwicklung und Nutzung dieser chemischen Sonden soll die Möglichkeiten zur Untersuchung der genannten Zielproteine erweitern und ergänzen.

## 1.2: Monoaminoxidasen

Die Monoaminoxidasen (MAO) A und B sind Enzyme, die sich auf der äußeren Membran von Mitochondrien befinden und den oxidativen Abbau von Aminen katalysieren. Die Oxidation erfolgt im aktiven Zentrum der Oxidasen, indem sich das Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) befindet (Abbildung 1). Nach Bindung eines Amins wird das FAD reduziert und es wird ein enzymgebundenes Imin gebildet. Mit Sauerstoff wird das FAD reoxidiert, das Imin verlässt das aktive Zentrum und als Nebenprodukt bildet sich Wasserstoffperoxid. Im Zytosol wird das Imin zu Ammoniak und einen Aldehyd hydrolysiert, der durch Aldehyd-Dehydrogenasen weiter oxidiert werden kann.<sup>2</sup>

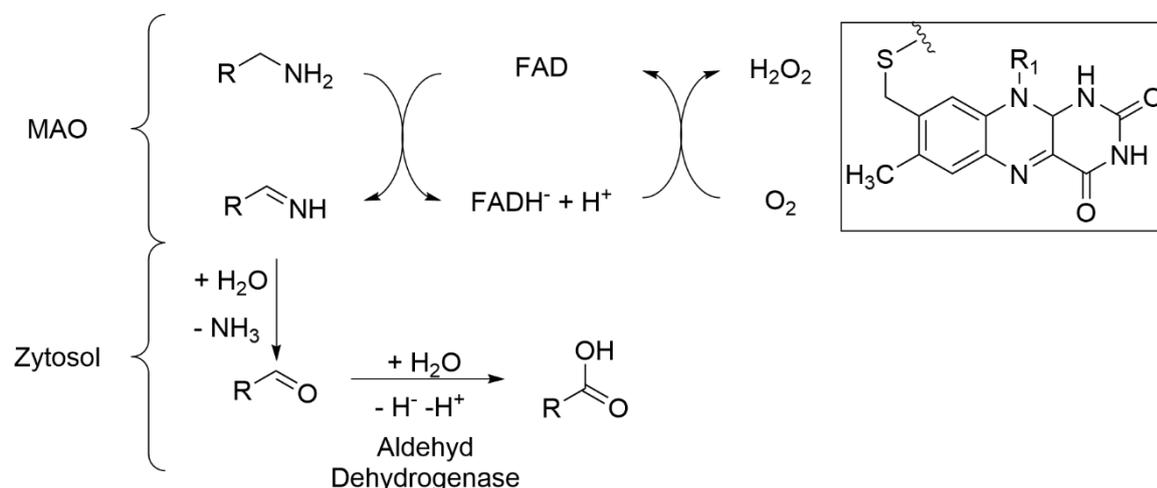


Abbildung 1: Oxidation von primären Aminen zu Iminen durch MAO-Katalyse mit anschließender Hydrolyse und Aldehyd-Dehydrogenase-katalysierter Oxidation zur Carbonsäure. Innerhalb der Box ist das Isoalloxazin gezeigt, das kovalent über einen Cysteinrest an die MAO-Enzyme gebunden ist.<sup>2</sup>

Sowohl MAO A als auch MAO B werden im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und degradieren über den oben genannten Mechanismus monoaminerge Neurotransmitter. Dabei wird Dopamin von beiden Isoformen abgebaut, wohingegen Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin vorwiegend von MAO A abgebaut werden.<sup>3,4</sup> Es ist daher naheliegend eine Vielzahl von neurologischen Erkrankungen mit MAO-Inhibitoren zu therapieren, um dem Abbau der Neurotransmitter entgegenzuwirken sowie oxidativen Stress, hervorgerufen durch

Wasserstoffperoxid, zu mindern.<sup>4,5</sup> So wird beispielsweise der Inhibitor Moclobemid als Antidepressivum eingesetzt (Abbildung 2). Die irreversiblen MAO B-Inhibitoren Rasagilin und Selegilin sind zur Therapie der Parkinson-Erkrankungen zugelassen.<sup>6,7</sup> Durch irreversible Enzymbindung können insbesondere in Verbindungen mit anderen neurotransmitter-modulierenden Substanzen schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten, wie etwa das Serotonin-Syndrom. Hochaffine reversible MAO-Inhibitoren, wie das kürzlich zur Parkinsontherapie zugelassene Saffinamid, stellen daher wichtige Therapieoptionen dar.<sup>8</sup>

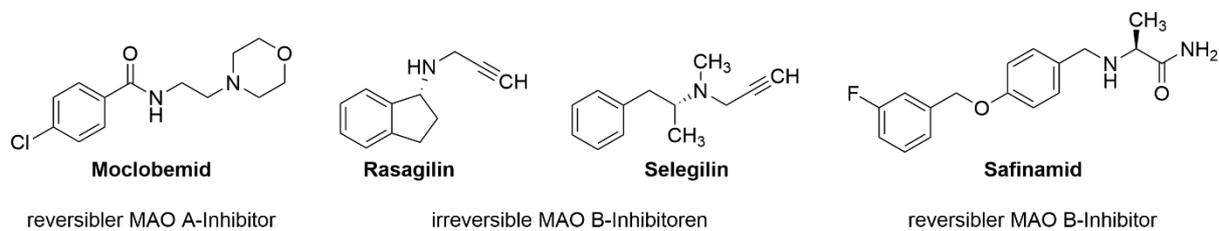


Abbildung 2: Zugelassene reversible und irreversible MAO A und B-Inhibitoren

Da neuronale Erkrankungen häufig multifaktorielle Ursachen aufweisen, ist die Entwicklung von Wirkstoffen, die mehrere Signalwege adressieren, Gegenstand der aktuellen Forschung. Die in dieser Arbeit präsentierten Verbindungen (Kapitel 5:) sollen daher Ausgangspunkte für ebensolche darstellen und dienen gleichzeitig als chemische Sonden, um Referenzstrukturen für die MAO-Inhibition zu generieren.

### 1.3: Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptoren

Mit der Entdeckung des H<sub>4</sub>R um die Jahrtausendwende wurde die Familie der Histamin-Rezeptoren vervollständigt. Im Gegensatz zu den lang bekannten und etablierten Histamin-H<sub>1</sub>-, H<sub>2</sub>- und H<sub>3</sub>-Rezeptoren (H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R und H<sub>3</sub>R) gilt es für den H<sub>4</sub>R noch sehr grundsätzliche Fragen zu klären. Kontrovers wird vor allem die Frage der Lokalisation innerhalb des menschlichen Organismus diskutiert.<sup>9,10</sup> Als gesicherte Tatsache gilt die modulierende Wirkung auf das Immunsystem, die von dem H<sub>4</sub>R ausgeht.<sup>11,12</sup> Nachgewiesene Expressionen auf Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind sowie die Tatsache, dass sich bereits einige H<sub>4</sub>R-affine Substanzen in der klinischen Testung zur Behandlung von Dysregulationen der Immunantwort befinden, bestätigen die primäre Rolle des H<sub>4</sub>R bei der Aufrechterhaltung des Immunsystems.<sup>13,14</sup> Hier zeigt sich eine gewisse Analogie zu dem H<sub>1</sub>R; die bekanntesten H<sub>1</sub>R-Antihistaminika lindern allergischen Reaktionen, welche ebenfalls auf immunologische Dysfunktionen zurückzuführen sind.<sup>15</sup>

Neben dem H<sub>1</sub>R übernimmt der H<sub>3</sub>R, der die höchste Ähnlichkeit zum H<sub>4</sub>R aufweist, wichtige Aufgaben im zentralen Nervensystem (ZNS),<sup>16</sup> sodass die Vermutung nahe liegt, dass der H<sub>4</sub>R ebenfalls an der Steuerung von zentralnervösen Prozessen beteiligt ist. Belege für die Beteiligung lassen sich aus Verhaltensexperimenten an H<sub>4</sub>R-*Knockout*-Mäusen ableiten. Die gen-manipulierten Mäuse zeigten ein gesteigertes Angstverhalten und eine höhere neuropathische Schmerzwahrnehmung.<sup>17</sup> Der fundierte Nachweis von funktional exprimierten H<sub>4</sub>R in zentralnervösen Geweben bleibt bisher ein Streitpunkt in der Forschungslandschaft. Hinweise für eine ZNS-Expression liefern Nachweise von mRNA, die den H<sub>4</sub>R codieren und Markierungen des Rezeptors mit polyklonalen Antikörpern.<sup>18</sup> Hauptkritikpunkte an diesen Hinweisen sind das mögliche Vorhandensein von Blutresten und somit H<sub>4</sub>R-tragenden Zellen des Immunsystems in den untersuchten Gewebeproben und die Tatsache, dass die verwendeten Antikörper polykonal erzeugt wurden, und somit falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können.<sup>9,10</sup>

Eine Lösungsstrategie zur Aufklärung der H<sub>4</sub>R-Lokalisation im ZNS könnte die Verwendung von visualisierbaren und selektiven Liganden zur Markierung der Rezeptoren sein. Da die Bindung von Liganden das Vorhandensein von funktionellen Bindungstaschen voraussetzt, kann so der Nachweis von auf Zelloberflächen-exprimierten H<sub>4</sub>R erbracht werden. Prinzipiell mögliche Auslesesignale für die Markierung sind Radioaktivitätsmessungen oder aber photospektroskopische Untersuchungen. Da die Herstellung radioaktiv-markierter Liganden wie beispielsweise [<sup>3</sup>H]UR-PI294 kostenaufwendig ist, sicherheitsrelevante Aspekte beinhaltet und behördlich überwacht werden muss, ist die Verwendung von radioaktiv-markierten Substanzen in vielerlei Hinsicht problematisch.<sup>19</sup> Die zugrundeliegende Arbeit fokussiert sich daher auf die Fluoreszenzmarkierung von H<sub>4</sub>R-Liganden.

### 1.3.1: Rezeptorstruktur des H<sub>4</sub>R

Die vier Rezeptorsubtypen, denen Histamin als endogener Ligand dient, gehören der Klasse A (Rhodopsin-ähnliche) der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an.<sup>20</sup> Das Erbgut des humanen H<sub>4</sub>R (hH<sub>4</sub>R), der um die Jahrtausendwende erstmals erfolgreich von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen kloniert und charakterisiert wurde,<sup>21–26</sup> ist auf dem Chromosom 18q11.2 kodiert und besteht aus rund 21 000 Basenpaaren.<sup>27</sup> Es enthält drei Exons und zwei große Introns, was das Erbmaterial von dem der H<sub>1</sub>R und H<sub>2</sub>R unterscheidet, die intronlos sind.<sup>27–29</sup> Daher sind mehrere Splicing-Varianten des H<sub>4</sub>R nachgewiesen worden,

von denen zwei nicht signalfähig sind. Die Variante H4(67) ist dabei frühzeitig nach Aminosäure 67 terminiert und der Variante H4(302) fehlen die Aminosäuren 68-155.<sup>30</sup> Zusätzlich zu den von van Rijn *et al.* beschriebenen Varianten, konnten zwei weitere identifiziert werden, welche in der Lage waren die für den H<sub>4</sub>R typische Signalkaskade auszulösen.<sup>31</sup>

Ein funktional exprimierter H<sub>4</sub>R weist 390 Aminosäuren auf, aus denen die sieben klassischen transmembranären Helices (TM) gebildet werden.<sup>20</sup> So entstehen jeweils drei extra- und intrazelluläre Schleifen sowie der extrazelluläre N-Terminus und der intrazelluläre C-Terminus. Zwischen zwei Cysteinresten - je einer auf der zweiten extrazellulären Schlaufe und der dritten Helix - bildet sich möglicherweise eine Disulfidbrücke, die die Rezeptorstruktur stabilisieren könnte. Die Disulfidbrücke könnte daher die Ligandenbindung beeinflussen, da eine Beteiligung der zweiten extrazellulären Schlaufe an der Bindung von Histamin vermutet wird. Die Aminosäuren Asp<sup>3.32</sup> und Glu<sup>5.46</sup> spielen eine Schlüsselrolle bei der Bindung von Histamin in das aktive Zentrum des Rezeptors (Abbildung 3 und Abbildung 4). Der negativ geladene Rest Asp<sup>3.32</sup> ist bei allen histaminergen Rezeptoren vorhanden und stellt wahrscheinlich einen Ankerpunkt für die protonierte Form des primären Amins des Histamins dar.<sup>32</sup>

Computergestützte Analysen und gerichtete Mutationsstudien zeigten, dass die ebenfalls negativ geladene Aminosäure Glu<sup>5.46</sup> eine Schlüsselbindestelle für die Imidazolgruppe des Histamins darstellt. Somit ist eine Analogie zum H<sub>3</sub>R hergestellt, bei dem die gleichen Aminosäuren für die Histaminbindung verantwortlich sind.<sup>33</sup> Zusammen mit den Aminosäuren Thr<sup>5.42</sup> und Trp<sup>6.48</sup> bildet Glu<sup>5.46</sup> die Bindetasche für den Imidazolring, wobei eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Trp<sup>6.48</sup> und Glu<sup>5.46</sup> postuliert wurde, um das aktive Rotamer von Trp<sup>6.48</sup> zu bilden. Zusätzlich stabilisiert wird die zu TM5 gerichtete Imidazolgruppe durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp<sup>3.32</sup> und Gln<sup>7.42</sup> und ein weiteres Wasserstoffbrückennetzwerk bestehend aus Imidazol, Glu<sup>5.46</sup>, Ser<sup>6.52</sup> und Trp<sup>6.48</sup>.<sup>34,35</sup> Eine mögliche Stelle für eine Glycosylierung stellen zwei Asparaginreste (Asn<sup>5</sup> und Asn<sup>9</sup>) am N-Terminus dar.<sup>36</sup>

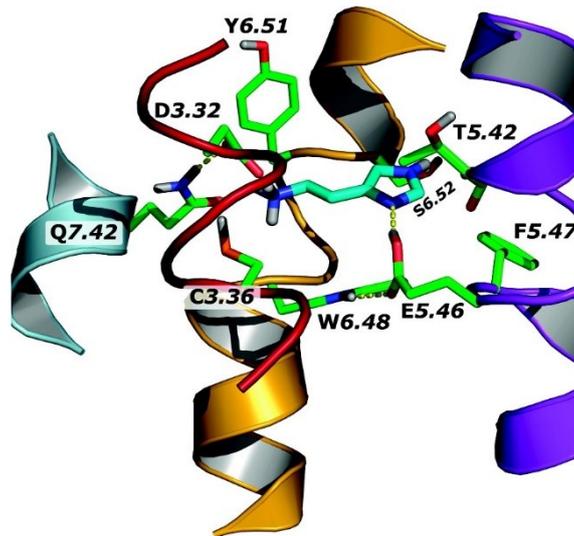


Abbildung 3: Errechnetes Modell für die Bindung von Histamin (hellblau) in die Bindetasche des humanen H<sub>4</sub>R. Nur die gezeigten Aminosäuren sind Teil der Berechnung. Die Helices sind gezeigt aber nicht Teil der Berechnung. Die  $\alpha$ -Spuren der TMs 3(rot), 5 (blau), 6 (orange) und 7 (aquamarin) sind eingefärbt. Abbildung übernommen von Jongejan et al.<sup>34</sup>

Viele GPCRs werden mittels einer ionischen Verbindung („*Ionic Lock*“) zwischen einem stark konservierten Glutamatrest auf TM6 und Arginin in einem ebenfalls häufig anzutreffenden Strukturmotiv, bestehend aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Arginin und Tyrosin auf TM3, in einem inaktiven Zustand stabilisiert. Da ein Alaninrest die ansonsten von Glutamat besetzte Stelle in der Aminosäuresequenz des humanen H<sub>4</sub>R einnimmt, wird das *Ionic Lock* nicht ausgebildet, was zu der erhöhten Basalaktivität führen kann.<sup>22,37,38</sup> Jedoch zeigten Schneider *et al.*, dass H<sub>4</sub>R von Mäusen ebenfalls einen Alaninrest an der entsprechenden Stelle aufweisen, die Basalaktivität jedoch deutlich geringer ist als bei humanen H<sub>4</sub>R.<sup>39,40</sup> In Bezug auf die hohe basale Aktivität stellten Wifling *et al.* fest, dass die Aminosäure Phe<sup>45,55</sup> in die orthosterische Bindestelle des hH<sub>4</sub>R hineinragt und zu einer Selbstaktivierung führt.<sup>41</sup>

Da in der Abwesenheit von einem aktivierenden Liganden der H<sub>4</sub>R eine basale Aktivität aufweist, werden H<sub>4</sub>R-Liganden funktional in Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten unterteilt.<sup>38</sup>

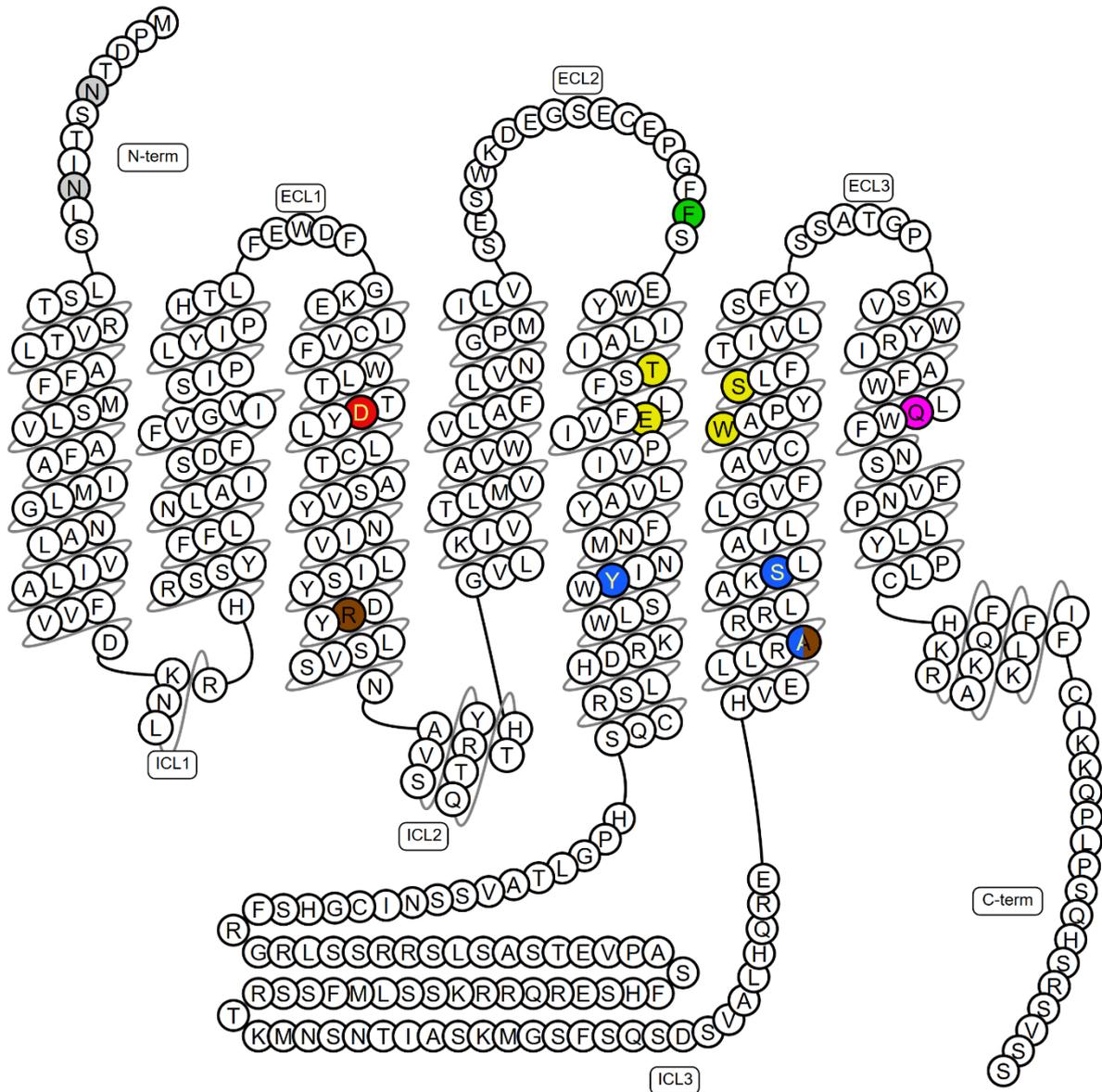


Abbildung 4: Aminosäuresequenz des humanen H<sub>4</sub>R dargestellt in Schlangenform und markante Aminosäuren; Asp<sup>3.32</sup> (rot) ist verantwortlich für eine ionische Wechselwirkung zum primären Amin des Histamins. Glu<sup>5.46</sup>, Thr<sup>5.42</sup>, Trp<sup>6.48</sup> und Ser<sup>6.52</sup> (gelb) stabilisieren die Imidazoleinheit des Histamins. Gln<sup>7.42</sup> (pink) bildet eine Wasserstoffbrücke zu Asp<sup>3.32</sup> aus. Asn<sup>5</sup> und Asn<sup>9</sup> (grau) stellen mögliche Positionen für eine Glycolisierung dar. Tyr<sup>5.62</sup>, Leu<sup>6.36</sup> und Ala<sup>6.30</sup> (blau) stabilisieren den Agonisten ST-989. Ala<sup>6.30</sup> und Arg<sup>3.50</sup> (braun) bilden in Gegenwart des inversen Agonisten ST-1012 über ein Wassermolekül ein „Pseudo Ionic Lock“. Phe<sup>169</sup> (grün) ist verantwortlich für die Rigidisierung der zweiten extrazellulären Schleife. ECL: extrazelluläre Schleife; ICL: intrazelluläre Schleife; D: Asp; E: Glu; T: Thr; W: Trp; S: Ser; Q: Gln; N: Asn; Y: Tyr; L: Leu; A: Ala; R: Arg; F: Phe.<sup>34,42</sup>

Mithilfe von *in-silico*-Charakterisierung klärten Werner *et al.* die Bindungsmodi der Liganden ST-989 und ST-1012, um die ungewöhnliche Aktivität des H<sub>4</sub>R genauer zu betrachten (Abbildung 5). Bei Dockingexperimenten mit dem Partialagonisten ST-989 zeigte sich, dass durch die Ligandenbindung die intrazellulären Enden von TM5 und TM6 angenähert werden und die Position durch Interaktion der Aminosäuren Tyr<sup>5.62</sup>, Leu<sup>6.36</sup> und Ala<sup>6.30</sup> stabilisiert ist.

Bindet hingegen der inverse Agonist ST-1012 an den H<sub>4</sub>R ergaben die Berechnungen einen gleichbleibenden Winkel zwischen TM5 und TM6. In diesem Winkel befinden sich die Aminosäuren Ala<sup>6.30</sup> und Arg<sup>3.50</sup> in einer ungefähren Entfernung von 6.5 Å und können so über ein verbrückendes Wassermolekül ein „Pseudo Ionic Lock“ ausbilden, das den Rezeptor in einem inaktivierten Zustand stabilisiert.<sup>42</sup>

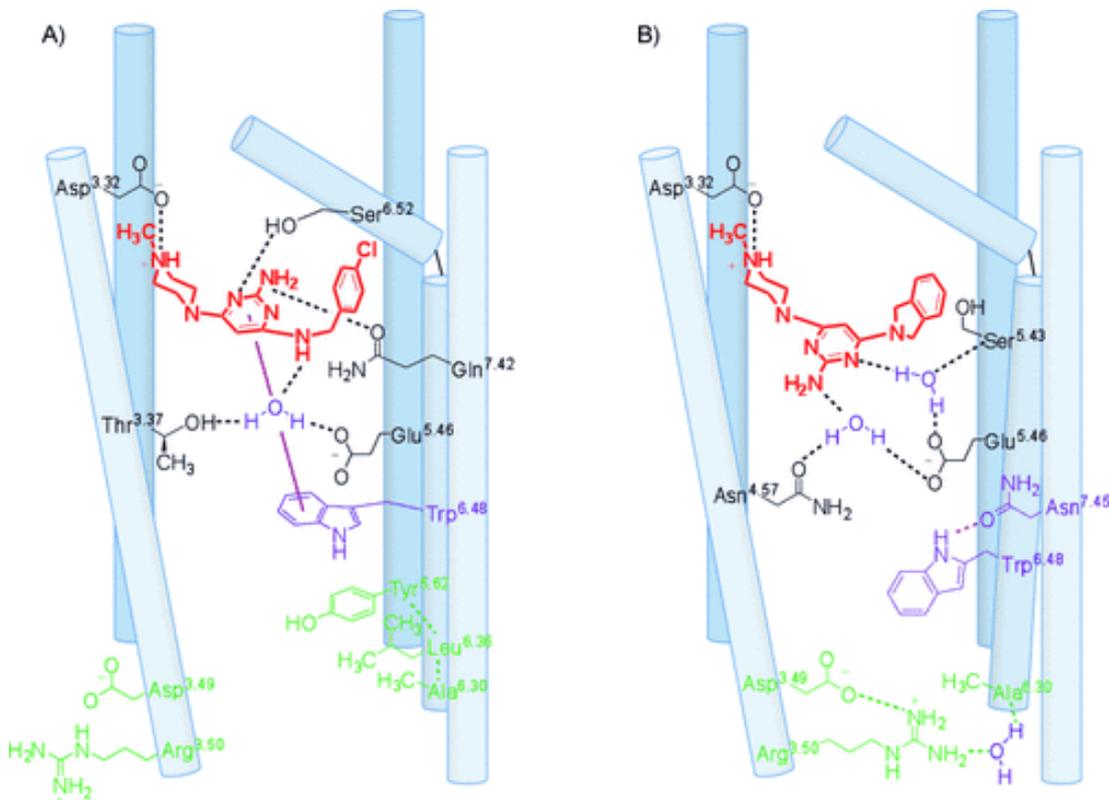


Abbildung 5: Wechselwirkungen zwischen Liganden und H<sub>4</sub>R in den berechneten Bindungsmodi aus A) dem partiellen Agonisten ST-989 und B) dem inversen Agonisten ST-1012. Abbildung übernommen von Werner et al.<sup>42</sup>

Erschwert wird die Erforschung des H<sub>4</sub>R dadurch, dass die Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Spezies teilweise erheblich sind. So liegt die Sequenzähnlichkeit der cDNA zwischen hH<sub>4</sub>R und H<sub>4</sub>R von Makaken noch bei hohen 92%,<sup>43</sup> die cDNA des H<sub>4</sub>R von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Schweinen und Hunden verfügt jedoch nur über Sequenzähnlichkeiten zwischen 67% und 72% gegenüber dem hH<sub>4</sub>R.<sup>44–46</sup> Dies führt dazu, dass Histamin eine signifikant geringere Affinität gegenüber dem murinen H<sub>4</sub>R (mH<sub>4</sub>R) zeigt im Vergleich zum hH<sub>4</sub>R ( $K_i(\text{mH}_4\text{R}) = 83 \text{ nM}$  vs.  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 13 \text{ nM}$ ).

Verantwortlich dafür ist ein Unterschied auf der zweiten extrazellulären Schlaufe: Korrespondierend zu Phe<sup>169</sup> des hH<sub>4</sub>R wird beim mH<sub>4</sub>R ein Valin exprimiert. Durch den

kleineren Rest und fehlende  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen wird die Flexibilität der Schlaufe erhöht, was zu einer verminderten Histamin-Affinität führt.<sup>47</sup>

### 1.3.2: Intrazelluläre Signaltransduktionskaskade des H<sub>4</sub>R

Auch wenn sich die cDNA-Sequenzen zwischen den Spezies teilweise erheblich unterscheiden, binden die H<sub>4</sub>R aller Spezies an Pertussis-Toxin (PTX)-sensitive G $\alpha_{i/0}$ -Proteine (Abbildung 6).<sup>36</sup> Eine Aktivierung des H<sub>4</sub>R (z. B. durch Histamin) bewirkt somit eine Inhibierung der Forskolin-induzierten Ausschüttung von cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und beeinflusst die Transkription von Genen in Zelllinien, die den H<sub>4</sub>R rekombinant exprimieren.<sup>25,48</sup> Zusätzlich wird über den PTX-Signalweg die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) stimuliert und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung forciert.<sup>22,25,49</sup>

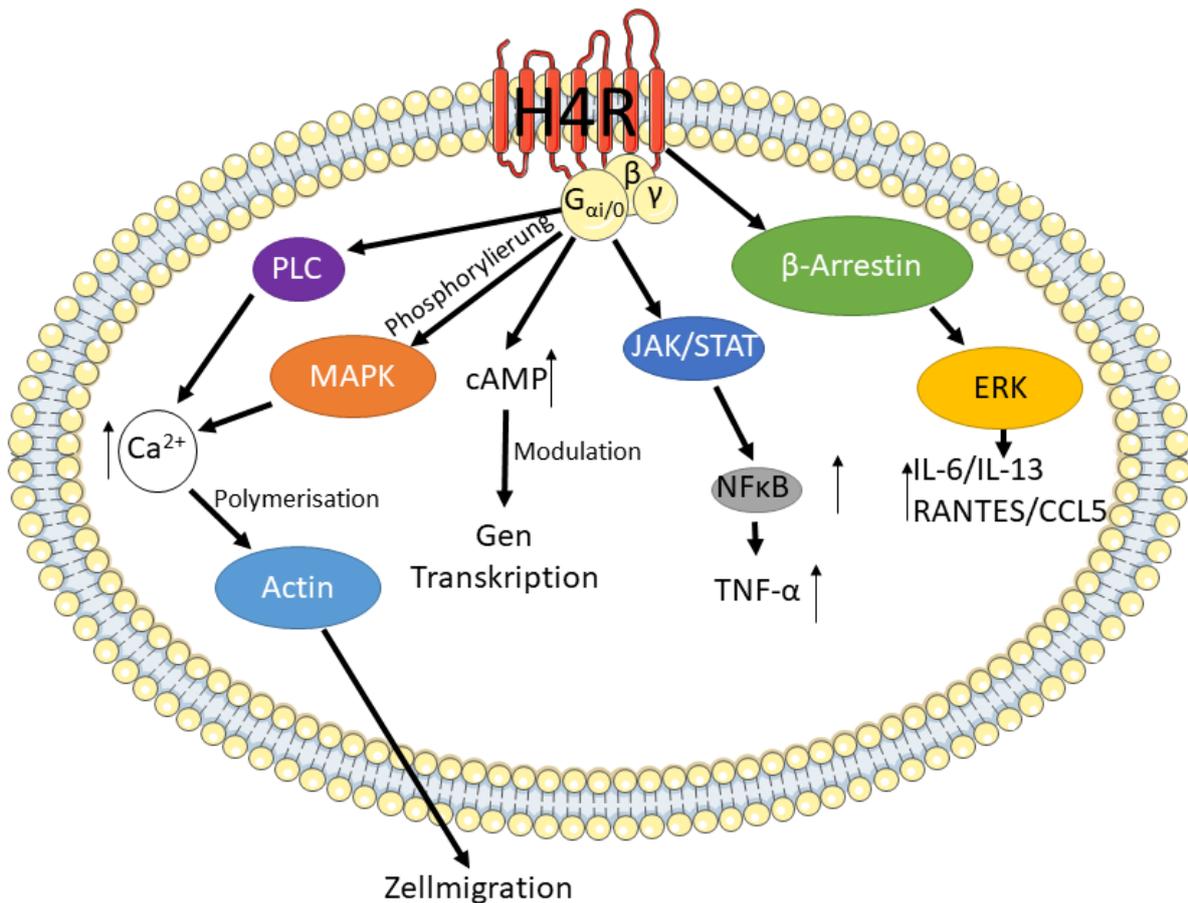


Abbildung 6: Übersicht der Signaltransduktionswege nach H<sub>4</sub>R-Aktivierung.<sup>22,25,36,48-51</sup>

Auch eine H<sub>4</sub>R-abhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt zu einer gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol, was die Polymerisation von Actin auslöst. Dadurch wird eine Veränderung der Morphologie der Zelle hervorgerufen, was zur Migration von Mastzellen,

Eosinophilen und Monozyten führt.<sup>36,49,52–55</sup> Weiterhin wurde gezeigt, dass die H<sub>4</sub>R-Aktivierung über den Januskinase (JAK) und *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Transduktionsweg eine Aktivierung des nuklearen Faktors  $\kappa$  aktivierter B-Zellen (NF $\kappa$ B) erfolgt und der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausgeschüttet wird. Via *extracellular regulated kinases* (ERK) werden unter anderem die Interleukine (IL) 6 und 13 und das Chemokin „*Regulated And Normal T-Cell Expressed and Secreted* (RANTES bzw. CCL5)“ ausgeschüttet. ERK-abhängige Signalwege werden infolge der cAMP-Modulation aktiviert.<sup>50,51</sup>

Diese Signalkaskaden können durch das Einwirken von Antagonisten unterbunden werden, jedoch zeigten Rosethorne *et al.*, dass bestimmte Antagonisten auch agonistische Effekte durch die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin hervorrufen können, was zu einer, im Vergleich zu Histamin, verzögerten ERK-Aktivierung führt. Diese Erkenntnisse zeigen auf, dass im Besonderen *in-vivo* erhobene Daten zu Fehlinterpretationen der Rolle des H<sub>4</sub>R führen können, wenn der Signaltransduktionsweg des zu untersuchenden Liganden nicht detailliert beschrieben ist.<sup>56</sup>

### 1.3.3: Beteiligung des H<sub>4</sub>R am Immunsystem

Der endogene H<sub>4</sub>R-Ligand Histamin ist ein zentraler Mediator in der Modulation des Immunsystems. Im Zusammenspiel mit anderen Entzündungsmediatoren sorgt Histamin dafür, dass sich z.B. im Verlauf einer allergischen Reaktion Blutgefäße weiten, Flüssigkeiten in die betroffenen Gewebe eintreten und sich Ödeme oder Quaddeln in Verbindung mit Rötungen bilden, die zu Juckreiz führen. Histamin entfaltet seine Wirkung hierbei durch Aktivierung insbesondere von H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R und H<sub>4</sub>R, die auf einer Vielzahl von Immunzelltypen exprimiert werden.<sup>57</sup> Studien zu einzelnen Immunzelltypen zeigten, dass Histamin in erster Linie pro-inflammatorisch wirkt. Es können sich jedoch auch entzündungshemmende Prozesse ergeben, wie die Reduktion der Chemotaxis, was bei höheren Histaminkonzentrationen an eosinophilen Granulozyten beobachtet werden kann und wahrscheinlich vom H<sub>2</sub>R gesteuert wird.<sup>58</sup>

Der H<sub>4</sub>R wird dabei auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen wie Mastzellen, Basophilen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten exprimiert, sodass sein Vorkommen in Geweben, die an der Immunantwort beteiligt sind, erwartungsgemäß am höchsten ist. Zu diesen zählen

Knochenmark, Lunge und Milz. Bei Entzündungsprozessen wird die Expression des H<sub>4</sub>R in den genannten Geweben stimuliert.<sup>21,22,26,27,48,59,60</sup>

Die hauptsächlich im Bindegewebe vorkommenden Mastzellen sowie Basophile, die sich in der Blutbahn befinden, sind die Hauptquellen für Histamin im menschlichen Körper.<sup>61</sup> Die Anregung des H<sub>4</sub>R durch seinen endogenen Agonisten Histamin führt zur Chemotaxis der oben genannten Zellen. Histamin wird ausgeschüttet, wenn Mastzellen und Basophile in Kontakt mit Allergenen kommen und diese an antigen-spezifische IgE-Rezeptoren (FcεRI) gebunden werden. Mastzellen sind zusammen mit dendritischen Zellen (DZ) Zellen des unspezifischen Immunsystems, die zuerst mit Antigenen, Pathogenen oder Umweltgiften in Kontakt kommen und eine Entzündungsantwort modulieren.<sup>62–65</sup> DZ sind im Körper ubiquitär vorhandene Fresszellen, die Krankheitserreger aufnehmen können und schließlich in den nächstgelegenen Lymphknoten gelangen, um die adaptive Immunantwort einzuleiten. Durch Aktivierung von H<sub>4</sub>R auf DZ wird die Ausschüttung von diversen ILs moduliert. So wird durch Reduktion der Ausschüttung von IL12p70 und Erhöhung der Produktion von IL6 und IL10 ein Milieu geschaffen, das die Polarisation von Typ 2 T-Zellen fördert.<sup>57,66,67</sup> Werden H<sub>4</sub>R auf Typ 2 T-Zellen stimuliert, schütten diese proinflammatorische Transkriptionsfaktoren und IL31 aus, welches eine entscheidene Rolle bei der Ausbildung von Juckreiz spielt.<sup>68</sup>

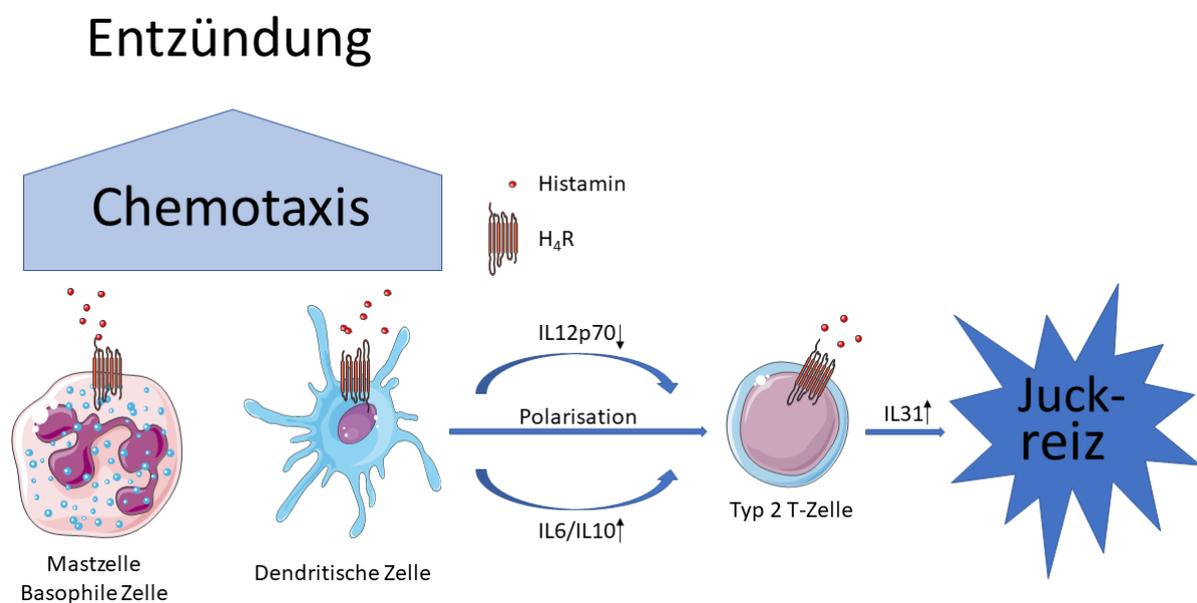


Abbildung 7: Wirkung von Histamin auf Mastzellen, basophilen und dendritischen Zellen sowie Typ 2 T-Zellen.<sup>68</sup>

Um solche mechanistischen und molekularen Zusammenhänge zu erforschen wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von H<sub>4</sub>R-Liganden als chemische Sonden eingesetzt. Die

Entwicklung von H<sub>4</sub>R-Liganden, sowie deren Einsatz als chemische Sonden wird in den folgenden Kapiteln thematisiert.

### 1.3.4: Entwicklung von H<sub>4</sub>R-Liganden

Zur pharmakologischen und physiologischen Charakterisierung des H<sub>4</sub>R wurden die ersten synthetischen H<sub>4</sub>R-Liganden aus H<sub>3</sub>R-Liganden entwickelt. Der hohe Verwandtschaftsgrad der beiden Rezeptorsubtypen hatte hierbei zur Folge, dass Liganden Affinitäten für beide Subtypen aufwiesen. So wurden mit Clobenpropit und Imetit zunächst Strukturen mit H<sub>4</sub>R-Affinität identifiziert, die über Imidazolgruppen verfügen und Derivate des Histamins sind (Abbildung 8).<sup>15</sup> Zu dieser Subgruppe gehören auch Verbindungen wie (R)- $\alpha$ -Methylhistamin und Thioperamid mit denen Liu *et al.* kurz nach der Deorphanisierung des H<sub>4</sub>R den Rezeptor pharmakologisch untersuchten.<sup>23</sup> Aufgrund der geringen Subtypselektivität oder auch der Hemmung von Cytochrom P450 Enzymen, die zu unerwünschten Nebenwirkungen im Körper führen kann, wurde die Suche nach neuartigen Liganden mit hoher H<sub>4</sub>R-Selektivität forciert.<sup>69</sup> Diese Interaktionen sind jedoch beim Design von chemischen Sonden von geringeren Interesse, sodass Histamin als basische Gruppe in Betracht gezogen werden kann.

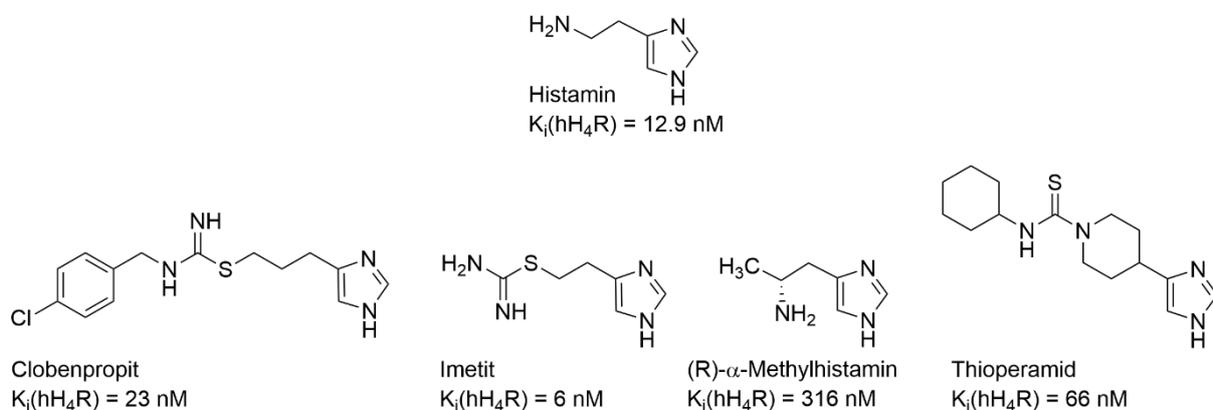


Abbildung 8: Ausgewählte imidazolhaltige H<sub>4</sub>R-Liganden.<sup>15,45,70</sup>

2003 wurde mit dem hochaffinen und selektiven inversen H<sub>4</sub>R-Agonisten JNJ-7777120 ein exzellentes pharmakologisches Werkzeug für *in-vitro* Experimente geschaffen, um die physiologische Rolle des H<sub>4</sub>R zu untersuchen.<sup>71,72</sup> Von der Struktur dieses Liganden lässt sich ein verallgemeinerter Bauplan für H<sub>4</sub>R-Liganden ableiten (Abbildung 9). So tragen viele H<sub>4</sub>R-affine Strukturen als zentrale Einheit ein Wasserstoffbrücken-Donor/Akzeptor-System. Dieses wird auf einer Seite von einer lipophilen Struktur flankiert und auf einer anderen Seite von einer basischen Funktionalität, meistens in Form eines tertiären (cyclo)aliphatischen Amins.<sup>69</sup>

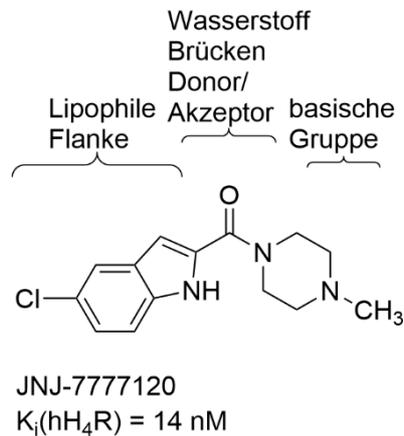
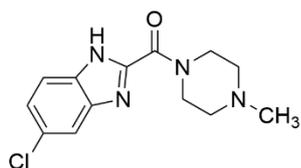


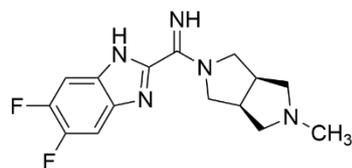
Abbildung 9: JNJ-7777120 und der daraus abgeleitete „Bauplan“ für  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden.<sup>69</sup>

JNJ-7777120 kann nicht nur invers agonistisch wirken, sondern über den  $\beta$ -Arrestin Signalweg auch  $\text{H}_4\text{R}$  agonistische Effekte erzielen (vgl Kapitel 1.3.2:).<sup>56</sup> Dies zeigt, dass zum Erlangen eines umfassenden Verständnisses der Pharmakologie des  $\text{H}_4\text{R}$ , die Kombination einer Vielzahl von pharmakologischen Werkzeugen nötig ist. Agonist/Antagonist-Paarungen zur Reversibilitätsbestimmung, Liganden unterschiedlicher chemischer Klassen, aber auch Experimente mit *Knockout*-Tieren müssen berücksichtigt werden, um ein akkurates Bild zu zeichnen. Denn ein einziger Ligand gibt nur Rückschlüsse über die Wirkung ebendieses unter den bestimmten experimentellen Bedingungen.<sup>73</sup>

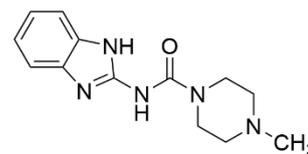
Aus der Struktur von JNJ-7777120 leiteten sich Verbindungen ab, bei denen die Indolgruppe durch ein Benzimidazol ausgetauscht wurde. Benzimidazole sind weit verbreitet bei bioaktiven Verbindungen und wirken unter anderem antiparasitär, antiallergen, antiviral oder entzündungshemmend.<sup>74–76</sup> Das Benzimidazol-Analogon VUF-6002 (Abbildung 10) von JNJ-7777120 weist Affinitätswerte in vergleichbaren Konzentrationsbereichen auf, jedoch ist die perorale Bioverfügbarkeit in Ratten mit 27% gering und die Halbwertszeit beträgt lediglich eine Stunde.<sup>57,72</sup> Zur Verbesserung der pharmakokinetischen Parameter wurde Verbindung I entwickelt, bei der neben der Variation der Substituenten des Benzimidazols auch die Amidgruppe durch ein Amidin ausgetauscht und *N*-Methylpiperazin bioisoster durch 2-Methyloctahydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol ersetzt wurde. Die erhöhte Polarität des Amidins verringerte zwar die perorale Bioverfügbarkeit auf 20%, jedoch wurde die Halbwertszeit auf 12 Stunden erhöht und die Affinität gegenüber dem  $\text{H}_4\text{R}$  gesteigert.<sup>77,78</sup> Im Gegensatz dazu führte die Einführung einer Harnstoffgruppe (vgl. VUF-6007) zu einer starken Reduktion der Bindungsaffinität gegenüber dem  $\text{H}_4\text{R}$ .<sup>79</sup>



VUF-6002  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 48 \text{ nM}$



**I**  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 10 \text{ nM}$

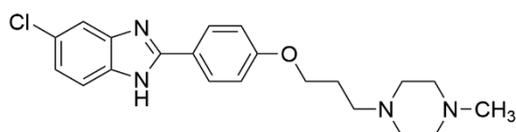


VUF-6007  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 20 \text{ }\mu\text{M}$

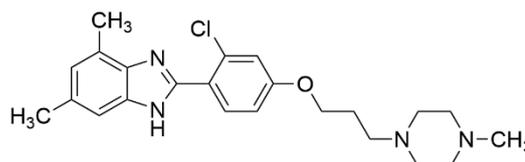
Abbildung 10: Auswahl benzimidazolhaltiger  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden.<sup>77-79</sup>

Durch das Einbringen einer Arylgruppe in 2-Position der Benzimidazole wurden  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden geschaffen, die sich an dem *High-Throughput-Screening*-Treffer **II** orientierten (Abbildung 11). Durch Optimierungen der Substituenten des Benzimidazols und des Aryls ergab sich Verbindung **III** und die Affinität gegenüber dem  $\text{H}_4\text{R}$  konnte deutlich verbessert werden. Der Wechsel zu *N*-Methylhomopiperazin anstelle von *N*-Methylpiperazin erbrachte mit **IV** die affinste Verbindung dieser Serie. Weitere Verbindungen innerhalb dieser Serie, die den *N*-Methylhomopiperazinrest (hier nicht dargestellt) trugen, zeigten ebenfalls eine höhere Affinität gegenüber dem  $\text{H}_4\text{R}$  als Verbindungen, die ein anderes tertiäres Amin als basische Ankergruppe trugen.<sup>80</sup>

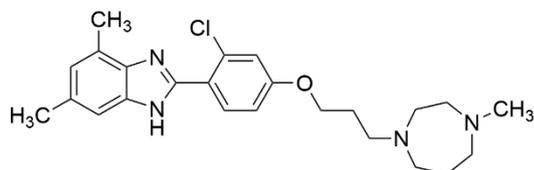
Ein daraus entwickeltes Pharmakophormodell ergab eine optimale Position des endständigen Stickstoffs in einer Entfernung von 8.3 Å in einem Umkreis von 1.5 Å. Dies wurde mit der Verwendung von *N*-Methylhomopiperazin erreicht, was die hervorragenden Affinitäten erklärt.<sup>80</sup>



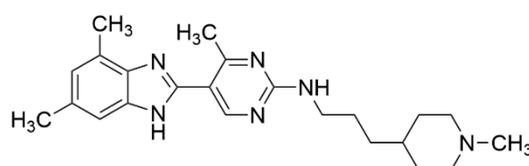
**II**  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 124 \text{ nM}$



**III**  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 22 \text{ nM}$



**IV**  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1 \text{ nM}$



Toreforant  
 $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 11 \text{ nM}$

Abbildung 11: Ausgewählte 2-Aryl-benzimidazolhaltiger  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden.<sup>80,81</sup>

Strukturverwandt zu den obigen Liganden ist Toreforant (Abbildung 11), ein selektiver  $\text{H}_4\text{R}$ -Antagonist, der in klinischen Studien der Phase 2 gut toleriert wurde und keine

unerwünschten Nebeneffekte hervorrief.<sup>82</sup> Die zentrale Arylkomponente ist bei Toreforant ein Pyrimidin und der basische Anker ist über ein Stickstoffatom gebunden. Eine Affinität in der gleichen Größenordnung wie die anderen Benzimidazol-tragenden Liganden zeigt, dass geringe strukturelle Modifikation, wie Veränderungen am zentralen Arylring und der Linkerverknüpfung möglich sind, ohne die Affinität negativ zu beeinflussen.<sup>81</sup> Interessanterweise werden auch die veränderten elektronischen Eigenschaften vom H<sub>4</sub>R akzeptiert. So ist die zentrale arylische Einheit der Verbindungen **II-IV** von einer lipophilen Moleküloberfläche geprägt, wohingegen das Aminopyrimidin im Toreforant in der Lage ist Wasserstoffbrückenbindungen und polare Wechselwirkungen auszubilden.

Azine, wie das Pyrimidin im Toreforant, sind elementarer Bestandteil einer großen Gruppe von H<sub>4</sub>R-Liganden. Diese Gruppe umfasst auch annelierte Azinderivate wie beispielsweise (Iso-)Chinazoline. Der generelle Bauplan dieser Verbindungen ähnelt dem von JNJ-7777120 und kombiniert eine wasserstoffbrückenbildende zentrale Einheit mit einer basischen Funktion auf der einen Seite und einer lipophilen Struktur an der anderen Seite. Sowohl einige 1,3,5-Triazinderivate (vgl. **V**) als auch Pyridinderivate (vgl. **VI**) weisen hohe Affinitäten gegenüber dem H<sub>4</sub>R auf (Abbildung 12). Der Fokus dieses Abschnittes liegt jedoch auf der Betrachtung der gut charakterisierten Pyrimidinderivaten.<sup>83,84</sup>

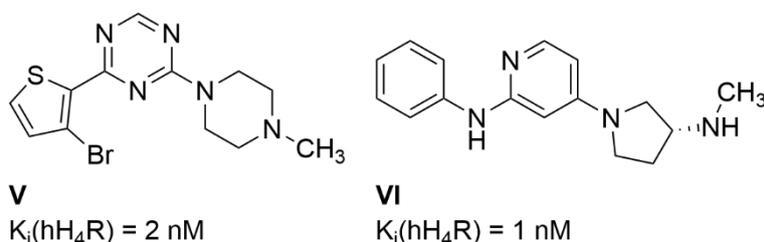


Abbildung 12: Stellvertreter H<sub>4</sub>R-affiner 1,3,5-Triazinderivate (**V**) und Pyrimidinderivate (**VI**).<sup>83,84</sup>

Die Verknüpfung der obig beschriebenen drei Grundelemente ist bei den Pyrimidinderivaten in unterschiedlichster Weise möglich. Wohingegen es sich bei dem basischen Anker nahezu ausschließlich um cycloalkylische tertiäre Amine handelt, die über einen Stickstoff an das zentrale Pyrimidin gebunden sind, ist die Anknüpfung der lipophilen Einheit freier gestaltet. Neben der Verwendung von Stickstoff<sup>85</sup> kommen Alkylbindungen<sup>86,87</sup> ebenso in Frage wie Biarylachsen<sup>88</sup> und in seltenen Fällen auch andere Heteroatome.<sup>85</sup> Häufig trägt der Pyrimidinkern mit einer freien Aminogruppe auch einen dritten Substituenten. Savall *et al.* zeigten, dass Pyrimidine, die in 6-Position eine Cyclopentylgruppe tragen, in Kombination mit

*N*-Methylpiperazin (**VII**), (*R*)-3-Amino-pyrrolidin (**VIII**) und bicyclischen 3-Amino-pyrrolidin (**X**) Affinitäten gegenüber dem H<sub>4</sub>R im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich aufwiesen, wohingegen das *S*-Enantiomer des Pyrrolidin (**IX**) um eine Potenz inaktiver war (Abbildung 13). Die Affinität wurde ebenfalls drastisch verringert sobald 3-Amino-piperidin (**XI**) als Base genutzt wurde. Dies zeigt, dass die Positionierung des basischen Ankers einen großen Einfluss auf die Aktivität des Liganden haben kann.

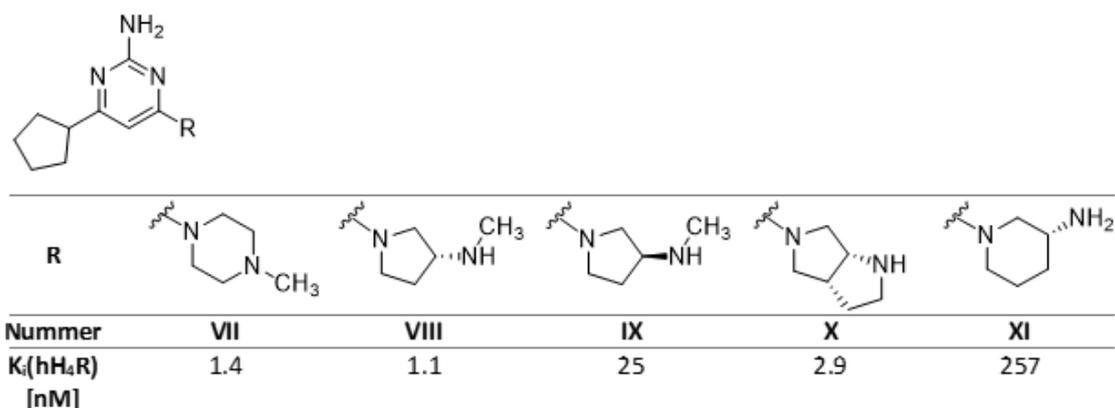


Abbildung 13: Serie ausgewählter Pyrimidinderivate von Savall *et al.*<sup>86</sup>

Sander *et al.* synthetisierten 2-Aminopyrimidinderivate mit *N*-Methylpiperazin als Base, unter anderem mit Benzylamin in 2-Position (**XII**, Abbildung 14). Das Derivat **XII** bindet im hohen zweistelligen nanomolaren Konzentrationsbereich an den H<sub>4</sub>R.<sup>85</sup> Verbindungen die ebenfalls eine Phenylgruppe als lipophile Einheit tragen wurden von Altenbach *et al.* und Cai *et al.* vorgestellt. Die Bindung an den Pyrimidinkern erfolgte entweder als Anilinderivat (**XIII**) oder in phenylischer (**XIV**) oder benzyliischer (**XV**) Position.<sup>88,89</sup> All diese Derivate zeigten Affinitäten zwischen 5 und 98 nM, wobei die Affinität mit steigender Flexibilität des lipophilen Restes abnahm. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten Phenylreste zu substituieren und den hervorragenden Bindungseigenschaften gegenüber dem H<sub>4</sub>R wurde das phenylsubstituierte 2-Aminopyrimidin als Leitstruktur für viele Verbindungen dieser Arbeit gewählt.

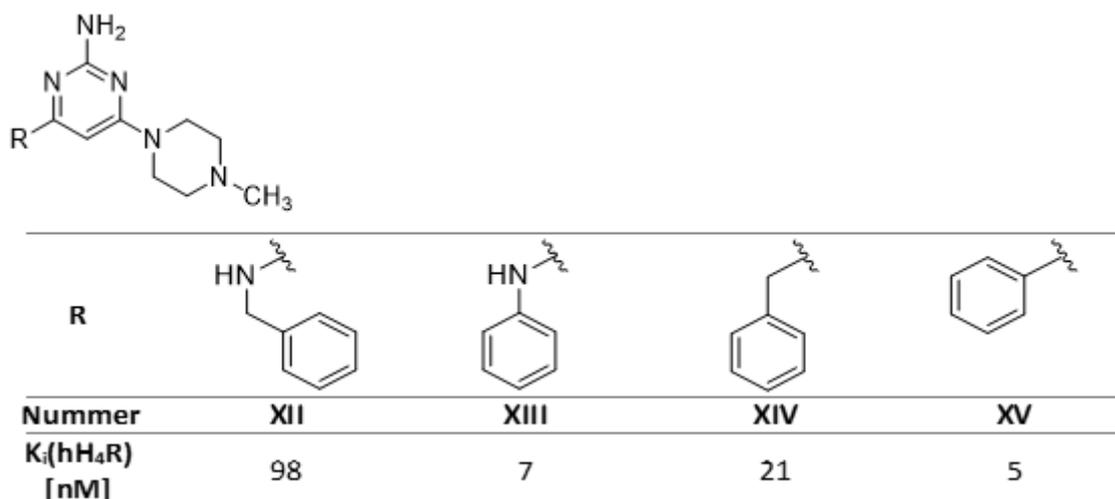
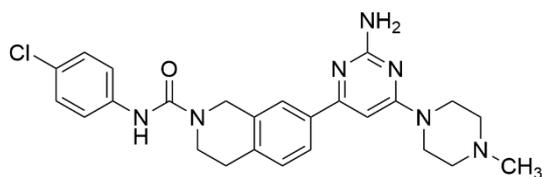


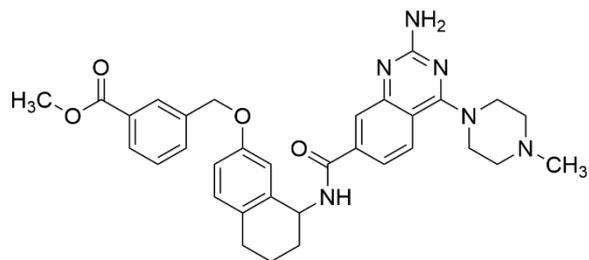
Abbildung 14: Ausgewählte 2-Aminopyrimidine zur Demonstration des Einflusses der lipophilen Gruppe auf die H<sub>4</sub>R-Affinität.<sup>85,88-90</sup>

Zusätzlich zeigten in einem Patent der Incyte Corporation analog aufgebaute Strukturen (Abbildung 15), dass eine Anbindung von voluminösen Gruppen an den Phenylrest prinzipiell möglich ist und die Bindung von [<sup>3</sup>H]-Histamin an den H<sub>4</sub>R im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich inhibierten. Beispielsweise ist bei Verbindung **XVI** an die Phenylgruppe ein Piperidin anneliert, welches wiederum über einen Harnstoff mit 4-Chlorphenyl substituiert ist. Trotz der beachtlichen Größe zeigt diese Verbindung einen Inhibitionswert von IC<sub>50</sub> = 13 nM gegenüber dem H<sub>4</sub>R auf. Das Patent beschreibt auch Chinazolinderivate (**XVII**, **XVIII**), die voluminöse lipophile Reste tragen. Die Anbindung erfolgt hierbei über ein Amid in 7-Position des Chinazolingrundgerüsts.

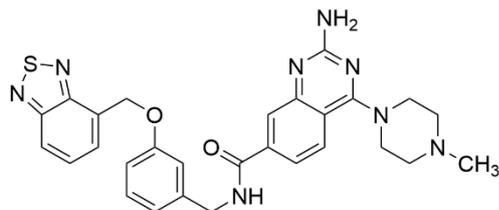
Demnach ist es möglich 2-aminopyrimidinhaltige H<sub>4</sub>R-Liganden zu erzeugen, die über großvolumige Reste am lipophilen Teil des Moleküls verfügen. Das Patent zeigt jedoch auch auf, dass nicht alle Reste in der Bindetasche des H<sub>4</sub>R akzeptiert werden, obwohl eine strukturelle Ähnlichkeit zu hochaffinen Liganden besteht (vgl. **XIX** und **XX**).<sup>91</sup> Dies unterstreicht die wichtige Rolle der explorativ-empirischen Erforschung von H<sub>4</sub>R-Liganden und die Schwierigkeit Affinitätswerte im Voraus abzuschätzen.



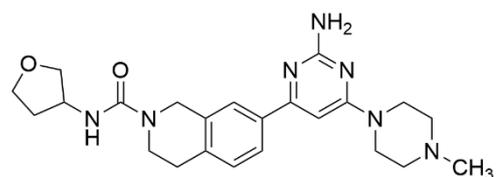
**XVI**  
 $IC_{50}(hH_4R) = 13 \text{ nM}$



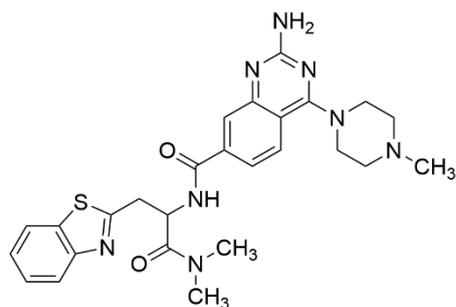
**XVII**  
 $IC_{50}(hH_4R) = 9 \text{ nM}$



**XVIII**  
 $IC_{50}(hH_4R) = 3 \text{ nM}$



**XIX**  
 $IC_{50}(hH_4R) = 744 \text{ nM}$



**XX**  
 $IC_{50}(hH_4R) = 190 \text{ nM}$

Abbildung 15: Ausgewählte patentierte  $H_4R$ -Liganden der Incyte Corporation.<sup>91</sup>

Auch Smits *et al.* nutzten die Klasse der Chinazoline, um  $H_4R$ -Liganden zu generieren. Ausgehend von Clozapinanaloga (vgl. **XXI**, Abbildung 16), die für ihre Promiskuität gegenüber GPCRs bekannt sind, und JNJ-7777120 wurden zunächst Chinoxalinderivate erzeugt, deren molekulare Oberfläche ähnliche Parameter einnahmen wie die Ausgangsverbindungen. Mit Verbindung **XXII** wurde ein Ligand mit nanomolarer Affinität erzeugt und als neue Leitstruktur definiert.<sup>92</sup> Unterschiedliche Strukturvariationen führten zu Chinazolinderivaten, die neben der Bindestelle für das basische Amin am Methylpiperazin und dem lipophilen Chinazolingrundgerüst eine dritte Bindestelle im  $H_4R$  offenbarten, die über eine leicht polare Oberfläche verfügt.<sup>93</sup> Anhand dieser Erkenntnis wurden Chinazolinderivate erzeugt, die über Sulfonamide aliphatische und aromatische Reste trugen und eine nanomolare  $H_4R$ -Affinität aufwiesen (vgl. **XXIII**). Durch die Einführung eines *N*-Ethylaminosulfonamid-Linkers wurde die

Aminogruppe des Sulfonamids in eine Position gebracht, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Substituenten tragen kann, die weiterhin vom H<sub>4</sub>R toleriert werden.<sup>94</sup> Die höchste Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R in dieser Serie zeigte die Substitution des Sulfonamids mit einer Methylgruppe. Geringfügig weniger affin zeigte sich eine Substitution mit einer Phenylgruppe (vgl. **XXIV**). Die Bildung eines Sulfonamids, derivatisiert mit einem Phenyl- und einem Methylrest (hier nicht dargestellt), zeigte ebenfalls eine einstellige nanomolare Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R. Eine Verlängerung des Taurinlinkers um eine Methyleinheit hingegen führte zum Affinitätsverlust um eine Größenordnung.<sup>94</sup>

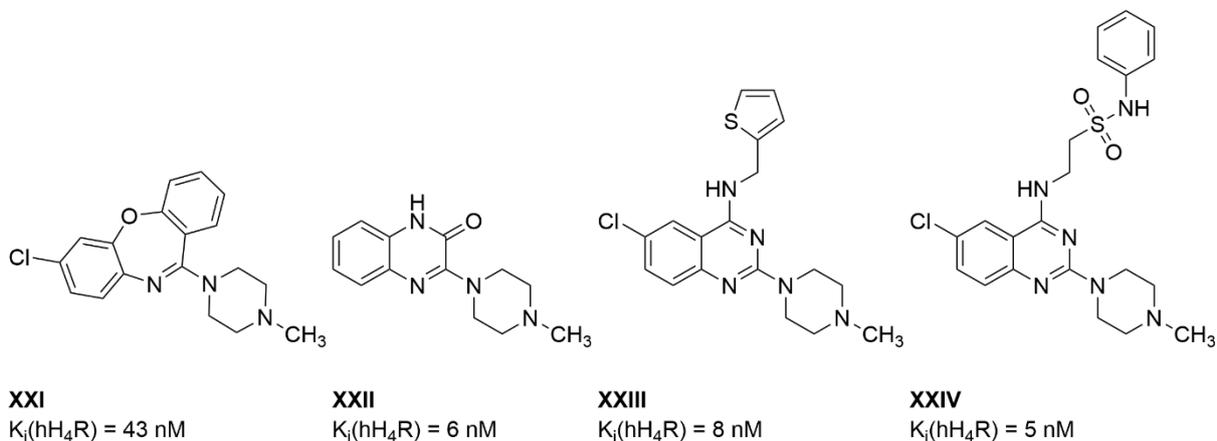
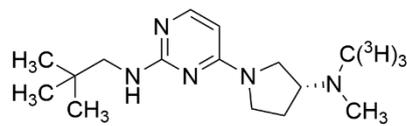


Abbildung 16: Ausgewählte H<sub>4</sub>R-Liganden synthetisiert von Smits et al.<sup>92-95</sup>

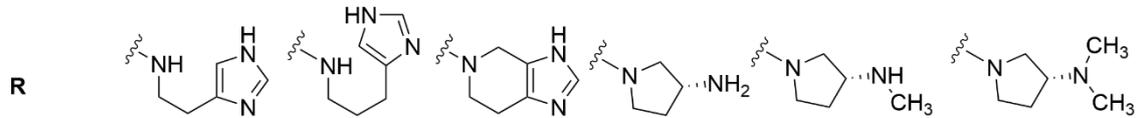
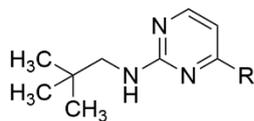
Bei den bisher beschriebenen H<sub>4</sub>R-Liganden handelt es sich um Verbindungen, die im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung entwickelt wurden. Für den Einsatz bei bildgebenden Verfahren wurden bisher zwei Liganden als chemische Sonden für den H<sub>4</sub>R entwickelt. Bartole *et al.* entwickelten mit Verbindung **XXV** (Abbildung 17) einen radioaktiv markierten Liganden für den H<sub>4</sub>R. Grundlage für die Entwicklung war eine Studie des Einflusses der basischen Gruppe auf die Bindungsaffinität von 2,4-Diaminopyrimidinen. In dieser Serie wurden unter anderem Histamin und Histaminderivate verwendet. Interessanterweise war die H<sub>4</sub>R-Affinität der Histamin-(**XXVI**) und Homohistaminderivate (**XXVII**) deutlich schwächer als bei Verwendung des rigidisierten Spineamin (**XXVIII**). Zusätzlich zeigten die Verbindungen **XXVI-XXVIII** eine Präferenz für den H<sub>3</sub>R (Affinitätsdaten nicht gezeigt). Der Methylierungsgrad der Pyrrolidinderivate (**XXIX-XXXI**) wirkte sich stärker auf das H<sub>4</sub>R/H<sub>3</sub>R-Selektivitätsprofil aus als auf die Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R. Da die sterische Hinderung durch die Einführung der Methylgruppen nicht stark vergrößert wird, kann darauf geschlossen werden, dass für die

Bindung zum H<sub>3</sub>R das Vorhandensein von Wasserstoffbrückendonatoren relevanter ist als für die Bindung zum H<sub>4</sub>R.



**XXV**

$K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 12 \text{ nM}$



#	XXVI	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI
$K_i(\text{hH}_4\text{R})$ [nM]	204	447	6	9	4	12

Abbildung 17: Ausgewählte H<sub>4</sub>R-Lianden synthetisiert von Bartole et al. (XXV-XXXI).<sup>96</sup>

**XXIX** und **XXX** wurden von der Radioaktivmarkierung ausgeschlossen, da die Markierung mit [H<sup>3</sup>]-Methyljodid im letzten synthetischen Schritt erfolgen sollte, was nur bei Verbindung **XXXI** möglich war. Die Nutzung von **XXV** zur Bestimmung von Affinitätswerten bekannter H<sub>4</sub>R-Liganden erbrachte eine gute Übereinstimmung mit Referenzwerten. Somit wurde ein neues (kommerziell nicht verfügbares) Werkzeug zur pharmakologischen Untersuchung des H<sub>4</sub>R geschaffen.<sup>96</sup>

BODIPY-FI-Histamin ist der bisher einzige beschriebene Fluoreszenzligand für den H<sub>4</sub>R (Abbildung 18). Hierbei handelt es sich um Histamin, dessen primäres Amin mit einem 4,4-Difluor-4-bora-3a,3a-diaza-s-indacen (BODIPY)-Derivat gekoppelt wurde. 2015 zeigten Mirzahosseini *et al.*, dass dieser Ligand in Durchflusszytometrie-Versuchen genutzt werden kann, um H<sub>4</sub>R zu markieren. Um das Vorhandensein der Interaktion von BODIPY-FI-Histamin mit dem H<sub>4</sub>R zu verifizieren, wurde die Affinität von Histamin mithilfe von Verdrängungsstudien unter Verwendung von BODIPY-FI-Histamin bestimmt. Es ergaben sich literaturvergleichbare Werte für die Affinität von Histamin gegenüber dem H<sub>4</sub>R.<sup>97</sup> Jedoch sind für BODIPY-FI-Histamin weder Affinitätsdaten zum H<sub>4</sub>R noch zu den weiteren Histamin-

Rezeptoren verfügbar. Zur Kalkulation wurde in der Arbeit von Mirzahassemi *et al.* die gleiche Bindungsaffinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R zugrunde gelegt, die auch Histamin aufweist, ohne diese experimentell zu bestimmen.<sup>97</sup> Die Ergebnisse der Verdünnungsexperimente und die Selektivität sind daher kritisch zu hinterfragen.

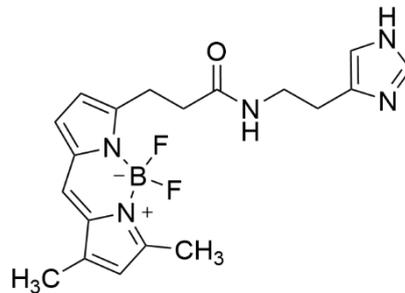


Abbildung 18: BODIPY-FI Histamin.

Widersprüchlich zu den Ergebnissen von Mirzahassemi *et al.* konnten Mocking *et al.* keine spezifische Bindung zwischen BODIPY-FI-Histamin und im *N*-Terminus mit NanoLuc Luciferase modifizierten H<sub>4</sub>R feststellen.<sup>98</sup> Ob BODIPY-FI-Histamin tatsächlich als Fluoreszenzligand für den H<sub>4</sub>R angesehen werden kann, ist daher fraglich.

Wie in diesem Kapitel dargelegt, bietet die Literatur eine große Vielzahl an Strukturen, die über eine Affinität zum H<sub>4</sub>R verfügen. Ein genereller „Bauplan“ für H<sub>4</sub>R-Liganden stützt sich auf das Vorhandensein einer basischen Ankergruppe, einem zentralen Wasserstoffbrücken-Akzeptorsystems und einer lipophilen Einheit. Dabei hat sowohl die sterische Ausrichtung der basischen Gruppe einen großen Einfluss auf die Affinität, als auch die exakte Struktur des lipophilen Rests. Dabei gelten unterschiedliche strukturelle Anforderungen für die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen bzw. chemische Sonden, wobei bei ersteren beispielweise pharmakokinetische Eigenschaften zu berücksichtigen sind. Insbesondere der lipophile Rest lässt einigen Spielraum für Derivatisierungen und durch die Entdeckung einer dritten lipophilen Bindetasche wurde dieser erweitert. Dies bereitet auch den Weg für die Fluoreszenzmarkierung von H<sub>4</sub>R-Liganden. Mit BODIPY®-FI-Histamin ist zurzeit lediglich ein fluoreszenzmarkierter H<sub>4</sub>R-Ligand kommerziell verfügbar, dessen Bindung zum H<sub>4</sub>R jedoch nicht belegbar ist. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Bereitstellung eines selektiven Fluoreszenzliganden für den H<sub>4</sub>R, die in dieser Arbeit angestrebt wird.

### 1.3.5: H<sub>4</sub>R-Liganden in klinischen Studien

Bisher wurden vier antagonistisch wirkende H<sub>4</sub>R-Liganden im Rahmen klinischer Studien untersucht (Stand September 2020). Zu dem oben erwähnten Toreforant werden noch drei Liganden aus der Klasse der Aminopyrimidine (JNJ-3978979, ZPL-389787 und SENS-111, Abbildung 19) erprobt. Toreforant, JNJ-3978979 und ZPL-389787 wurden dabei auf den therapeutischen Nutzen zur Bekämpfung von krankhaften Veränderungen des Immunsystems hin untersucht, während SENS-111 zur Therapie von Gleichgewichtsstörungen eingesetzt werden soll. Die Studien mit Toreforant wurden mangels signifikanter Wirkung terminiert. Die Studien mit JNJ-3978979 wurden terminiert, da bei Patienten Fälle von Agranulozytose auftraten, deren Ursprung strukturell begründet wurde und nicht durch die Hemmung des H<sub>4</sub>R hervorgerufen wurde.<sup>99</sup> ZPL-389787 wurde erfolgreich zur Behandlung von atopischer Dermatitis eingesetzt<sup>100</sup>. SENS-111 bestand Verträglichkeitsstudien im Rahmen klinischer Phase 1 Studien, scheiterte jedoch daran den Endpunkt von Phase 2 Studien zu erreichen, weshalb von einer weiteren Erprobung abgesehen wurde.<sup>101</sup> Strukturell ähneln sich JNJ-3978979 und ZPL-389787 stark. Beide verfügen über eine 2-Aminopyrrolidinbase, die bei letzterem N-methyliert ist. Anstelle einer Isopropylgruppe (JNJ-3978979) als lipophile Einheit ist ZPL-389787 mit einem Cyclopropylring substituiert. Beide Liganden binden an den H<sub>4</sub>R im niedrigen zweistelligen nanomolaren Konzentrationsbereich.<sup>89</sup>

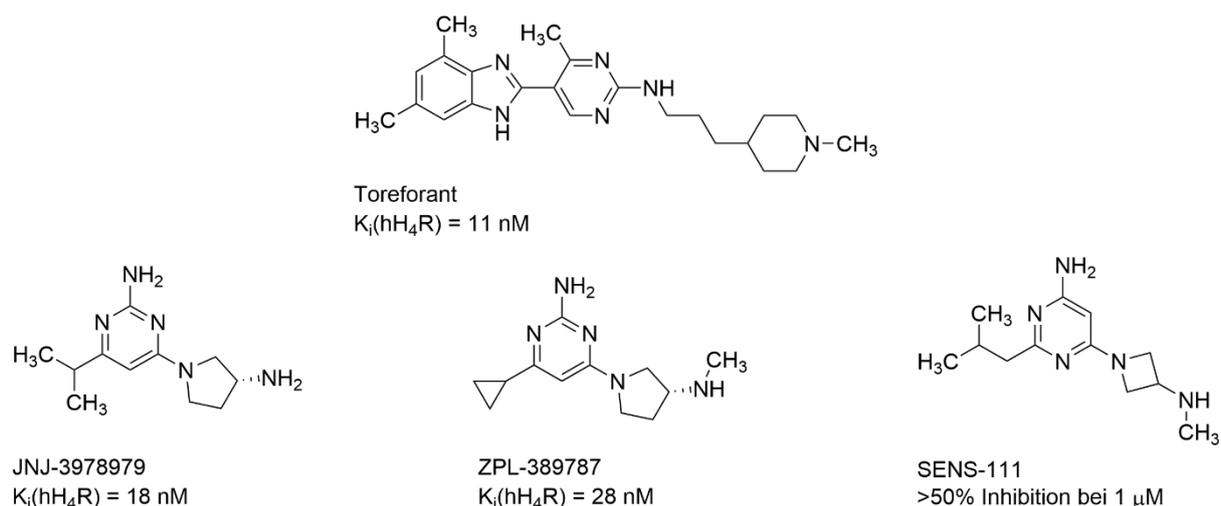


Abbildung 19: In klinischen Studien evaluierte von H<sub>4</sub>R-Antagonisten.<sup>81,89,102</sup>

Bei SENS-111 handelt es sich ebenfalls um ein Aminopyrimidin jedoch ist die Guanidinstruktur durch einen Wechsel der Positionen des primären Amins und des aliphatischen Rests

aufgehoben worden. Von einer Bindungsaffinität zum H<sub>4</sub>R im nanomolaren Konzentrationsbereich ist mit einer Inhibition von >50% bei 1 µM auszugehen.<sup>102</sup>

### 1.3.6: H<sub>4</sub>R-Liganden als chemische Sonden in pharmakologischen Assays

Der Großteil der Studien, bei denen H<sub>4</sub>R-Liganden als chemische Sonden zum Einsatz kamen, betreffen die Erforschung der Rolle des H<sub>4</sub>R im Immunsystem. H<sub>4</sub>R-Liganden wurden jedoch auch eingesetzt, um karzinogene Krankheitsbilder zu beleuchten oder die Beteiligung von H<sub>4</sub>R an zentralnervösen Prozessen zu hinterfragen. Beispielhafte Studien werden in diesem Kapitel zusammengefasst.

Die Chemotaxis von Zellen des Immunsystems infolge von intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung wurde unter Verwendung von chemischen Sonden in Form von H<sub>4</sub>R-Liganden häufig untersucht. Zur Feststellung der chemotaktischen Wirkung von Histamin wurden *in-vitro* Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl von Mastzellen-Precursoren, die infolge der Behandlung mit einer Testsubstanz durch eine Membran gewandert sind, durchflusszytometrisch bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass Histamin die Chemotaxis der Zell-Precusoren anregte. Dieser Prozess konnte durch Präinkubation der Zellen mit JNJ-7777120 inhibiert werden.<sup>103</sup>

In humanen Mastzellen konnte die Produktion von IL13 und RANTES, beides kritische Mediatoren bei allergischen Entzündungen, in Abhängigkeit von H<sub>4</sub>R-Aktivierung durch Histamin bzw. 4-Methylhistamin nachgewiesen werden. Die IL13 und RANTES-Level wurden mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) quantifiziert und es konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation mit JNJ-7777120 den Histamineffekt auf die Mastzellen inhibiert.<sup>50</sup> Mit diesen chemischen Sonden wurde zusätzlich eine Vielzahl weiterer Cytokine (Eotaxin-2, ICAM-1, IL1α, IL3, IL6, IL6sR, IL8, IL10, IL16, IP-10, M-CSF, MCP-1, MIP-1α, PDGF-BB, TGF-β1, TIMP-2 und TNF-β), die durch H<sub>4</sub>R-Aktivierung ausgeschüttet werden, mittels Antikörperarrays in Mastzellen identifiziert.<sup>104</sup>

Ein weiterer Zelltyp, der häufig für Untersuchungen des Einflusses von H<sub>4</sub>R-Liganden genutzt wird sind dendritische Zellen (DZ). Mithilfe der chemischen Sonden JNJ-7777120, Clobenpropit und 4-Methylhistamin konnte der Einfluss des H<sub>4</sub>R auf die Modulation der Produktion von IL12 und CCL2 *in-vitro* mittels ELISA und intrazellulärer Antikörpermarkierung nachgewiesen werden.<sup>105</sup> *Ex-vivo* konnte anhand von DZ aus menschlicher Epidermis gezeigt

werden, dass 4-Methylhistamin die Zellmigration induziert und JNJ-7777120 diesen Prozess inhibieren kann. Die Migration wurde mittels Echtzeit PCR und Durchflusszytometrie quantifiziert. Zum *in-vivo* Nachweis wurde Mäusen intradermal 4-Methylhistamin in ein Ohr appliziert und die DZ-Konzentration anhand der immunologischen Anfärbung von MHC-II-Komplexen mit dem anderen Ohr verglichen.<sup>106</sup>

Um die Wirkung von H<sub>4</sub>R-Antagonisten auf intestinale allergische Reaktionen zu untersuchen, wurde Mäusen JNJ-7777120 peroral verabreicht. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten dabei eine signifikant niedrigere DZ Zunahme im Verdauungstrakt. *In-vitro* wurde unterstützend eine reduzierte Produktion der proinflammatorischen Interleukine IL4, IL13 und IL17A mittels ELISA festgestellt.<sup>107</sup>

Der H<sub>4</sub>R ist zudem am Differenzierungsprozess von Monozyten zu Makrophagen beteiligt. So ist der Marker CD68, der eine Makrophagen-Differenzierung anzeigt, erhöht, wenn die *in-vitro* Differenzierung in Gegenwart des H<sub>4</sub>R-Agonisten ST-1006 durchgeführt wird. Die Erhöhung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Gleichzeitig konnte die Polymerisation von Actin fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und eine geänderte Zellmorphologie der Makrophagen unter dem Lichtmikroskop ausgemacht werden.<sup>14</sup>

Die Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen des Immunsystems, die funktional exprimierte H<sub>4</sub>R aufweisen belegt die wichtige Rolle, die dieser in der Immunmodulation spielt. Die obig beschriebenen Experimente zeigen wie mannigfaltig die Untersuchungen von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen unter Zurhilfenahme von H<sub>4</sub>R-Liganden als chemische Sonden genutzt werden können, um die Funktionalität des H<sub>4</sub>R näher zu beleuchten. Es gibt zudem eine Vielzahl von Hinweisen, dass H<sub>4</sub>R neben den Zellen des Immunsystems auch in weiteren Gewebsarten exprimiert werden. Diese werden mitunter kontrovers diskutiert, da Befunde sich teils oppositionell entgegenstehen. So wird unter Anderem die Beteiligung des H<sub>4</sub>R in der Karzinogenese diskutiert.<sup>108–115</sup> Das Vorkommen des H<sub>4</sub>R im ZNS<sup>9,10,17,116–121</sup> und Microgliazellen,<sup>122</sup> im peripheren Nervensystem<sup>123–126</sup> und in sensorischen Systemen (vestibulär<sup>101,127,128</sup> und retinal<sup>129</sup>) wurde ebenfalls untersucht (beispielsweise mittels mRNA-Nachweisen). Auch hier wurden H<sub>4</sub>R-Liganden als chemische Sonden verwendet, um die Beteiligung des H<sub>4</sub>R an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in diesen Geweben und Zelltypen nachzuweisen.

So zeigten Verhaltensexperimente an Ratten mit induzierten vestibulären Defiziten, dass eine intraperitoneale Gabe des H<sub>4</sub>R-Antagonisten JNJ-10191584 zu einer Normalisierung des Verhaltens führte. Dies führen die Autoren der Studie auf die Reduktion der Anzahl an mittels *Patch-Clamp* gemessenen Aktionspotentialen zurück, die durch den Antagonisten hervorgerufen wurde.<sup>127</sup>

Im peripheren Nervensystem scheinen H<sub>4</sub>R eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung zu spielen. Anhand eines Modells von verletzten Nerven wurde gezeigt, dass durch intrathekale Injektion des H<sub>4</sub>R-Agonisten VUF-8430 sowohl die erhöhte Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  als auch gesteigerte Marker für oxidativen Stress normalisiert werden konnten. In Verhaltensexperimenten konnte gezeigt werden, dass der H<sub>4</sub>R-Agonist eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit aufheben konnte.<sup>123</sup> Die Kontrollgruppe an *Knockout*-Mäusen zeigte eine selektiv erhöhte Schmerzwahrnehmung gegenüber Nervenverletzungen. Damit einhergehend wurde eine Zunahme der ERK-Aktivität in Zellen des Rückenmarks beobachtet.<sup>124</sup>

Im Gegensatz dazu zeigten Popiolek-Barczyk *et al.* in einem Schmerzmodell des Ischiasnervs, dass die intraperitoneale Gabe des H<sub>4</sub>R-Antagonisten TR-7 eine analgetische Wirkung im Mäusemodell zur Folge hatte. Da der Wirkstoff systemisch verabreicht wurden, halten die Autoren eine Beteiligung von anti-inflammatorischen Vorgängen durch die H<sub>4</sub>R-Antagonistengabe für wahrscheinlich.<sup>125</sup>

Äußerst kontrovers diskutiert wird die Expression von H<sub>4</sub>R im ZNS. Karlstedt *et al.* wiesen mittels RT-PCR H<sub>4</sub>R-Gene in Endothelzellen aus Mäusehirnen nach. Zellen dieser Linie wiesen eine Histamin-abhängige Aktivierung des ERK1/2 und MAPK-Signalweges auf, wobei die MAPK-Aktivierung durch Administration von JNJ-7777120 blockiert werden konnte.<sup>119</sup> Shan *et al.* beschrieben, dass in ZNS-Entzündungsmodellen die Expression des H<sub>4</sub>R zeitabhängig in Microgliazellen ansteigt und deren Proliferationsrate durch eine H<sub>4</sub>R-Überexpression gehemmt wird. Dabei wurde eine Interaktion von H<sub>4</sub>R mit Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) festgestellt, die eine Reduktion von Zytokinen nach sich zog. Diese These wurde gestützt durch die Inhibition der inflammatorischen Signalkaskade durch den H<sub>4</sub>R-Agonisten 4-Methylhistamin.<sup>122</sup> Dettori *et al.* zeigten anhand chronischer intraperitonealer Gabe des H<sub>4</sub>R-Antagonisten JNJ-7777120 eine neuroprotektive Wirkung gegenüber einer induzierten Ischämie im Frontalkortex von Mäusen. Die Resultate schlossen

eine reduzierte Anzahl von aktivierten Microglia-Zellen und Astrocyten ein und zeigten, dass das neurologische Defizit durch Inhibition dieser pro-inflammatorischen Marker reduziert wurde.<sup>117</sup>

Mittels intracerebroventriculärer Administration des H<sub>4</sub>R-Agonisten VUF 8430 beobachteten Galeotti *et al.*, dass der H<sub>4</sub>R sowohl an Prozessen der Schmerzwahrnehmung als auch der Verarbeitung von Angst und Erinnerungen beteiligt ist. In Verhaltensexperimenten wiesen die Mäuse eine höhere Toleranz gegenüber Schmerzen auf, zeigten weniger Angst und eine Scopolamin-induzierte Gedächtnisreduktion konnte verhindert werden.<sup>120</sup> Unterstützend wurde in Versuchen mit H<sub>4</sub>R-*Knockout*-Mäusen eine erhöhte neuropathische Schmerzwahrnehmung und eine gesteigerte Ängstlichkeit festgestellt, wohingegen Gedächtnisprozesse unverändert stattfanden.<sup>17</sup>

Diesen Befunden, die auf eine Expression des H<sub>4</sub>R im ZNS hindeuten, widersprechen einige Veröffentlichungen, die keinerlei Beweise für die Gegenwart von H<sub>4</sub>R im ZNS gefunden haben.<sup>9,10,118,121</sup> So versuchten Feliszek *et al.* funktionelle H<sub>4</sub>R im menschlichen Gehirn, sowie in Gehirnproben von Meerschweinchen und Mäusen zu identifizieren. Die Messung von <sup>35</sup>S-GTP-γS-Bindung und <sup>3</sup>H-Noradrenalin-Ausschüttung nach Stimulus mit 4-Methylhistamin sollte als Nachweis für die H<sub>4</sub>R-Aktivität dienen. Die Bindung von <sup>35</sup>S-GTP-γS wurde in den Proben der Cortex-Membranen von Mäusen nicht signifikant erhöht, ebenso wenig wie die Ausschüttung von <sup>3</sup>H-Noradrenalin. Wie bei Gewebeproben aus Mäusen konnte weder in menschlichen noch bei Proben von Meerschweinchen-Cortices eine vermehrte Ausschüttung von <sup>3</sup>H-Noradrenalin in Folge einer Inkubation mit 4-Methylhistamin festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass H<sub>4</sub>R nicht funktional in den Cortices-Proben der untersuchten Spezies exprimiert wird.<sup>121</sup>

Zusammenfassend konnte mittels chemischer Sonden gezeigt werden, dass der H<sub>4</sub>R an vielen Stellen regulierend auf das Immunsystem wirkt. Es wurden H<sub>4</sub>R-Liganden genutzt, um *in-vitro* sowie *in-vivo* die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine und Chemokine zu untersuchen, Zellmigration festzustellen und die Zellmorphologie zu beeinflussen. Bei den *in-vivo* Experimenten wurden die chemischen Sonden sowohl per Injektion als auch oral verabreicht. Dies zeigt die breit aufgestellten Einsatzmöglichkeiten chemischer Sonden in der Grundlagenforschung. In Krebszelllinien konnte die Proliferationsrate als Signal genutzt

werden um die Aktivität von H<sub>4</sub>R-Liganden nachzuweisen und veränderte Verhaltensweisen in Tiermodellen zeigen, dass chemische Sonden im Bereich der Erforschung des H<sub>4</sub>R auch phänotypische Auswirkungen haben. Die Frage nach der Beteiligung an zentralnervösen Prozessen hingegen bleibt ein Feld, das kritisch betrachtet werden muss. Zwar weisen Experimente mit H<sub>4</sub>R-*Knockout*-Mäusen auf eine Beteiligung an Verhaltensänderungen hin, jedoch ist es auch möglich, dass diese durch eine veränderte Blutchemie infolge der Genmanipulation hervorgerufen werden könnte. Histologische und mRNA-Nachweise sind kritisch zu hinterfragen, da bisher keine monoklonalen Antikörper kommerziell zugänglich sind und mRNA-Level nicht zwangsläufig mit der funktionalen Rezeptor-Expression korrelieren. Bildgebende chemische Sonden in Form von fluoreszierenden H<sub>4</sub>R-Liganden können hier hilfreich sein, um die Fragestellung nach ZNS-exprimierten H<sub>4</sub>R zu beantworten. Dafür könnte man sich einen großen Vorteil bei der Verwendung von Fluoreszenzliganden als chemische Sonden zu Nutze machen. Während konventionelle H<sub>4</sub>R-Liganden beim Einsatz als Sonden nur eine indirekte Wirkung auf das ausgelesene Signal haben, ist das Ergebnis der Fluoreszenzmessung direkt abhängig von der Anwesenheit eines Fluoreszenzliganden. Der eindeutige Nachweis eines funktional exprimierten H<sub>4</sub>R in Zellen oder Geweben wäre damit erbracht. Grundlagen zur Fluoreszenz und bereits bestehende Fluoreszenzmarkierungsmittel werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

## 1.4: Fluoreszenzmarkierung von GPCRs

### 1.4.1: Prinzip der Fluoreszenz

Da Menschen eine visuell geprägte Lebensform sind, ist die bildliche Darstellung die greifbarste Methodik, komplexe Inhalte verständlich zu machen. Um zellbiologische Strukturen im menschlichen Körper sichtbar zu machen wird häufig das Phänomen der Fluoreszenz genutzt. Der große Einfluss der Fluoreszenzanalyse auf die Erforschung von Prozessen im menschlichen Körper wurde durch den 2014 verliehenen Nobelpreis „Für die Entwicklung von Super-auflösender Fluoreszenz Mikroskopie“ geehrt und zeigt das enorme Potential dieser Techniken.<sup>130</sup> Die Laureaten Eric Betzig, Stefan Hell und William Moerner entwickelten Techniken, die Auflösungen jenseits des 1873 von Ernst Abbe<sup>131</sup> postulierten Limits ermöglichen. Während Moerner und Betzig die Möglichkeit ausnutzten einzelne Fluorophore „an-“ oder „auszuschalten“ und mittels Überlagerung von vielen Einzelbildern ein höchstaflösendes Bild erzeugten,<sup>132,133</sup> durchbrach Hell die Auflösungsgrenze mithilfe von stimulierter Löschung von Fluorophoren und entwickelte die *stimulated emission depletion (STED)-microscopy*.<sup>134</sup>

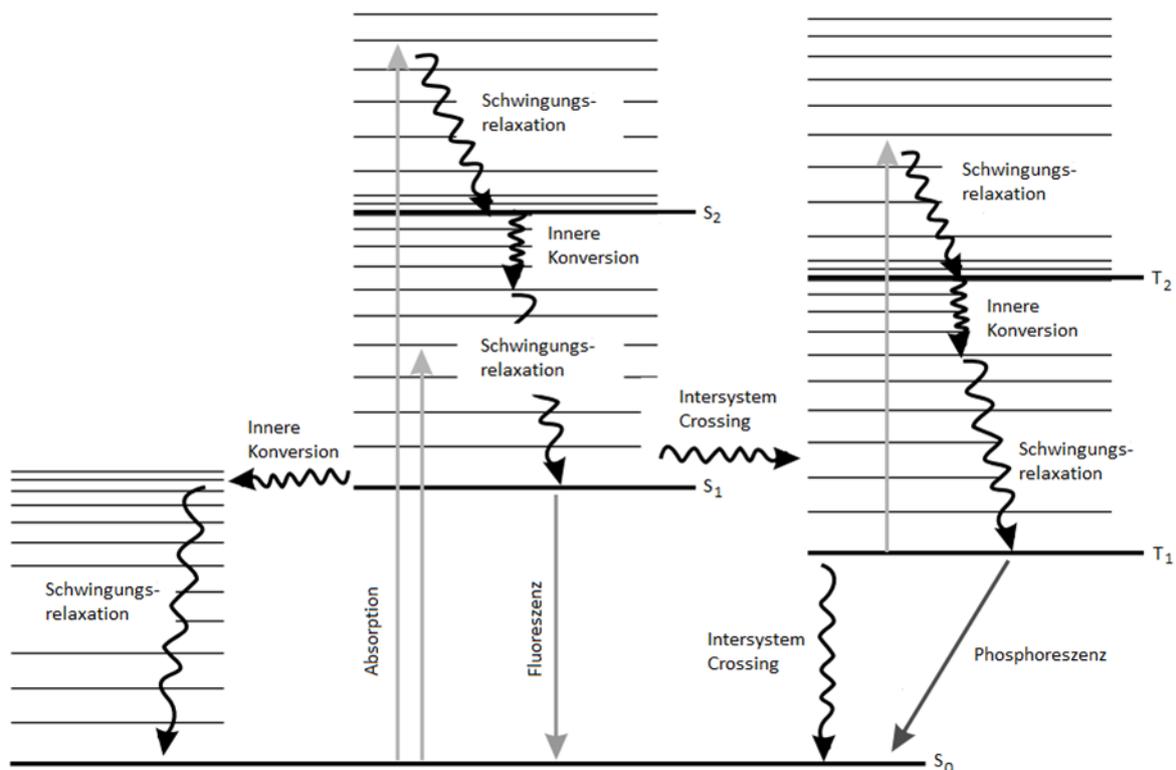


Abbildung 20: Jablonski-Diagramm, das die elektronischen Zustände und die Übergänge zwischen diesen beschreibt.<sup>135</sup>

Diese Techniken haben gemein, dass sie die Eigenschaft von bestimmten Molekülen, Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich zu emittieren, ausnutzen. Abgrenzend zur Phosphoreszenz setzt bei der Fluoreszenz die spontane Emission zeitlich kurz nach der elektronischen Anregung des Moleküls ein. Schematisch kann dieser Prozess in einem Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abbildung 20).<sup>135</sup> Aus seinem elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ) wird durch Lichtabsorption ein Fluorophor in angeregte Zustände ( $S_1$ ,  $S_n$ ) versetzt. Typischerweise wird dabei auch der Übergang in ein höheres Schwingungsniveau angeregt. Innerhalb kürzester Zeit ( $10^{-12}$  s) wird die Schwingungsenergie über Schwingungsrelaxation abgegeben und mittels strahlungsloser innerer Konversion das niedrigste Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes erreicht (Regel von Kasha). Dies hat zur Folge, dass die verbleibende Energie des Systems geringer ist als die, die zur Anregung benötigt wurde. Somit ist die elektromagnetische Strahlung, die beim Übergang vom  $S_1$  in den  $S_0$  Zustand emittiert wird (die Fluoreszenz), bathochrom verschoben.<sup>136</sup> Die energetische Differenz der Absorption und Emission ergibt dabei den nach Gabriel Stokes benannten *Stokes-Shift*.

Häufig fällt das System dabei in einen schwingungsangeregten Zustand des  $S_0$ -Niveaus zurück. Diese vertikalen Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen lassen sich mithilfe des Franck-Condon-Prinzips und der Born-Oppenheimer-Näherung erklären: Dabei besagt die Born-Oppenheimer-Näherung, dass aufgrund der ungleich höheren Geschwindigkeit bei deutlich geringeren Gewichts eines Elektrons im Vergleich zum Atomkern die Kernkoordinate des Atomkerns während elektronischer Bewegung nahezu unverändert bleibt. Diese Annäherung liegt dem Franck-Condon-Prinzip zugrunde, das besagt, dass die Übergangsintensität zwischen zwei Schwingungszuständen proportional zum Quadrat des Überlappintegrals der Schwingungswellenfunktionen ist.<sup>137-139</sup> Da im Vergleich zur Bewegung des Kerns der elektronische Übergang ohne Verzögerung auftritt, muss der zu erreichende Schwingungszustand kompatibel zur Position und zum Moment des Anfangszustands sein. Dies gilt sowohl für die Anregung (Absorption) als auch die Emission und führt so dazu, dass sich die normalisierten Absorptions- und Emissionsspektren von fluoreszierenden organischen Verbindungen gewöhnlich spiegelbildlich verhalten (Abbildung 21).<sup>140-142</sup>

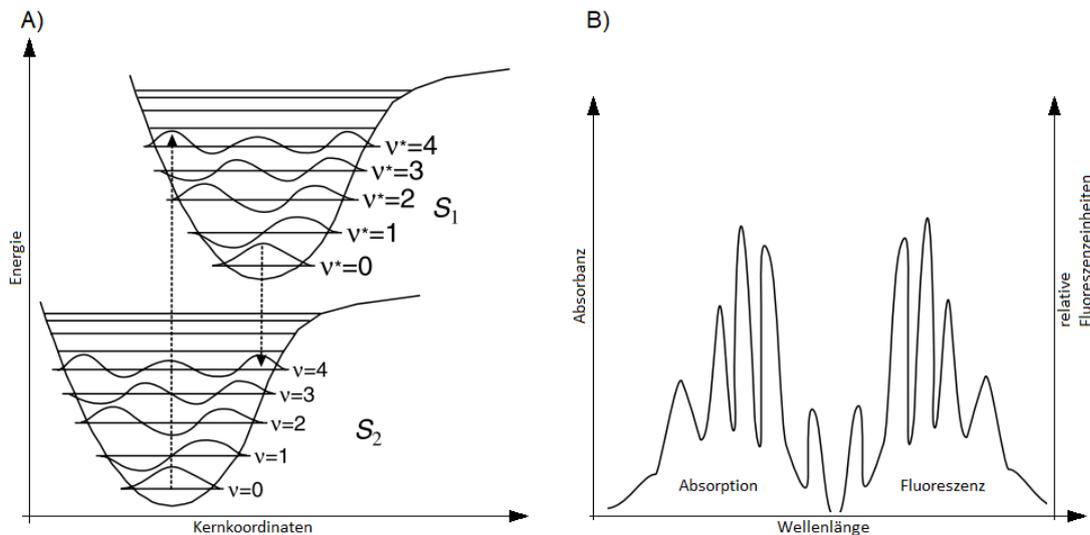


Abbildung 21: A) Morse-Potentiale eines Moleküls im elektronischen Grundzustand  $S_0$  und dem ersten angeregten Zustand  $S_1$  zur Veranschaulichung des Franck-Condon-Prinzips. B) Beispielhafte Darstellung der spiegelbildlichen Absorptions- und Emissionsspektren eines Moleküls. Modifiziert nach Lakowicz.<sup>140</sup>

Neben den Wellenlängen der Absorptions- und Emissionsspektren ist die Fluoreszenzquantenausbeute ein weiterer wichtiger Parameter, der ein Fluorophor charakterisiert und das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen beschreibt. Ausgedrückt mithilfe der Konstanten für die Geschwindigkeit von strahlenden Übergängen ( $k_s$ ) und der Geschwindigkeit von strahlungslosen Übergängen ( $k_{ns}$ ) lässt sich für die Quantenausbeute  $\Phi_f$  folgende Gleichung formulieren:

$$\Phi_f = \frac{k_s}{k_s + k_{ns}} \quad (1)$$

Dabei umfasst  $k_{ns}$  alle Prozesse, die mit der Fluoreszenz konkurrieren. Darunter fallen beispielsweise die innere Konversion in den Grundzustand oder auch das *Intersystem Crossing* (ISC), welches schlussendlich zur Phosphoreszenz führt. Dabei erfährt ein angeregtes Elektron eine Spinumkehr, und es wird ein Triplettzustand ( $T_n$ ) erreicht. Aus dem Triplettzustand kann der  $S_0$ -Zustand entweder strahlungslos durch ISC oder aber zeitverzögert unter Emission von elektromagnetischer Strahlung (Phosphoreszenz) wieder erreicht werden. Andere Quenching-Prozesse, die inter- oder intramolekular stattfinden, schwächen die Fluoreszenz ebenfalls. Die Vielzahl der möglichen Prozesse, die zu einer Reduktion der Fluoreszenz führen, machen es dabei unmöglich die exakte Quantenausbeute eines Moleküls vorherzusagen. Um diese unerwünschten Übergänge zu minimieren, lassen sich folgende Grundsätze formulieren:

- I.) Ein starres Grundgerüst verringert die strahlungslose Desaktivierung über Rotations- oder Schwingungsrelaxationen.
- II.) Konjugierte Systeme aus Elektronenakzeptoren und -donatoren begünstigen häufig Ladungstransfer-Übergänge und wirken sich so positiv auf die Fluoreszenzintensität aus.
- III.) Schweratomlose Strukturen zeigen häufiger erhöhte Fluoreszenzintensität, da Schweratome das ISC begünstigen.<sup>140</sup>

Die Vielzahl der Anwendungsgebiete, in denen Fluorophore zum Einsatz kommen spiegelt sich in deren strukturellen Diversität wider. So kommen sie in der Natur vor,<sup>143</sup> werden bei spektroskopischen Versuchen benötigt,<sup>140–142</sup> und finden Anwendung in der Biochemie und der Medizin.<sup>144–146</sup>

In der Biochemie und der Medizin haben sich unter anderem organische Fluorophore folgender Stoffklassen als brauchbar erwiesen:

- I.) Cumarine (Abbildung 22)
- II.) Fluoresceine (Abbildung 23)
- III.) Polymethine (Abbildung 24)
- IV.) Borhaltige Heterozyklen (Abbildung 25)

Zusätzlich existieren einige kleinere aromatische Fluorophore, die aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Kosteneffizienz häufig Anwendung finden. Strukturell weisen diese Verbindungen alle die oben genannten Strukturmerkmale auf und spannen unter Verwendung von annelierten aromatischen Systemen oder konjugierten Doppelbindungen starre Grundgerüste auf, die häufig von Elektronenakzeptoren oder -donatoren flankiert sind.<sup>147</sup>

Cumarine sind häufig als sekundäre Metaboliten in der Natur zu finden und mit Elektronendonatoren in der 7-Position ergeben sich stark fluoreszierende Moleküle.<sup>148,149</sup> Synthetisch werden Cumarine häufig aus Phenolen und entsprechenden  $\beta$ -substituierten Carbonsäuren oder -estern mithilfe der Pechmann-Kondensation gewonnen (Abbildung 22).<sup>147,150</sup>

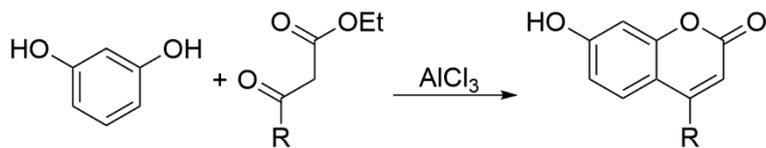


Abbildung 22: Synthese von Coumarinderivaten.

Fluoresceinderivate finden sich in nahezu allen wissenschaftlichen Gebieten wieder: Von der Diagnostik über die Raumfahrt bis hin zur Immunfluoreszenzmarkierung sind sie anzutreffen.<sup>151–153</sup> Lediglich die chinoide Form von Fluoresceinderivaten zeigt Fluoreszenz, weshalb diese stark pH-Wert abhängig ist.<sup>147</sup> Ursprünglich wurde Fluorescein aus der Kondensation von Phthalsäureanhydrid und Resorcin im sauren Milieu gewonnen (Abbildung 23).<sup>154</sup>

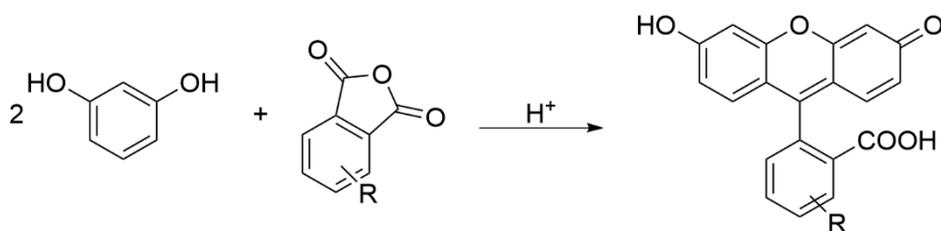


Abbildung 23: Synthese von Fluoresceinderivaten.

Bei den Polymethinen handelt es sich um eine breitgefächerte Gruppe, die alle ein lineares konjugiertes Doppelbindungssystem mit einer ungeraden Anzahl an  $sp^2$ -hybridisierten Kettengliedern beinhalten und von Heteroatomen flankiert ist. Handelt es sich bei den Heteroatomstrukturen um eine Kombination aus Ammonium- und Aminogruppe spricht man von Cyaninen. Strukturelle Variationen dieser Stoffklasse lassen eine hohe Variabilität der photophysikalischen Parameter zu. Zum Beispiel lässt eine Verlängerung der Polymethinkette eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzspektrums zu und eine Rigidisierung der Kette erhöht die Quantenausbeute. Klassisch werden Polymethine als Färbemittel für Zellmembranen oder auch der DNA eingesetzt; neuere Entwicklungen führten jedoch auch zur Verwendung als Markierungsmittel von Proteinen und Nucleinsäuren.<sup>155–158</sup> Synthetisch werden Polymethine z.B. aus der Addition von substituierten 2-Methylindolen an Orthoformate im Basischen gewonnen (Abbildung 24).<sup>159</sup>

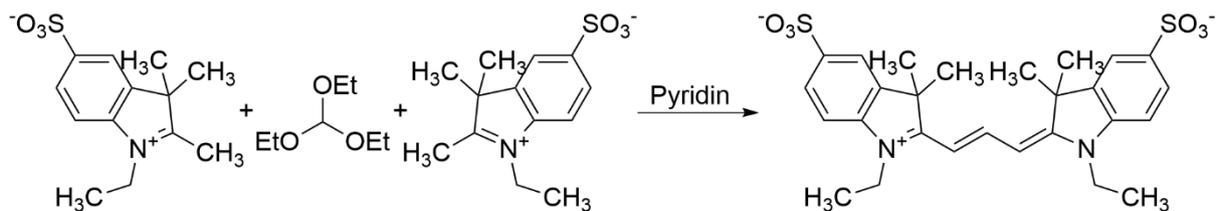


Abbildung 24: Beispielhafte Synthese eines Polymethinfarbstoffs.

Die bekannteste Unterart der borhaltigen Heterozyklen mit Fluoreszenzeigenschaften sind 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIPY)-Derivate. Hierbei ist ein zentrales Boratom, meist als Difluorid, von einem organischen Dipyrromethenrest komplexiert. Substituierte BODIPY-Derivate zeichnen sich durch hervorragende Photostabilitäten sowie gute Quantenausbeuten aus und besitzen in der Regel einen geringen Stokes-Shift.<sup>160,161</sup> Da die Synthesebausteine Aldehyd und Pyrrol eine Vielzahl an Substitutionen zulassen, lässt sich diese Stoffklasse äußerst breit modifizieren, was teils zu erheblichen Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften führt.<sup>161,162</sup> Die breite Variabilität von akzeptierten Substituenten am BODIPY-Zentrum erlaubt eine Vielzahl von Markierungsmöglichkeiten, sodass es häufig zur Markierung von Proteinen oder Liganden eingesetzt wird.<sup>163–166</sup> Gewonnen werden können diese Verbindungen durch doppelte Kondensation von zwei Äquivalenten Pyrrol an ein Säurechlorid und anschließende Reaktion mit Bortrifluorid (Abbildung 25 A).<sup>164</sup> Durch Variation der Bor-komplexierenden organischen Verbindungen konnten neuartige Fluorophore geschaffen werden, die Markierungen von substituierten Phenolen oder Ketonen ermöglichen. Im Vergleich zu den klassischen BODIPY-Derivaten zeigen diese Fluorophore eine hypsochrome Verschiebung der Absorptions- und Emissionspektren und deutlich größere Stokes-Shifts bei ähnlichen Quantenausbeuten.<sup>167,168</sup> Eben solche finden sich auch bei Verbindungen, bei denen eine hydrazinverknüpfte Pyrrol-Picolinoyl-Einheit zwei Bordifluoride komplexieren. Diese stark fluoreszierenden Verbindungen, als BOPPY-Derivate bekannt, sind äußerst photostabil und unempfindlich gegenüber pH-Wert-Änderungen.<sup>169</sup> Hergestellt werden diese Fluorophore in einer Eintopf-Synthese, bei der zunächst Hydrazinylpyridine mit Pyrrolcarboxylaldehyden kondensiert werden und bei anschließender Umsetzung mit Bortrifluorid zum gewünschten Fluorophor reagieren (Abbildung 25 B).<sup>169</sup> Die Synthese-Führung ist somit deutlich vorteilhafter als bei der Herstellung von BODIPY und erlaubt in der Regel höhere Ausbeuten bei der Herstellung des Fluorophors.<sup>164,169</sup>

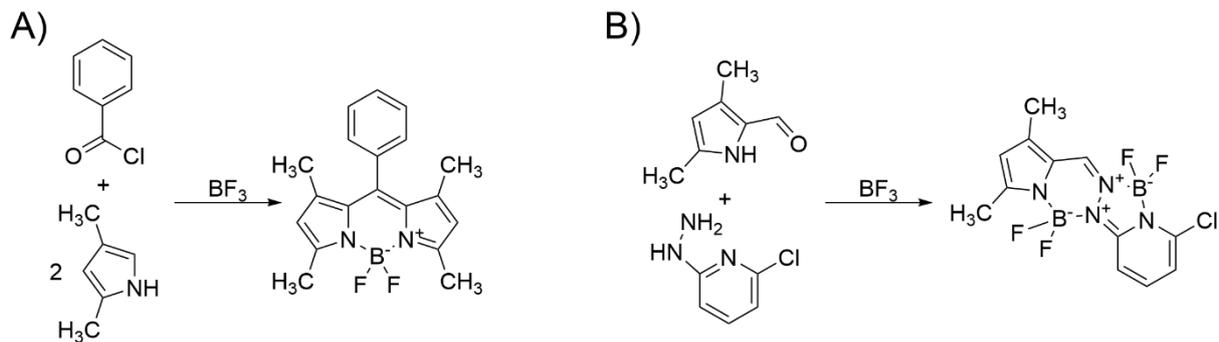


Abbildung 25: Synthese von beispielhaften A) BODIPY und B) BOPPY-Derivaten.

Neben diesen vier strukturell anspruchsvollen Verbindungsklassen gibt es eine Reihe kleinerer aromatischer Verbindungen, die häufig als Marker genutzt werden. Solche Verbindungen sind beispielsweise die Sanger- und die Dansylgruppe.<sup>170</sup> Sanger's-Reagenz und Dansylchlorid (Abbildung 26) wurde historisch in der Aminosäuresequenzanalytik verwendet und reagiert mit *N*-terminalen Aminosäuren, die nach Hydrolyse und chromatographischer Trennung charakterisiert werden können.<sup>171</sup> Die Dansylgruppe eignet sich aufgrund ihrer Anregungswellenlänge zur Charakterisierung von Proteinen, die Tryptophan enthalten. Über Förster Energieresonanztransfer (FRET) kann der Abstand dieser beiden Gruppen zueinander ermittelt werden.<sup>172</sup>

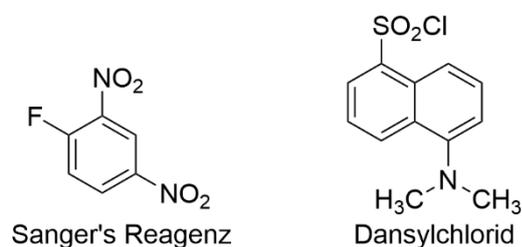


Abbildung 26: Niedermolekulare Reagenzien zur Fluoreszenzmarkierung.

#### 1.4.2: Methoden der Fluoreszenzmarkierung von GPCRs

Die Strategien zur Markierung von GPCRs mit fluoreszierenden Verbindungen lässt sich in zwei Gruppen aufteilen: Auf der einen Seite ist es möglich die Rezeptoren selbst mit einem Fluoreszenzlabel zu versehen und auf der anderen Seite können affine Liganden konzipiert werden, die den Fluoreszenzfarbstoff tragen. Mithilfe dieser Markierungsmethoden lassen sich eine Vielzahl von wissenschaftlichen Fragestellungen beantworten. So können Rezeptoren visualisiert und lokalisiert werden, sowie deren Interaktionen mit Liganden oder auch anderen Rezeptoren in Echtzeit untersucht werden.

Eine mögliche Strategie zur Fluoreszenzmarkierung des GPCRs selbst ist die proteinbasierte Fluoreszenzmarkierung. Hierbei werden Protein-Markierungen gentechnisch direkt in die Rezeptorstruktur eingefügt. Bekannte Markierungen dieser Art sind die SNAP- und die Polyhistidin-Markierung. An diese Markierungen wird in einem zweiten Schritt das eigentliche Fluorophor komplex gebunden.<sup>173–175</sup> Ebenso ist es möglich einen Rezeptor ohne weiteres Substrat fluoreszent zu markieren, indem fluoreszierende Proteine, wie etwa das grün-fluoreszierende Protein (GFP), in den C-Terminus des Rezeptors eingefügt werden.<sup>176</sup> Ein häufig genannter Nachteil ist, dass sich eine strukturelle Modifikation des Rezeptors auf dessen physiologische Funktionalität auswirken kann. Nichtsdestotrotz findet dieser Ansatz häufig Anwendung bei der Entwicklung von *in-vitro* Assaysystemen zur Untersuchung von Liganden. Für Lokalisations-Untersuchungen von GPCRs *in-vivo* hingegen ist diese Strategie wertlos.

Hierbei kommen chemische Sonden in Form von fluoreszenzmarkierten Rezeptor-Liganden ins Spiel, mit dessen Synthese sich diese Arbeit beschäftigt. Dabei bedarf es keines Eingriffs in die Rezeptorstruktur. Die Markierung mit niedermolekularen Fluoreszenzliganden setzt zudem die funktionale Expression der jeweiligen Rezeptoren voraus und eignet sich daher nicht nur zur Identifizierung, sondern auch zur Funktionalitätsüberprüfung von GPCRs. Der Vollständigkeit halber sei hier auch die immunochemische Markierung mit fluoreszenten Antikörpern erwähnt, die zumeist zur Quantifizierung von Proteinen eingesetzt wird.<sup>177–179</sup> Diese werden in *in-vitro* Testsystemen wie etwa ELISAs eingesetzt. Das häufige Problem der unspezifischen Bindung an Proteinfragmente, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt, kann durch die Benutzung von fluoreszenzmarkierten Liganden als chemische Sonden vermieden werden.

### 1.4.3: Ligandenbasierte Fluoreszenzmarkierung

Bei dem Design und der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Rezeptorliganden wird ausgenutzt, dass GPCRs ihre Liganden hochselektiv und mit großer Affinität binden. Durch die breite Vielfalt an Verbindungen, die den unterschiedlichen Rezeptoren als Liganden dienen können, der vielen möglichen Fluorophore auf die zurückgegriffen werden kann und die unterschiedlichen Möglichkeiten der Verknüpfung der beiden Strukturelemente, ergibt sich eine große Vielfalt an angewendeten Fluoreszenzliganden.<sup>146,180</sup> Drei Fälle der Verknüpfung können unterschieden werden (Abbildung 27):

- a) Das Pharmakophor und das Fluorophor teilen sich eine strukturelle Komponente, sodass ein Überlapp ausgenutzt werden kann;
- b) das Pharmakophor bietet eine molekulare Bindungsstelle, die zur direkten Kopplung eines Fluorophors genutzt werden kann oder
- c) zwischen Pharmakophor und Fluorophor befindet sich ein abstandhaltender Linker.



Abbildung 27: Verknüpfungsmöglichkeiten von Pharmakophor und Fluorophor: a) Überlappende Kombination von Pharmakophor und Fluorophor; b) Direkte Bindung des Fluorophors an das Pharmakophor; c) Verknüpfung unter Verwendung eines Linkers.

Die Wahl der jeweiligen Methodik ist dabei häufig abhängig von der Struktur des zugrundeliegenden Pharmakophors. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Ansätze zur Entwicklung von Fluoreszenzliganden anhand von Beispiel aufgezeigt und mögliche Anwendungen erläutert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anwendungsgebiete von fluoreszenzmarkierten Rezeptorliganden

Ligand	Zielstruktur	Anwendung
XXXII	Galanin-Rezeptor	Untersuchung von Rezeptor-Internalisierung
XXXIII	NPY-R	Referenzligand zur Bestimmung von Affinitätsdaten
XXXV	MT <sub>1</sub> R und MT <sub>2</sub> R	Rezeptormarkierung
Bodilisant	H <sub>3</sub> R	Rezeptormarkierung von nativen Gewebeproben, Referenzligand zur Bestimmung von Affinitätsdaten
XXXVIII	EP <sub>3</sub> R	Rezeptormarkierung
XL	5-HT <sub>4</sub> R	Rezeptormarkierung
XLI	M <sub>1</sub> R	Untersuchung von Rezeptoroligomerisation

Im Falle der Peptid-bindenden GPCRs (zum Beispiel Galanin-Rezeptoren, Chemokin-Rezeptoren, Sekretinrezeptoren oder Glukagonrezeptoren) sind die aktiven Peptide im Vergleich zu den Fluorophoren relativ groß, sodass letztere einen geringeren Einfluss auf die

Aktivität haben und Fluorophor-Pharmakophor-Konjugate vergleichbare Affinitäten zeigen, wie die jeweiligen Ausgangsverbindungen. Beispielhaft für fluoreszenzmarkierte Peptide stehen die Verbindungen **XXXII** und **XXXIII** (Abbildung 28). So wurde im Falle von **XXXII** an das Neuropeptid Galanin Fluorescein gebunden, um mittels Durchflusszytometrie die Wechselwirkung des Galanins mit seinen Rezeptoren und deren Internalisierung zu analysieren.<sup>181</sup> Durch Kopplung des Polymethinfarbstoffes Dy630 an das Neuropeptid Y (NPY) wurde ein Fluoreszenzligand (**XXXIII**) geschaffen, der zur Bestimmung von Affinitäts- und Selektivitätswerten von Liganden der NPY-Rezeptoren herangezogen wurde.<sup>182</sup>

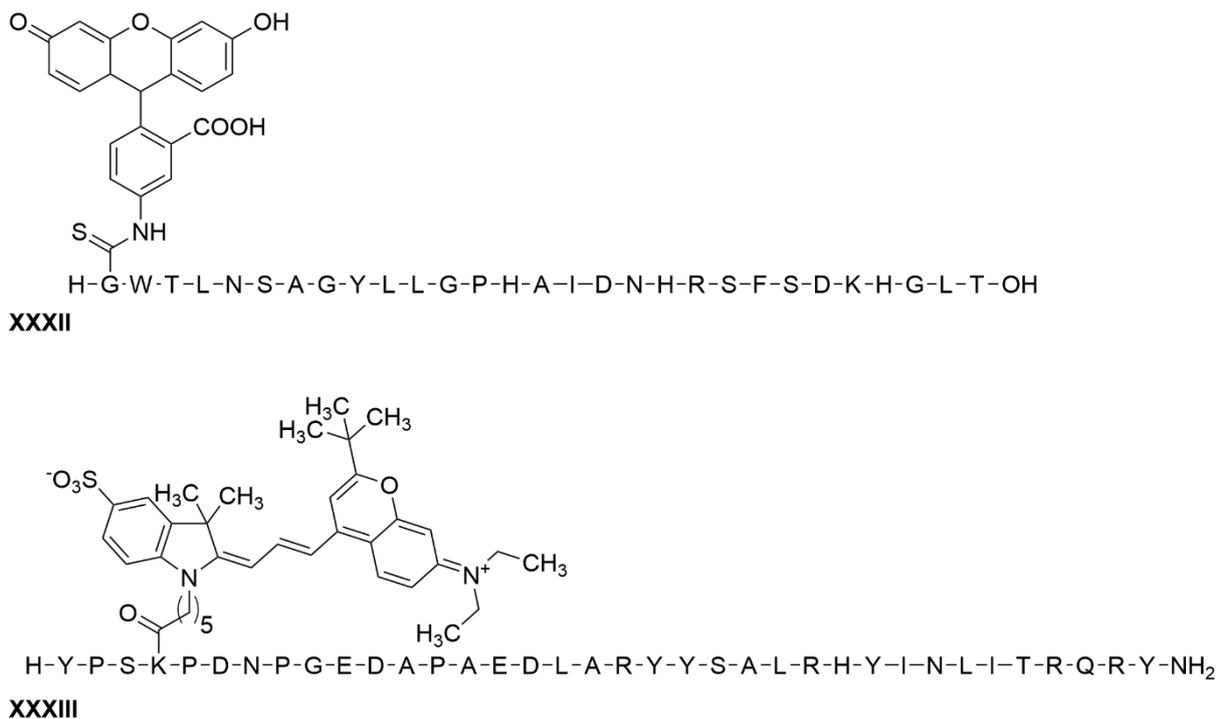


Abbildung 28: Fluoreszenzmarkierte Neuropeptide Galanin und NPY; Aminosäuren im Einbuchstabencode dargestellt.

Handelt es sich um GPCRs, deren endogene Liganden kleine Moleküle wie beispielsweise biogene Amine (Histamin, Serotonin, Dopamin, (Nor-)Adrenalin) oder Steroide sind, ist das Design von hochaffinen Fluoreszenzliganden ungleich diffiziler, da die teils sehr voluminösen Fluorophore einen großen Teil der Molekülmasse ausmachen und somit einen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten gegenüber dem Rezeptor haben können. In diesen Fällen liefert die rationale Analyse von bereits vorhandenen Liganden die Grundlage, um ein Pharmakophor zu identifizieren, das eine hohe Affinität und Selektivität gegenüber dem gewünschten Rezeptor zeigt und zusätzlich Regionen aufweist, die bereits Fluorophoren ähneln und bioisoster ersetzt werden können. Oder aber es finden sich Liganden, die mit Bindungsstellen ausgestattet sind

oder ausgestattet werden können, die sich für die Kopplung eines Fluorophors bzw. Fluorophor-Linker-Konjugats nutzen lassen. Dies sind häufig Amine, Hydroxyle, Alkine oder aber Carboxyle. Zu Derivatisierungszwecken werden daher häufig Kondensations- oder aber Click-Reaktionen angewandt. Basierend auf diesen Grundlagen wurden für viele GPCRs bereits Fluoreszenzliganden entwickelt.<sup>164,183–188</sup>

Für die nicht aminergen Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 (CB<sub>1</sub>R und CB<sub>2</sub>R) wurde ausgehend von  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) das Cumarinderivat **XXXIV** entwickelt (Abbildung 29).<sup>183,184</sup> Eine Cumarinstruktur ersetzt dabei die trizyklische Einheit des  $\Delta^9$ -THC und erhält dabei größtenteils die sterischen und elektronischen Eigenschaften der Ausgangsverbindung. So konnte die Affinität zum CB<sub>2</sub>R gewährleistet werden ( $\Delta^9$ -THC:  $K_i(\text{CB}_2\text{R}) = 3.1 - 75.3 \text{ nM}$ ; **XXXIV**:  $K_i(\text{CB}_2\text{R}) = 25 \text{ nM}$ ), die Bindungsstärke gegenüber dem CB<sub>1</sub>R nahm jedoch leicht ab ( $\Delta^9$ -THC:  $K_i(\text{CB}_1\text{R}) = 80.3 \text{ nM}$ ; **XXXIV**:  $K_i(\text{CB}_1\text{R}) = 150 \text{ nM}$ ).<sup>184,189</sup> Limitiert wird die Anwendung von **XXXIV** als Fluoreszenzligand durch das Absorptions- und Emissionsprofil, deren Maxima bei 320 nm respektive 423 nm liegen, und somit verhältnismäßig stark mit der Autofluoreszenz von Zellgewebe überlappen. Daher kam die Verbindung nicht als chemische Sonde zum Einsatz.<sup>184,190</sup>

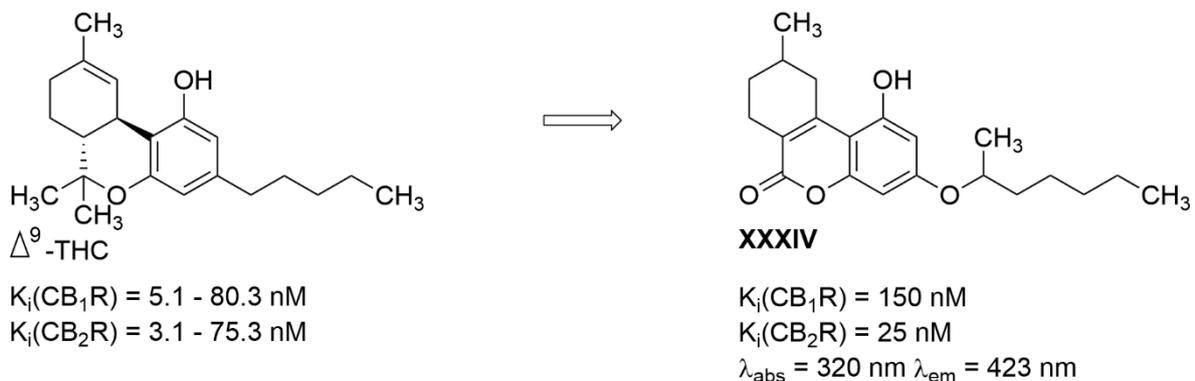


Abbildung 29: Ausgangsverbindung  $\Delta^9$ -THC und der Fluoreszenzligand **XXXIV**.<sup>184,189</sup>

Eine ähnliche Strategie wurde von Thireau *et al.* verwendet, die ebenfalls durch Fusionierung von Pharmakophor und Fluorophor Fluoreszenzliganden für die Melatoninrezeptoren 1 und 2 (MT<sub>1</sub>R und MT<sub>2</sub>R) geschaffen haben. Ausgangspunkt für das Design des Fluoreszenzligands war der endogene Ligand Melatonin (MT<sub>1</sub>R und MT<sub>2</sub>R:  $K_i = 0.5 \text{ nM}$ <sup>191</sup>, Abbildung 30). Der Pyrrolring des Melatonins wurde dafür in das Grundgerüst des BODIPY-Fluorophors inkorporiert und ergab so die Verbindung **XXXV**, die sich durch Affinitätswerte im

nanomolaren Bereich ( $K_i(\text{MT}_1\text{R}) = 32 \text{ nM}$ ;  $K_i(\text{MT}_2\text{R}) = 10 \text{ nM}$ ) auszeichnet. Die Absorptions- und Emissionsmaxima liegen mit  $\lambda_{\text{maxAbs}} = 426 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{maxEm}} = 492 \text{ nm}$  im typischen Bereich für BODIPY-Derivate. Mit **XXXV** konnten  $\text{MT}_1\text{R}$ - und  $\text{MT}_2\text{R}$ -exprimierende Zellen visualisiert werden.<sup>185</sup>

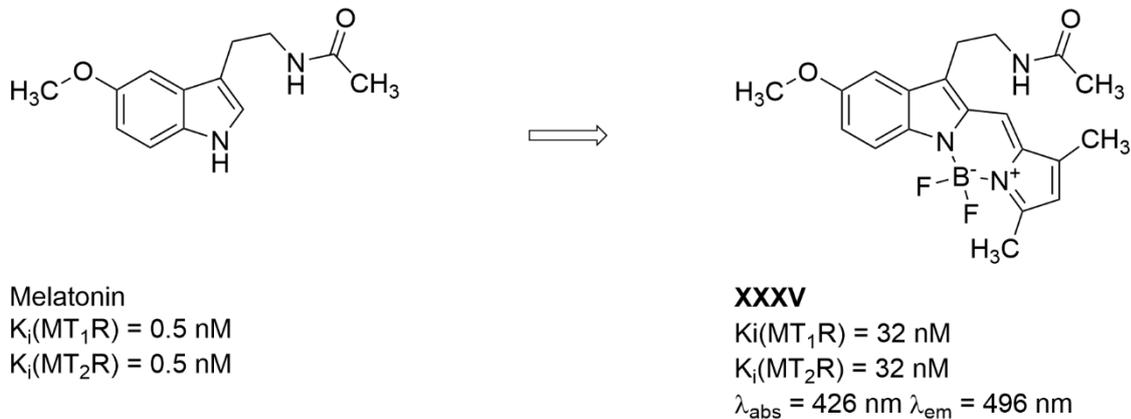


Abbildung 30: Ausgangsverbindung Melantonin und der Fluoreszenzligand **XXXV**.<sup>185,191</sup>

Die Verbindung **XXXVI** (Abbildung 31) zeigt eine Anknüpfung eines Fluorophors an das Pharmakophor ohne Nutzung eines Linkers am Beispiel des  $\text{H}_3\text{R}$ . Grundlage war der hochaffine  $\text{H}_3\text{R}$ -Ligand UCL-2190, ( $K_i(\text{H}_3\text{R}) = 46 \text{ nM}$ <sup>192</sup>) dessen Carbonylfunktion um eine Chalconeinheit erweitert wurde. Der resultierende  $\text{H}_3\text{R}$ -Ligand **XXXVI** wies eine gute Affinität ( $K_i(\text{H}_3\text{R}) = 70 \text{ nM}$ ) und überzeugende Fluoreszenzeigenschaften ( $\lambda_{\text{maxAbs}} = 405 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{maxEm}} = 584 \text{ nm}$ ) auf. Mithilfe von Verbindung **XXXVI** konnten  $\text{H}_3\text{R}$  auf der Zelloberfläche von  $\text{hH}_3\text{R}$ -HEK-293 mittels konfokaler *Laser Scanning*-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Substitution des Chalconfuorophors mit einem BODIPY-Grundkörper konnte die  $\text{H}_3\text{R}$ -Affinität um eine Potenz verbessern und lieferte den hervorragenden Fluoreszenzliganden Bodilisant ( $K_i(\text{H}_3\text{R}) = 6.5 \text{ nM}$ ;  $\lambda_{\text{maxAbs}} = 468 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{maxEm}} = 494 \text{ und } 563 \text{ nm}$ ;  $\Phi = 0.92$ ). Bodilisant konnte genutzt werden um  $\text{H}_3\text{R}$  auf der Zelloberfläche von nativem humanem Gehirngewebe nachzuweisen.<sup>164</sup>

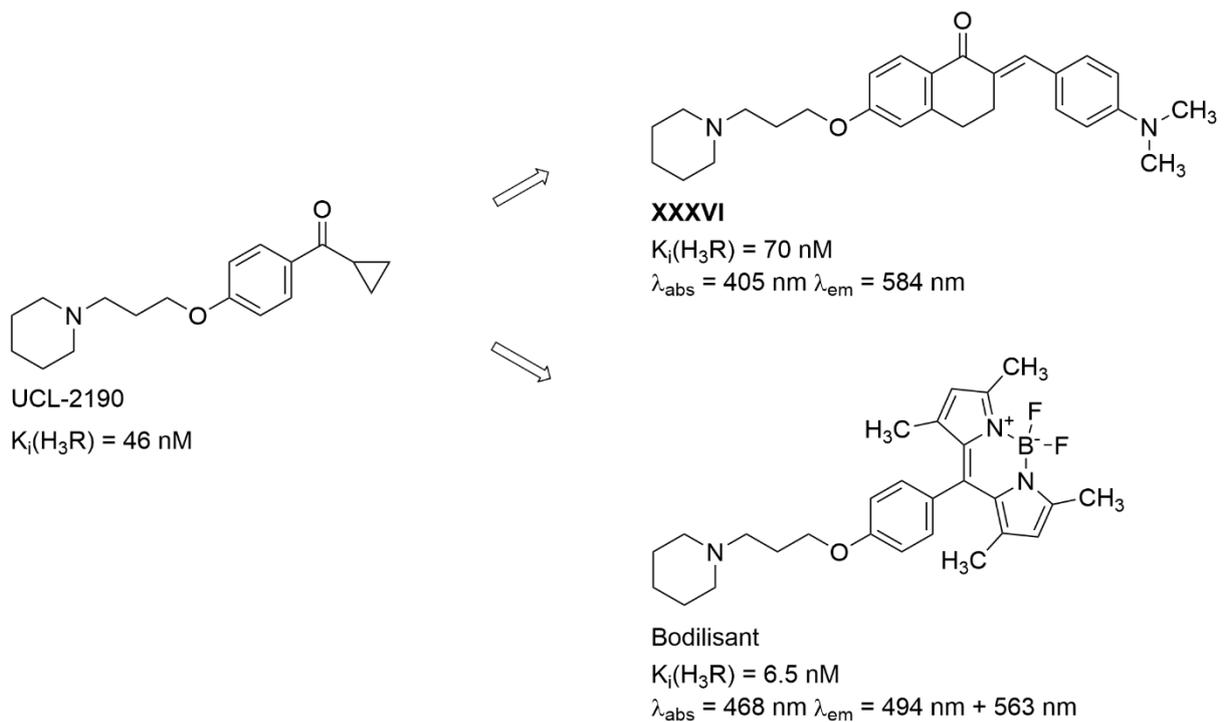


Abbildung 31: Ausgangsverbindung UCL-2190 und die Fluoreszenzliganden **XXXVI** und Bodilisant.<sup>164,192</sup>

Ein weiterer Fluoreszenzligand, der eine direkte Bindung von Fluorophor und Pharmakophor aufweist, ist der Prostaglandin-EP<sub>3</sub>-Rezeptor (EP<sub>3</sub>R)-Antagonist **XXXVIII** (Abbildung 32). Durch die Einführung eines Cyanisindols besitzt der Ligand passable Fluoreszenzeigenschaften ( $\lambda_{\text{maxAbs}} = 350 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{maxEm}} = 396 \text{ nm}$ ) und eine höhere Affinität zum EP<sub>3</sub>R als die zugrundeliegende Ausgangsverbindung **XXXVII** (**XXXVII**:  $K_i(\text{EP}_3\text{R}) = 44.5 \text{ nM}$ ; **XXXVIII**  $K_i(\text{EP}_3\text{R}) = 18.2 \text{ nM}$ ). Mittels konfokaler Lasermikroskopie konnten mit **XXXVIII** EP<sub>3</sub>R auf der Oberfläche von HT-29 Zellen visualisiert werden.<sup>186</sup>

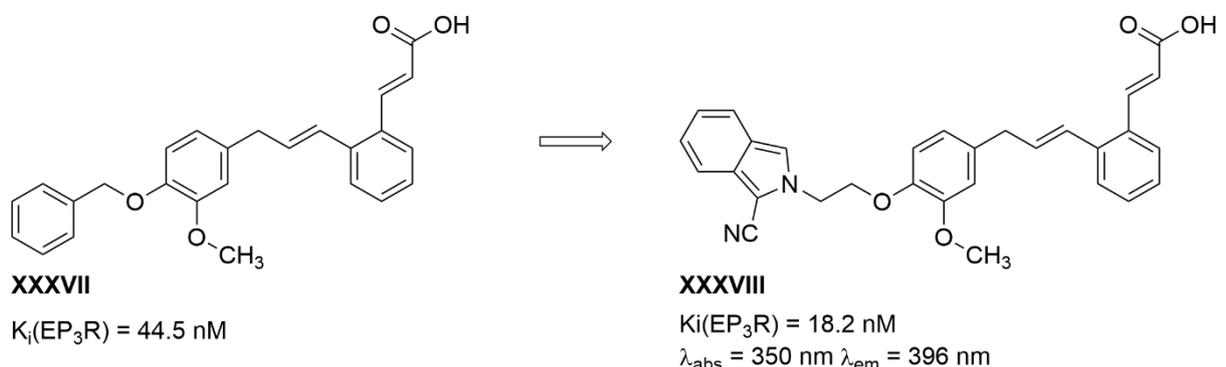


Abbildung 32: Ausgangsverbindung **XXXVII** und Fluoreszenzligand **XXXVIII**.<sup>186</sup>

Wie wichtig bei dem Design solcher Fluoreszenzliganden die Wahl des Verknüpfungspunktes von Fluorophor und Pharmakophor sein kann, zeigt sich anhand von Liganden des

5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-4 (5-HT<sub>4</sub>R). Die Ausgangsverbindung ML10302 wurde hierbei sowohl über das aromatische Amin und einen Linker an eine Dansylgruppe geknüpft (**XXXIX**), als auch über die 4-Position des Piperidins (**XL**) (Abbildung 33). Beide Verbindungen zeigen Anregungs- und Emissionswerte, die von Dansylgruppen zu erwarten waren ( $\lambda_{\text{maxAbs}} = 315 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{maxEm}} = 540 \text{ nm}$ ). Wohingegen die Affinität im Vergleich zur Ausgangsverbindung ( $K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) = 1 \text{ nM}$ ) bei **XL** nahezu erhalten werden konnte ( $K_i(5\text{-HT}_4\text{R}) = 24 \text{ nM}$ ), zeigte **XXXIX** keine Affinität mehr gegenüber dem Rezeptor. Die Liganden wurden zur Markierung von 5-HT<sub>4</sub>R auf der Zelloberfläche von transfizierten Gliazellen genutzt werden.<sup>187</sup>

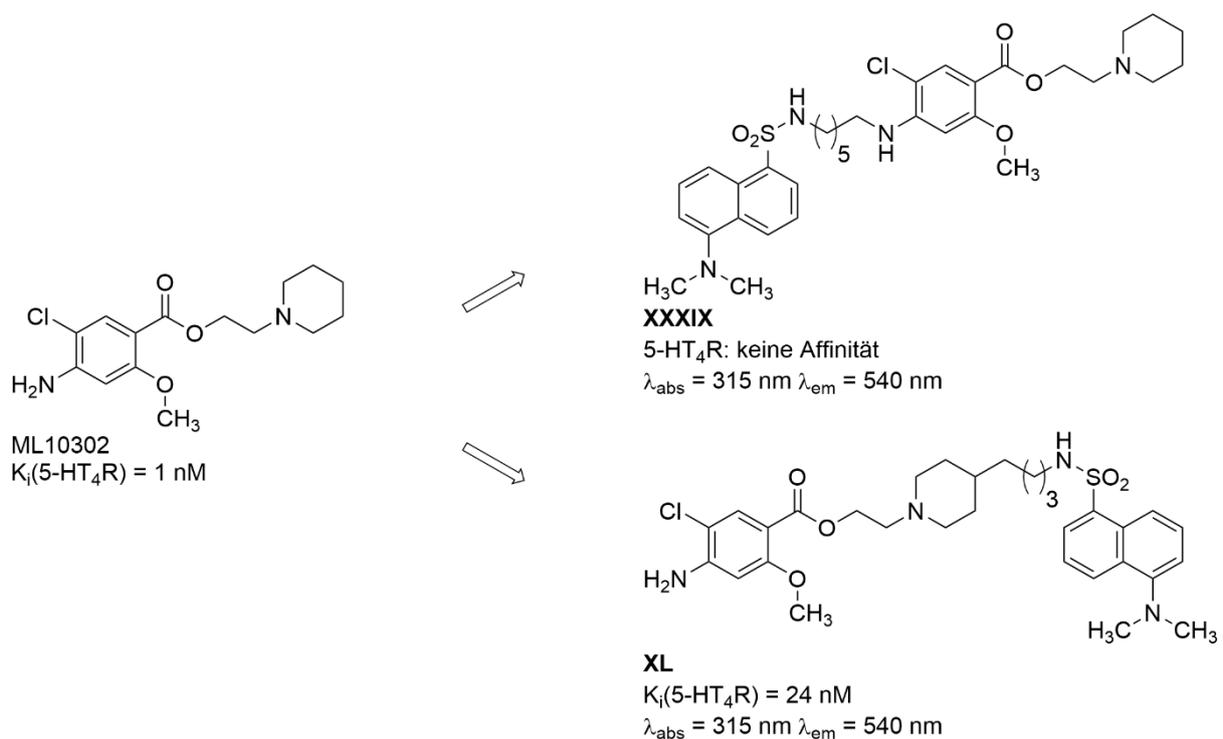
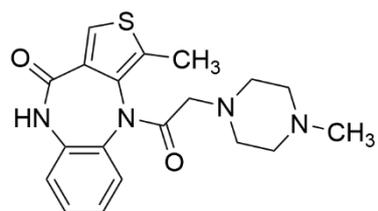
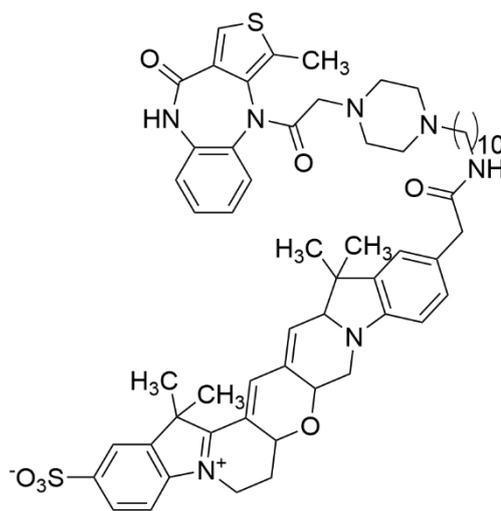


Abbildung 33: Ausgangsverbindung ML10302 und die Fluoreszenzliganden **XXXIV** und **XL**.<sup>187</sup>

Unter Zuhilfenahme eines langkettigen aliphatischen Linkers konnten Hern *et al.* Telenzepin (Abbildung 34) mit dem Polymethinfarbstoff Cy3B ( $\lambda_{\text{maxAbs}} = 558 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{maxEm}} = 571 \text{ nm}$ ) markieren und mit diesem die laterale Diffusion von Muskarin-M<sub>1</sub>-Rezeptoren (M<sub>1</sub>R) auf Zelloberflächen über Sekunden beobachten. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass jeder Rezeptor jeweils einen Liganden zeitgleich bindet und sich auf der Zelloberfläche sowohl monomere als dimere Rezeptoreinheiten bildeten, Oligomere hingegen nicht. Diese hochauflösenden Bilder konnten nur erzeugt werden, weil die subnanomolare Affinität von Telenzepin ( $K_i(M_1R) = 0.9 \text{ nM}$ <sup>193</sup>) im Fluoreszenzkonjugat **XLI** erhalten blieb ( $K_d(M_1R) = 0.04 \text{ nM}$ ).<sup>188</sup>



Telenzepin  
 $K_i(M_1R) = 0.9 \text{ nM}$



**XLI**  
 $K_d(M_1R) = 0.04 \text{ nM}$   
 $\lambda_{\text{abs}} = 558 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 571 \text{ nm}$

Abbildung 34: Ausgangsverbindung Telenzepin und Fluoreszenzligand **XLI**.<sup>188,193</sup>

## 2: Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen chemische Sonden entwickelt und synthetisiert werden, die zum einen den Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptor (H<sub>4</sub>R) und zum anderen die Monoaminoxidasen (MAO) A und B als molekulare Zielstrukturen haben. Der Hauptfokus liegt dabei auf der Entwicklung neuer H<sub>4</sub>R-Liganden, die über eine Fluoreszenzmarkierung verfügen, sowie die Untersuchung ihrer Eigenschaften und die Aufstellung von Struktur-Wirk-Beziehungen. Zum Aufbau der Fluoreszenzliganden sollen bereits bekannte H<sub>4</sub>R-Liganden als Ausgangspunkt dienen, und auf ihre Eignung zur Fluoreszenzmarkierung geprüft werden. Weiterhin sollen Fluorophore identifiziert werden, die die Bindungseigenschaften nur minimal beeinflussen und gleichzeitig photospektroskopische Untersuchungen in Zellen oder Geweben erlauben. Dabei kann das synthetische Einbringen einer fluoreszenten Gruppe entweder durch Integration in den pharmakologisch wirksamen Teil des Liganden erfolgen, über eine direkte Kopplung mit diesem oder durch Verknüpfung beider Strukturelemente mit einem Linker. Bei der Synthese steht die Derivatisierung von gut charakterisierten Aminopyrimidinen mit bekannten Fluorophoren im Mittelpunkt. Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Evaluierung dieser Verbindungen sollen in einem iterativen Prozess die Liganden bezüglich Ihrer Affinität und Fluoreszenzeigenschaften optimiert werden. Fluoreszente H<sub>4</sub>R-Liganden können zukünftig als chemische Sonden eingesetzt werden und dabei helfen, funktional exprimierte H<sub>4</sub>R in unterschiedlichen Geweben nachzuweisen oder aber die (patho)physiologische Rolle des H<sub>4</sub>R weiter aufzuklären.

Eine Auswahl an strukturellen Modifikationen von bereits beschriebenen hochaffinen H<sub>4</sub>R-Liganden (z.B. JNJ-7777120) soll vorab Möglichkeiten und den synthetischen Spielraum zur Affinitätssteigerung bzw. -erhaltung neuartiger H<sub>4</sub>R-Liganden näher beleuchten. Das Design von Strukturanaloga (Pyrazololderivate) und die Manipulation des basischen Ankers (z.B. durch Verwendung des endogenen Liganden Histamin) steht hierbei im Fokus.

In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollen chemische Sonden für humane MAO generiert werden. Die Entwicklung kleiner Anilid-Derivate, die sich als potente Precursor-Moleküle zur Synthese von selektiven MAO-Inhibitoren oder aber multipotenten Wirkstoffen eignen, wird hierbei angestrebt. Diese Verbindungen sollen trotz einfachster Struktur und leichter Synthetisierbarkeit eine hohe Affinität gegenüber mindestens einer Isoform der MAO-Enzyme aufweisen. Anhand dieser Verbindungen sollen Struktur-Wirkbeziehungen abgeleitet werden

und die biologisch erhobenen Daten durch computergestützte Techniken verifiziert werden. Die Ergebnisse dieses Teilprojekts werden in kumulativer Form im Kapitel 5: basierend auf der Publikation „Potent reversible small molecule inhibitors of MAO A and MAO B with anilide motifs“ präsentiert.

### 3: Ergebnisse

Im Folgenden werden für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten H<sub>4</sub>R-Liganden die Syntheserouten, sowie deren photophysikalischen und biologischen Eigenschaften vorgestellt.

#### 3.1: Syntheseplanung von Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptor-Liganden

Die Grundlage der hier vorgestellten H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden bilden bereits veröffentlichte hochaffine H<sub>4</sub>R-Liganden. Der Einsatz als chemische Sonden wirkt sich dabei insofern auf die Überlegungen zum Strukturdesign aus, dass Faktoren, die die *druglikeness* steigern nicht berücksichtigt werden müssen. Da eine gute Bioverfügbarkeit nicht ausschlaggebend für die Zielverbindungen ist, entfallen zum Beispiel Betrachtungen zur Verteilung der Substanzen zwischen Octanol und Wasser (logP-Werte), Interaktionen mit Medikamenten bzw. Lebensmitteln oder aber Transportvorgänge mittels Carrierproteinen. Bestimmend ist hier nur eine hinreichende Löslichkeit in wässrigen Puffern, die als Lösemittel in den jeweiligen Assay-Systemen zum Einsatz kommen. Ebenso kann die biologische Wirkung der Liganden unberücksichtigt bleiben, da lediglich eine hohe Affinität zum H<sub>4</sub>R generiert werden muss. Als Ausgangsliganden eignen sich daher alle Liganden, die sich hochaffin gegenüber dem H<sub>4</sub>R verhalten.

Diese Eigenschaft wurde in vielen Testsystemen für JNJ-7777120 gezeigt. Durch Variation der basischen Funktionalität auf der einen Seite und dem lipophilen Rest auf der anderen Seite sollte zunächst evaluiert werden, ob sich das Grundgerüst von JNJ-7777120 als Startpunkt für den Entwurf von H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden eignet (Abbildung 35). Das zentrale Amid lässt sich durch Kopplung von bekannten Aminen mit der zugrundeliegenden Indolcarbonsäure leicht bilden, sodass sich dieser Syntheseschritt eignet, um die unterschiedlichen basischen Funktionalitäten einzubringen.

Der lipophile Rest sollte dahingehend modifiziert werden, dass Substitutionen mit Fluorophoren ermöglicht werden. Diese Möglichkeit sollte durch Pyrazololderivate geschaffen werden, die über Knorr-Synthesen aufgebaut werden sollten.

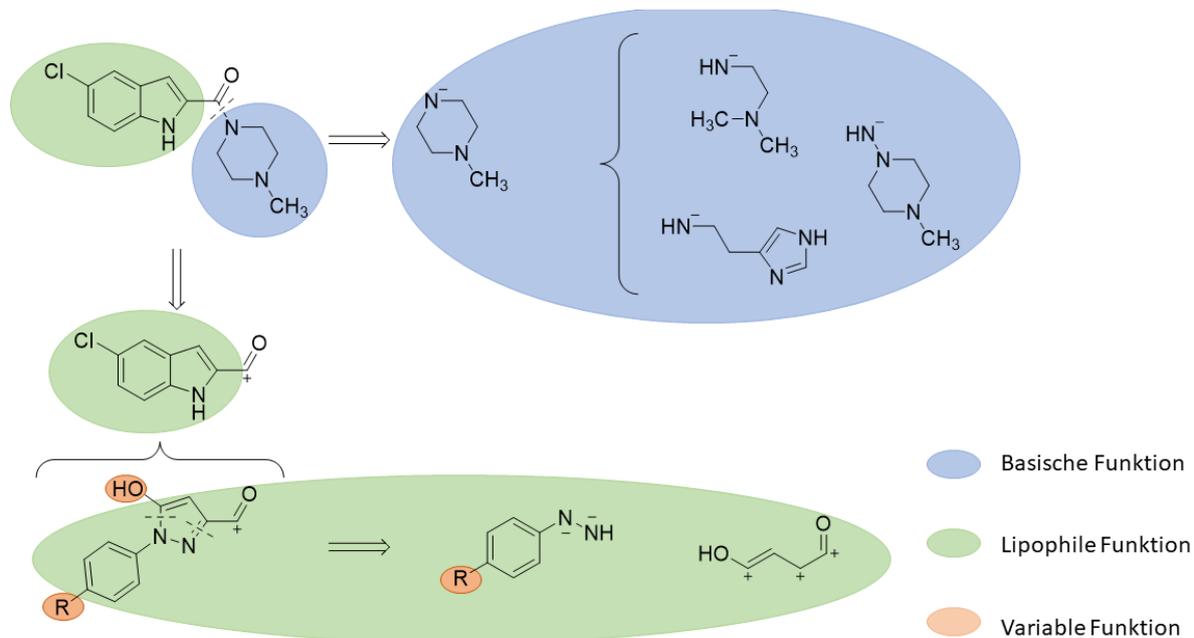


Abbildung 35: Retrosynthetische Betrachtung von JNJ777120 zur Einbringung struktureller Variationen.

Neben JNJ-777120 zeigen viele Aminopyrimidine (ST-994, VUF10460, Toreforant) und Chinazolinderivate hohe  $H_4R$ -Affinitäten (Abbildung 36). Daher dienen diese Verbindungsklassen ebenfalls als Ausgangspunkte für das Design chemischer  $H_4R$ -Sonden. Synthetisch lassen sich Aminopyrimidine aus Guanidin und 1,3-Dicarbonylen gewinnen. Die chlorierten Pyrimidine eignen sich hervorragend zur aromatischen nucleophilen Substitution, da die intrazyklischen Stickstoffe dazu führen, dass sich positive Partialladungen in 2-, 4- und 6-Position gut stabilisieren. Diese beiden Reaktionen bilden daher die Basis vieler Pyrimidinderivate, die in dieser Arbeit hergestellt wurden.

Anhand dieser Derivate sollte geklärt werden bei welchen Substitutionsmustervariationen die hohe  $H_4R$ -Affinität beibehalten wird und welche Fluorophore in welcher Anbindung toleriert werden.

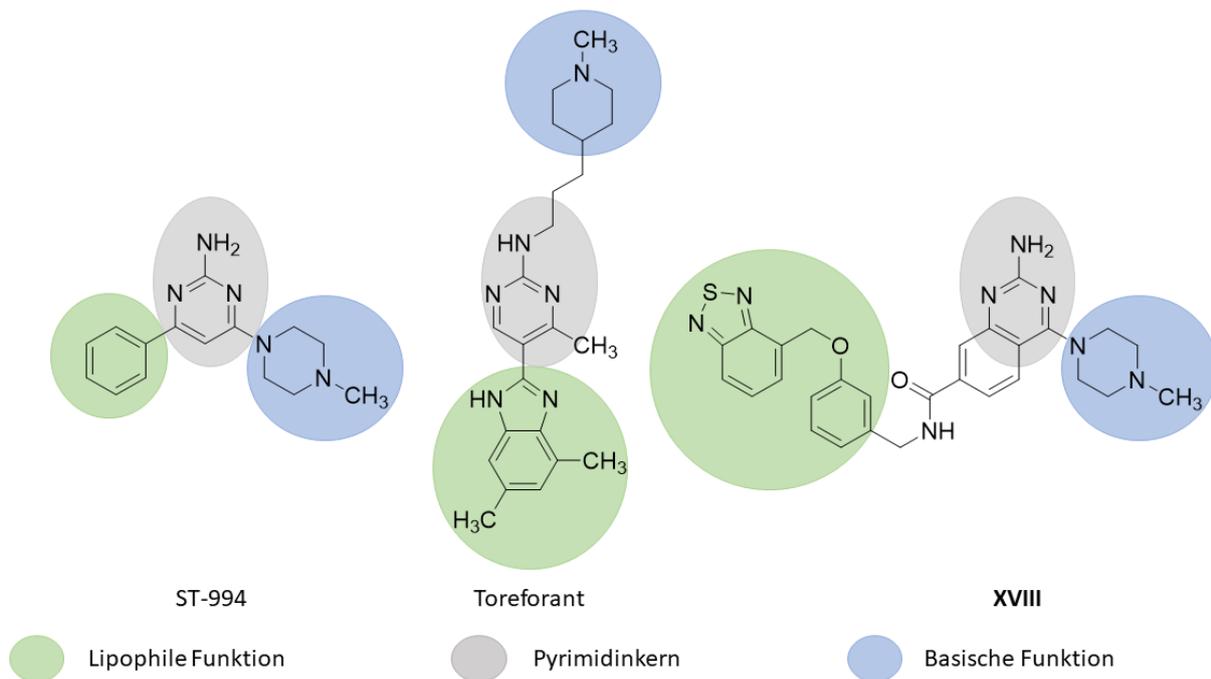


Abbildung 36: Pyrimidinderivate, die als Designvorlage zur Synthese chemischer H<sub>4</sub>R-Sonden dienen.

Zur Anbindung des Fluorophors kamen dabei alle Teile der Vorlagemoleküle (lipophile Funktion, Pyrimidinkern und basische Funktion) infrage ebenso wie die Art der Anbindung (integrativ, direkt oder linkergebunden).

Als Zielfluorophor wurde zum einen BOPPY gewählt, ein hydrazinverknüpfter Pyrrol-Picolinoyl-bis-(bordifluorid) Komplex mit einer hohen Quantenausbeute, dessen Emissionsspektrum sich nicht mit der Autofluoreszenz von Zellmaterial überschneidet.<sup>169</sup> Zum anderen sollte ein H<sub>4</sub>R-Ligand entwickelt werden, der mit der Dansylgruppe markiert ist. Die Dansylgruppe kann unter anderem bei der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Spektroskopie eingesetzt werden, um als Akzeptor des strahlungslosen Energietransfers von beispielsweise Tryptophan zu dienen.<sup>172</sup> Mit Trp<sup>6,48</sup> befindet sich ein Tryptophanrest in der Bindetasche des H<sub>4</sub>R, der diesen Übergang ermöglichen könnte, wenn die Dansylpositionierung bei der Liganden-Bindung dies zulässt.<sup>34</sup> Als Modellfluorophor zur Evaluierung der optimalen Anbindung sollte aufgrund seiner kommerziellen Verfügbarkeit Sanger's Fluorophor eingesetzt werden (Strukturen der Fluorophore siehe Kapitel 1.4:).

### 3.2: Synthese von Strukturanaloga bekannter H<sub>4</sub>R-Liganden

Ausgehend von dem Referenzliganden JNJ-777120 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 14 \text{ nM}^{85}$ ) sollte die Auswirkung der Einbringung alternativer basischer Funktionalitäten (Histamin und *N*-Amino-4-

methylpiperazin) auf die H<sub>4</sub>R-Affinität überprüft werden. Die Einschnitt-Synthesen erfolgten ausgehend von 5-Chlorindolcarbonsäure unter Nutzung von Carbonyldiimidazol (CDI) als Kopplungsreagenz und erbrachten die Verbindungen **1** und **2** mit Ausbeuten von 62% bzw. 40% (Abbildung 37).

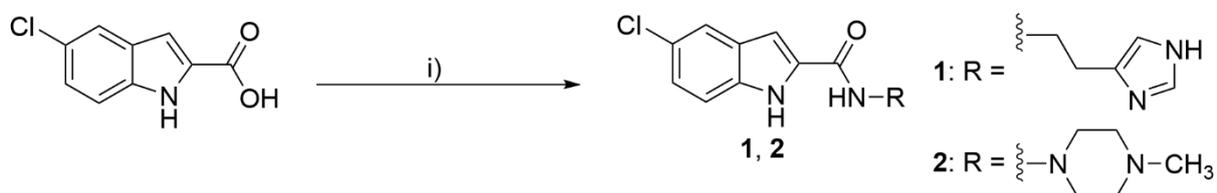


Abbildung 37: Synthese der JNJ-777120-Derivate **1** und **2**. Reaktanden und Bedingungen: i) Amin, CDI, THF, reflux, 0.5-2 d.

Neben dieser Betrachtung wurde ebenfalls die lipophile Einheit modifiziert. Die Indolgruppe wurde dabei durch ein sterisch ähnliches *N*-substituiertes Pyrazolol ersetzt, welches durch eine Ringschlussreaktion von 2-Oxo-bernsteinsäure mit aromatischen Hydrazinderivaten gewonnen wurde (**P1-P3**). Die Hydroxygruppe des Pyrazolols sollte dabei als neuer Anknüpfungspunkt für weitere Substituenten genutzt werden, um eine mögliche Grundlage zur Optimierung des Substitutionsmusters der lipophilen Einheit zu schaffen. Die Zielverbindungen (**3-6**) wurden durch Amidkopplung unter Verwendung von CDI gewonnen (Ausbeute 20-35%, Abbildung 38).

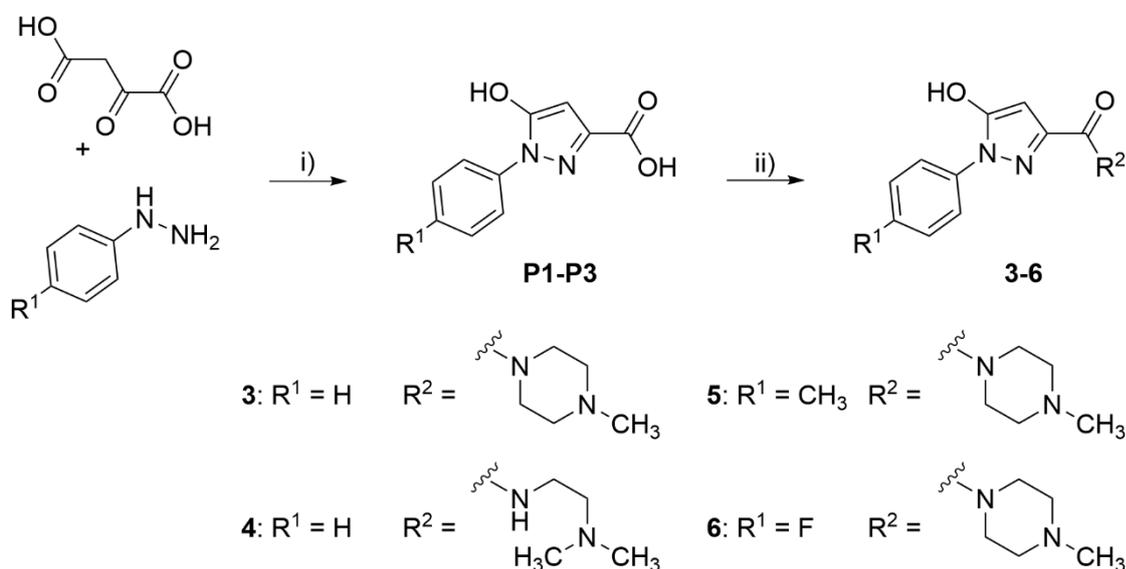


Abbildung 38: Synthese von Verbindungen **3-6**. Reaktanden und Bedingungen: i) 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, R.T., 2 h. ii) Amin, CDI, THF, reflux, 20 h.

Analog zu den Versuchen mit JNJ-777120-Derivaten sollten an bekannten Aminopyrimidinen Basensubstitutionen stattfinden. Die Zielverbindungen orientierten sich dabei strukturell an

den Referenzliganden ST-994 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 146 \text{ nM}$ ) und VUF-10460 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 4.1 \text{ nM}$ , Abbildung 39). Bei beiden Referenzliganden wurde *N*-Methylpiperazin als basische Ankergruppe verwendet, das jeweils durch Histamin ersetzt wurde. Die Verbindungen **7** und **8** wurden mit einer Ausbeute von 30% bzw. 16% über drei Schritte aus der nucleophilen aromatischen Substitution der entsprechenden 6-Chloraminopyrimidinderivate (**P4** und **P6**) gewonnen. Das Edukt **P4** wurde ebenfalls durch eine nucleophile aromatische Substitution mit Histamin an 4,6-Dichloraminopyrimidin synthetisiert. **P6** wurde durch eine Zyklisierung von Ethylbenzoylacetat mit Guanidiniumcarbonat und anschließender Chlorierung des Pyrimidons gewonnen.

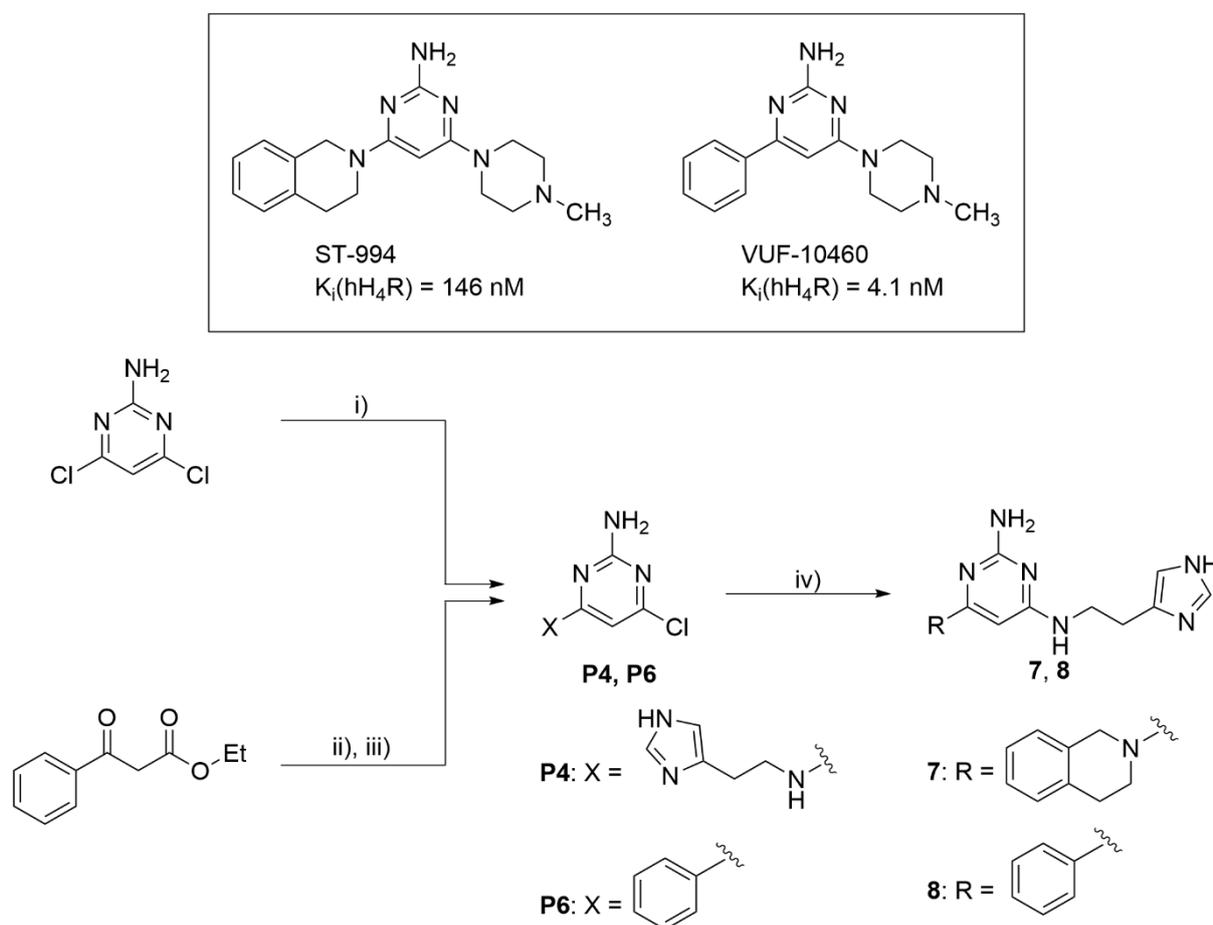


Abbildung 39: Synthese der Verbindungen **7** und **8**. Reaktanden und Bedingungen: i) Histamin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 140 °C, 2 h; ii) Guanidiniumcarbonat, Ethanol/Toluol, reflux, 12 h; iii)  $\text{POCl}_3$ , MeCN, reflux, 12 h; iv) Amin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h. Die Inbox zeigt die Referenzliganden ST-994 und VUF-10460.<sup>85,89</sup>

Durch Modifikation des lipophilen Rests ausgehend von dem  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden VUF-10460 wurde in diesem Rahmen zudem die Fusion mit einem etablierten  $\text{H}_3\text{R}$ -Pharmakophor durchgeführt (Abbildung 40). Die  $\text{H}_3\text{R}$ -Aktivität sollte dabei durch den Einsatz eines *N*-Propylpiperidinrests

erzeugt werden, der als Schlüsselement des gut charakterisierten H<sub>3</sub>R-Pharmakophors Bestandteil vieler hochaffiner H<sub>3</sub>R-Verbindungen ist. Von Interesse war hierbei, ob sich auf diesem Wege ein H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R-Hybrid-Ligand erzeugen lässt, der weiterhin eine nanomolare Affinität zum H<sub>4</sub>R aufweist.

Synthetisch wurde analog zum etablierten Verfahren zur Gewinnung von Verbindung **8** vorgegangen und im Anschluss an eine Ethersynthese nach Williamson zur Bereitstellung von Intermediat **P9** und Bildung des 1,3-Dicarbonyls **P10**, die Zyklisierung mit Guanidin und anschließende Chlorierung unter Verwendung von POCl<sub>3</sub> genutzt, um das Zwischenprodukt **P12** zu generieren. Die nucleophile Substitution von diesem mit *N*-Methylpiperazin erbrachte Verbindung **9** mit einer Ausbeute von 2% über sechs Schritte als gewünschtes Produkt. Die niedrige Gesamtausbeute kam durch die moderaten Ausbeuten der Schritte iii) bis vi) zustande, die sich zwischen 40% und 63% bewegten.

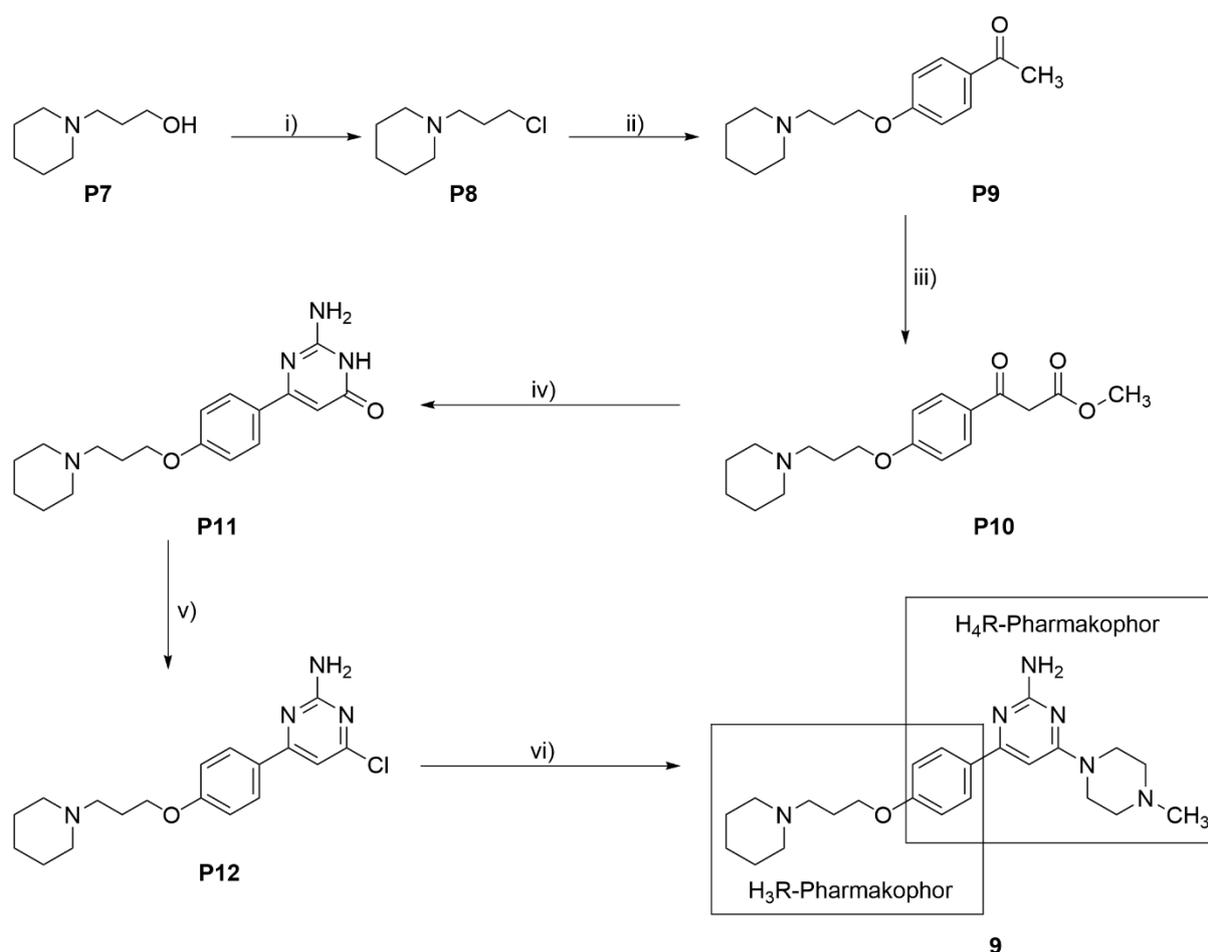


Abbildung 40: Synthese von Verbindung **9**; Reaktanden und Bedingungen. i) SOCl<sub>2</sub>, THF, reflux, 3 h; ii) 4-Hydroxyacetophenon, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, Aceton, reflux, 24 h; iii) CO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>, NaH, Toluol, reflux, 12 h; iv) Guanidiniumcarbonat, EtOH/Toluol, reflux, 12 h; v) POCl<sub>3</sub>, MeCN, reflux, 12 h; vi) *N*-Methylpiperazin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h.

### 3.3: Synthese von fluoreszenten H<sub>4</sub>R-Liganden

Neben der Modifikation von bereits beschriebenen Referenzliganden, stellt die Entwicklung von fluoreszenten H<sub>4</sub>R-Liganden das Kernstück diese Arbeit dar. Zur Synthese dieser sollten Ligandendesigns genutzt werden, die das Fluorophor sowohl in das Pharmakophor integrierten, als auch solche die entweder eine direkte Fluorophoranbindung oder eine Anbindung über einen Linker beinhalten. Basierend auf ihrer vielfachen Charakterisierung und den zufriedenstellenden Bindungseigenschaften in Hinblick auf den H<sub>4</sub>R, wurde dabei häufig eine Aminopyrimidinstruktur als Pharmakophor zu Grunde gelegt. Zusätzlich wurden Azlactamderivate synthetisiert, deren Sterik vergleichbar zum lipophilen Rest von Toreforant ist, als auch Chalconderivate, die sich von bekannten H<sub>3</sub>R-Fluoreszenzliganden mit marginaler H<sub>4</sub>R-Affinität ableiteten, um eine breitere Strukturvielfalt zu generieren.

Letztere wurden durch Kopplung von 6-Hydroxytetralon und 3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propan-1-ol im Sinne einer Mitsunobu-Reaktion und anschließender Aldolkondensation mit Dimethylaminobenzaldehyd (zu Verbindung **10**) bzw. p-(Dimethylamino)-zimtaldehyd (zu Verbindung **11**) gewonnen (Abbildung 41). Die Ausbeute beider Verbindungen über zwei Syntheseschritte lag bei 25%.

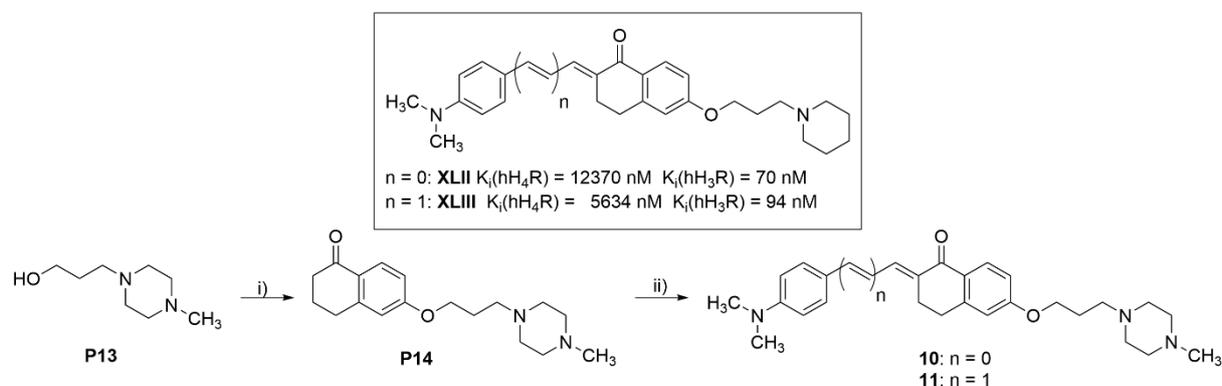


Abbildung 41: Synthese der Verbindungen **10** und **11**. Reaktanden und Bedingungen: i) 6-Hydroxytetralon, PPh<sub>3</sub>, DEAD, THF, reflux, 12 h; ii) Aldehyd, NaOH, EtOH, R.T., 12 h. Die Inbox zeigt die Referenzliganden **LIX** und **LX**.

Eine Serie von Azlactamderivaten wurde ausgehend von der linearen Struktur des Toreforant als Leitstruktur entwickelt (**12-17**, Abbildung 42). Die basische Ankerfunktion wurde mit N-Methylpiperazin (für Verbindungen **12-15**), Histamin (für Verbindung **16**) und Piperidin (für Verbindung **17**) realisiert. Das lipophile Azaindol von Toreforant wurde hierbei durch ein Fluorophor ersetzt, das sich aus der Struktur des GFP ableitet. Als verbrückendes Element sollten unterschiedliche Linker untersucht werden, die entweder den Abstand zwischen dem

basischen Anker des Toforants und dem Pyrimidin oder aber dem Azaindol abbilden. Dies wurde durch die Wahl eines Propyllinkers (Verbindung **12**) und um eine Phenylethereinheit verlängerte Variation (Verbindungen **13**, **15** und **17**) realisiert. Bei Verbindung **14** wurde als Anker 1-Amino-4-methylpiperazin eingesetzt, womit auf eine sterische Ähnlichkeit zu JNJ-7777120 abgezielt wurde.

Synthetisch wurden die Azlactone **P15** und **P21** mittels Erlenmeyer-Synthese gewonnen und im Anschluss durch Mikrowellensynthese in die Azlactame **15-20** überführt. Die dabei benötigten primären Amine (Histamin, 1-Amino-4-methylpiperazin, **P17**, **P20** und **P23**) trugen den basischen Anker. **P17** wurde durch Alkylierung von Methylpiperazin mit *N*-(3-Brompropyl)-phthalimid und anschließender Abspaltung der Phthalschutzgruppe gewonnen. **P20** und **P23** wurden durch Reduktion der entsprechenden Nitroaromaten (**P19** und **P22**) synthetisiert, die durch eine Williamson-Ethersynthese hergestellt wurden. Die geplante Einbringung einer BF<sub>2</sub>-Einheit mittels Reaktion mit Bortribromid und anschließenden Brom-Fluor-Austausch analog zu Frizler *et al.*<sup>194</sup> schlug fehl, sodass lediglich die Vorstufen des geplanten Fluorophors auf ihre Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R hin untersucht wurden.

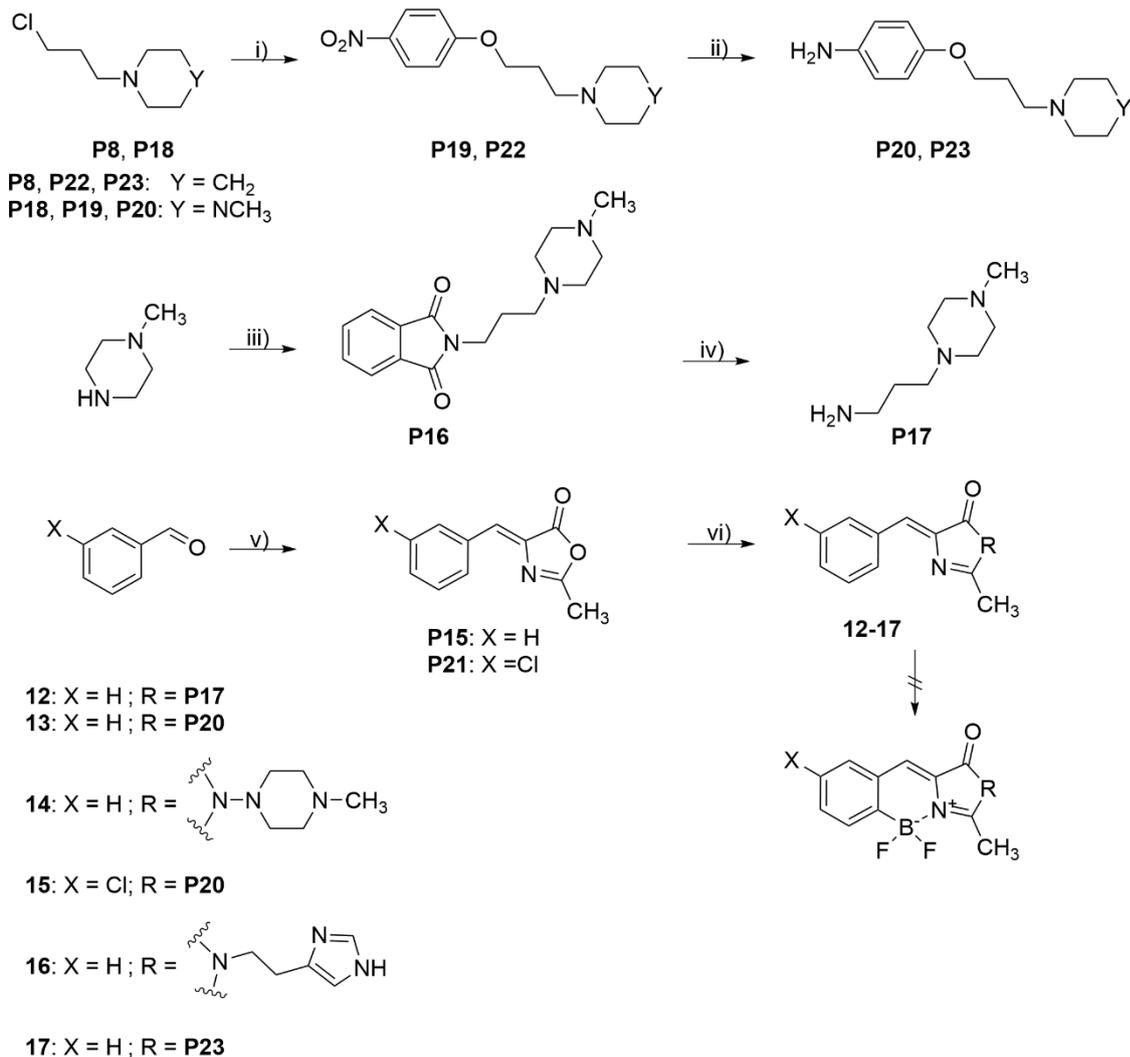
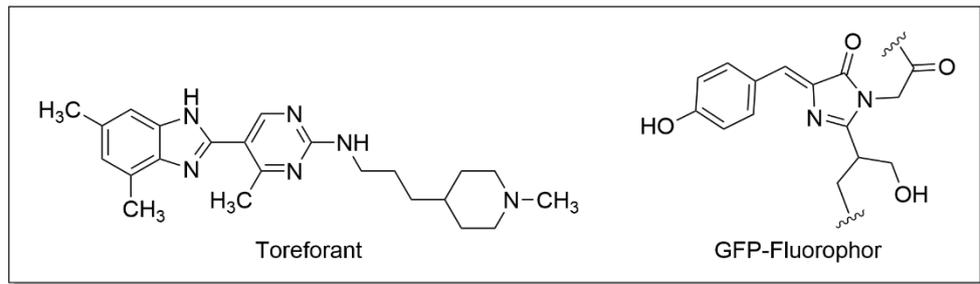


Abbildung 42: Synthese der Verbindungen **12-17**. Reaktanden und Bedingungen: i) *p*-Nitrophenol, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, Aceton, reflux, 24 h; ii) H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, Pd/C, reflux, 3 h; iii) *N*-(3-Brompropyl)phthalimid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, Aceton, reflux, 24 h; iv) H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, EtOH, reflux, 9 h; v) Acetylglycin, NaOAc, Ac<sub>2</sub>O, Mikrowelle, 190 °C, 4 min; vi) Amin, Pyridin, Mikrowelle, 190 °C, 10 min. Die Inbox zeigt Toreforant als Referenzliganden und das Fluorophor des GFP.

Ein weiterer Ansatz mit dem Ziel der Entwicklung möglichst kleiner H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden stellt die integrative Kopplung des Fluorophors in das Pharmakophor dar. Strukturell dienen Liganden der Klasse der Pyrimidinderivate als Ausgangspunkte. So sollte ein endozyklischer Stickstoff der Guanidingruppe mit einem weiteren endo- oder exozyklischen Heteroatom über

eine Bordifluorid-Einheit verbrückt werden. Die dabei entstehenden Fluorophore orientierten sich an Vorläuferverbindungen aus Arbeiten von Kubota *et al.* und Ma *et al.*, die strukturelle Modifikationen des 4-Bora-3a,4a-diaza-s-indacens (BODIPY)-Kerns durchführten.<sup>167,168,195</sup>

Die Syntheseroute zu Verbindungen den **18-20** erfolgte sehr ähnlich zu den bereits durchgeführten Synthesen der Verbindungen **7-9**: So wurden *N*-Methylpiperazin bzw. das CH-azide 2-Pyridylacetonitril mittels nucleophiler aromatischer Substitution an den Pyrimidinkern gebunden (**P25**, **P28**, **P30**) und das Pyrimidin **P27** über Zyklisierung von Ethyl-3-(2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoat mit Guanidiniumcarbonat sowie anschließender Chlorierung des Pyrimidons **P26** gewonnen. Die Einführung der Bordifluoridgruppe war hierbei der Schritt mit der geringsten Ausbeute (15% für Verbindung **18** und 19% für Verbindung **19**) und blieb bei Verbindung **20** ergebnislos (Abbildung 43).

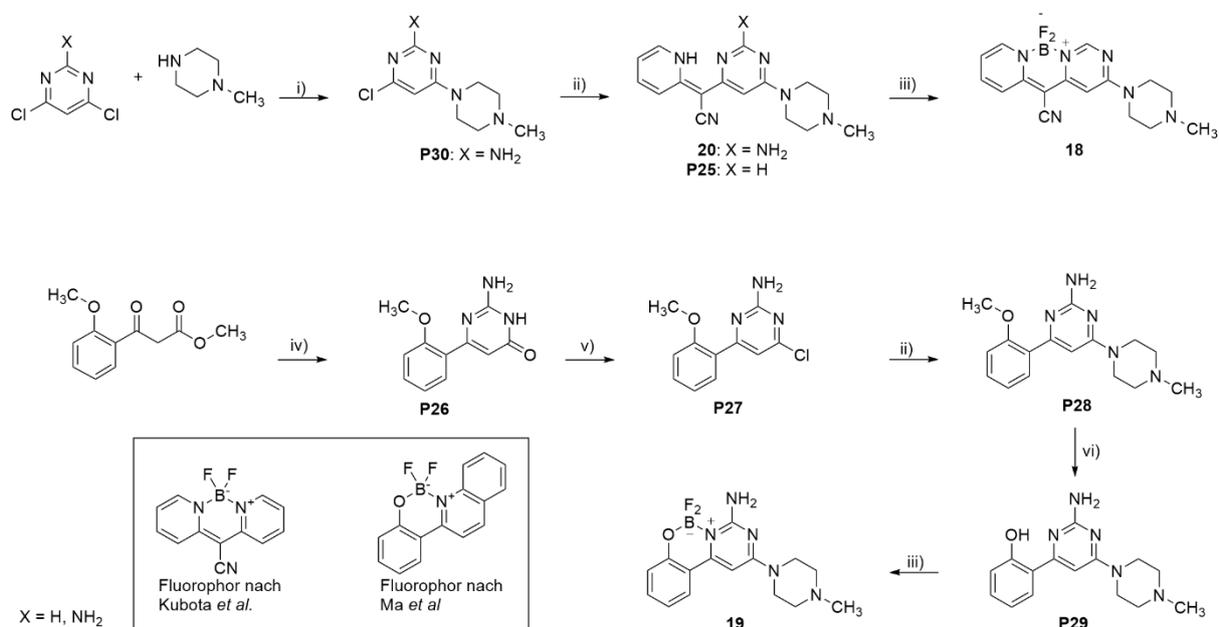


Abbildung 43: Synthese von Verbindungen **18-20** (Integrierung von Fluorophor und Pharmakophor). Reaktanden und Bedingungen: i) DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 140 °C, 2 h; ii) 2-Pyridylacetonitril, NaH, DMF, R.T., 12 h; iii) BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, TEA, DCM, 40 °C, 8 h; iv) Guanidiniumcarbonat, EtOH/Toluol, reflux, 12 h; v) POCl<sub>3</sub>, MeCN, reflux, 12 h; vi) HBr; AcOH, 60 °C, 72 h. Die Inbox zeigt die zugrundeliegenden Fluorophore.

Neben der Verschmelzung des Fluorophors mit dem Pharmakophor bietet die Strukturklasse der Aminopyrimidine auch die Möglichkeit der Anbindung des Fluorophors direkt oder über einen Linker. Generell lassen sich drei Möglichkeiten realisieren (Abbildung 44):

- 1.) am lipophilen Substituenten,
- 2.) am basischen Amin-Anker,
- 3.) oder am primären Amin der Guanidinstruktur.

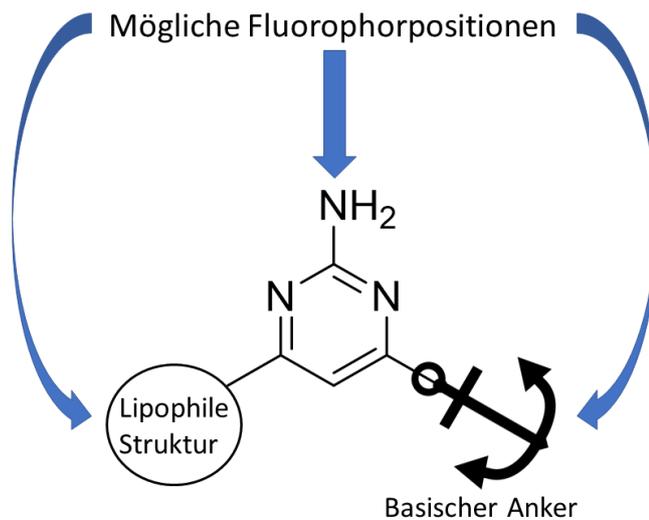
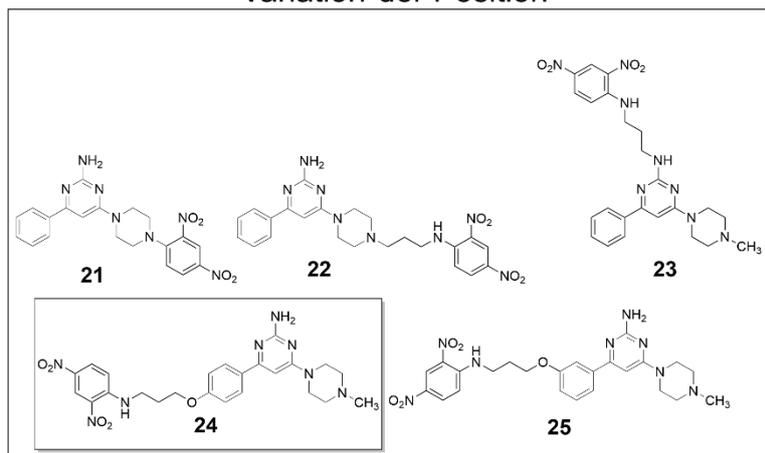


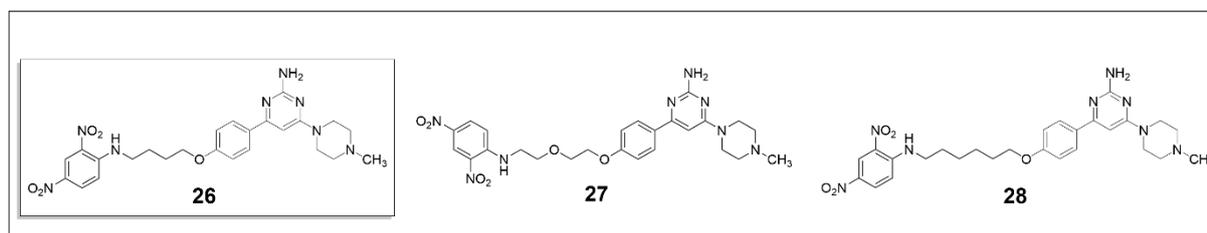
Abbildung 44: Optionen zum Einfügen von Fluoreszenzmarkern an 2-Aminopyrimidine.

In einem iterativen Prozess wurde aus einem Ensemble von Liganden derjenige mit der höchsten H<sub>4</sub>R-Affinität bestimmt und dieser als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen gewählt (Abbildung 45). Der erste Schritt war die Ermittlung der optimalen Markierungsposition (Verbindungen **21-25**). Im Anschluss wurde in einem folgenden Schritt der Linker modifiziert (Verbindungen **26-28**). Danach wurden Fluorophore mit geeigneteren Fluoreszenzeigenschaften verwendet, um Liganden zu erzeugen, die über eine höhere Leuchtkraft und Emissionen im sichtbaren Spektrum des Lichts verfügten (Verbindungen **29, 30**). Als letzter Schritt schloss sich eine Verlängerung des Linkers an. Damit sollte überprüft werden, ob deutlich längere Linker, die es erlauben, dass lediglich das Pharmakophor in die Rezeptor-Bindetasche vordringt, zu einer Affinitätszunahme führen können (Verbindungen **31** und **32**).

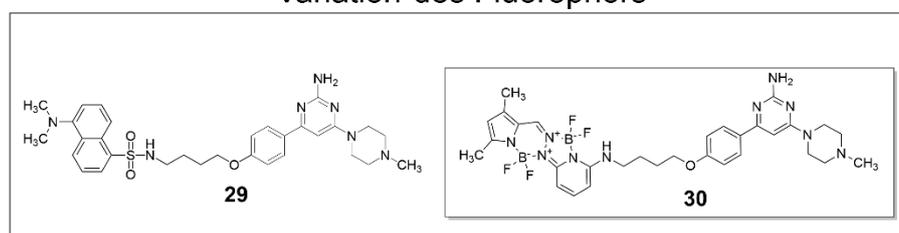
### Variation der Position



### Variation des Linkers



### Variation des Fluorophors



### Variation der Linkerlänge

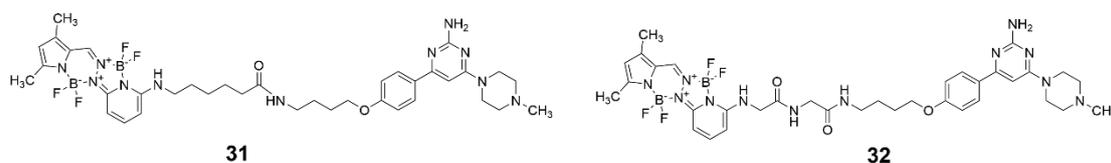


Abbildung 45: Entwicklungsstrategie der Verbindungen **21-32**. Die innerhalb des Pfeils umrahmten Verbindungen stellen dabei den Ausgangspunkt für die weitere Modifikation dar.

Dazu wurde zunächst 2,4-Dinitrobenzol als ein niedermolekulares und in der Sequenzanalyse von Aminosäuren nach Sanger genutztes Referenzfluorophor gewählt und Derivate des hochaffinen H<sub>4</sub>R-Liganden VUF-10460 hergestellt (Verbindungen **21-25**). Die Verbindungen **21** und **22** stellen dabei die Variationen am basischen Anker, **23** am primären Amin der Guanidinstruktur und **24** und **25** am lipophilen Ende des Grundkörpers dar.

Der Pyrimidingrundkörper **P6** wurde zur Bildung von Verbindung **21** und **22** dabei mit einem Piperazinrest gekoppelt, der zuvor entweder direkt im Sinne einer nucleophilen aromatischen Substitution mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol derivatisiert wurde (**21**; 10% Ausbeute über zwei Schritte) oder aber über einen Propyllinker (**22**; 6% Ausbeute über vier Schritte; Abbildung 46).

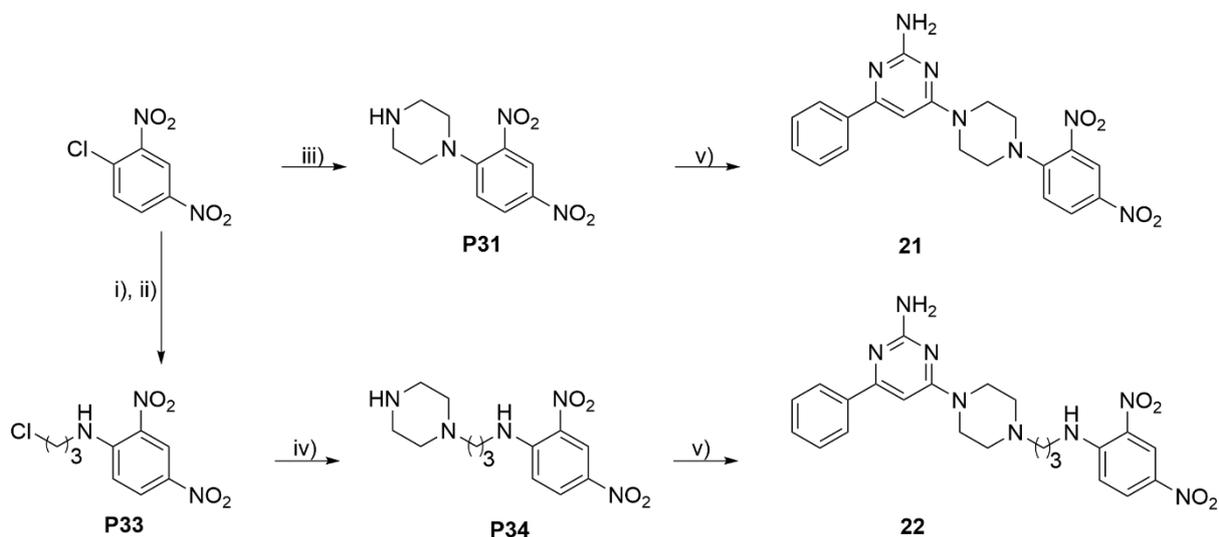


Abbildung 46: Synthese der Verbindungen **21** und **22**. Reaktanden und Bedingungen: i) 3-Amino-propan-1-ol, TEA, THF, R.T., 4 h; ii)  $\text{SOCl}_2$ , THF, 65 °C, 3 h; iii) Piperazin, DCM, R.T., 3 h; iv) Piperazin, Aceton, reflux, 12 h; v) **P6**, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h.

Bei der Synthese von Verbindung **23** (Ausbeute über vier Schritte: 2%) wurde zur Zyklisierung von Ethylbenzoylacetat zum Pyrimidon statt Guanidiniumcarbonat Harnstoff verwendet und im Anschluss beide Sauerstoffe mithilfe von Phosphoroxchlorid durch Chlor substituiert (**P37**), um die anschließenden sukzessiven aromatischen nucleophilen Substitutionen mit *N*-Methylpiperazin und **P35**, gewonnen aus der Reaktion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol mit 1,3-Diaminopropan, zu ermöglichen (Abbildung 47).

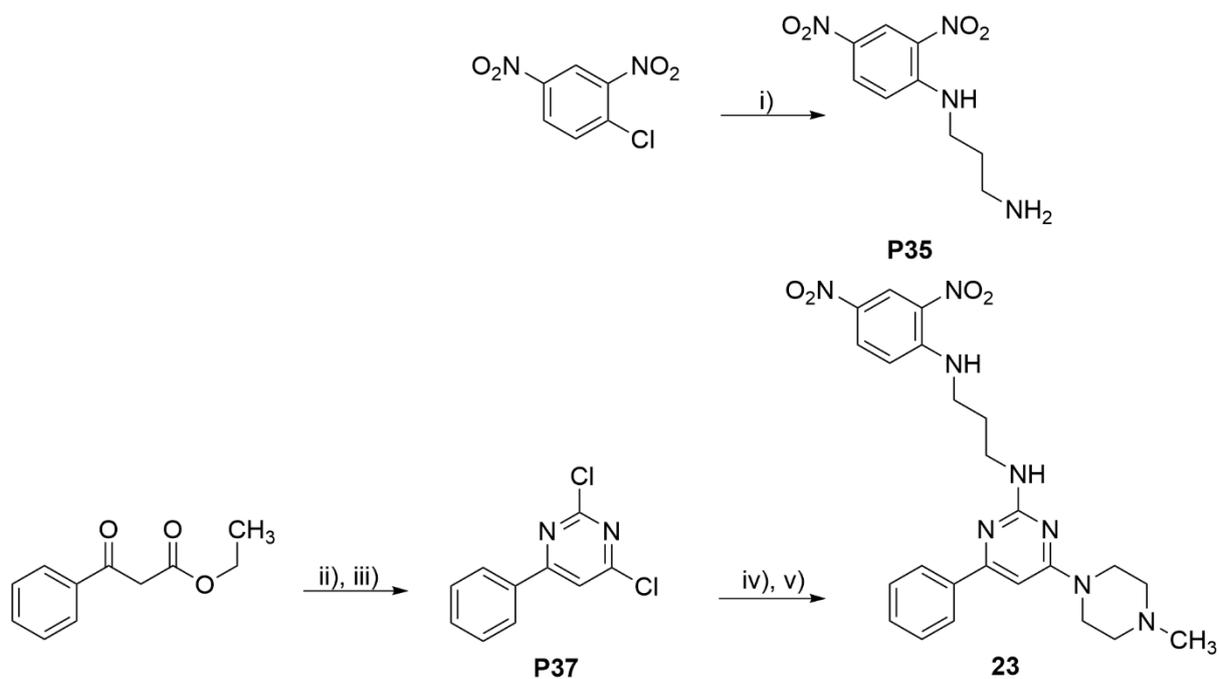


Abbildung 47: Synthese der Verbindung **23**. Reaktanden und Bedingungen: i) 1,3-Diaminopropan, DCM, R.T., 3 h; ii) Harnstoff, Mikrowelle, 165 °C, 20 min; iii) POCl<sub>3</sub>, MeCN, reflux, 12 h; iv) N-Methylpiperazin, DIPEA, EtOH, 20 °C, 3 h; v) **P35**, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h.

Um die Verbindungen **24** und **25** zu generieren, wurden die Precursor-Moleküle **P42** und **P47** analog zu Verbindung **9** hergestellt (Abbildung 48). Demethylierung der paraständigen Methoxygruppe erbrachte die substituierbaren Pharmakophore **P43** und **P48**, die gemäß einer Williamson-Ethersynthese zu den Produkten **24** und **25** derivatisiert wurden. Die Ausbeute über sechs Schritte beider Verbindungen betrug je 4%.

Synthetisch wurden die Verbindungen **27** (Ausbeute über sechs Schritte: 5%) und **28** (Ausbeute über sechs Schritte: 4%) analog aus dem Precursor **P43** und linkergebundenem 2,4-Dinitrobenzol (**P56** und **P58**) gewonnen. Die Synthese von **P56** und **P58** (ohne Abbildung) erfolgte analog zur Bildung von **P33**.

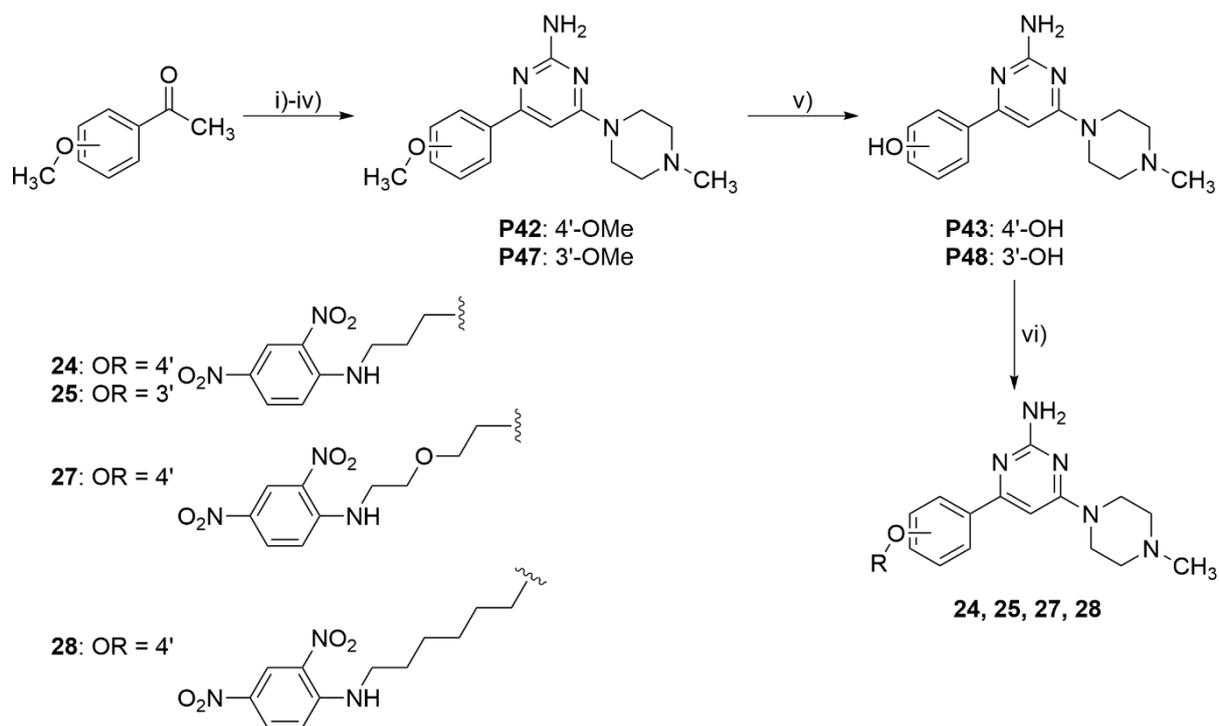


Abbildung 48: Synthese der Verbindungen **24**, **25**, **27**, **28**. Reaktanden und Bedingungen: i)  $\text{CO}_3\text{Me}_2$ , NaH, Toluol, reflux, 12 h; ii) Guanidiniumcarbonat, EtOH/Toluol, reflux, 12 h; iii)  $\text{POCl}_3$ , MeCN, reflux, 12 h; iv) *N*-Methylpiperazin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h; v) HBr, AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 60 °C, 3 d, vi) **P33**, **P56** bzw. **P58**  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, Aceton reflux, 12 h.

Beim Syntheseweg zu Verbindung **26** wurde zusätzlich evaluiert, ob die Linkerkopplung an das Pharmakophor der Fluorophorbinding voranschaltbar ist (Abbildung 49). Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, aus einer gemeinsamen Vorstufe unterschiedliche Pharmakophor-Fluorophor-Kombinationen bei einer vereinheitlichten Reaktionsführung zu erzeugen.

So wurde zunächst 4-Hydroxyacetophenon mit 4-Brombutyronitril verethert (**P49**) und anschließend über drei Schritte in ein 6-Chlor-aminopyrimidinderivat überführt. Aus der Substitution des Chlors mit *N*-Methylpiperazin und anschließender Reduktion des Nitrils in Gegenwart von Raney-Nickel unter einer Wasserstoffatmosphäre wurde die Zwischenstufe **P54** hergestellt. Auf diese Weise wurde ein primäres Amin erzeugt, das verfügbar zur Derivatisierung mit handelsüblichen amin-reaktiven Fluorophoren ist. Durch Verwendung von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol wurde so Verbindung **26** generiert. Diese Syntheseroute führte zu einer Ausbeute von 19% über insgesamt sieben Schritte.

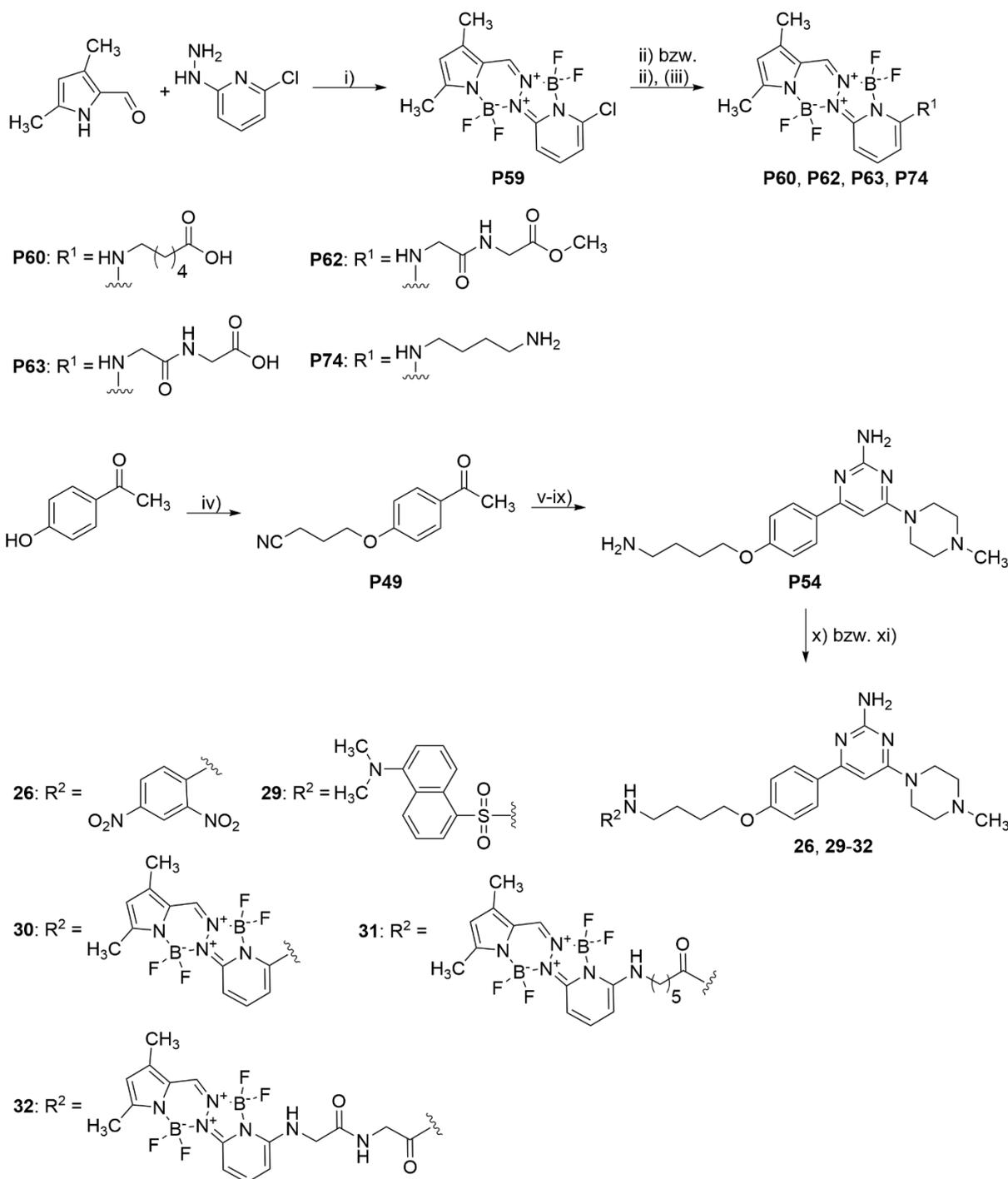


Abbildung 49: Synthese der Verbindungen **26** und **29-32**. Reaktanden und Bedingungen: i) 1.) *p*-Toluolsulfonsäure, DCE, reflux, 12 h; 2.) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, DIPEA, reflux, 4 h; ii) Amin, TEA, DMF, 60 °C, 24 h; iii) LiOH, MeOH, R.T., 12 h; iv) 4-Brombutyronitril, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, Aceton, reflux, 12 h; v) CO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>, NaH, Toluol, reflux, 12 h; vi) Guanidiniumcarbonat, EtOH/Toluol, reflux, 12 h; vii) POCl<sub>3</sub>, MeCN, reflux, 12 h; viii) *N*-Methylpiperazin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h; ix) H<sub>2</sub>, Raney-Ni, NH<sub>3</sub>, MeOH, 40 °C, 3 d; x) 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol oder Dansylchlorid oder BOPPY, TEA, DMF, 60 °C – 100 °C, 3 h – 3 d; xi) **P60** oder **P63**, EDC, DMAP, DMF, 60 °C, 12 h.

Die Derivatisierung zu Verbindung **29** erfolgte analog unter Verwendung von Dansylchlorid als Elektrophil, ebenfalls über sieben Schritte mit einer Ausbeute von 16%. Der für Verbindung **30** benötigte hydrazinverknüpfte Pyrrol-Picolinoyl-bis-(bordifluorid)-Komplex (BOPPY, **P59**)

wurde in einer Ein-Topf-Synthese nach Yu *et al.*<sup>169</sup> ausgehend von 3,5-Dimethylpyrrol-2-carboxaldehyd und 2-Chlor-6-hydrazinylpyridin hergestellt und durch anschließende nucleophile aromatische Substitution an den Precursor **P54** gebunden (Abbildung 49). Nach einer siebenschrittigen Synthese ergab sich für Verbindung **30** eine Gesamtausbeute von 8%. Bei den Verbindungen **31** und **32** (Ausbeute über sieben Schritte jeweils: 3%) handelt es sich ebenfalls um Liganden, die BOPPY als Fluorophor tragen. Durch die Kombination des bestehenden Aminobutyllinkers mit langkettigen Carbonsäuren wurde versucht eine Positionierung des Fluorophors außerhalb des aktiven Zentrums des H<sub>4</sub>R zu ermöglichen. Auch hier diente **P54** als Ausgangsverbindung. Zuvor wurde das BOPPY-Fluorophor entweder an Aminocaprinsäure (**P60**) oder aber an Methylglycylglycinat (**P62**) gebunden. Eine direkte Kopplung von BOPPY an Glycylglycin war nicht erfolgreich, sodass die Schützung der Carbonsäure als Methylester und anschließende Entschützung notwendig war.

Derivate der in Kapitel 1.3.4: gezeigten hochaffinen Chinazolinverbindungen (**XVII** und **XVIII**) tragen teilweise voluminöse Reste, weshalb diese für weitere fluoreszente H<sub>4</sub>R-Liganden als Referenzverbindungen herangezogen wurden. Die Verbindungen **33** und **34** (Ausbeute über zwei Schritte: 16% bzw. 12%) können dabei als struktureller Übergang angesehen werden, die den Pyrimidinkern mit der Substituentenanordnung der genannten Chinazolinderivate kombinieren. Zur Erzeugung dieser Verbindungen wurde 2,4-Dichlorpyrimidin sukzessive mit *N*-Methylpiperazin und **P35** bzw. umgekehrt substituiert (Abbildung 50).

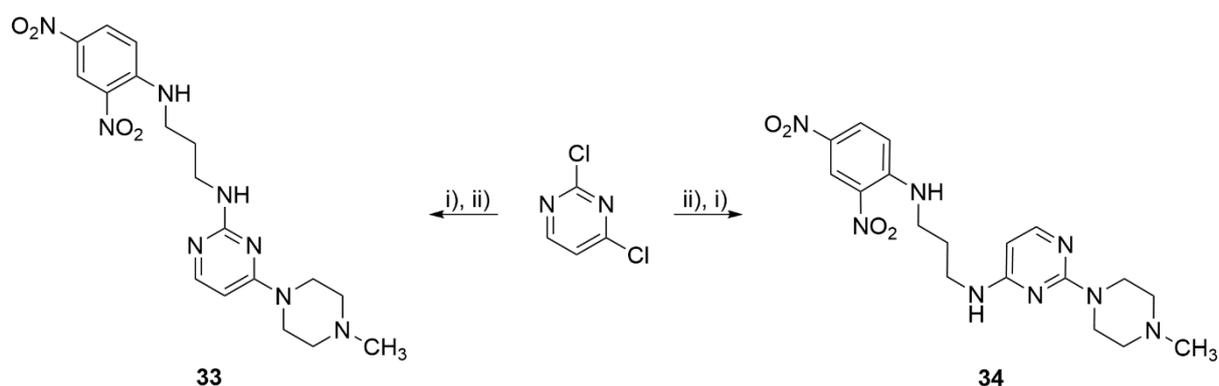


Abbildung 50: Synthese der Verbindungen **33** und **34**. Reaktanden und Bedingungen: i) *N*-Methylpiperazin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h; ii) **P35**, DIPEA, Isopropanol, 20 °C, 2 h.

Die Chinazolingrundgerüste **P66** (für Verbindungen **35-37**) und **P75** (für Verbindung **38**) wurden literaturanalog aus 2-Amino-5-chlorbenzoesäure durch Zyklisierung mit Harnstoff und anschließender Chlorierung sowie aus 2-Aminoterephthalat und Cyanamid über Chlorierung

der Pyrimidonstruktur und Einbringen einer 1,2,5-Triazolgruppe mit anschließendem Austausch durch *N*-Methylpiperazin gewonnen (Abbildung 51).

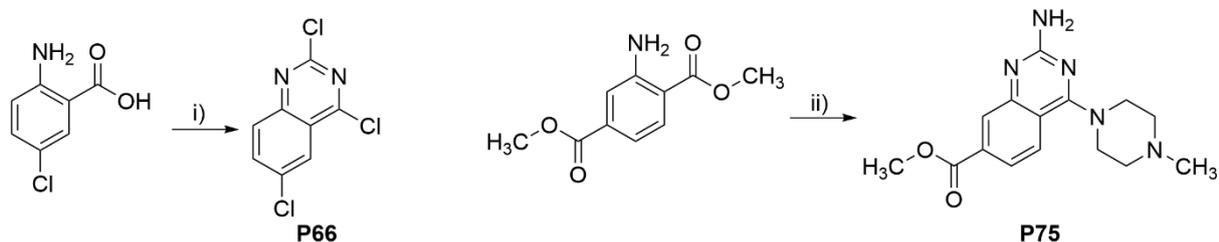


Abbildung 51: Synthese der Chinazolinprecursoren **P66** und **P75**. Reaktanden und Bedingungen: i) 1.) Harnstoff, 160 °C, 6 h; 2.) POCl<sub>3</sub>, DEA, reflux, 1 h; ii) 1.) Cyanamid, HCl, MeCN, 90 °C, 12 h; 2.) Ac<sub>2</sub>O, reflux, 16 h; 3.) 1,2,4-Triazol, DIPEA, POCl<sub>3</sub>, R.T., 16 h; 4.) *N*-Methylpiperazin, Dioxan, reflux, 1 h.

Zwei aufeinanderfolgende nucleophile aromatische Substitutionen von **P66** mit *N*-Methylpiperazin und **P35** führten zu den Produkten **35** und **36** in Ausbeuten von 26% bzw. 38% über drei Schritte (Abbildung 52). Da die von Smits *et al.* synthetisierten Verbindungen über ein substituiertes Sulfonamid verfügten (vgl. Verbindung **XXIV**), wurde **P35** um eine Taurineinheit verlängert und so eine größere strukturelle Ähnlichkeit erzeugt (**P47**). Zuvor musste dabei der Taurinstickstoff geschützt werden, um eine Selbstkondensation zu vermeiden. Reaktion des fluoreszenzmerkierten Taurins **P72** und **P66** erbrachte Verbindung **37** nach Substitution mit *N*-Methylpiperazin (Ausbeute über drei Schritte: 8%).

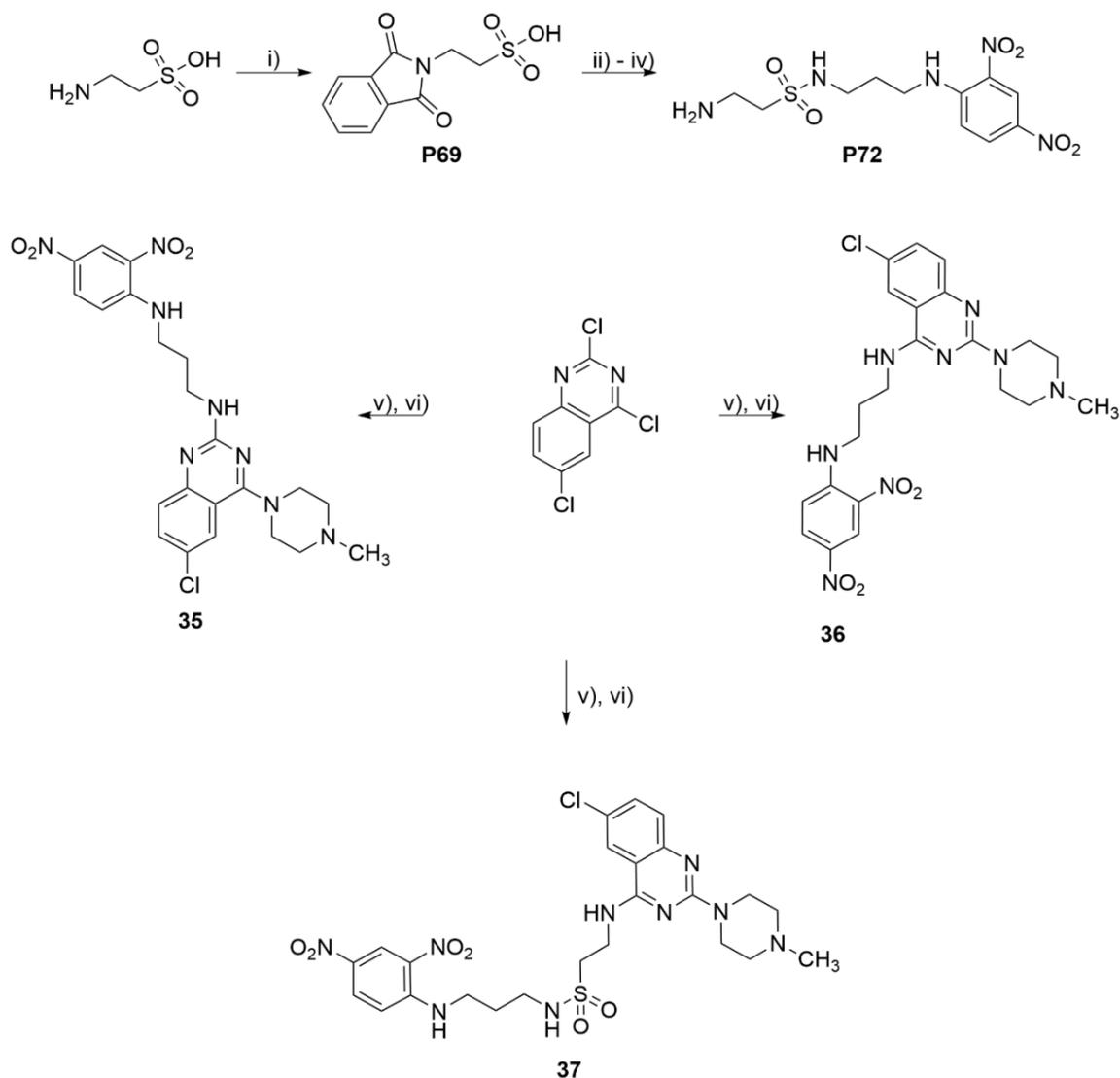


Abbildung 52: Synthese der Verbindungen **35-37**. Reaktanden und Bedingungen. i) Phthalsäureanhydrid, KOAc, AcOH, reflux, 10 min; ii)  $\text{PCl}_5$ , Toluol, reflux, 3 h; iii) **P35**, TEA,  $\text{CHCl}_3$ , R.T., 20 h; iv)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflux, 9 h; v) Amin, DIPEA, Isopropanol, R.T., 2 h. vi) Amin, DIPEA, Isopropanol, Mikrowelle, 165 °C, 2 h.

Verbindung **38** wurde durch Verseifung des Esters **P75** und anschließende Amidierung mit dem BOPPY-Derivat **P74** in Gegenwart von EDC gewonnen (Abbildung 53).

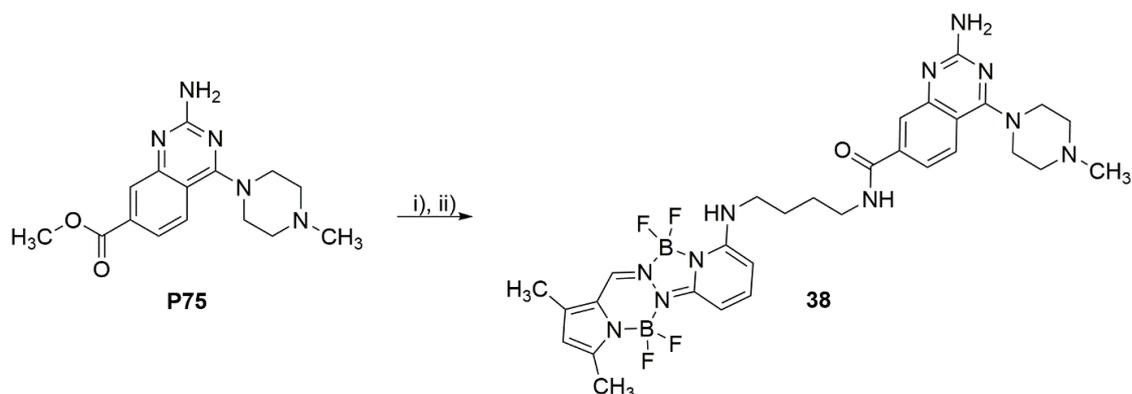


Abbildung 53: Synthese der Verbindung **38**. Reaktanden und Bedingungen: i) LiOH, MeOH, R.T., 12 h; ii) **P74**, EDC, kat. DMAP, DMF 60 °C, 12 h.

### 3.4: Photophysikalische Untersuchungen

Die in dieser Arbeit entwickelten H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden sollen primär zur Markierung von funktionalen H<sub>4</sub>R in Geweben oder aber zur Durchführung pharmakologischer Bindungsassays verwendet werden. Angestrebt wurden daher Verbindungen mit hohen Quantenausbeuten und Emissionsspektren im sichtbaren Licht. Die Ermittlung dieser photophysikalischen Kenngrößen wird in dem folgenden Kapitel dargestellt.

Für Verbindung **18** wurden Ergebnisse ermittelt, die mit den Beobachtungen von Kubota *et al.* vergleichbar sind. Der Verbindung **18** zugrundeliegende Pyridomethen-BF<sub>2</sub>-Komplexe weisen in Abhängigkeit von den jeweiligen Substituenten Emissionsmaxima in Lösung zwischen 456 nm und 473 nm auf. Die Absorptionsmaxima liegen substituentenabhängig zwischen 450 nm und 459 nm.<sup>195</sup> Das Emissionsmaximum von Verbindung **18** liegt bei 487 nm und die maximale Absorption bei 402 nm (Abbildung 54). Die geringere Symmetrie im Vergleich zu den Verbindungen, dargestellt von Kubota *et al.*, ist hierbei verantwortlich dafür, dass die elektronische Anregung einen höheren Energiebedarf hat und das Absorptionsmaximum daher hypsochrom verschoben ist.

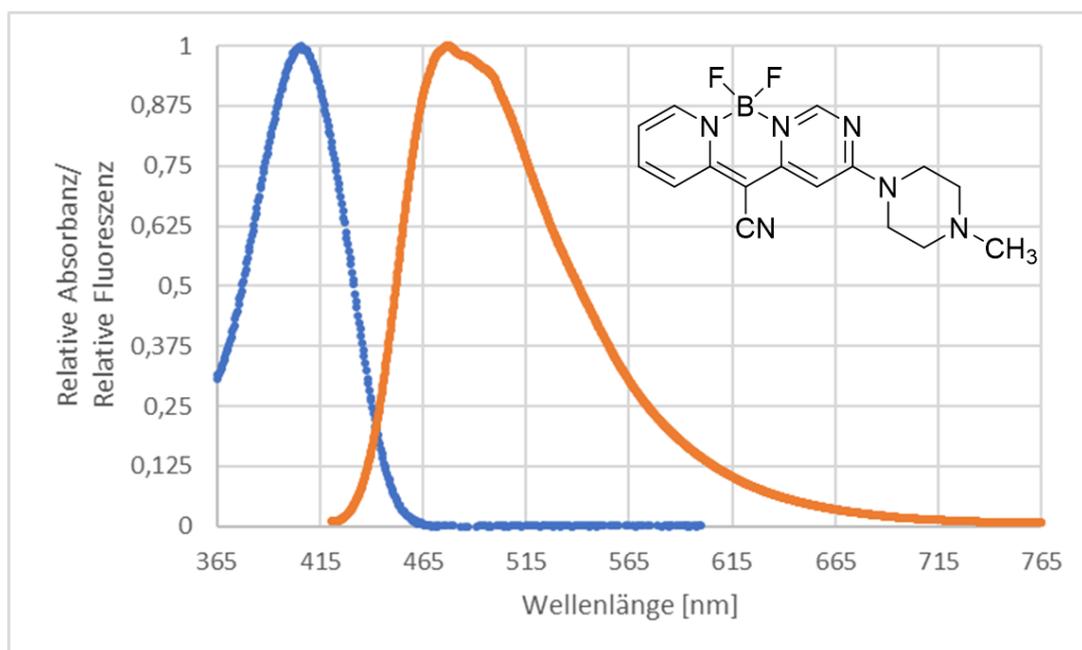


Abbildung 54: Normiertes Absorptionsspektrum (blau) und normiertes Emissionsspektrum (orange) der Verbindung **18**. Spektren vermessen in Methanol mit  $c(\text{Absorption}) = 1 \mu\text{M}$  und  $c(\text{Emission}) = 0.3 \mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$ ).

Die Quantenausbeute, die für die Referenzverbindungen substituentenabhängig zwischen 3% und 25% liegt,<sup>195</sup> ist jedoch vergleichbar mit einer gemessenen Quantenausbeute von 14% für

Verbindung **18**. Da die Bestimmung der unterschiedlichen Kinetiken technisch nicht möglich ist, wurde anstatt der in Kapitel 1.4 vorgestellten Formel (1) die Quantenausbeute durch Vergleich mit einem Referenzfluorophor ermittelt.

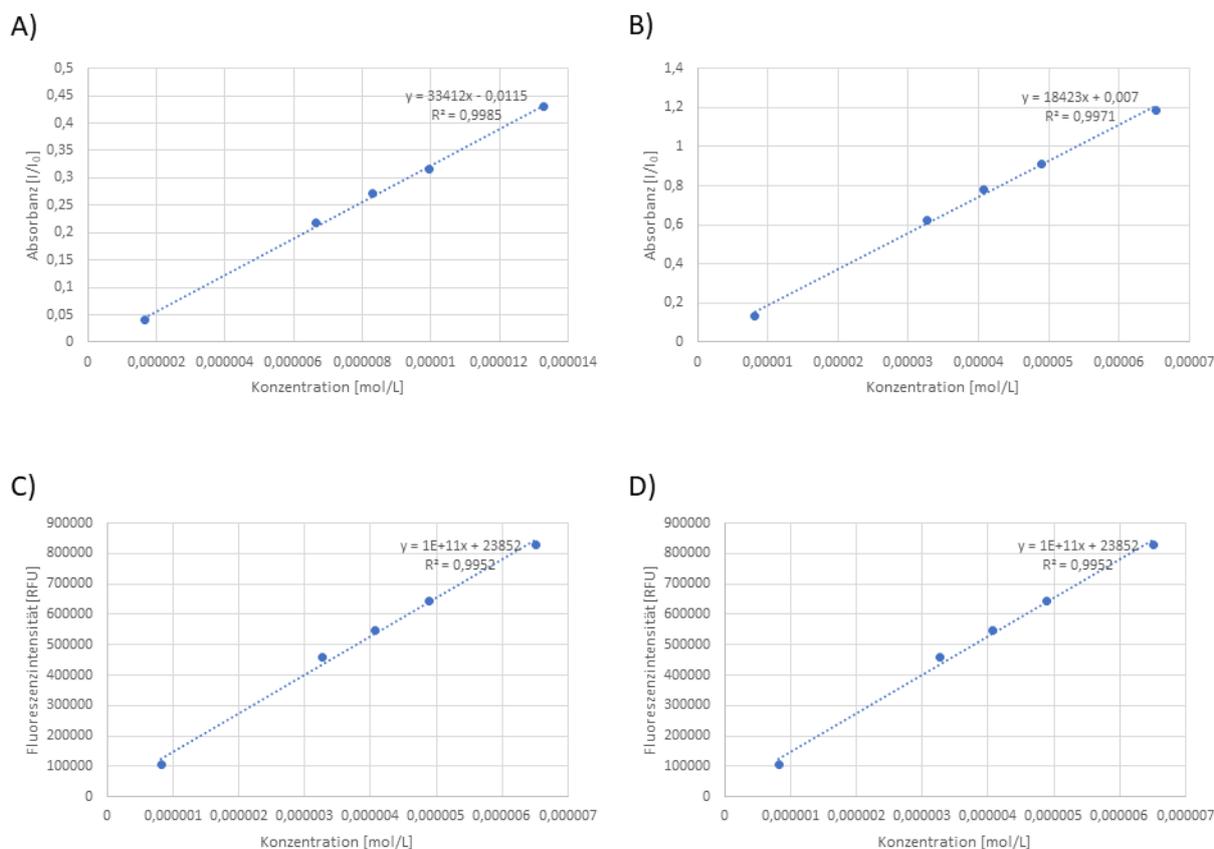
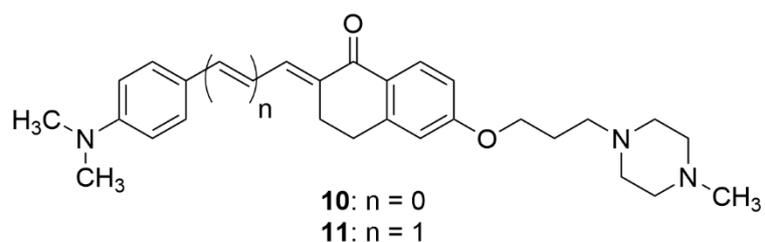
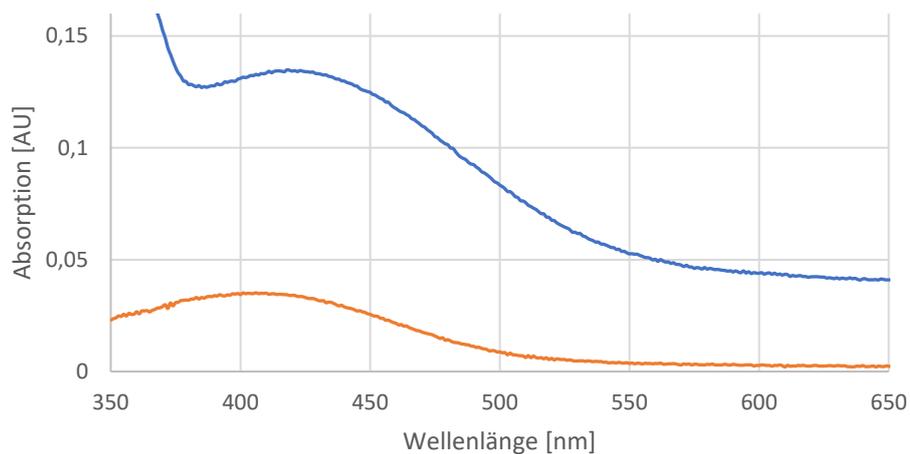


Abbildung 55: Linearisierte Auftrugungen der Konzentrationsabhängigkeit der Absorbanz und Fluoreszenzintensität der Verbindung **18** und Coumarin-153. A) Absorbanz von Verbindung **18** in Abhängigkeit der Konzentration; B) Absorbanz von Coumarin-153 in Abhängigkeit der Konzentration; C) Fluoreszenzintensität von Verbindung **18** in Abhängigkeit der Konzentration; D) Fluoreszenzintensität von Coumarin-153 in Abhängigkeit der Konzentration.

Bei den Chalcondenivaten **10** und **11** wurden, wie bei den jeweiligen Ausgangsverbindungen **XLII** und **XLIII**, hohe Stokesverschiebungen gemessen, da das Fluorophor wenig rigidisiert ist. Die Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen **10** und **11** (Abbildung 56) zeigte, dass die Absorptionsmaxima bei 408 nm für **10** und bei 425 nm für **11** (vgl.:  $\lambda_{\max}\text{Abs}(\text{XLII}) = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\max}\text{Abs}(\text{XLIII}) = 468 \text{ nm}$ ) liegen. Die Emissionswellenlängen liegen bei 638 nm für **11** und 680 nm für **10** (vgl.:  $\lambda_{\max}\text{Em}(\text{XLII}) = 584 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\max}\text{Em}(\text{XLIII}) = 670 \text{ nm}$ ). Bei gleicher Konzentration zeigte Verbindung **11** eine intensivere Fluoreszenz als Verbindung **10** (Abbildung 56 B).



A



B

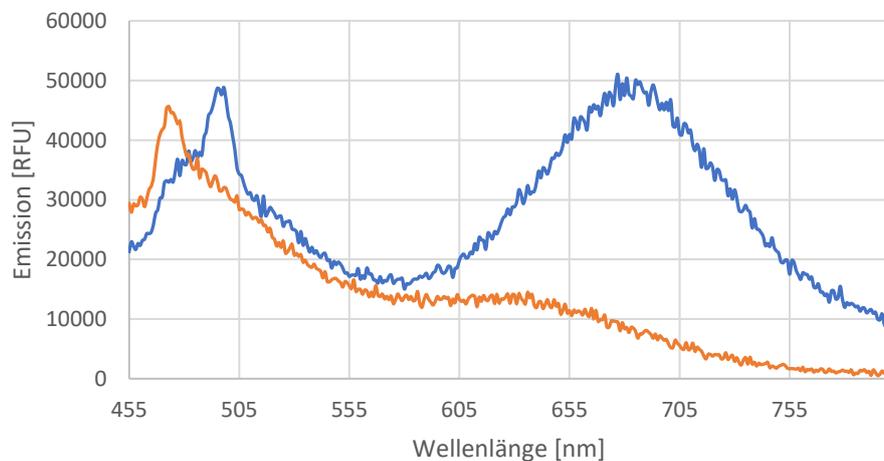


Abbildung 56: Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen **10** (orange) und **11** (blau). A) Absorptionsspektren gemessen in Methanol  $c = 15 \mu\text{M}$ ; B) Emissionsspektren gemessen in Methanol  $c = 2 \mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 425 \text{ nm}$ ).

Aus den Absorptionsspektren der Aminopyrimidinderivate **24**, **29** und **30** ist ersichtlich, dass die maximalen Absorptionen von **24** und **29** sich mit 335 nm respektive 325 nm im nahen UV-Bereich befinden und die Absorption von **30** mit einem Maximum von 455 nm im sichtbaren Spektrum des Lichts liegt. Alle Verbindungen weisen damit literaturvergleichbare Werte

auf.<sup>169,170</sup> Bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$  und einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  lässt sich das Emissionsmaximum von **24** nicht ermitteln, da das Fluoreszenzsignal nur unwesentlich höher ausfällt als das Hintergrundrauschen. Bei gleicher Konzentration und Anregungswellenlänge zeigt Verbindung **29** ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei  $\lambda_{\text{maxEm}} = 500 \text{ nm}$  und verhält sich damit literaturkonform.<sup>196</sup> Das Emissionsspektrum von Verbindung **30** wurde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{Ex}} = 450 \text{ nm}$  und einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  vermessen und zeigt ein Hauptmaximum bei  $\lambda_{\text{maxEm}} = 480 \text{ nm}$  und ein Nebenmaximum bei  $\lambda = 517 \text{ nm}$  (Abbildung 57). Das Fluoreszenzverhalten entspricht damit den von Yu *et al.*<sup>169</sup> beschriebenen Fluorophoren. Die Spektren zeigen die typische Spiegelbildsymmetrie, die sich aus dem Franck-Condon-Prinzip ergibt. Die Fluoreszenzeigenschaften der vermessenen Verbindungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Ersichtlich ist, dass mit zunehmender Fluorophorgröße die Absorptionen zu höheren Wellenlängen verschoben sind sowie ein erhöhter Stokes-Shift für die Verbindungen **10** und **11** die eine flexible Struktur aufweisen.

Tabelle 2: Fluoreszenzeigenschaften der Verbindungen **18**, **10**, **11**, **24**, **29** und **30**

Verbindung	$\lambda_{\text{maxAbs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{maxEm}}$ [nm]	Stokes-Shift [nm]
<b>18</b>	402	487	85
<b>10</b>	408	680	272
<b>11</b>	425	638	213
<b>24</b>	335	n.a.	n.a.
<b>29</b>	325	500	175
<b>30</b>	455	480	25

n.a. = keine Fluoreszenz messbar

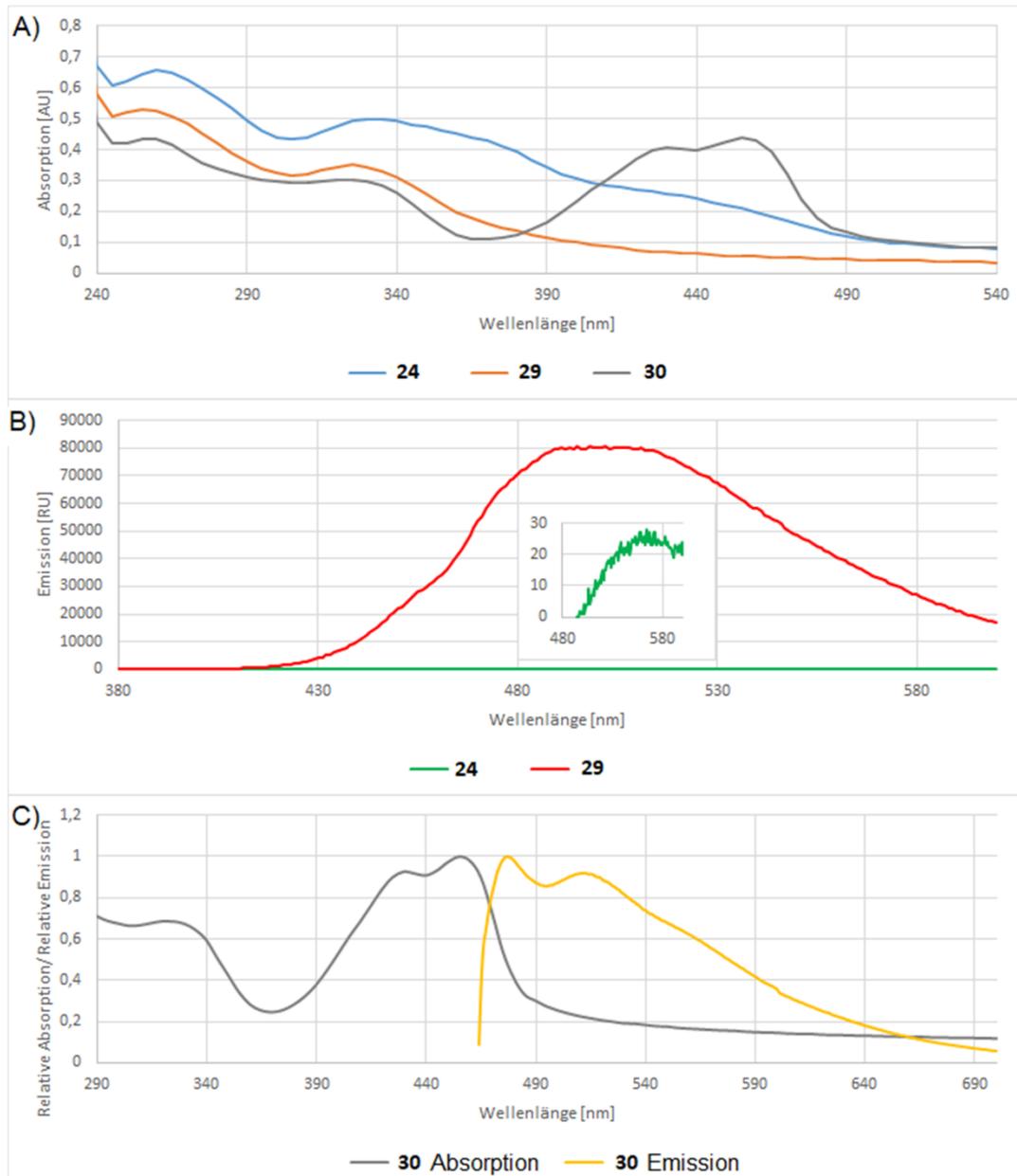
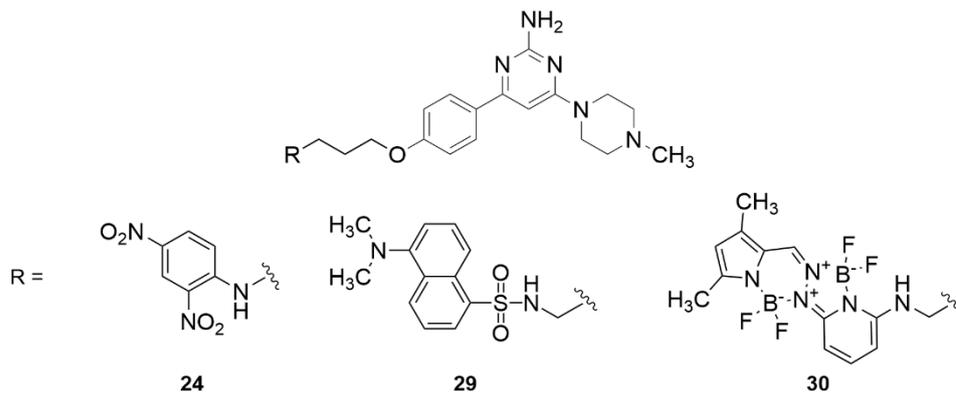


Abbildung 57: Photophysikalische Untersuchungen der Verbindungen **24**, **29** und **30**. A) Absorptionsspektren von **24**, **29** und **30** in  $H_4R$ -Pufferlösung;  $c = 0.1 \text{ mM}$ . B) Emissionsspektren von **24** und **29** in  $H_4R$ -Pufferlösung;  $c = 10 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$ . C) Normierte Absorptions- und Emissionsspektren der BOPPY-markierten Verbindung **30** in  $H_4R$ -Puffer;  $c(\text{Abs}) = 10 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $c(\text{Em}) = 0.1 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{Ex}} = 450 \text{ nm}$ .

### 3.5: Biologische Evaluation

Die synthetisierten Verbindungen wurden in Verdrängungsassays unter Verwendung des radioaktivmarkierten Referenzliganden [<sup>3</sup>H]-Histamin auf Ihre Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R untersucht. Aufgereinigte Zellmembranen mit humanen H<sub>4</sub>R wurden aus *Spodoptera frugiperda* Zellen (Sf-9) gewonnen, die durch Einsatz von Baculoviren transient zur H<sub>4</sub>R-Überexpression modifiziert wurden.<sup>197</sup> Die Bestimmung der Affinität gegenüber dem H<sub>3</sub>R erfolgte analog unter Verwendung von [<sup>3</sup>H]-N<sup>α</sup>-Methylhistamin als Radioligand und Zellmembranfragmenten, die aus modifizierten HEK 293 Zellen gewonnen wurden.<sup>198</sup> Die biologische Evaluation der Liganden wurde in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. h.c. Stark von Stephan Schwedt, Stefanie Hagenow und David Reiner durchgeführt.

#### 3.5.1: Strukturanaloga bekannter H<sub>4</sub>R-Liganden

Mit der Einführung des Histaminrests an den Indolkörper von JNJ-7777120 anstelle des *N*-Methylpiperazins (Verbindung **1**) konnte eine Affinität im niedrigen mikromolaren Bereich erhalten werden ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1106 \text{ nM}$ ). Im Vergleich zu JNJ-7777120 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 14 \text{ nM}$ ) ist diese jedoch rund 80-fach geringer. Das Hydrazinderivat des Referenzliganden JNJ-7777120 Verbindung **2** weist keine Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R auf (Tabelle 3).

Die Verbindungen **3**–**6** orientieren sich strukturell an JNJ-7777120, doch trotz ihrer plastischen Ähnlichkeit zu JNJ-7777120 zeigte keine der synthetisierten Verbindungen eine Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R (Tabelle 3).

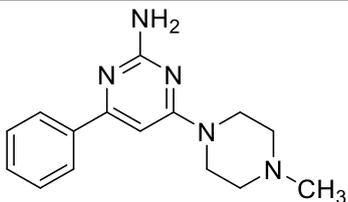
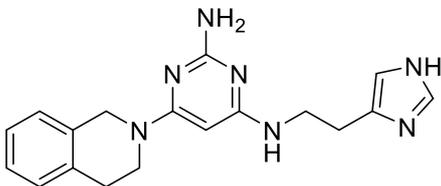
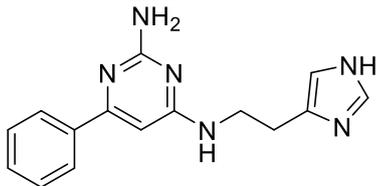
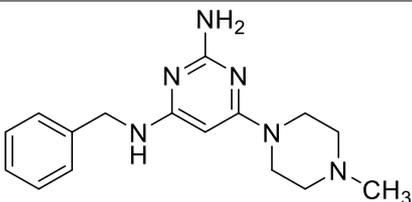
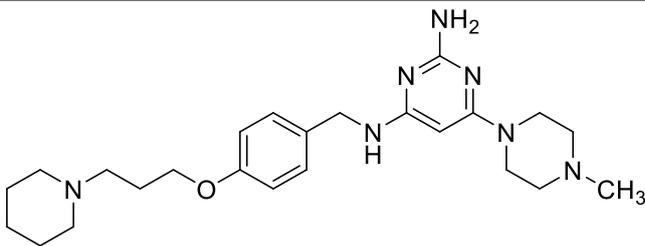
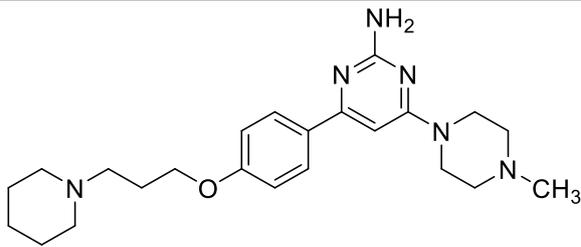
Da die Verwendung von 1-Amino-4-methylpiperazin zu einem vollständigen Verlust der H<sub>4</sub>R-Affinität bei Verbindung **2** führte, wurde dieser Rest nicht mehr verwendet. Für die Verbindungen **7** und **8** wurde daher Histamin als basischer Anker verwendet. Die Verbindungen zeigten hohe Affinitäten gegenüber dem H<sub>4</sub>R (**7**:  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 106 \text{ nM}$ ; **8**:  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 11.3 \text{ nM}$ ) (Tabelle 4). Verbindung **8** ist somit die affinste Verbindung dieser Arbeit.

Die Kombination von VUF-10460 mit *N*-Propylpiperidin zur Bildung von Verbindung **9** erbrachte einen hochaffinen H<sub>3</sub>R-Liganden. Ähnlich wie beim Referenzliganden **XLIV** ging dadurch die H<sub>4</sub>R-Affinität signifikant zurück (Tabelle 4).

Tabelle 3: hH<sub>4</sub>R-Affinitäten der Verbindungen JNJ-777120 und 1-6. Daten sind angegeben als Mittelwert innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (KI) von n unabhängigen Experimenten.

Verbindung	Struktur	K <sub>i</sub> (hH <sub>4</sub> R) [nM] [95% KI] (n)
JNJ-777120		14 <sup>69</sup>
1		1106 [822, 1488] (3)
2		> 10 000 (3)
3		> 10 000 (2)
4		> 10 000 (2)
5		> 10 000 (2)
6		> 10 000 (3)

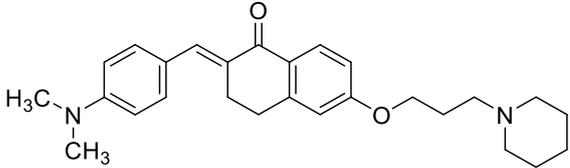
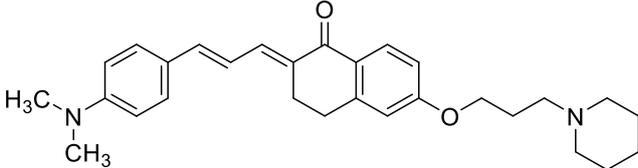
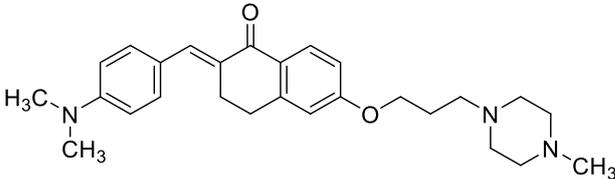
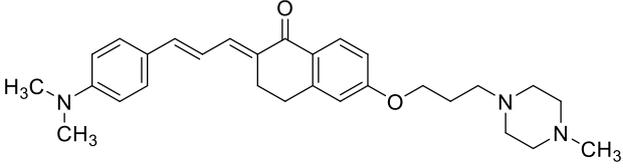
Tabelle 4:  $hH_3R$  und  $hH_4R$ -Affinitäten der Verbindungen 7-9 sowie der entsprechenden Referenzliganden. Daten sind angegeben als Mittelwert innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (KI) von  $n$  unabhängigen Experimenten.

Verbindung	Struktur	$K_i(hH_4R)$ [nM] [95% KI] (n)	$K_i(hH_3R)$ [nM] [95% KI] (n)
VUF-10460		4.1 <sup>89</sup>	n.b.
7		106 [25, 445] (4)	n.b.
8		11.3 [2.2, 59.1] (5)	n.b.
XII		98 <sup>199</sup>	n.b.
XLIV		4480 <sup>200</sup>	49.1 <sup>200</sup>
9		5136 [2945, 8958] (4)	0.83 [0.12, 5.63] (4)

### 3.5.2: Fluoreszente H<sub>4</sub>R-Liganden

Die Synthese der Chalconverbindungen **10** und **11** erbrachte Derivate der Referenzliganden **XLII** und **XLIII**. Dabei zeigte Verbindung **10** eine geringere H<sub>4</sub>R-Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 2039 \text{ nM}$ ) als Verbindung **11** ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 562 \text{ nM}$ ) (Tabelle 5).

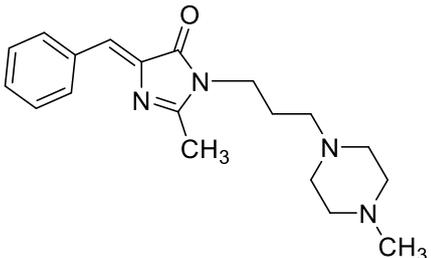
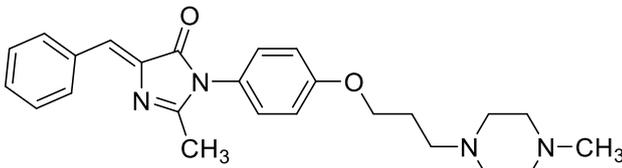
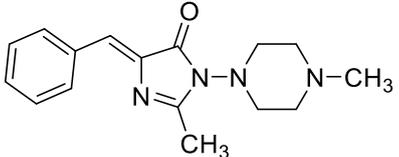
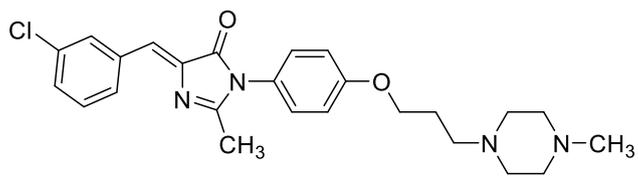
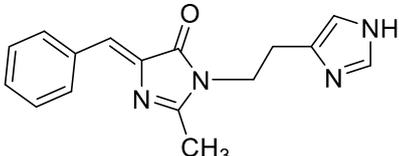
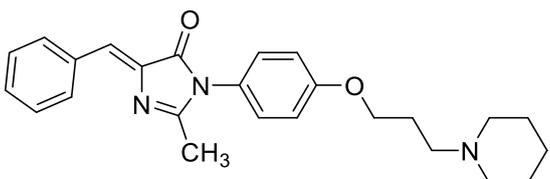
Tabelle 5: hH<sub>4</sub>R Affinitäten der Verbindungen **10** und **11**. Daten sind angegeben als Mittelwert innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (KI) von n unabhängigen Experimenten

#	Struktur	$K_i(\text{hH}_4\text{R})$ [nM] [95% KI] (n)
<b>XLII</b>		12370
<b>XLIII</b>		5634
<b>10</b>		2039 [1036, 4014] (4)
<b>11</b>		562 [276, 1145] (4)

Bei dem Versuch fluoreszierende H<sub>4</sub>R-Liganden zu erzeugen, deren räumliche Gestalt Toreforant ähnelten, wurden die Azlactame **12-17** gewonnen. Diese zeigten bei einer Konzentration von 10 μM nur geringe Inhibitionen der Bindung von [H<sup>3</sup>]-Histamin an den H<sub>4</sub>R, die 50% nicht signifikant überschritten. Da die Inhibitionsraten so gering ausfielen wurden keine K<sub>i</sub>-Werte für den H<sub>4</sub>R bestimmt. Selbst die hohe Affinität von Histamin gegenüber dem H<sub>4</sub>R wurde reduziert, sobald es mit dem Azlactam kombiniert wurde (Verbindung **16**; Inhibition = 31±3%).

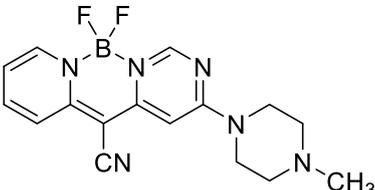
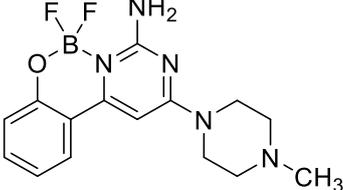
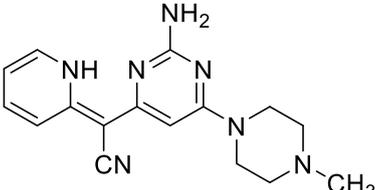
Verbindung **15** stellt die aktivste Verbindung dieser Serie dar (Inhibition =  $57\pm 8\%$ ) und trägt als Alleinstellungsmerkmal ein Chloratom in der Region, die als Fluorophor dienen sollte. Die nichthalogenierte Variante (Verbindung **13**) stellt hingegen die inaktivste Verbindung der Serie dar (Inhibition =  $20\pm 12\%$ ). Mit Verbindung **17** wurde eine Struktur geschaffen, die hochselektiv gegenüber dem H<sub>3</sub>R ( $K_i = 4.7$  nM) ist. Als einzige Verbindung der Serie mit einer Piperidinygruppe zeigt diese ebenfalls keine H<sub>4</sub>R-Aktivität ( $K_i > 10\,000$  nM) (Tabelle 6). Aufgrund der geringen H<sub>4</sub>R-Affinität der Serie und der erfolglosen Bildung des Fluorophors wurde auf die weitere Synthese von Azlactam-Derivaten verzichtet.

Tabelle 6: hH<sub>3</sub>R und hH<sub>4</sub>R-Affinitäten der Verbindungen **12** bis **17**. Daten sind angegeben entweder als Mittelwert innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (KI) von *n* unabhängigen Experimenten oder als Mittelwert ± Standardabweichung der prozentualen Verdrängung/Inhibition des Radioliganden bei einer Konzentration von 10 μM.

#	Struktur	Ki(hH <sub>4</sub> R) [nM] [95% KI] (n) oder %Inhibition @10 μM	Ki(hH <sub>3</sub> R) [nM] [95% KI] (n)
12		25±4%	n.b.
13		20±12%	n.b.
14		27±11%	n.b.
15		> 10 000 (2) 57±8%	508 [147, 1753] (4)
16		31±3%	n.b.
17		> 10 000 (3)	4.7 [1.4, 15.8] (4)

Die Schaffung möglichst niederatomiger H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden wurde durch Verschmelzung des Fluorophors mit dem H<sub>4</sub>R Pharmakophor realisiert (Verbindungen **18-20**). Die Verbindungen **18** und **20** stellten sich als inaktiv gegenüber dem H<sub>4</sub>R heraus ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 10\,000\text{ nM}$ ). Verbindung **19**, bei der das primäre Amin am Pyrimidin erhalten blieb und die Bordifluorid-gruppe über einen Phenol-Sauerstoff gebunden ist, zeigte die höchste H<sub>4</sub>R-Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 400\text{ nM}$ ) dieser Serie (Tabelle 7).

Tabelle 7: hH<sub>4</sub>R Affinitäten der Verbindungen **18** bis **20**. Daten sind angegeben als Mittelwert n unabhängigen Experimenten

#	Struktur	$K_i(\text{hH}_4\text{R})$ [nM] (n)
<b>18</b>		> 10 000 (2)
<b>19</b>		400 (1)
<b>20</b>		> 10 000 (2)

Das Aminopyrimidin-Pharmakophor wurde auch als Ausgangspunkt für Fluoreszenzliganden genutzt, bei denen die Fluorophoranbindung direkt oder über einen Linker realisiert wurde. Dabei wurde mit den Verbindungen **21-25** die bestmögliche Anbindungsposition unter Verwendung einer 2,4-Dinitrobenzolgruppe als Modellfluorophor evaluiert. Die Verbindungen **21** und **22** (Bindung des Fluorophors ohne und mit Linker an den Piperazinrest) und **23** (Bindung des Fluorophors mit Linker an das primäre Amin des Pyrimidins) erwiesen sich dabei als inaktiv gegenüber dem H<sub>4</sub>R ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 4\text{ }\mu\text{M}$ ). Wurde der Phenylsubstituent des Pyrimidins als Anbindungspunkt für das Fluorophor mit Linker genutzt (Verbindungen **24** und **25**) ergaben sich Liganden mit H<sub>4</sub>R-Affinitäten im niedrigen dreistelligen nanomolaren Bereich.

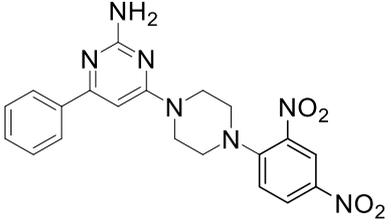
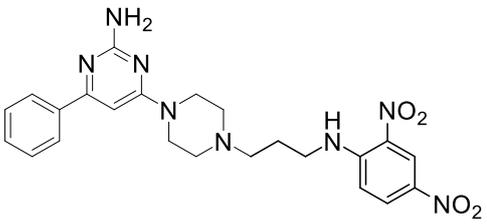
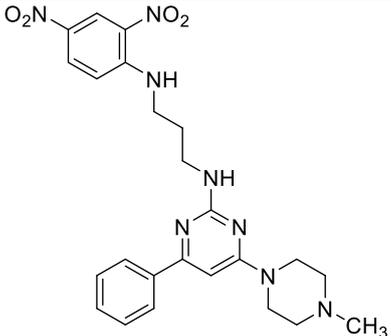
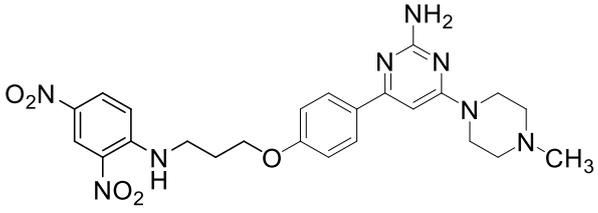
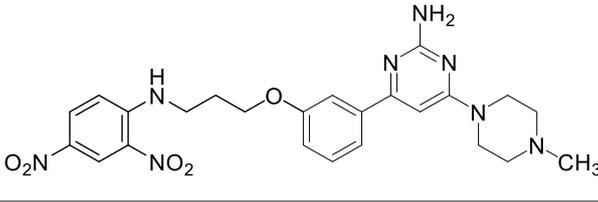
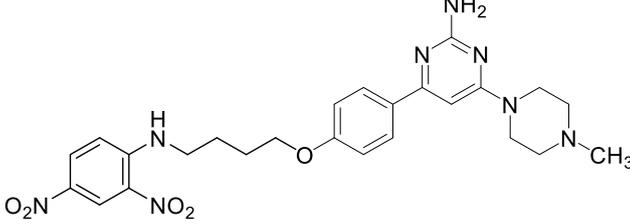
Ausgehend von Verbindung **24** wurde der Linker variiert und es ergaben sich die Verbindungen **26** und **27**. Mit der Einführung einer Diethylenetherbrücke wurde Verbindung **27** erzeugt, die signifikant geringer affin gegenüber dem H<sub>4</sub>R ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1500 \text{ nM}$ ) war als die Ausgangsverbindung. Hingegen zeigten die Verbindungen **26** und **27** ähnliche H<sub>4</sub>R-Affinitäten wie die der Verbindung **24**. Als Linker dienten hier eine Butyl- bzw. eine Hexyleinheit.

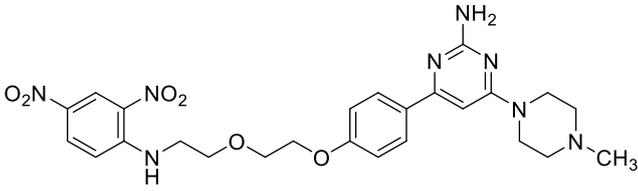
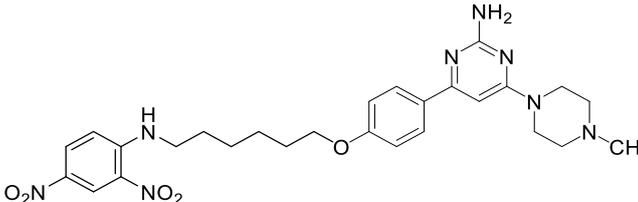
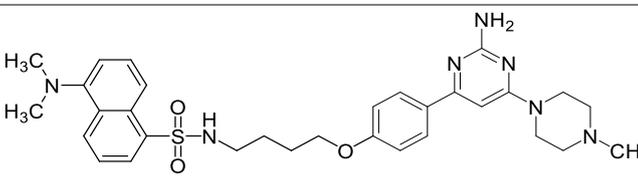
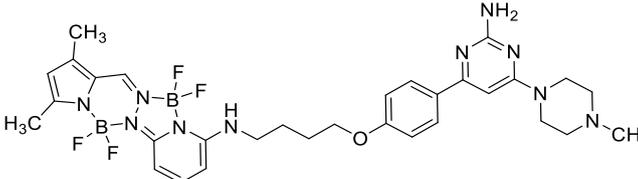
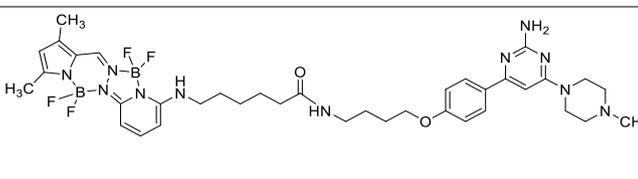
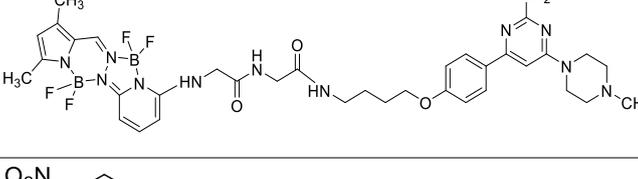
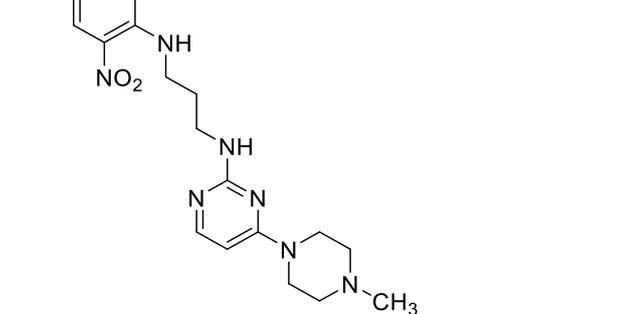
In Folge wurden Derivate von Verbindung **26** gebildet, um weitere Fluorophore einzubringen (Verbindungen **29** und **30**). Die Verbindungen zeigten eine nicht signifikant geringere Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R als Verbindung **27**.

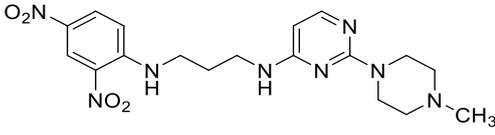
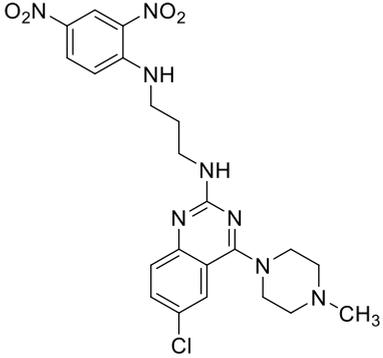
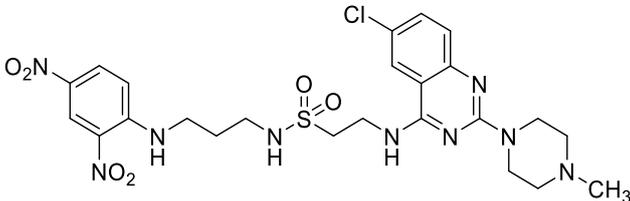
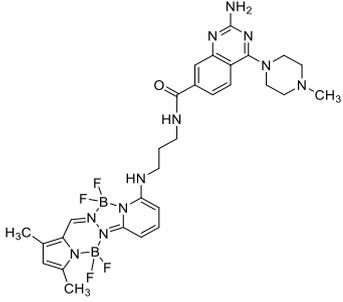
Die BOPPY-tragenden Verbindungen **31** ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 850 \text{ nM}$ ) und **32** ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1200 \text{ nM}$ ) mit längeren Linker zeigten keine gesteigerte H<sub>4</sub>R-Affinität im Vergleich zu Verbindung **30**.

Die Verbindungen **33** und **34**, bei denen es sich um die Übergangsverbindungen zu den Chinazolinderivaten **35** bis **37** handelt, zeigten keine Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 4 \mu\text{M}$ ) in dem zugrundeliegenden Assay-System. Ebenso waren die Chinazolinderivate **35** und **36** nicht H<sub>4</sub>R-affin ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 4 \mu\text{M}$ ). Lediglich Verbindung **37**, in deren Linker zwischen Pharmakophor und Fluorophor eine Taurineinheit inkooperiert wurde, zeigte eine Restaffinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 2077 \text{ nM}$ ). Mit Verbindung **38** wurde der Anknüpfungspunkt an das Chinazolin-gerüst variiert, was zu einer gesteigerten Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 510 \text{ nM}$ ) im Vergleich zu den Verbindungen **35** – **37** führte (Tabelle 8).

Tabelle 8: hH<sub>4</sub>R Affinitäten der Verbindungen **21-38**. Daten sind angegeben als Mittelwert innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (KI) von n unabhängigen Experimenten

#	Struktur	Ki(hH <sub>4</sub> R) [nM] [95% KI] (n)
21		> 4 000
22		> 4 000
23		> 4 000
24		154 [97.1, 243] (4)
25		174 [115, 263] (3)
26		149 [107, 209] (4)

#	Struktur	Ki(hH <sub>4</sub> R) [nM] [95% KI] (n)
27		1500 [300, 8000] (6)
28		186 [147, 235] (4)
29		224 [81.0, 620] (4)
30		428 [188, 974] (3)
31		850 [410,1750] (3)
32		1200 [600, 2200] (4)
33		> 4 000

#	Struktur	Ki(hH <sub>4</sub> R) [nM] [95% KI] (n)
34		> 4 000
35		> 4 000
36		> 4 000
37		2077 [755, 5713] (2)
38		510 [300, 890] (4)

## 4: Diskussion

### 4.1: Strukturanaloga bekannter H<sub>4</sub>R-Liganden

Um neuartige H<sub>4</sub>R-Liganden zu schaffen, die die Möglichkeiten und den synthetischen Spielraum zur Affinitätssteigerung aufzeigen sollten, wurden zunächst Strukturanaloga des bekannten H<sub>4</sub>R-Liganden JNJ-7777120 synthetisiert.

Die Strukturvariationen von JNJ-7777120 ähnlichen Verbindungen, die in dieser Arbeit präsentiert werden (Verbindungen **1-6**) waren nicht affiner gegenüber dem H<sub>4</sub>R als die Ausgangsverbindung. Die geringe H<sub>4</sub>R-Affinität von Verbindung **2** ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 10\,000\text{ nM}$ ) ist dabei in Übereinstimmung mit von Terzioglu *et al.*<sup>79</sup> veröffentlichten Ergebnissen. Als Grund für den Verlust der Bindungseigenschaft ist der geänderte Winkel zwischen dem basischen tertiären Amin und dem chlorierten Indol denkbar.

*In-silico* Berechnungen haben gezeigt, dass das basische Amin des *N*-Methylpiperazins mit der konservierten Aminosäure Asp<sup>3.32</sup> eine ionische Wechselwirkung eingeht.<sup>32,34,201</sup> Der Indolrest von JNJ-7777120 wird dabei höchstwahrscheinlich in eine hydrophobe Kavität der extrazellulär zugewandten Seite des H<sub>4</sub>R kooperiert und über Wechselwirkungen des Indolstickstoffs mit der Aminosäure Glu<sup>5.46</sup> stabilisiert.<sup>34,202–204</sup> Durch den aufgeweiteten Winkel und die erhöhte Flexibilität und Abstand zwischen Indol und basischen Stickstoff des 1-Amino-4-methylpiperazins in Verbindung **2** ist möglicherweise diese Bindungsregion nicht mehr erreichbar, sodass die Affinität sinkt.

Interessanterweise ist mit der Einführung des Histaminrests eine Restaffinität der Verbindung **1** erhalten geblieben ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1106\text{ nM}$ ). Wie bereits im Kapitel 1.3.1: gezeigt, interagiert Histamin als endogener Ligand mit seinem primären Amin mit Asp<sup>3.32</sup> und mit Glu<sup>5.46</sup> über den Imidazolstickstoff.<sup>34</sup> Würde der Histaminrest von Verbindung **1** eine invertierte Ausrichtung in Bezug auf den endogenen Liganden Histamin einnehmen und mit dem deutlich schwächer basischen Imidazolstickstoff ( $\text{pKs} \approx 7$ , vgl.  $\text{pKs}(\text{N-Methylpiperazin}) \approx 8.7$ ) mit dem Ankerpunkt Asp<sup>3.32</sup> wechselwirken, so wäre die Distanz zum Indolrest vergleichbar mit der Distanz zwischen dem basischen Amin und dem meist aromatischen Substituenten von Liganden der Aminopyrimidinklasse, wie beispielsweise ST-994 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 146\text{ nM}$ <sup>85</sup>) oder VUF-10460 ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 4.1\text{ nM}$ <sup>90</sup>). Bei diesen Verbindungen weisen die aromatischen Substituenten in die oben angesprochene hydrophobe Kavität und erfahren keine spezifischen Wechselwirkungen mit Aminosäuren des

Rezeptors. Die Aminogruppen der Guanidinstruktur dieser Verbindungen interagieren entweder direkt mit Glu<sup>5.46</sup> oder über Wasserbrücken.<sup>42,202,205</sup> Diese Interaktion zwischen dem Rezeptor und Verbindung **1** ist nicht möglich, was die geringere Affinität in Bezug auf ST-994 und VUF-10460 erklärt.

Da jedoch eine Restaffinität erhalten blieb, konnte mit Verbindung **1** gezeigt werden, dass ein Histaminrest in der Struktur von chemischen Sonden für den H<sub>4</sub>R prinzipiell als basische Funktionalität in Frage kommt. Am Beispiel der Verbindungen **7** und **8** konnte dies belegt werden. Die Affinitäten dieser Verbindungen unterscheiden sich nicht signifikant von den Ausgangsverbindungen ST-994 und VUF-10460.

VUF-10460 diente auch als Ausgangsverbindung für Verbindung **9**. Durch die Einführung des *N*-Propylpiperidinylrests wurde die gewünschte H<sub>3</sub>R-Affinität erzielt ( $K_i(\text{hH}_3\text{R}) = 0.83 \text{ nM}$ ). Dies zeigt, dass die *N*-Propylpiperidinyleinheit maßgeblich für die H<sub>3</sub>R-Affinität verantwortlich ist und in mannigfaltiger Kombination potente H<sub>3</sub>R Liganden erzeugt werden können, die sich durch zusätzliche Funktionalitäten auszeichnen.

Jedoch ließ sich die hohe H<sub>4</sub>R-Affinität von VUF-10460 nicht beibehalten und reduzierte sich drastisch um drei Potenzen. Damit verhält sich Verbindung **9** analog zu Verbindung **XLIV**. **XLIV** weist ebenfalls eine hohe Affinität zum H<sub>3</sub>R ( $K_i(\text{hH}_3\text{R}) = 49.1 \text{ nM}$ ) auf, verliert aber gleichzeitig in einem hohen Maße die H<sub>4</sub>R-Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 4480 \text{ nM}$ ) im Vergleich zur Ausgangsverbindung (**XII**;  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 98 \text{ nM}$ ), die von Sander *et al.* synthetisiert wurde (Tabelle 4).<sup>199,200</sup> Dies weist die Unterschiede in der Akzeptanz von Resten an hochaffinen Verbindungen zwischen H<sub>3</sub>R und H<sub>4</sub>R auf; wohingegen der H<sub>3</sub>R eine Vielzahl an Substituenten an der *N*-Alkylpiperidin-Grundstruktur toleriert,<sup>206,207</sup> ist die Akzeptanz für strukturelle Variationen beim H<sub>4</sub>R deutlich geringer.

Die Verbindungen **3-6**, die Strukturvariationen von JNJ-7777120 darstellen, bei denen die lipophile Einheit durch einen Pyrazololrest substituiert wurde, zeigten keine Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R (Tabelle 3). Die lipophile Wechselwirkung, die für die hohe Affinität von JNJ-7777120 verantwortlich ist, könnte durch die Anwesenheit der polaren Hydroxygruppe am Pyrazol gestört sein. Nicht zuletzt liegt ein veränderter Winkel zwischen dem basischen Brückenkopf und dem aromatischen System vor, was bei der marginalen Veränderung von Verbindung **2** schon zu einer beträchtlichen Beeinflussung der Affinität im Vergleich zu JNJ-7777120 führte.

Synthetisch wurden die Pyrazololderivate aus einem Ringschluss von 2-Oxo-bernsteinsäure mit aromatischen Hydrazinderivaten zu den Precursoren **P1-P3** und anschließender Amidbildung mittels CDI gewonnen. Eine Methylierung der Hydroxylgruppe, die die Anbindung weiterer Substituenten ermöglichen sollte, war nicht erfolgreich, sodass deren Einfluss nicht überprüft werden konnte. Grund hierfür kann die vorhandene Nukleophilie des sekundären Stickstoffs im Pyrazol sein. Durch Bildung von quartären Ammoniumsalzen entstanden Nebenprodukte, die sich aufgrund ihrer Salzstruktur nur unzulänglich aufreinigen ließen. Die hier gezeigten Pyrazololderivate eignen sich daher nicht als Grundkörper für neuartige H<sub>4</sub>R-Liganden.

Mit der Bereitstellung neuer JNJ-7777120-Derivate konnten neue Einblicke in die Wahl des Pharmakophors zur Fluoreszenzmarkierung gewährt werden. Es konnte gezeigt werden, dass selbst geringe Modifikationen an JNJ-7777120 zu erheblichen Affinitätsverlusten gegenüber dem H<sub>4</sub>R führen können. Daher wurde dieses Pharmakophor nicht genutzt um fluoreszenzmarkierte H<sub>4</sub>R-Liganden zu erzeugen. Mit den Verbindungen **7-9** konnte jedoch gezeigt werden, dass die Klasse der Aminopyrimidine strukturelle Vielfalt zulassen und sich somit als Ausgangspunkt für die Synthese fluoreszenzmarkierter H<sub>4</sub>R-Liganden eignen.

#### 4.2: Fluoreszente H<sub>4</sub>R-Liganden

Zur Gewinnung von fluoreszenten H<sub>4</sub>R-Liganden wurden bekannte Fluorophore entweder durch Integration in den pharmakologisch wirksamen Teil, über eine direkte Kopplung mit diesem oder durch Verknüpfung beider Strukturelemente mit einem Linker gewonnen. Besonders die Klasse der Aminopyrimidine stellte sich als vielversprechender Ausgangspunkt für den iterativen Prozess zur Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften und der Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R heraus.

Bei der Synthese der Chalconderivate **10** und **11** konnte durch die Umstellung auf die Mitsunobu-Reaktion zu Beginn der Synthesesequenz diese um eine Stufe reduziert werden im Vergleich zu den Referenzverbindungen **XLII** und **XLIII**, ohne dass die Gesamtausbeute reduziert wurde.<sup>208</sup> Der hier beschriebene Syntheseweg stellt somit eine optimierte Variante dar.

Durch die Einführung der *N*-Methylpiperazin-Gruppe anstelle eines Piperidins konnte die Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R signifikant gesteigert werden. Die Affinität der Verbindung **XLII** konnte um den Faktor 6 (**XLII**: K<sub>i</sub>(H<sub>4</sub>R) = 12370 nM vs. **10**: K<sub>i</sub>(H<sub>4</sub>R) = 2039 nM) erhöht werden

und im Falle der Verbindung **XLIII** belief sich die Steigerung auf das 10-Fache (**XLIII**:  $K_i(\text{H}_4\text{R}) = 5634 \text{ nM}$  vs. **11**:  $K_i(\text{H}_4\text{R}) = 562 \text{ nM}$ ).

So konnte mit Verbindung **11** ein Fluoreszenzligand geschaffen werden, dessen Fluoreszenzspektrum es erlaubt Markierungsexperimente durchzuführen,<sup>208</sup> jedoch ist die Bindungsaffinität zum  $\text{H}_4\text{R}$  nicht ausreichend und bleibt hinter denen der Aminopyrimidine **7** und **8** zurück, sodass alternative Fluoreszenzliganden entwickelt wurden.

Bei den Verbindungen **12-17** handelt es sich um Strukturen, die den sterischen Aufbau von Toreforant widerspiegeln und Vorstufen zu GFP-analogen Fluorophoren darstellen.

Bei einer Testkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  zeigte keine der Verbindungen **12-17** eine hinreichende Verdrängung des Radioliganden von  $\text{H}_4\text{R}$  (%Inhibition  $<50\%$  bzw.  $K_i(\text{H}_4\text{R}) > 10\,000 \text{ nM}$ , Tabelle 6). Die Substanzen sind demnach nicht  $\text{H}_4\text{R}$  affin.

Wahrscheinlich ist das Azlactam deutlich zu polar ( $\text{cLog P}(\mathbf{15}) = 2.99$  vgl.  $\text{cLog P}(\text{Toreforant}) = 3.83$ ), um in die hydrophobe Kavität des  $\text{H}_4\text{R}$  zu binden. Verbindung **15**, die über einen aromatisch gebundenen Chlorsubstituenten verfügt, stellt innerhalb der Serie die Verbindung mit der stärksten inhibitorischen Wirkung dar. Durch die erhöhte Lipophilie weist diese Verbindung wahrscheinlich die höchste Komplementarität mit der hydrophoben Bindetasche des  $\text{H}_4\text{R}$  auf. Zusätzlich weichen die Verbindungen **12-17** insofern von der Leitstruktur Toreforant ab, als dass das zentrale Pyrimidin entweder entfiel oder durch ein Phenol ersetzt wurde. Dadurch fehlen wichtige polare Eigenschaften im Zielmolekül, die für eine mögliche Bindung zu  $\text{Glu}^{5.46}$  sorgen. Da die Affinitäten gegenüber dem  $\text{H}_4\text{R}$  so gering ausfielen, wurde diese Strukturklasse für die Synthese von fluoreszenzmarkierten  $\text{H}_4\text{R}$ -Liganden nicht weiter in Betracht gezogen.

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu früheren  $\text{H}_3\text{R}$ -Liganden<sup>209</sup> wurden die Verbindungen **15** und **17** jedoch zusätzlich auf ihre  $\text{H}_3\text{R}$ -Affinität untersucht. Dabei zeigte Verbindung **15** eine moderate Affinität im submikromolaren Bereich. Verbindung **17** mit einem  $K_i(\text{hH}_3\text{R})$  von  $4.7 \text{ nM}$  ist jedoch hochaffin und gleichzeitig  $\text{H}_3\text{R}$  selektiv ( $K_i(\text{hH}_4\text{R})/K_i(\text{hH}_3\text{R}) > 2000$ ). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der *N*-Propylpiperidin-Funktionalität für die Bindung an den  $\text{H}_3\text{R}$  und die breitgefächerten Möglichkeiten der Substitution an diesen Baustein.<sup>206,207</sup> Der generelle Bauplan des  $\text{H}_3\text{R}$  ist bereits gut charakterisiert und auch das *N*-Propylpiperidin-substituierte Aminopyrimidin-Element, das hier ursprünglich das  $\text{H}_4\text{R}$ -Pharmakophor darstellte, wurde gut von dem  $\text{H}_3\text{R}$  akzeptiert (Verbindung **9**).

Der Wechsel zu *N*-Methylpiperazin (Verbindung **15** vs. **17**) hat in diesem Fall einen Affinitätsverlust am H<sub>3</sub>R um den Faktor 100 zur Folge. Durch diesen Austausch lässt sich eine mögliche Rolle zur Modulation des H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R-Selektivitätsprofil solcher Liganden vermuten. Die Verwendung des *N*-Methylpiperazins als basische Funktionalität könnte bei der zukünftigen Bereitstellung von H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R-Hybridliganden helfen, H<sub>4</sub>R-selektive oder -präferierende Liganden zu entwerfen.

Bei den Verbindungen **18** bis **20** handelt es sich um Pyrimidinderivate, die genutzt wurden, um eine integrative Kopplung des Fluorophors zu realisieren.

Dabei wurden Affinitätswerte größer 10 μM gegenüber dem H<sub>4</sub>R bestimmt. Der Verlust an Kompatibilität zum H<sub>4</sub>R könnte bei Verbindung **18** mit dem Fehlen der exozyklischen Aminogruppe des Pyrimidins begründet sein, die bei strukturverwandten Molekülen für die Interaktion mit der Aminosäure Glu<sup>5.46</sup> verantwortlich ist. Diese muss jedoch nicht zwingend vorhanden sein (für eine Visualisierung der Bindetasche siehe Kapitel 1.3.1.)<sup>83,84,96</sup> und ihre Anwesenheit scheint nicht ausschlaggebend für eine nanomolare H<sub>4</sub>R-Affinität zu sein, da Verbindung **20** zwar eine exozyklische Aminogruppe trägt aber nicht an den H<sub>4</sub>R bindet. Der Affinitätsverlust der Verbindung **20** lässt sich jedoch auch dadurch erklären, dass diese mit einer stark polaren Pyridylgruppe substituiert ist, welche die Position im Molekül einnimmt, die bei Referenzverbindungen für die hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich ist. Verbindung **19** hingegen weist die exozyklische Aminogruppe auf und durch Inkooperation der phenolischen Gruppe in das Fluorophor verliert diese an Polarität, sodass Verbindung **19** mit einer moderaten Affinität an den H<sub>4</sub>R bindet ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 400 \text{ nM}$ ).

Verbindung **19** weist ein Absorptionsmaximum von 334 nm bei einem Emissionsmaximum von 400 nm auf. Die hypsochrome Verschiebung im Vergleich zu den Fluorophoren von Ma *et al.*<sup>167</sup> lässt sich hierbei durch die Reduktion der Fluorophorgröße erklären. So findet sich in Verbindung **19** anstelle des Chinolins ein Pyrimidin. Weiterhin sind die Absorptions- und Emissionsmaxima von **19** nahe dem Bereich der zellulären Autofluoreszenz, was zur negativen Beeinflussung in der Auswertung von fluoreszenzbasierten Assays führen könnte. Dies weist die Limitierung der integrativen Kombination von Fluorophoren mit dem H<sub>4</sub>R-Pharmakophoren der Klasse der Aminopyrimidinen auf: Die geringe Größe und Symmetrie der gewonnenen Fluorophore erzeugt leuchtschwache Verbindungen mit hochenergetischer

Strahlung, die nur bedingt in biologischen Systemen zur Evaluierung von H<sub>4</sub>R-abhängigen Prozessen brauchbar sind.

Mit der Serie **21-38** wurden die erfolgsversprechendsten Fluoreszenzliganden dieser Arbeit synthetisiert. Diesen lag die Aminopyrimidin- oder Chinazolinstruktur zugrunde. Dabei stellten sich diejenigen Verbindungen als die affinsten H<sub>4</sub>R-Liganden heraus, die im lipophilen Molekülteil mit dem Fluorophor ausgestattet waren.

Die pharmakologische Untersuchung der am basischen Anker substituierten Verbindungen **21** und **22** erbrachte, dass sowohl die direkte Substitution des Methylpiperazins mit dem Testfluorophor 2,4-Dinitrobenzol, als auch die über einen Linker zum kompletten Bindungsverlust gegenüber dem H<sub>4</sub>R führte. Im Falle von Verbindung **21** ist der Verlust auf die fehlende Basizität der aromatisch substituierten Piperazinstickstoffe zurückzuführen. Die geringe Affinität von Verbindung **22** liegt womöglich in der sterischen Inkompatibilität mit der Rezeptorbindetasche in der Umgebung des Ankerpunktes Asp<sup>3.32</sup> begründet. Die fehlende Affinität dieser Verbindungen gibt daher Aufschluss darüber, dass die *N*-Methylpiperazin-Funktionalität erhalten bleiben muss und nicht zur Modifikation geeignet ist.

Bei der Derivatisierung an dem primären Amin des Pyrimidinkerns ergaben sich die Aminopyrimidine **23**, **33** und **34**, sowie die Chinazolinderivate **35** und **36**, die jedoch keine Affinität ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) > 4 \mu\text{M}$ ) gegenüber dem H<sub>4</sub>R aufwiesen. Sterische Hinderung kann zu den geringeren Affinitäten der Verbindungen **23** und **33-36** geführt haben, wobei im Falle der Verbindungen **23**, **33** und **35** durch die Substitution der Aminogruppe der Guanidinstruktur auch elektronische Veränderungen ebendieser eine Rolle spielen werden. Verbindung **37** hingegen weist eine Restaffinität auf ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 2 \mu\text{M}$ ). Die strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindung zu Verbindung **XXIV** ( $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 4.9 \text{ nM}$ )<sup>94</sup> ist durch das Vorhandensein der Sulfonamidgruppe am größten. Bei Verbindung **37** handelt es sich jedoch um ein alkyliches Sulfonamid, sodass die elektronischen Eigenschaften nicht vergleichbar sind, was die Abnahme der Affinität begründen könnte.

Die Substitution des lipophilen Molekülteil erwies sich als vielversprechender. So erhaltene Verbindungen wiesen submikromolare K<sub>i</sub>-Werte auf, die bis in den niedrigen dreistelligen nanomolaren Konzentrationsbereich reichten. Die Verbindungen **24** und **25** unterscheiden sich lediglich in der Verknüpfungsposition des Linkers an die phenolische Gruppe. Die Orthoposition wurde nicht berücksichtigt, um die fluorophore Gruppe in möglichst großer

Distanz zum Pyrimidinkern zu positionieren. Die Affinität war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Verbindung **25** wurde als Ausgangspunkt für die Konzeption weiterer Fluoreszenzliganden genutzt, da sich diese als die tendenziell affinere herausstellte.

Beim Vergleich der Verbindungen **24**, **26** und **28**, welche unterschiedlich lange Alkyl linker besitzen, zeigte sich, dass alle Derivate eine gute Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R aufwiesen und sich nicht signifikant unterschieden. Tendenziell jedoch scheint der Butyl-Linker (**26**) die beste Affinität zu erbringen, wohingegen eine Verlängerung des Linkers eine tendenzielle Reduktion der H<sub>4</sub>R-Affinität bewirkte. Beim Wechsel auf den Ether-Linker Aminoethoxyethanol (**27** vs. **26**) verschlechterte sich die Affinität signifikant in den einstelligen mikromolaren Bereich, weshalb diese Variation bei weiteren Strukturüberlegungen ausgeschlossen wurde. Aufgrund der guten Bindungswerte von Verbindung **26** wurde diese als Leitstruktur ausgewählt und durch den Austausch des Fluorophors eine Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften vorangetrieben.

Dabei wurde zum einen die Dansylgruppe (**29**) und zum anderen das BOPPY-Fluorophor (**30**) genutzt. Der Wechsel erbrachte deutlich bathochrom verschobene Emissionsmaxima und erhöhte Fluoreszenzintensitäten. Betrachtet man das Bindungsverhalten gegenüber dem H<sub>4</sub>R so fällt eine nicht signifikante Abnahme der Bindungsaffinität in Korrelation mit der Größe des Fluorophors auf. Mit einer Affinität von  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 224 \text{ nM}$  für Verbindung **29** und  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 428 \text{ nM}$  für **30** weisen die Liganden jedoch weiterhin eine submikromolare Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R auf. Zurückzuführen ist dieser Affinitätsverlust wahrscheinlich auf sterische Hinderungen in der Bindetasche des Rezeptors. Die hohe Fluoreszenzintensität, das Emissionsmaximum im Bereich des sichtbaren Lichts und die gute Synthetisierbarkeit von BOPPY lassen auf eine gute Eignung als Baustein chemischer Sonden schließen. Daher wurden ausgehend von **30** bei den Verbindungen **31** und **32** deutlich längere Linker eingeführt. Somit sollte überprüft werden, ob eine Positionierung des BOPPY-Fluorophors weiter außerhalb der Liganden-Bindetasche zu einer Steigerung der H<sub>4</sub>R-Affinität führen könnte. Die Einbringung des Linkers führte allerdings dazu, dass sich die Affinität weiter reduzierte (**31**:  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 850 \text{ nM}$ ; **32**:  $K_i(\text{hH}_4\text{R}) = 1200 \text{ nM}$ ). Der lipophilere Linker (**31**) zeigte hierbei wieder eine höhere Affinität als die hydrophile Variante (**32**), jedoch blieb bei Letzteren eine moderate Affinität vorhanden.

Vergleichbar ist dieses Verhalten mit Arbeiten von Karton *et al.*<sup>210</sup> und Tahtaoui *et al.*<sup>211</sup>, die anhand des M<sub>1</sub>R zeigten, dass sich die Affinität nicht zwangsläufig linear mit der Kettenlänge des Linkers verhält. So zeigten Pirenzepinderivate (Verbindungen nicht gezeigt), bei denen die Methylgruppe des Piperazins durch unterschiedliche Linker substituiert wurden, dass bei kurzen Linkern mit zwei bis sechs Gliedern eine Verlängerung der Kette die Affinität graduell verringerte, bei mittleren Kettenlängen (sechs bis neun Gliedern) die Affinität gegenüber dem M<sub>1</sub>R schwach ausfiel und bei Verwendung eines zehngliedrigen Linkers wieder ein affiner Ligand gewonnen wurde.<sup>210</sup> Tahtaoui *et al.* bestätigten diese Ergebnisse mit fluoreszenzmarkierten Pirenzepinderivaten und ergänzten diese um die Erkenntnis, dass eine Verlängerung der Linkerkette bis zu 22 Gliedern keinen Einfluss auf die Affinität hat, ein 24-gliedriger Linker die Affinität jedoch signifikant steigerte.<sup>211</sup>

Möglicherweise verhält es sich bei den hier beschriebenen H<sub>4</sub>R-Liganden auf ähnliche Weise, sodass eine Kettenlänge von vier Methyleneinheiten ein lokales Affinitätsmaximum darstellt und anschließend mit längerer Kette graduell an Affinität verliert. Da der längste Linker in dieser Serie eine Kettenlänge von elf Atomen aufweist (Verbindung **31**) können an dieser Stelle keine Aussagen gemacht werden, ob sich sehr lange Linkerketten wie etwa Polyglykol- oder Polyglycinketten positiv auf die Affinität auswirken können. Wird die Kette soweit verlängert, sodass das Fluorophor aus dem Rezeptor herausragt, wäre eine Verbesserung der Affinität denkbar, da sterische Hinderungen in der Bindetasche verringert werden. Jedoch würden dadurch auch die lipophilen Wechselwirkungen mit der Zellmembran erhöht, was eine gesteigerte unspezifische Bindung zu Membranfragmenten zur Folge haben könnte. Die äußerst kostspielige Bereitstellung von Polyglykolen mit je einer Aminogruppe und einer Hydroxylgruppe als Endfunktionalität bei definierter Kettenlänge limitierte weitere vielversprechende Synthesestrategien.

Diese längeren Linker wurden daher nicht synthetisiert, aber mit Verbindung **38** wurde das stark fluoreszierende BOPPY an eine Chinazolingrundstruktur gekoppelt, die bei Versuchen der Incyte corp. in der Lage war, voluminöse Reste zu tragen und zugleich eine hohe Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R bewahrte (siehe Kapitel 1.3.4: Verbindungen **XVII** und **XVIII**).<sup>212</sup> Verbindung **38** zeigte jedoch keine gesteigerte Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R und wies mit K<sub>i</sub>(hH<sub>4</sub>R) = 510 nM eine ähnliche Bindungsstärke wie Verbindung **30** auf.

Aus dieser Serie von Aminopyrimidin-Derivaten stellt Verbindung **30** den erfolgsversprechendsten H<sub>4</sub>R-Fluoreszenzliganden dar. Das verknüpfte BOPPY-Fluorophor eignet sich auf der einen Seite hervorragend zur Derivatisierung primärer Amine und weist auf der anderen Seite sehr gute Fluoreszenzeigenschaften auf. So liegen die Absorptions- und Emissionsmaxima im Bereich des sichtbaren Lichts ( $\lambda_{\text{maxAbs}} = 455 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{maxEm}} = 480 \text{ nm}$  für Verbindung **30**) und BOPPY weist laut Literatur ein gute Quantenausbeute von 44% auf.<sup>169</sup>

Die Hintergrundfluoreszenz von Zell- und Gewebematerial ist in diesem Wellenlängenbereich gering, sodass Messungen der Fluoreszenzintensität dieses Liganden in zellbasierten Assays unbeeinflusst bleiben würden. Zusätzlich liefert ein Stokesshift von circa 25 nm durch Ausschluss möglicher Überlagerungen mit der Anregungswellenlänge geeignete Messgegebenheiten. Dabei ist nicht nur die Nutzung zur Markierung von H<sub>4</sub>R in unterschiedlichen Geweben denkbar, sondern auch die Bestimmung von kinetischen Parametern anderer H<sub>4</sub>R-Liganden, wie kürzlich mit Bodilisant für den H<sub>3</sub>R gezeigt. Unter Verwendung des H<sub>3</sub>R-Fluoreszenzliganden Bodilisant konnten durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen die Bindungskinetiken von nicht-markierten H<sub>3</sub>R-Liganden bestimmt werden.<sup>213</sup>

Mit Verbindung **29** wurde gezeigt, dass das Dansyl-Fluorophor an die Aminopyrimidinstruktur von VUF-10460 gebunden werden kann. Im Vergleich zu VUF-10460 wurde die H<sub>4</sub>R-Affinität 55-fach reduziert. Die Frage, ob die Affinität im niedrigen dreistelligen nanomolaren Bereich ausreichend ist, um den Förster Energietransfer von Trp<sup>6,48</sup> beispielweise zur Affinitätsbestimmung anderer Liganden ausnutzen zu können, bedarf noch experimenteller Bestätigung.

Synthetisch wurden in dieser Arbeit eine Vielzahl des 4,6-disubstituierten 2-Aminopyrimidine über Ringschlussreaktionen von Acetessigsäure-Derivaten mit Guanidiniumcarbonat gewonnen. Im Vergleich zur Suzuki-Miyaura-Kupplung, die ausgehend von 4,6-Dichloraminopyrimidin und Phenylborsäure mittels Palladiumkatalyse dieselben Zwischenprodukte generieren würde, konnte so durch Wegfallen des kostspieligen Katalysators und durch Nutzen günstigerer Edukte die Kosten reduziert werden. Zusätzlich wurde die Aufreinigung der Zwischenprodukte effizienter gestaltet, da auf die säulenchromatographische Abtrennung der Phenylborsäuren verzichtet werden konnte, die bei Suzuki-Miyaura-Kupplungen unabwendbar ist, und die Zwischenprodukte durch Extraktion und Präzipitation isoliert wurden.

Zusammenfassend wurde mit Verbindung **27** eine neue Aminopyrimidin-basierte Leitstruktur entwickelt, die sich zur Fluoreszenzmarkierung von H<sub>4</sub>R-Liganden eignet. Die Fluoreszenzliganden **29** und **30** belegen, dass eine Derivatisierung dieser Struktur mit voluminöseren Fluoreszenzmarkern möglich ist, ohne dass es zu signifikanten Verlusten der Affinität gegenüber dem H<sub>4</sub>R kommt.

Gleichzeitig wurde mit Verbindung **30** in dieser Arbeit erstmalig die stark fluoreszierende BOPPY-Gruppe an ein biologisch aktives Molekül gekoppelt und damit gezeigt, dass es sich zur Fluoreszenzmarkierung von chemischen Sonden eignet. Durch die hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften von BOPPY und einer Affinität im dreistelligen nanomolaren Konzentrationsbereich wurde hier mit Verbindung **30** ein fluoreszenter Rezeptorligand geschaffen, der sich fakultativ für die Markierung des H<sub>4</sub>R in Zellen und Geweben eignet.

Zur weiteren Charakterisierung sollten jedoch noch Bindungsaffinitäten gegenüber weiterer GPCRs, insbesondere der Histaminrezeptorfamilie, vorrangig dem H<sub>3</sub>R, erstellt werden, um eine selektive H<sub>4</sub>R-Bindung zu verifizieren. Die Fluoreszenzmarkierung von Chinazolinderivaten war ebenfalls erfolgreich, wobei in dieser Substanzklasse die H<sub>4</sub>R-Affinität noch maßgeblich verbessert werden muss.

Die hier präsentierten fluoreszenz-markierten Aminopyrimidinderivate (**21 - 30**) wurden als erfolgsversprechendste Substanzklasse identifiziert. Somit wurden erstmalig fluoreszente Liganden mit H<sub>4</sub>R-Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich synthetisiert, die den Grundstein für weitere Strukturoptimierungen legen. Ein denkbares Optimierungspotential liegt bei der Kettenverlängerung des Linkers beispielsweise durch Verwendung geeigneter Polyglykol- oder Polyglycinlinkern. So könnte das Fluorophor außerhalb der H<sub>4</sub>R-Bindetasche positioniert werden, um dessen Einfluss auf die Interaktion zwischen Pharmakophor und Rezeptorbindestelle zu minimieren. Zusätzlich wurde bei Verbindung **38** erstmalig ein Fluorophor an ein Chinazolingrundkörper mit H<sub>4</sub>R-Affinität gekoppelt und resultierte in einer moderat H<sub>4</sub>R-aktiven Fluoreszenzverbindung. Durch geschickte Linkerwahl kann diese Struktur ebenfalls als Ausgangspunkt für weitere fluoreszente chemische Sonden für den H<sub>4</sub>R genutzt werden.

## 5: Synthese von niedermolekularen MAO-Inhibitoren

In diesem Kapitel werden die Zielsetzung und Ergebnisse der Publikation „Potent reversible small molecule inhibitors of MAO A and MAO B with anilide motifs“ zusammengefasst. Verbindungen, die aus dieser Publikation stammen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet und analog nummeriert. Kapitel 5.3: beinhaltet die vollständige Publikation sowie eine Darlegung der beigetragenen Anteile des Autors zu dieser Publikation.

### 5.1: Zielsetzung

Zur Bekämpfung neurologischer Erkrankungen werden mit steigender Quantität sogenannte *multitargeting ligands* (MTL) erprobt. Dieser Ansatz der Gestaltung eines multifunktionalen Wirkprofils berücksichtigt die Tatsache, dass Fehlfunktionen im ZNS häufig multifaktorielle Ursachen zu Grunde liegen und die Adressierung verschiedener gestörter Signalwege eine optimalere Pharmakotherapie erlauben könnte.<sup>214</sup> Dabei stellt der kombinatorische Ansatz von unterschiedlichen Pharmakophoren solcher Verbindungen hohe Ansprüche an die molekulare Struktur.

Nicht nur die Affinität zu den jeweiligen biologischen Zielen muss erhalten bleiben, sondern auch die *drug-likeness*. So ist die Identifizierung von niedermolekularen chemischen Entitäten mit einer hohen Zielstrukturaffinität von besonderer Wichtigkeit. Diese können einfacher mit anderen Pharmakophoren zu MTLs zusammengefügt werden, da ihr Einfluss auf die gesamte molekulare Größe gering ist und so die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass das multifunktionale Wirkprofil aufrechterhalten wird.

Den neurotransmitter-katabolisierenden Monoaminoxidasen (MAO) fällt bei der Therapie von neuronalen Erkrankungen eine zentrale Rolle zu und einige Inhibitoren sind gut etabliert in der Pharmakotherapie.<sup>3,4,6-8</sup> Auf dieser Basis gibt es das Bestreben Liganden zu schaffen, die neben der MAO-Aktivität in der Lage sein sollen, weitere neurologische Zielstrukturen (z.B. H<sub>3</sub>R, Acetyl- und Butylcholinesterasen etc.) zu adressieren.<sup>197,198,206</sup>

In mehreren vorangegangenen Publikationen erwiesen sich Moleküle,<sup>215-219</sup> die aus zwei verbrückten aromatischen Einheiten bestehen als vielversprechende MAO-Inhibitoren, sodass im Rahmen der Publikation niedermolekulare aromatische Amide synthetisiert und charakterisiert werden sollten, die als Ausgangspunkte für ein Design von MTLs genutzt werden können. Amide wurden hierbei aufgrund ihrer hohen Stabilität unter physiologischen

Bedingungen gewählt. Die synthetisierten Verbindungen sollten auf Ihre MAO-Inhibition untersucht werden und die ermittelten Werte durch die Schaffung von Pharmakophor-Modellen, durchgeführt von *Dr. Khanfar*, und Docking-Experimente im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Proschak* an der Universität Frankfurt verifiziert werden.

## 5.2: Zusammenfassung der Publikation

In der Publikation wurde die Synthese und die biologische Aktivität von 66 Anilinderivaten vorgestellt. Synthetisch wurden diese Verbindungen in einer einfachen Reaktionsführung gewonnen, die lediglich Fällungs- oder Kristallisierungsprozesse zur Aufreinigung benötigten. Sieben der getesteten Verbindungen zeigten in *Screenings* vielversprechende MAO-Inhibitionswerte bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und wurden daraufhin auf ihre  $\text{IC}_{50}$ -Werte untersucht. Sechs davon (**31\***, **33\***, **34\***, **55\*** und **65\***) inhibierten präferiert MAO B im nanomolaren Konzentrationsbereich und eine MAO A (**7\***). Die Berechnung von Docking-Positionen in den Bindetaschen von MAO A und B fügen sich in konsistenter Weise in die Erkenntnisse vorangegangener Arbeiten ein und zeigen eine gute Oberflächenkomplementarität zwischen Liganden und Bindetasche. Drei der MAO B präferierenden Verbindungen (**31\***, **33\*** und **34\***) leiten sich strukturell von der Salicylsäure ab und sind auf der benzylichen Seite mit einem Chlorsubstituenten in der 5-Position ausgestattet, sowie mit einem hoch lipophilen Substituenten an der anilinschen Seite des Moleküls. Die hohe Lipophilie ist dabei vorteilhaft, um hydrophobe Wechselwirkungen mit der MAO B-Bindetasche zu generieren. Die zentrale Carbonylfunktion und die Hydroxylgruppe weisen in den Berechnungen polare aprotische Wechselwirkungen mit der Aminosäure Cys172 auf. Weiterführende Untersuchungen der aktivsten Verbindung **55\*** zeigten ein reversibles und kompetitives Bindungsverhalten gegenüber MAO B auf. Aufgrund der einfachen Struktur und der guten Synthetisierbarkeit der Verbindungen eignen sie sich hervorragend als Ausgangspunkt für das Design neuer MTLs, die MAO-inhibitorische Effekte aufweisen können.

### 5.3: Publikation

Die vorliegende Publikation wurde zu Veröffentlichung eingereicht in:

„Drug Design, Development and Therapy“

Impactfactor: 3.208 (2018)

Jens Hagenow, Stefanie Hagenow, Kathrin Grau, Mohammad Khanfar, Lena Hefke, Ewgenij Proschak, Holger Stark. Potent Reversible Small Molecule Inhibitors of MAO A and MAO B With Anilide Motifs. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:371-393.

**Eigener Anteil der Arbeit:** Erstautor; Planung und Durchführung der organischen Synthesen aller Verbindungen, sowie die analytische Charakterisierung dieser Verbindungen; Verfassung und Mitarbeit an der Revision des Manuskripts.

# Reversible Small Molecule Inhibitors of MAO A and MAO B with Anilide Motifs

This article was published in the following Dove Press journal:  
*Drug Design, Development and Therapy*

Jens Hagenow<sup>1</sup>  
Stefanie Hagenow<sup>1</sup>  
Kathrin Grau<sup>1</sup>  
Mohammad Khanfar<sup>1-3</sup>  
Lena Hefke<sup>4</sup>  
Ewgenij Proschak<sup>4</sup>  
Holger Stark<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Heinrich Heine University Düsseldorf, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Duesseldorf 40225, Germany; <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, The University of Jordan, Amman 11942, Jordan; <sup>3</sup>College of Pharmacy, Alfaisal University, Riyadh 11533, Saudi Arabia; <sup>4</sup>Goethe University Frankfurt, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Frankfurt 60438, Germany

**Background:** Ligands consisting of two aryl moieties connected via a short spacer were shown to be potent inhibitors of monoamine oxidases (MAO) A and B, which are known as suitable targets in treatment of neurological diseases. Based on this general blueprint, we synthesized a series of 66 small aromatic amide derivatives as novel MAO A/B inhibitors.

**Methods:** The compounds were synthesized, purified and structurally confirmed by spectroscopic methods. Fluorimetric enzymological assays were performed to determine MAO A/B inhibition properties. Mode and reversibility of inhibition was determined for the most potent MAO B inhibitor. Docking poses and pharmacophore models were generated to confirm the in vitro results.

**Results:** *N*-(2,4-Dinitrophenyl)benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (**55**, ST-2043) was found to be a reversible competitive moderately selective MAO B inhibitor (IC<sub>50</sub> = 56 nM, K<sub>i</sub> = 6.3 nM), while *N*-(2,4-dinitrophenyl)benzamide (**7**, ST-2023) showed higher preference for MAO A (IC<sub>50</sub> = 126 nM). Computational analysis confirmed in vitro binding properties, where the anilides examined possessed high surface complementarity to MAO A/B active sites.

**Conclusion:** The small molecule anilides with different substitution patterns were identified as potent MAO A/B inhibitors, which were active in nanomolar concentrations ranges. These small and easily accessible molecules are promising motifs, especially for newly designed multitargeted ligands taking advantage of these fragments.

**Keywords:** salicylic acid derivatives, molecular modeling, Parkinson's disease, enzyme inhibitor, pharmacophore, structure-activity relationships

## Plain Language Summary

Monoamine oxidases (MAO) A and B are neurotransmitter-catabolizing enzymes, which play a role in the pathophysiology of neurological diseases such as Parkinson's disease, depression or schizophrenia. Small molecules consisting of two aryl moieties connected via a short spacer were shown to be potent MAO A/B inhibitors. In this study, aromatic amide derivatives with different structural variations and substitution pattern were demonstrated to have MAO A/B inhibition properties in a nanomolar concentration range. Compound **55** was found to be a reversible competitive MAO B preferring inhibitor (IC<sub>50</sub> = 56 nM, K<sub>i</sub> = 6.3 nM), while compound **7** showed a higher preference for MAO A (IC<sub>50</sub> = 126 nM). Computational analysis confirmed in vitro binding properties as the respective anilides possessed high surface complementarity to MAO A/B active sites. These results suggest that the herein described anilides are small and easily accessible molecules, which may serve as promising precursors for the design of selective or multitargeting MAO A/B inhibitors.

Correspondence: Holger Stark  
Heinrich Heine University Duesseldorf,  
Institute of Pharmaceutical and Medicinal  
Chemistry, Universitaetsstr. 1,  
Duesseldorf 40225, Germany  
Tel +49 211 81-10478  
Fax +49 211 81-13359  
Email stark@hhu.de

submit your manuscript | [www.dovepress.com](http://www.dovepress.com)  
DovePress      
<https://doi.org/10.2147/DDT.S236586>

Drug Design, Development and Therapy 2020:14 371–393

371

 © 2020 Hagenow et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Noncommercial uses of the work are permitted without any further permissions from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

## Introduction

The neurotransmitter-catabolizing monoamine oxidases (MAO) are localized in the outer mitochondrial membrane and are classified into the A and B isoforms. MAO A is mainly involved in the degradation of serotonin, melatonin, norepinephrine, and epinephrine, and is expressed nearly ubiquitously in the human body. MAO B breaks down phenethylamine and benzylamine and it is highly expressed in the central nervous system (CNS). Dopamine, tyramine and tryptamine can be metabolized by both isoforms but with individual metabolic activity for each substrate. Consequently, inhibitors of both enzymes are established in the pharmacotherapy for neurological diseases.<sup>1-3</sup> Moclobemide was the first marketed MAO inhibitor and entered the Swedish market in 1989.<sup>4</sup> Slowing down the degradation of neurotransmitters like dopamine and norepinephrine via MAO A inhibition, this drug exhibits mood-lifting properties facilitating its use as an antidepressant.<sup>4</sup> Since then the irreversible nonselective MAO inhibitor tranylcypromine as well as the irreversible MAO B inhibitors rasagiline and selegiline were approved for the treatment of depression and Parkinson's disease (PD), respectively. Recently, safinamide as first reversible MAO B inhibitor in PD therapy was approved.<sup>5-7</sup> As the imminent therapeutic benefits of MAO inhibitors are nowadays clear, multiple efforts have been made to develop new reversible and irreversible inhibitors. Due to long-term enzyme inactivation by irreversible MAO inhibitors, these can be associated with serious side effects or drug-drug interactions, eg leading to a serotonin syndrome.<sup>8</sup> Reversible MAO inhibitors have a more favorable side effect profile; however, they can be displaced from the active site in case of high levels of the endogenous ligands. To maintain pharmacological efficacy, they are aimed to show a high affinity towards the MAOs and/or tight binding behavior.<sup>9</sup> The design of such reversible and selective inhibitors of MAO A and B became a strongly researched area to identify suitable drug candidates for the treatment of neurological diseases, particularly of PD.

Having in mind that such diseases usually derive from multifactorial disorders, the development of sophisticated multitargeted ligands (MTLs) became of major exploration to treat these CNS disorders.<sup>10,11</sup> The combination of different biological active moieties in one molecule is challenging since the affinity for each target needs to be preserved together with maintaining drug-likeness properties. Identification of small chemical entities with a promising target affinity are of great value in MTL drug design, as they might be easily combined

or fused with other pharmacophores with minor influences on molecular size.

Accordingly, we synthesized a series of 66 anilides with diverse substitution patterns. The presented anilides are small-sized and have low molecular weights. The ligands show structural similarities to previously described potent MAO inhibitors assuring potential MAO inhibition activities. Multiple publications identified two aromatic moieties linked by a short bridging element as mutual MAO scaffold.<sup>8,12-16</sup> Due to their high stability under physiological conditions, amides were used as linkers in our series. Aromatic moieties bearing different substituents were chosen to elucidate electronic and steric effects on the binding affinities towards both MAO isoforms. The presented ligands were characterized in vitro. For a better understanding of the binding modes, computational docking experiments were performed and a ligand-based pharmacophore-model was established.

## Materials and Methods

### Reagents and Instrumentation

Reagents and solvents for synthesis were purchased from Sigma-Aldrich, VWR Chemicals, Fisher Scientific, Panreac AppliChem, Alfa Aesar and Chemsolute and were used without further purifications (unless stated otherwise). <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR were recorded on a Bruker AMX spectrometer (Bruker, Germany) at 300 and 75 MHz respectively, where either CDCl<sub>3</sub> or DMSO-d<sub>6</sub> was used as a solvent. Tetramethylsilane was used as standard and chemical shifts are reported in parts per million (ppm). Elementary analyses (C, H, N) were measured on a CHN-Rapid (Heraeus, Germany) and were within 0.4% of the theoretical values for final compounds. LC-MS analysis was performed on a Bruker Elute SP; Column: Intensity Solo C<sub>18</sub> RP; column dimensions: 100 x 2.1 mm; eluent: acetonitrile (1-40%) in water, 0.1% formic acid; flow: 0.3 mL/min) combined with mass spectrometric detection (Bruker amazon speed with ESI; detection: ion-trap; ion-polarity: positive; scan: 100-600 m/z). Data are given as retention time (t<sub>R</sub>), mass number ([M + H]<sup>+</sup>), and normalized peak area (%) as approximated purity. Melting points (m.p., uncorrected) were determined on a M-564 Büchi melting point apparatus (Büchi, Germany). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using pre-coated silica gel 60 with fluorescence indicator at UV 254 nm (Macherey-Nagel, Germany). The structure and purity of each compound were confirmed

using  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, LC-MS and/or elemental analysis.

Human recombinant monoamine oxidase A (MAO A, E.C. 1.4.3.4), human recombinant monoamine oxidase B (MAO B, E.C. 1.4.3.4), kynuramine dihydrobromide (KYN) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich. For biological evaluation tests, compounds were dissolved in 100% DMSO (max.  $10^{-3}$  M). Fluorescence intensity measurements were performed with an infinite M1000 Pro multimode reader (Tecan, Switzerland). Assay pipetting was partly automated using a Freedom EVO pipetting robot (Tecan, Switzerland).

### Experimental Procedures

#### *N*-Phenylbenzamid (**1**)<sup>34</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white amorphous powder. Yield: 53%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.25 (s, 1H), 8.00–7.93 (m, 2H), 7.82–7.75 (m, 2H), 7.65–7.49 (m, 3H), 7.41–7.29 (m, 2H), 7.15–7.06 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.50, 139.13, 134.95, 131.49, 128.55, 128.33, 127.60, 123.60, 120.31.

Elemental Analysis: calc C 79.17%, H 5.62%, N 7.10%; found C 78.91%, H 5.53%, N 6.89%.

m.p.: 163°C (lit. 163–164°C).<sup>35</sup>

#### *N*-(Pyridin-2-yl)benzamide (**2**)<sup>36</sup>

Using Method C the title compound was isolated as a white amorphous powder. Yield: 83%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.95 (s, 1H), 8.51 (dt, *J* = 5.6, 1.3 Hz, 1H), 8.28–8.24 (m, 2H), 8.20–8.12 (m, 2H), 7.73–7.64 (m, 1H), 7.62–7.54 (m, 2H), 7.47 (td, *J* = 5.7, 2.7 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  166.89, 149.65, 143.30, 142.29, 132.94, 132.55, 128.60, 128.32, 120.34, 116.28.

LC-MS *t*<sub>R</sub> = 16.8 min;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 198.9; 100%.

m.p.: 78°C (lit. 75–80°C).

#### *N*-(4-Cyanophenyl)benzamide (**3**)<sup>37</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield: 57%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.65 (s, 1H), 8.06–7.92 (m, 4H), 7.87–7.78 (m, 2H), 7.68–7.49 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  166.15, 143.46, 134.34, 133.07, 131.99, 128.44, 127.80, 120.12, 119.04, 105.30.

Elemental Analysis: calc C 75.60%, H 4.54%, N 12.60%; found C 75.44%, H 4.24%, N 12.33%.

m.p.: 165°C (lit. 165–166°C).<sup>38</sup>

#### *N*-(4-(Trifluoromethoxy)phenyl)benzamide (**4**)<sup>39</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield: 62%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.44 (s, 1H), 8.14–7.79 (m, 4H), 7.57 (ddd, *J* = 14.4, 7.8, 6.0 Hz, 3H), 7.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.66, 143.82, 143.79, 138.36, 134.61, 131.68, 128.37, 127.65, 121.60, 121.41.

Elemental Analysis: calc C 59.79%, H 3.58%, N 4.98%; found C 59.76%, H 3.42%, N 4.90%.

m.p.: 179°C (lit. 176–178°C).<sup>40</sup>

#### *N*-(4-Amino-2-methylphenyl)benzamide (**5**)<sup>41</sup>

Using Method D the title compound was isolated as a white solid. Yield 89%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.57 (s, 1H), 8.06–7.86 (m, 2H), 7.62–7.43 (m, 3H), 6.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.29, 146.96, 134.81, 134.59, 131.13, 128.26, 127.78, 127.40, 124.87, 115.19, 111.43, 17.99.

Elemental Analysis: calc C 74.31%, H 6.05%, N 12.38%; found C 74.22%, H 6.05%, N 12.08%.

m.p.: 201°C (lit. 199–201°C).<sup>42</sup>

#### *N*-(2-Methyl-4-nitrophenyl)benzamide (**6**)<sup>41</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a faint yellow solid. 63%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.11 (s, 1H), 8.19 (dd, *J* = 2.6, 0.9 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 8.05–7.98 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.68–7.52 (m, 3H), 2.41 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.59, 144.14, 143.00, 133.99, 133.88, 131.99, 128.47, 127.86, 125.57, 125.35, 121.49, 17.90.

Elemental Analysis: calc C 65.62%, H 4.72%, N 10.93%; found C 65.38%, H 4.42%, N 10.74%.

m.p.: 186°C (lit. 181–186°C).<sup>42</sup>

#### *N*-(2,4-Dinitrophenyl)benzamide (**7**)<sup>43</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 23%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.23 (s, 1H), 8.76 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.59 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.05–7.91 (m, 2H), 7.78–7.53 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  164.49, 156.60, 141.19, 139.12, 137.12, 134.71, 131.32, 129.31, 123.56, 121.58, 119.84, 117.83, 116.95.

Elemental Analysis: calc C 54.36%, H 3.16%, N 14.63%; found C 54.21%, H 3.48%, N 14.80%.

m.p.: 199°C (lit: 199–201°C).<sup>44</sup>

#### *N*-(4-Amino-2-methoxyphenyl)benzamide (**8**)<sup>45</sup>

Using Method D the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 90%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.17 (s, 1H), 8.01–7.88 (m, 2H), 7.63–7.40 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.15 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.71 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  153.40, 147.70, 134.82, 131.12, 128.28, 127.29, 126.68, 115.16, 105.13, 97.61, 55.12.

Elemental Analysis: calc C 69.41%, H 5.81%, N 11.56%; found C 69.49%, H 5.82%, N 11.38%.

m.p.: 115°C (lit: 112–113°C).

#### *N*-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)benzamide (**9**)<sup>45</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 60%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.63 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.03–7.88 (m, 3H), 7.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.69–7.49 (m, 3H), 4.00 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.32, 149.81, 143.47, 133.76, 132.16, 128.57, 127.62, 121.16, 116.53, 105.97, 56.55.

Elemental Analysis: calc C 61.76%, H 4.44%, N 10.29%; found C 61.71%, H 4.53%, N 10.33%.

m.p.: 149°C (lit: 148–151°C).

#### *N*-(2-Chloro-4-nitrophenyl)benzamide (**10**)<sup>46</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 59%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.29 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.05–7.95 (m, 2H), 7.73–7.50 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.49, 144.45, 141.31, 133.37, 132.36, 128.59, 128.01, 127.89, 126.58, 124.85, 122.89.

Elemental Analysis: calc C 56.44%, H 3.28%, N 10.13%; found C 56.14%, H 3.38%, N 10.18%.

m.p.: 161°C (lit: 160°C).

#### *N*-(4-Bromophenyl)picolinamide (**11**)<sup>47</sup>

Using Method B the title compound was isolated as a white solid. Yield 75%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.80 (s, 1H), 8.75 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.17 (dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 8.07 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.96–7.88 (m, 2H), 7.69 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.4 Hz, 1H), 7.59–7.52 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.65, 149.66, 148.41, 138.12, 137.77, 131.41, 127.00, 122.46, 122.24, 115.64.

Elemental Analysis: calc C 52.01%, H 3.27%, N 10.11%; found C 51.74%, H 3.06%, N 10.10%.

m.p.: 148°C (lit: 147–148°C).<sup>48</sup>

#### 2-Hydroxy-*N*-phenylbenzamide (**12**)<sup>49</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 61%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.83 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 7.99 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.75–7.69 (m, 2H), 7.51–7.33 (m, 3H), 7.18–7.09 (m, 1H), 7.03–6.93 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  166.57, 158.48, 138.10, 133.62, 128.99, 128.69, 124.15, 120.96, 118.98, 117.42, 117.19.

Elemental Analysis: calc C 73.23%, H 5.20%, N 6.57%; found C 73.13%, H 5.21%, N 6.46%.

m.p.: 132°C (lit: 127–129°C).<sup>50</sup>

#### *N*-(4-Cyanophenyl)-2-hydroxybenzamide (**13**)<sup>51</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 47%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.41 (s, 1H), 10.66 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.88 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.7 Hz, 1H), 7.05–6.92 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  166.45, 157.49, 142.68, 133.67, 133.15, 129.48, 120.40, 119.18, 118.96, 118.47, 117.05, 105.57.

Elemental Analysis: calc C 70.58%, H 4.23%, N 11.76%; found C 70.40%, H 4.11%, N 11.67%.

m.p.: 176°C (lit: 175–176.5°C).<sup>52</sup>

#### *N*-(2,4-Dinitrophenyl)-2-hydroxybenzamide (**14**)<sup>53</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 22%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.41 (s, 1H), 11.96 (s, 1H), 9.01 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 8.88 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.59 (dd, *J* = 9.4, 2.8 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 7.50 (ddd, *J* = 8.6, 7.2, 1.8 Hz, 1H), 7.11–6.97 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.50, 142.73, 137.31, 132.90, 132.80, 128.81, 128.61, 127.91, 125.49, 121.16.

Elemental Analysis: calc C 51.49%, H 2.99%, N 13.86%; found C 51.40%, H 2.77%, N 13.97%.  
m.p.: 212°C (lit: 213–214°C).<sup>54</sup>

**2-Hydroxy-N-(2-methoxy-4-nitrophenyl)benzamide (15)**<sup>55</sup>  
Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 45%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.86 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 8.73 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.45 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.8 Hz, 1H), 7.09–6.96 (m, 2H), 4.04 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.54, 156.01, 147.85, 142.27, 134.60, 133.98, 131.09, 119.89, 118.33, 118.17, 117.34, 116.95, 105.64, 56.78.

Elemental Analysis: calc C 58.33%, H 4.20%, N 9.72%; found C 58.15%, H 4.05%, N 9.54%.

m.p.: 207°C (lit: 205–206°C).

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide (16)**<sup>56</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 55%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.18 (s, 1H), 11.42 (s, 1H), 8.89 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 8.09 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.8 Hz, 1H), 7.16–7.02 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.74, 156.15, 142.21, 141.45, 134.41, 131.14, 124.67, 123.78, 122.09, 120.45, 120.03, 117.82, 116.98.

Elemental Analysis: calc C 53.35%, H 3.10%, N 9.57%; found C 53.05%, H 3.32%, N 9.27%.

m.p.: 219°C (lit: 218–220°C).

**4-Methyl-N-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (17)**

Using Method A the title compound was isolated as a paleyellow solid. Yield 12%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.31 (s, 1H), 8.56 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.92–7.86 (m, 2H), 7.38 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.12, 145.09, 142.45, 141.88, 141.86, 141.84, 131.48, 130.41, 129.09, 127.87, 127.80, 126.04, 125.63, 124.29, 122.32, 122.25, 120.66, 20.99.

Elemental Analysis: calc C 55.56%, H 3.42%, N 8.64%; found C 55.46%, H 3.25%, N 8.39%.

m.p.: 144°C.

**4-Chloro-N-phenylbenzamide (18)**<sup>57</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 63%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.32 (s, 1H), 8.04–7.95 (m, 2H), 7.83–7.74 (m, 2H), 7.65–7.55 (m, 2H), 7.36 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 2H), 7.16–7.07 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.38, 138.92, 136.34, 133.61, 129.57, 128.58, 128.40, 123.77, 120.38.

Elemental Analysis: calc C 67.40%, H 4.35%, N 6.05%; found C 67.37%, H 4.21%, N 5.93%.

m.p.: 198°C (lit: 200–201°C).

**4-Chloro-N-(pyridin-2-yl)benzamide (19)**<sup>58</sup>

Using Method C the title compound was isolated as a white solid. Yield 78%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.13 (s, 1H), 8.51 (ddd, J = 5.7, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.36–8.14 (m, 4H), 7.73–7.60 (m, 2H), 7.47 (ddd, J = 7.1, 5.6, 1.5 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.86, 149.58, 143.24, 142.44, 137.80, 131.38, 130.33, 128.66, 120.45, 116.30.

LC-MS t<sub>R</sub> = 22.3 min; [M+H]<sup>+</sup> = 232.9; 100%.

m.p.: 138°C (lit: 137–139°C).<sup>59</sup>

**4-Chloro-N-(4-cyanophenyl)benzamide (20)**

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 49%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.67 (s, 1H), 8.00 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.97 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.6 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.97, 143.25, 136.87, 133.04, 132.97, 129.75, 128.49, 120.18, 118.98, 105.48.

Elemental Analysis: calc C 65.51%, H 3.53%, N 10.91%; found C 65.62%, H 3.51%, N 10.95%.

m.p.: 208°C.

**4-Chloro-N-(2-methyl-4-nitrophenyl)benzamide (21)**<sup>60</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 52%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.18 (s, 1H), 8.19 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.11 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.57, 144.26, 142.76, 136.83, 134.00, 132.70, 129.81, 128.53, 125.72, 125.36, 121.48, 17.89.

Elemental Analysis: calc C 57.84%, H 3.81%, N 9.64%; found C 58.03%, H 3.99%, N 9.64%.  
m.p.: 193°C.

#### 4-Chloro-*N*-(2-methoxy-4-nitrophenyl)benzamide (**22**)

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 54%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.83 (s, 1H), 8.24 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.03–7.91 (m, 3H), 7.88 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.67–7.58 (m, 2H), 4.00 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.51, 150.30, 143.83, 136.97, 133.55, 132.59, 129.72, 128.60, 122.03, 116.45, 106.18, 56.56.

Elemental Analysis: calc C 54.83%, H 3.62%, N 9.13%; found C 54.67%, H 3.57%, N 8.86%.

m.p.: 200°C (decomposition).

#### 4-Chloro-*N*-(2-chloro-4-nitrophenyl)benzamide (**23**)

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 17%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.42 (s, 1H), 8.43 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.27 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 8.09–7.98 (m, 3H), 7.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.56, 144.69, 141.12, 137.19, 132.13, 129.87, 128.69, 128.32, 127.00, 124.90, 122.89.

Elemental Analysis: calc C 50.19%, H 2.59%, N 9.00%; found C 50.44%, H 2.30%, N 8.96%.

m.p.: 219°C.

#### 4-Bromo-*N*-(2-chloro-4-nitrophenyl)benzamide (**24**)

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 20%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.41 (s, 1H), 8.41 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.27 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.99–7.92 (m, 2H), 7.83–7.76 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.70, 144.65, 141.10, 132.49, 131.62, 130.00, 128.25, 126.92, 126.19, 124.88, 122.88.

Elemental Analysis: calc C 43.91%, H 2.27%, N 7.88%; found C 43.65%, H 1.90%, N 7.53%.

m.p.: 205°C.

#### 5-Amino-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (**25**)<sup>61</sup>

Using Method D the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 90%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.47 (s, 1H), 7.69 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.21–7.15 (m, 1H), 7.12 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 4.72 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.96, 148.64, 140.98, 138.50, 128.72, 123.71, 120.37, 120.29, 118.02, 117.50, 113.68.

Elemental Analysis: calc C 68.41%, H 5.30%, N 12.27%; found C 68.01%, H 4.96%, N 12.38%.

m.p.: 176°C (lit: 174–176°C).<sup>62</sup>

#### 2-Hydroxy-5-nitro-*N*-phenylbenzamide (**26**)<sup>61</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 61%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.78 (s, 1H), 10.57 (s, 1H), 8.79 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 8.29 (dd, J = 9.1, 2.9 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.16 (dd, J = 8.4, 5.5 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.08, 163.27, 139.34, 137.89, 128.75, 128.33, 125.71, 124.39, 120.77, 119.33, 117.97.

Elemental Analysis: calc C 60.47%, H 3.90%, N 10.85%; found C 60.20%, H 3.85%, N 10.65%.

m.p.: 223°C (lit: 219–221°C).

#### 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamide (**27**)<sup>56</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 62%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.87 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 7.98 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.77–7.64 (m, 2H), 7.47 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.43–7.32 (m, 2H), 7.21–7.10 (m, 1H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.96, 156.87, 137.95, 132.99, 128.72, 128.32, 124.29, 122.68, 120.81, 119.45, 119.04.

Elemental Analysis: calc C 63.04%, H 4.07%, N 5.66%; found C 62.83%, H 4.17%, N 5.55%.

m.p.: 209°C (lit: 211–212°C).<sup>63</sup>

#### 5-Chloro-*N*-(2-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide (**28**)<sup>64</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 46%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.26 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 8.40 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 7.43–7.34 (m, 1H), 7.17 (ddd, J = 8.0, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d6) δ 162.59, 155.35, 134.98, 133.33, 129.72, 129.29, 127.78, 125.32, 123.46, 122.76, 119.58, 118.99.

Elemental Analysis: calc C 55.35%, H 3.22%, N 4.96%; found C 55.35%, H 3.31%, N 4.75%.

m.p.: 189°C (lit: 184–186°C).<sup>62</sup>

**5-Chloro-N-(3-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide (29)**<sup>56</sup>  
Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 41%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.65 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 7.92 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.61 (ddd, J = 8.3, 2.1, 1.0 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.20 (ddd, J = 8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d6) δ 164.96, 156.41, 139.55, 133.01, 130.39, 128.44, 123.87, 122.72, 120.05, 119.94, 118.99.

Elemental Analysis: calc C 55.35%, H 3.22%, N 4.96%; found C 55.12%, H 3.25%, N 4.86%.

m.p.: 219°C (lit: 217–218°C).<sup>62</sup>

**Ethyl 4-(5-chloro-2-hydroxybenzamido)benzoate (30)**<sup>65</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 37%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.63 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 8.03–7.93 (m, 2H), 7.92–7.83 (m, 3H), 7.47 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.30 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.22, 164.87, 156.25, 142.53, 132.99, 130.11, 128.61, 125.00, 122.74, 120.28, 119.80, 118.96, 60.49, 14.17.

Elemental Analysis: calc C 60.10%, H 4.41%, N 4.38%; found C 60.46%, H 4.38%, N 4.32%.

m.p.: 214°C (lit: 212–214°C).

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (31)**<sup>66</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 62%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.65 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 8.7, 0.9 Hz, 2H), 7.46 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.02, 156.30, 141.75, 141.73, 133.02, 128.57, 125.97, 125.92, 122.78, 120.39, 120.07, 118.95.

Elemental Analysis: calc C 53.27%, H 2.87%, N 4.44%; found C 53.09%, H 2.63%, N 4.38%.

m.p.: 221°C (lit: 222–223°C).<sup>63</sup>

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-nitrophenyl)benzamide (32)**<sup>65</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 9%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.46 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 8.28 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.98, 155.83, 144.50, 142.70, 133.00, 128.73, 124.85, 122.77, 120.88, 120.01, 118.90.

Elemental Analysis: calc C 53.35%, H 3.10%, N 9.57%; found C 53.37%, H 3.02%, N 9.36%.

m.p.: 259°C (lit: 260–262°C).<sup>62</sup>

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)benzamide (33)**<sup>63</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 60%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.76 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 7.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.46 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.41–7.30 (m, 2H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.04, 156.73, 144.25 (m), 137.21, 133.02, 128.36, 122.71, 122.12, 121.46, 119.51, 118.99.

Elemental Analysis: calc C 50.70%, H 2.74%, N 4.22%; found C 50.30%, H 2.65%, N 4.06%.

m.p.: 200°C (lit: 200–202°C).

**N-(4-Bromophenyl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide (34)**<sup>67</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 55%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.75 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.76–7.65 (m, 2H), 7.59–7.50 (m, 2H), 7.45 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.92, 156.63, 137.43, 133.00, 131.52, 128.38, 122.71, 122.57, 119.64, 119.00, 115.97.

Elemental Analysis: calc C 47.81%, H 2.78%, N 4.29%; found C 47.49%, H 2.47%, N 3.94%.

m.p.: 237°C (lit: 240–241.5°C).<sup>68</sup>

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(2-methyl-4-nitrophenyl)benzamide (35)**<sup>69</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 16%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.33 (s, 1H), 10.73 (s, 1H), 8.52 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.25–8.11 (m, 2H), 7.98 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.53 (dd,  $J$  = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 7.10 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR not performed due to poor solubility.

Elemental Analysis: calc C 54.83%, H 3.62%, N 9.13%; found C 54.78%, H 3.32%, N 8.96%.

m.p.: 229°C (lit: 225–227).

**N-(2,4-Bis(trifluoromethyl)phenyl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide (36)**<sup>70</sup>

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 51%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.42 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 7.91–7.63 (m, 2H), 7.39 (dd,  $J$  = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.46, 156.39, 140.14, 133.21, 130.64 (q,  $J$  = 32.9 Hz), 128.47, 124.94, 122.73, 121.33, 120.22, 119.74, 118.97, 116.70 (q,  $J$  = 7.8, 4.0 Hz).

Elemental Analysis: calc C 46.96%, H 2.10%, N 3.65%; found C 46.73%, H 1.70%, N 3.61%.

m.p.: 171°C.

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (37)**

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 63%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.51 (s, 1H), 11.24 (s, 1H), 8.77 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 8.53 (dd,  $J$  = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 8.43 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.51 (dd,  $J$  = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.06 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  162.50, 155.11, 142.28, 141.10, 134.09, 130.06, 128.68, 123.81, 123.74, 122.11, 122.02, 118.98, 118.95, 118.26.

Elemental Analysis: calc C 46.62%, H 2.24%, N 7.77%; found C 46.32%, H 1.94%, N 7.64%.

m.p.: 191°C.

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(2-methoxy-4-nitrophenyl)benzamide (38)**<sup>71</sup>

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 13%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.25 (s, 1H), 11.24 (s, 1H), 8.69 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.04–7.82 (m, 3H), 7.50 (dd,  $J$  = 8.7, 2.9 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  162.21, 154.92, 147.93, 142.54, 134.19, 133.54, 130.00, 123.62, 119.85, 119.04, 118.34, 117.31, 105.72, 56.84.

Elemental Analysis: calc C 52.10%, H 3.28%, N 8.68%; found C 52.10%, H 3.28%, N 8.65%.

m.p.: 230°C (lit: 233–235°C).<sup>72</sup>

**Dimethyl 2-(5-chloro-2-hydroxybenzamido)terephthalate (39)**

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 57%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.05 (s, 1H), 11.89 (s, 1H), 9.23 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J$  = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.49 (dd,  $J$  = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.06 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  166.13, 165.35, 163.21, 155.43, 139.41, 133.74, 133.34, 131.12, 129.96, 123.60, 123.07, 122.67, 121.54, 120.19, 118.83, 52.78, 52.58.

Elemental Analysis: calc C 56.13%, H 3.88%, N 3.85%; found C 56.53%, H 3.64%, N 4.00%.

m.p.: 193°C.

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(5-fluoro-2-nitrophenyl)benzamide (40)**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 11%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.24 (s, 1H), 12.20 (s, 1H), 8.58 (dd,  $J$  = 11.9, 2.9 Hz, 1H), 8.30 (dd,  $J$  = 9.2, 5.8 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.49 (dd,  $J$  = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 7.20 (ddd,  $J$  = 9.8, 7.3, 3.0 Hz, 1H), 7.05 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164.87 (d,  $J$  = 252.5 Hz), 163.08, 155.34, 136.01 (d,  $J$  = 13.7 Hz), 134.52 (d,  $J$  = 2.7 Hz), 133.83, 130.12, 128.75 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 123.36, 119.48, 118.92, 111.09 (d,  $J$  = 24.2 Hz), 109.40 (d,  $J$  = 29.8 Hz).

Elemental Analysis: calc C 50.26%, H 2.60%, N 9.02%; found C 50.19%, H 2.73%, N 9.02%.

m.p.: 178°C.

**5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamide (41)**

Using Method A the title compound was isolated as a brown solid. Yield 37%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.61 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 8.50 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J$  = 8.1, 2.5 Hz, 2H), 7.58–7.44 (m, 2H), 7.03 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.18, 156.50, 148.51, 137.04, 133.10, 133.04, 128.39, 128.15, 125.13, 122.69, 119.80, 119.02, 115.79, 19.19.

Elemental Analysis: calc C 54.83%, H 3.62%, N 9.13%; found C 55.21%, H 3.50%, N 8.73%.

m.p.: 278°C.

#### 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-(3,4-dimethoxyphenyl)benzamide (42)<sup>73</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 29%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.04 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.02, 157.36, 148.46, 145.70, 133.03, 131.21, 127.99, 122.58, 119.10, 118.81, 113.05, 111.77, 106.00, 55.63, 55.42.

Elemental Analysis: calc C 58.55%, H 4.59%, N 4.55%; found C 58.53%, H 4.68%, N 4.46%.

m.p.: 185°C.

#### 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-(3,5-dichlorophenyl)benzamide (43)<sup>63</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 56%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.75–11.27 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 7.90–7.76 (m, 2H), 7.47 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  164.99, 156.11, 140.56, 133.99, 133.05, 128.53, 123.23, 122.74, 120.21, 118.93, 118.54.

Elemental Analysis: calc C 49.32%, H 2.55%, N 4.42%; found C 49.70%, H 2.20%, N 4.36%.

m.p.: 247 °C (lit: 247–249 °C).

#### 2-Chloro-4-nitro-*N*-(2-chlorophenyl)benzamide (44)

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 50%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.52 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.32 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.43 (td, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.32 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.90, 148.38, 141.98, 133.87, 131.20, 130.11, 129.72, 128.35, 127.69, 127.56, 124.57, 122.40.

Elemental Analysis: calc C 50.19%, H 2.59%, N 9.00%; found C 50.11%, H 2.70%, N 8.81%.

m.p.: 171°C.

#### 2-Chloro-4-nitro-*N*-(3-chlorophenyl)benzamide (45)

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 51%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.95 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.32 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.99–7.87 (m, 2H), 7.58 (ddd, *J* = 8.3, 2.1, 1.0 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.57, 148.44, 141.85, 139.78, 133.18, 131.09, 130.62, 130.06, 124.63, 123.98, 122.49, 119.14, 118.09.

Elemental Analysis: calc C 50.19%, H 2.59%, N 9.00%; found C 50.26%, H 2.64%, N 8.92%.

m.p.: 163°C.

#### 2-Chloro-4-nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamide (46)<sup>74</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 39%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.36 (s, 1H), 8.45 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.36–8.25 (m, 3H), 7.97 (dd, *J* = 8.7, 5.3 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164.04, 148.58, 144.35, 142.96, 141.45, 131.09, 130.15, 125.03, 124.67, 122.54, 119.54.

Elemental Analysis: calc C 48.54%, H 2.51%, N 13.06%; found C 48.16%, H 2.63%, N 12.81%.

m.p.: 197°C (lit: 196–198°C).

#### 2-Chloro-4-nitro-*N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)benzamide (47)

Using Method B the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 20%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.26 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.88, 148.22, 147.47, 142.16, 131.16, 130.13, 126.51, 124.96, 124.35, 122.24, 121.98, 116.59.

Elemental Analysis: calc C 47.79%, H 2.47%, N 8.56%; found C 47.68%, H 2.48%, N 8.51%.

m.p.: 223°C.

#### 3,4-Diethoxy-*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)benzamide (48)

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 66%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.22 (s, 1H), 7.95–7.81 (m, 2H), 7.60 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.41–7.30 (m, 2H), 7.08 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.11 (qd,  $J$  = 7.0, 1.7 Hz, 4H), 1.36 (td,  $J$  = 6.9, 1.1 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.01, 151.23, 147.59, 143.67, 143.64, 138.50, 126.46, 121.63, 121.35, 121.16, 112.52, 111.99, 63.96, 63.82, 14.67, 14.55.

Elemental Analysis: calc C 58.54%, H 4.91%, N 3.79%; found C 58.64%, H 5.16%, N 3.66%.

m.p.: 173°C.

### 3,4-Diethoxy-*N*-(4-bromophenyl)benzamide (49)

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 57%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.16 (s, 1H), 7.79–7.71 (m, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.56–7.49 (m, 3H), 7.07 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.11 (qd,  $J$  = 7.0, 1.3 Hz, 4H), 1.36 (td,  $J$  = 7.0, 1.1 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  164.96, 151.19, 147.57, 138.67, 131.31, 126.53, 122.22, 121.14, 115.03, 112.48, 111.99, 63.96, 63.82, 14.69, 14.57.

Elemental Analysis: calc C 56.06%, H 4.98%, N 3.85%; found C 56.19%, H 5.26%, N 3.77%.

m.p.: 198°C.

### 3,4-Diethoxy-*N*-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (50)

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 64%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.20 (s, 1H), 8.56 (dd,  $J$  = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 8.52 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.93 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.24–4.01 (m, 4H), 1.37 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.66, 151.64, 147.68, 145.02, 142.03, 131.43, 127.87, 125.97, 125.56, 125.10, 122.36, 121.35, 112.38, 112.13, 63.92, 63.88, 14.63, 14.53.

Elemental Analysis: calc C 54.27%, H 4.30%, N 7.03%; found C 54.18%, H 4.22%, N 6.96%.

m.p.: 158°C.

### 3,4-Diethoxy-*N*-(2-chloro-4-nitrophenyl)benzamide (51)

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 65%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.08 (s, 1H), 8.41 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.26 (dd,  $J$  = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 8.04 (d,

$J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.64 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.12 (qd,  $J$  = 6.9, 5.4 Hz, 4H), 1.37 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  164.82, 151.71, 147.70, 144.28, 141.56, 127.89, 126.54, 125.22, 124.84, 122.86, 121.51, 112.43, 112.10, 63.94, 63.89, 14.65, 14.54.

Elemental Analysis: calc C 55.98%, H 4.70%, N 7.68%; found C 56.00%, H 4.69%, N 7.54%.

m.p.: 168°C.

### *N*-Phenylbenzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (52)<sup>75</sup>

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 64%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.06 (s, 1H), 7.83–7.72 (m, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J$  = 8.5, 7.3 Hz, 2H), 7.15–7.02 (m, 2H), 6.14 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  164.44, 149.98, 147.32, 139.18, 128.70, 128.50, 123.46, 122.79, 120.31, 107.87, 107.68, 101.76.

Elemental Analysis: calc C 69.70%, H 4.60%, N 5.81%; found C 69.54%, H 4.65%, N 5.77%.

m.p.: 142°C (lit: 138–139°C).<sup>76</sup>

### *N*-(4-Cyanophenyl)benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (53)

Using Method A the title compound was isolated as a white solid. Yield 48%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.44 (s, 1H), 7.97 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.80 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.15 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.02, 150.42, 147.41, 143.54, 133.02, 128.01, 123.21, 120.06, 119.06, 107.96, 107.80, 105.10, 101.91.

Elemental Analysis: calc C 67.67%, H 3.79%, N 10.52%; found C 67.62%, H 3.87%, N 10.67%.

m.p.: 193°C.

### *N*-(2-Methyl-4-nitrophenyl)benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (54)

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 18%

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.92 (s, 1H), 8.19 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 8.10 (dd,  $J$  = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.09 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.15 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.56, 150.40, 147.43, 144.05, 143.11, 133.85, 127.74, 125.59, 125.33, 123.20, 121.47, 108.02, 107.83, 101.88, 17.89.

Elemental Analysis: calc C 60.00%, H 4.03%, N 9.33%; found C 59.85%, H 3.76%, N 9.22%.

m.p.: 230°C.

**N-(2,4-Dinitrophenyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (55)**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 10%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.04 (s, 1H), 8.74 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.57 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.17 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.49, 151.20, 147.73, 142.52, 140.60, 137.48, 128.56, 126.54, 125.30, 123.62, 121.14, 108.26, 107.68, 102.18.

Elemental Analysis: calc C 50.77%, H 2.74%, N 12.69%; found C 50.84%, H 2.46%, N 12.68%.

m.p.: 200°C.

**N-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (56)**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 33%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.53 (s, 1H), 8.24 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.94 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.15 (s, 2H), 4.01 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.40, 150.58, 150.01, 147.55, 143.50, 133.87, 127.62, 123.09, 121.56, 116.53, 108.09, 107.67, 106.07, 101.96, 56.57.

Elemental Analysis: calc C 56.97%, H 3.82%, N 8.86%; found C 56.67%, H 3.71%, N 8.64%.

m.p.: 237°C.

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (57)**

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 53%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.41 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.16 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.49, 150.72, 147.55, 144.38, 141.41, 127.99, 127.12, 126.65, 124.85, 123.39, 122.86, 108.12, 107.78, 101.99.

Elemental Analysis: calc C 52.44%, H 2.83%, N 8.74%; found C 52.20%, H 2.85%, N 8.65%.

m.p.: 227°C.

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)-2-naphthamide (58)**

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 52%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.86 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.43–8.37 (m, 1H), 8.31 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.19 (ddd, J = 9.3, 2.6, 0.5 Hz, 1H), 7.99–7.82 (m, 4H), 7.63–7.49 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.44, 143.07, 140.51, 135.31, 132.57, 130.76, 129.30, 129.24, 128.64, 128.32, 127.92, 127.37, 124.76, 123.83, 123.06, 122.59, 120.24.

Elemental Analysis: calc C 62.49%, H 3.39%, N 8.57%; found C 62.72%, H 3.09%, N 8.71%.

m.p.: 225°C.

**1-Hydroxy-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-naphthamide (59)<sup>56</sup>**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 10%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.21 (s, 1H), 11.64 (s, 1H), 8.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.46 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.56 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.46–7.35 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.56, 152.25, 142.46, 141.41, 136.28, 133.41, 129.23, 128.86, 127.21, 125.73, 124.81, 124.14, 123.93, 122.35, 120.73, 120.10, 110.95.

Elemental Analysis: calc C 59.58%, H 3.24%, N 8.17%; found C 58.97%, H 3.20%, N 7.67%.

m.p.: 230°C (lit: 233°C).<sup>77</sup>

**3-Hydroxy-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-2-naphthamide (60)<sup>78</sup>**

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 26%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.20 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 8.7, 4.6 Hz, 3H), 7.51 (ddd, J = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.42–7.31 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.84, 153.25, 142.22, 135.71, 130.63, 128.66, 128.11, 126.83, 126.12, 126.06, 126.01, 125.75, 123.72, 122.51, 120.11, 110.47.

Elemental Analysis: calc C 65.26%, H 3.65%, N 4.23%; found C 64.43%, H 3.69%, N 3.93%.

m.p.: 280°C (lit: 276–278°C).

**3-Hydroxy-N-(4-bromophenyl)-2-naphthamide (61)<sup>78</sup>**

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 29%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.22 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.83–7.71 (m, 4H), 7.63–7.45 (m, 4H), 7.42–7.30 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.64, 153.46, 137.91, 135.70, 131.57, 130.44, 128.65, 128.09, 126.82, 125.75, 123.72, 122.26, 122.12, 115.62, 110.48.

Elemental Analysis: calc C 59.67%, H 3.53%, N 4.09%; found C 59.37%, H 3.56%, N 3.98%.

m.p.: 250°C (lit: 248–250°C).

**3-Hydroxy-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-naphthamide (62)<sup>79</sup>**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 13%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.06 (s, 1H), 11.92–11.53 (m, 1H), 8.50–8.42 (m, 2H), 8.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.72–7.54 (m, 2H), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.42, 143.79, 141.30, 136.40, 129.02, 127.62, 126.20, 125.80, 124.85, 124.75, 124.52, 123.42, 123.35, 109.88.

Elemental Analysis: calc C 59.58%, H 3.24%, N 8.17%; found C 59.36%, H 3.25%, N 8.05%.

m.p.: 238°C.

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)-3-methyl-1H-indene-2-carboxamide (63)**

Using Method A the title compound was isolated as a pale-yellow solid. Yield 47%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.90 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.46–8.29 (m, 2H), 8.21 (dd, J = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 7.57 (ddt, J = 5.3, 3.8, 1.9 Hz, 2H), 7.50–7.39 (m, 2H), 3.80 (q, J = 2.4 Hz, 2H), 2.69 (t, J = 2.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.71, 152.04, 145.10, 142.64, 141.96, 140.74, 130.78, 128.36, 127.23, 124.68, 124.04, 123.76, 122.02, 121.40, 119.77, 38.03, 12.76.

Elemental Analysis: calc C 62.11%, H 3.99%, N 8.54%; found C 62.23%, H 3.59%, N 8.29%.

m.p.: 216°C.

**N-(2,4-Dinitrophenyl)benzofuran-2-carboxamide (64)**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 13%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.58 (s, 1H), 8.82 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.94–7.84 (m, 2H), 7.78 (dd, J = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (td, J = 7.6, 1.0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR not performed due to poor solubility.

Elemental Analysis: calc C 55.05%, H 2.77%, N 12.84%; found C 54.77%, H 2.67%, N 12.85%.

m.p.: 237°C.

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)benzofuran-2-carboxamide (65)**

Using Method A the title compound was isolated as a yellow solid. Yield 54%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 9.13 (s, 1H), 8.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.15 (ddd, J = 9.2, 2.6, 0.6 Hz, 1H), 7.71–7.65 (m, 1H), 7.62 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.54 (dq, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.44 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.29 (ddd, J = 8.0, 7.2, 1.1 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.56, 155.05, 147.26, 143.26, 139.86, 128.12, 127.41, 124.84, 124.33, 123.71, 123.13, 122.73, 120.23, 113.21, 112.13.

Elemental Analysis: calc C 56.89%, H 2.86%, N 8.85%; found C 56.99%, H 2.78%, N 8.64%.

m.p.: 203°C.

**N-(2-Chloro-4-nitrophenyl)benzo[b]thiophene-2-carboxamide (66)<sup>80</sup>**

Using Method A the title compound was isolated as an off-white solid. Yield 21%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.59 (s, 1H), 8.49–8.39 (m, 2H), 8.28 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 8.13–7.99 (m, 3H), 7.58–7.45 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.53, 144.74, 140.72, 140.63, 138.90, 138.05, 128.21, 127.35, 127.03, 126.94, 125.69, 125.20, 124.97, 122.93, 122.90.

Elemental Analysis: calc C 54.14%, H 2.73%, N 8.42%, S 9.63%; found C 54.34%, H 2.46%, N 8.37%, S 9.49%.

m.p.: 228°C.

**Chemistry****General Synthesis Procedures****Method A**

The aniline derivative (6 mmol, 1 eq) and the aromatic acid derivative (6 mmol, 1 eq) were suspended in toluene (10 mL). After heating to reflux and dissolving of the precipitate, phosphor trichloride (2.4 mmol, 0.4 eq) was

added in a dropwise manner. The reaction was monitored using TLC (ethyl acetate:n-hexane 1:4). After reaction completion, the hot mixture was filtered and the organic solution was stored at 5 °C. The formed precipitate was filtered off, washed with ice-cold toluene and recrystallized from toluene.<sup>17</sup>

#### Method B

1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) (9 mmol, 1.5 eq) was dissolved in THF (10 mL). To this solution the respective aromatic acid (9 mmol, 1.5 eq) was added dissolved in THF (10 mL). After 10 min stirring at room temperature, a solution of the aniline derivative (6 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature and then refluxed overnight. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in ethylacetate. The organic phase was then washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution and brine. After drying over magnesium sulfate, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was recrystallized from toluene.<sup>18</sup>

#### Method C

The respective pyridine derivative (6 mmol, 1 eq) and the benzoyl chloride derivative (6 mmol, 1 eq) were sealed in a glass vial. The reaction mixture was stirred for 4 min at 160°C under microwave irradiation. The resulting mixture was recrystallized from ethanol.<sup>19</sup>

#### Method D

The respective nitro derivative (**6**, **9**, **26**) (6 mmol, 1 eq) was dissolved in dried ethanol (20 mL). After adding Pd/C (0.6 mmol, 0.1 eq) and hydrazine monohydrate (60 mmol, 10 eq), the mixture was refluxed for 2 h and afterwards stirred for another 45 min at room temperature. Filtration via a short Celite column and evaporation of the solvent afforded the desired compounds (**5**, **8**, **25**).<sup>20</sup>

### Enzymology

Monoamine oxidase A/B inhibition assays were performed as described previously using the discontinuous fluorimetric method with kynuramine as MAO substrate.<sup>21</sup> For the screening (test concentration:  $10^{-6}$  M) and  $IC_{50}$  determinations (ten suitable concentrations ranging from  $10^{-11}$  to  $10^{-5}$  M), the test compounds were pre-mixed with the substrate ( $2 \times K_M$  final concentration;  $K_M$  of 20  $\mu$ m and

30  $\mu$ m for MAO A and B, respectively). MAO A ( $1.25 \text{ ng mL}^{-1}$ , 900 units  $\text{mL}^{-1}$ ) or MAO B ( $1.67 \text{ ng mL}^{-1}$ , 375 units  $\text{mL}^{-1}$ ), respectively, was added to start the reactions. The reaction mixtures were incubated for 20 min incubation time at 37°C. All enzyme assays were conducted in pre-warmed potassium phosphate buffer (50 mM, pH = 7.4) and a final assay volume of 100  $\mu$ L. Reactions were stopped by adding 35  $\mu$ L sodium hydroxide solution (2 N) to the assay mixture. The enzyme activity was determined by measuring the 4-hydroxyquinoline formed during incubation time (expressed as RFU;  $\lambda_{Em} = 405 \pm 20 \text{ nm}$  and  $\lambda_{Ex} = 320 \pm 20 \text{ nm}$ ). Compounds showing a MAO B inhibition >90% at  $10^{-6}$  M were evaluated for their  $IC_{50}$ -values. The  $IC_{50}$  curves were fitted (via nonlinear regression) either to the respective bottom plateau (graphically defined by RFUs for the at least two highest concentrations used, see [Figure S12](#) in [supplemental material](#)) or set to zero in case when the bottom plateau was not reached with highest concentration tested (leading to “ $IC_{50}$  estimates”). The highest concentrations to be tested had to be identified considering each compound’s solubility and potential interfering fluorescence properties under assay conditions.

Reversibility of inhibition was confirmed via preincubation of inhibitor ( $10 \times IC_{50}$  in preincubation setting) with MAO B (10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  in preincubation setting) for 0, 30, 60 and 90 min (37 °C), followed by 50 $\times$  dilution in buffer and assayed with an excess of substrate ( $10 \times K_M$  final concentration) as described above.<sup>21</sup> Data were calculated as percentage of vehicle control (DMSO; set to 100% enzyme activity remained) for each time point.

Mode of MAO B inhibition was determined by substrate-dependent (seven concentrations, 5 to 400  $\mu$ m kynuramine) Michaelis-Menten kinetic analysis without inhibitor and in the presence of five different inhibitor concentrations (0.25 $\times$ , 0.5 $\times$ , 0.75 $\times$ , 1 $\times$  and 2  $\times IC_{50}$ ) and assayed as described above. Data were fitted using nonlinear “Competitive inhibition” fit and transformed into double reciprocal (Lineweaver–Burk) plots. The slopes of respective Lineweaver–Burk linearization were plotted against inhibitor concentration for additional  $K_i$  determination.<sup>22</sup>

All data were analyzed with GraphPad Prism 6.

### Molecular Modelling

The crystal structure 2Z5X<sup>23</sup> was used as the representative complex structure of MAO A and the crystal structure 6FVZ<sup>9</sup> for MAO B. Both crystal structures were chosen due to the lipophilicity of the crystallized

ligands (HRM for MAO A and E8Z for MAO B) and the presence of a peptide bond of the MAO B ligand. The enzyme structures were prepared using the Quick Prep tool in MOE 2018.0101 (Chemical Computing Group Inc., Canada) including protonation and energy minimization. Poses were generated using the Dock tool in MOE 2018.0101. A general docking was conducted. In case of MAO A, solvent was ignored. The placement method triangle matcher with the scoring function London dG was chosen. The refinement method rigid receptor with the scoring function Alpha HB was chosen.

### Pharmacophore Modeling

The pharmacophore hypotheses of the MAO A and B inhibitors were constructed using the HipHop module of Discovery studio software 2.5.5. A subset of 25 representative compounds was selected and classified as active, moderately active, and inactive (Table S1 in the supplemental material). In total 16 HipHop runs were separately conducted for MAO A and MAO B ligands that ultimately generate 160 models (10 from each run) for each target by varying the types and ranges of pharmacophoric features and the number of features (Table S2 in the supplemental material). The generated models were allowed to compete in Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis to assess their abilities to selectively capture diverse MAO A or MAO B inhibitors from a large list of decoys. The decoy list was prepared as described by Verdonk et al.<sup>24</sup> The testing sets include structurally diverse active inhibitors of 14 MAO A and 18 MAO B retrieved from literature.<sup>14,25,26</sup> 36 decoys were selected for each active compound in the testing set retrieved from ZINC-database. The ROC testing set was screened by each pharmacophore for ROC analysis employing the "Best rigid search" option, while the conformational spaces of the compounds were generated employing the "CAESAR conformation generation option". Compounds missing one or more features were discarded from hit lists. The validity of a particular pharmacophore is assessed by the area under the curve (AUC) of the corresponding ROC curve, as well as accuracy, specificity, true positive rate, and false negative rate of the pharmacophore. Table S3 and Figure S10 in the supplemental material show the ROC performance of the best pharmacophore models generated for MAO A and MAO B. The active/

inactive classification accuracy of these models is good with ROC-AUC values of 0.779 and 0.750 for MAO A and MAO B models, respectively. Further theoretical and experimental methodology of ROC analyses are described in supplemental material.

## Results and Discussion

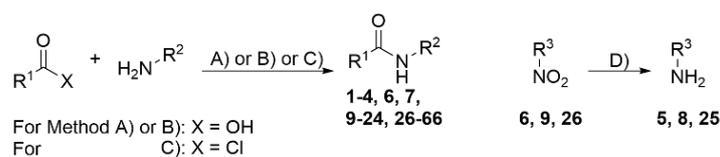
### Chemistry

In 2018 the European Medicines Agency (EMA) recommended 22 biological active small molecules for market authorization.<sup>27</sup> All newly approved small molecules exhibit rather complex structures with the need for multistep synthesis, often including stereoselective synthesis steps. Using a one-step synthesis followed by easy purification procedures, we generated a series of promising MAO A/B inhibitors. These small entities might be of interest for the development of selective or multitargeting MAO A/B inhibitors. The substituted aromatic amides were synthesized in low to good yields via activation of the carboxylic acid using either  $\text{PCl}_3$  or CDI. CDI was used as a coupling agent for compound 47 to prevent condensation to a substituted benzoxazole, which was the major product using  $\text{PCl}_3$  method. For compounds 2 and 19, solvent free acylation using benzoyl chloride derivatives was performed under microwave irradiation (Figure 1). The aromatic amines (5, 8, 25) were obtained in excellent yields from reduction of the respective nitro derivatives (6, 9, 26). Due to their simple structures, many of our compounds have been described previously, but to our knowledge none of them were determined as potent inhibitors for MAO A or B so far.

### Biological Activity

#### MAO A and B Inhibition

An enzyme inhibition screening at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  revealed that the synthesized anilides showed the presumed MAO inhibition potency. The majority of derivatives (32 compounds) were found to be MAO B-preferring inhibitors, while 24 compounds were not selective for either of the isoforms and only ten compounds exhibited MAO A preference (Table 1 and see Figure 2 for all compound structures). The most potent MAO inhibitors were chosen for further  $\text{IC}_{50}$  evaluation. Six compounds (31, 33, 34, 39, 55, and 65) showed >90% inhibition of MAO B. The most potent MAO A-preferring inhibitor (with MAO B inhibition <50%), compound 7 was also considered for additional investigations.



**Figure 1** Synthetic route to the amide analogs **1-4, 6, 7, 9-24, 26-66**. Reagents and conditions: (A)  $\text{PCl}_3$ , toluene, reflux. (B) CDI, THF, reflux. (C) mw, 160 °C. For  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ , and  $\text{R}^3$  see Table 1.

Compounds **31, 33, 34, 55**, and **65** showed the expected preference for MAO B with  $\text{IC}_{50}$  values in nanomolar concentration ranges ( $\text{IC}_{50}$  values between 55 nM and 139 nM; Table 2). A preference for MAO A could be confirmed for compound **7 (ST-2023)** (MAO A,  $\text{IC}_{50}$  = 126 nM) with an  $\text{IC}_{50}$  > 1000 nM for MAO B; selectivity index, SI = 0.1). The potent MAO

**Table 1** MAO A and B Inhibition Percentages Measured at One-Point Screening of Anilides (Screening Concentration 1  $\mu\text{M}$ )

n	% Inhibition at 1 $\mu\text{M}$		n	% Inhibition at 1 $\mu\text{M}$	
	MAO A	MAO B		MAO A	MAO B
1	12±8	5±3	15	9±3	7±5
2	11±5	2±4	16	20±12	14±10
3	29±3	27±3	17	10±5	69±28
4	24±20	29±3	18	18±5	24±9
5	1±2	-2±3	19	13±2	11±7
6	16±7	7±5	20	72±2	61±4
7	<b>82±2</b>	46±4	21	13±1	10±7
8	10±4	1±3	22	2±1	14±3
9	14±7	14±5	23	23±3	25±4
10	28±8	25±3	24	27±4	48±5
11	48±3	85±1	25	25±2	11±4
12	28±8	5±3	26	11±2	2±3
13	50±4	32±10	27	20±6	44±23
14	49±5	18±11	28	8±4	5±2
29	15±1	87±5	41	8±4	85±3
30	7±3	38±7	42	5±3	30±5
31	<b>82±1</b>	<b>104±2</b>	43	4±8	0±5
32	45±5	66±5	44	34±3	6±2
33	74±2	<b>96±2</b>	45	13±2	36±4
34	71±5	<b>96±1</b>	46	13±3	68±2
35	8±1	5±10	47	35±3	36±4

(Continued)

Table 1 (Continued).

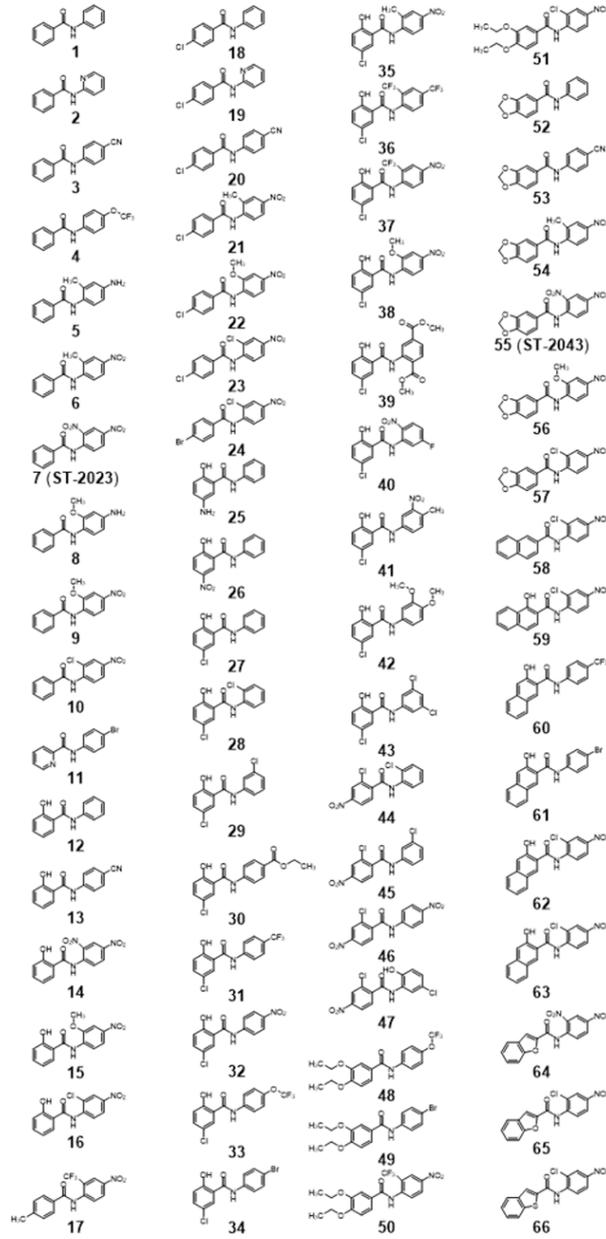
n	% Inhibition at 1 $\mu$ m		n	% Inhibition at 1 $\mu$ m	
	MAO A	MAO B		MAO A	MAO B
36	6 $\pm$ 4	84 $\pm$ 12	48	5 $\pm$ 5	1 $\pm$ 2
37	13 $\pm$ 4	30 $\pm$ 10	49	3 $\pm$ 3	13 $\pm$ 6
38	9 $\pm$ 2	-2 $\pm$ 2	50	6 $\pm$ 5	62 $\pm$ 2
39	20 $\pm$ 8	<b>91<math>\pm</math>1</b>	51	3 $\pm$ 4	34 $\pm$ 2
40	8 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	52	19 $\pm$ 4	80 $\pm$ 4
53	38 $\pm$ 6	87 $\pm$ 1	60	-12 $\pm$ 18	67 $\pm$ 2
54	7 $\pm$ 9	24 $\pm$ 26	61	-3 $\pm$ 5	72 $\pm$ 2
55	44 $\pm$ 4	<b>91<math>\pm</math>2</b>	62	-2 $\pm$ 20	48 $\pm$ 5
56	1 $\pm$ 2	47 $\pm$ 5	63	-3 $\pm$ 19	44 $\pm$ 23
57	9 $\pm$ 9	62 $\pm$ 7	64	84 $\pm$ 2	80 $\pm$ 4
58	11 $\pm$ 7	58 $\pm$ 1	65	52 $\pm$ 10	<b>92<math>\pm</math>4</b>
59	-4 $\pm$ 10	28 $\pm$ 2	66	11 $\pm$ 8	40 $\pm$ 31

Notes: \*Data represent mean values  $\pm$  standard deviation of at least two independent experiments each performed in duplicates (global fit). Percentage values were calculated relative to control (set to 100% remained activity). Bold values represent inhibition rates >90 % MAO B and highest MAO A inhibitions.

B inhibition capacity of **39**, presumed depending on screening results, could not be verified in  $IC_{50}$  determinations (MAO B,  $IC_{50}$  >1000 nM), where assay limitations did not allow the determination of the bottom plateau due to low solubility and fluorescence crosstalk. Assuming that the real but nondetectable bottom plateau might be  $\gg$  0, the previous determined percent inhibition value in one-point screening would have been overestimated (as calculated with bottom = 0). The most potent compound **55** (ST-2043) showed high inhibition of MAO B ( $IC_{50}$  = 56 nM), which is in a similar range as described for the marketed drug safinamide ( $IC_{50}$  = 53 nM; Table 1). Compared to safinamide (MAO A/B SI >940), **55** demonstrated only an about five-fold lower inhibition of isoform A, thus being a rather balanced MAO inhibitor. The highest MAO B preference within this series was shown for compound **31** with an SI >10 (MAO B,  $IC_{50}$  = 92 nM).

The docking experiments revealed a good match of all compounds in the lipophilic binding pockets of the MAO A and B with exception of compound **39**, where no suitable docking pose into the MAO A binding pocket could be identified (see Figures S1-S9 in the supplemental material). According to the result of the docking experiments, surface complementarities influence the binding properties of the anilides nearly exclusively, whereas direct interactions are not

involved in the binding of the presented ligands. Compounds **31**, **33**, and **34** showed close structural similarities and comparable inhibition properties. All of these ligands are substituted with a hydroxyl group at the 2-position of the benzylic site and a chloro substituent at the 5-position. The aniline moiety in all cases is para-substituted with a highly lipophilic residue, i.e. a bromo-substituent (**34**), a trifluoromethoxy group (**33**), and a trifluoromethyl group (**31**) in the para-position. The interaction of these hydrophobic residues with the lipophilic cavity of the MAO B binding pocket, including the nonpolar amino acids Pro102 and Leu164, might be responsible for their potent MAO B inhibition properties. The carbonyl function of the linking amide and the hydroxyl groups in 2-position are directed towards Cys172 and interact via polar aprotic forces (see Figures S5-S7 in the supplemental material). A similar polar system is present in pyrrolo-pyridinyl derivatives synthesized by Tzvetkov et al indicating that a central hydrogen bond donor/acceptor complex is favorable for MAO B binding.<sup>28</sup> The docking pose of the MAO A preferring inhibitor **7** (ST-2023) is inverted by 180° in the binding pocket of the MAO B model, where the polar nitro-group is interacted with Cys172 (Figure 3). This would enlarge the distance to the FAD and could be responsible for the low MAO B activity compared with MAO A. This reversed pose was also observed in



**Figure 2** Compounds with anilide motifs taken to MAO A and B screening.

**Table 2** MAO A and B Inhibition Activities of the Most Potent Compounds Expressed as IC<sub>50</sub> Values Within the 95%CI

No.	IC <sub>50</sub> [nM] [95%CI] (N) <sup>a</sup>		
	hMAO B	hMAO A	MAO SI <sup>c</sup>
7 (ST-2023)	1052 [759; 1459] (3)	126 [101; 158] (4)	0.1
31	92.3 [70.3; 121] (3)	>1000 <sup>b</sup>	>10.8
33	128 [54.0; 305] (3)	>1000 <sup>b</sup>	>7.8
34	139 [64.7; 300] (3)	>1000 <sup>b</sup>	>7.2
39	>1000 <sup>b</sup>	>5000 <sup>b</sup>	
55 (ST-2043)	55.5 [31.9; 96.7] (5)	289 [193; 433] (5)	5.2
65	123 [87.6; 172] (5)	293 [203; 424] (3)	2.4
Safinamide <sup>d</sup>	53 [20; 141] (4)	>50000 (4)	>940

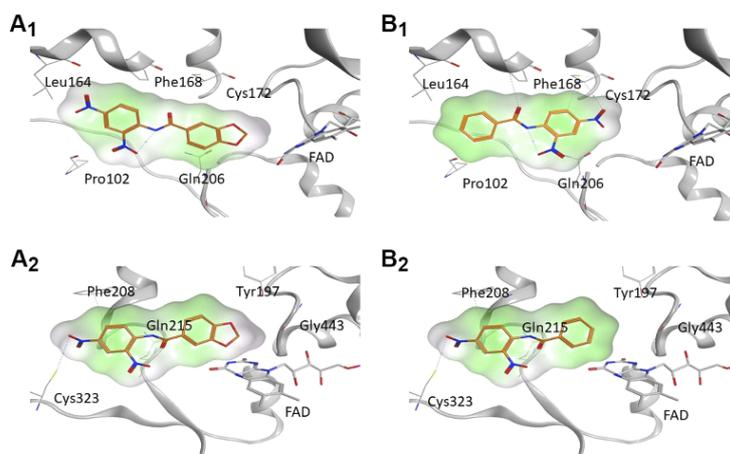
Notes: <sup>a</sup>Data represent mean values within the 95%CI of multiple independent experiments (n) each performed in duplicates. <sup>b</sup>Compounds did not reach bottom plateau at highest tested concentrations; Data are estimates extrapolated with bottom was set to zero. <sup>c</sup>Selectivity index (SI) = IC<sub>50</sub> MAO A/IC<sub>50</sub> MAO B. <sup>d</sup>Values taken from Affini et al.<sup>21</sup>

compounds **39** and **65**. In case of inhibitor **39**, the salicylic moiety is shifted towards the lipophilic cavity at the entrance of the binding pocket, which might be responsible for its rather poor inhibition properties (see [Figures S8](#) in the [supplemental material](#)). In contrast, inhibitor **65** maintained the lipophilic interaction with its benzofuran residue resulting in an orientation of the polar nitro group towards the FAD (see [Figures S9](#) in the [supplemental material](#)). Carboxamides synthesized by Tzvetkov et al showed the same orientation resulting from

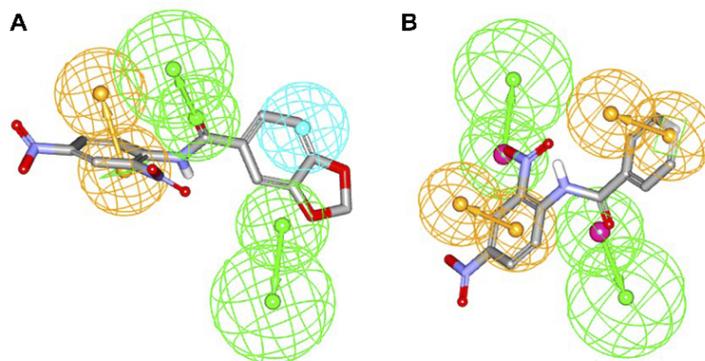
a polar interaction with a bridging water molecule and a tyrosine close to the FAD.<sup>29</sup> The most potent inhibitor **55** (ST-2043) in this series is oriented with its piperonyl acid moiety towards the FAD ([Figure 3](#)). Using the same moiety, Vishnu et al designed MTLs where the piperonyl acid aligned within the hydrophobic region opposite to the FAD, and the high inhibition capacities resulted from irreversible binding via a propargyl amine residue.<sup>30</sup>

Due to their small size and molecular weight, the presented structures are useful starting skeletons to design MTLs with MAO B activity. The docking experiments suggest using the aniline residue of **55** (ST-2043) as an attachment point to implement pharmacophores of additional targets. Zhang et al showed that larger substituents at this position are tolerated, where a bulky fluorobenzyl group is located further outside of the enzymes binding pocket than the here presented aniline groups.<sup>31</sup> The hypothesis that substitution at this position might be suitable for designing MTLs is coherent with the linear structures synthesized by Pisani et al that combine MAO B inhibition with nitric oxide releasing precursors and acetylcholine esterase (AChE) inhibition moieties.<sup>32</sup>

In the MAO A binding pocket, the polar salicylic group of compounds **31**, **33**, **34**, and **39** did not match the surrounding hydrophobic cavity, which might explain the loss of inhibition properties for MAO A (see [Figures S1-S3](#) in the [supplemental material](#)). The three compounds, missing the salicylic moiety (**7**, **55**, **65**), are aligned well into the MAO



**Figure 3** Visualization of **55** (ST-2043, **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2</sub>**) and **7** (ST-2023, **B<sub>1</sub>**, **B<sub>2</sub>**) in the binding pockets of MAO A and B. Compound **55** (ST-2043) binding to the crystal structure of **A<sub>1</sub>**) hMAO B (PDB: 6FVZ) and **A<sub>2</sub>**) hMAO A (PDB: 2Z5X). Compound **7** (ST-2023) binding to the crystal structure of **B<sub>1</sub>**) hMAO B (PDB: 6FVZ) and **B<sub>2</sub>**) hMAO A (PDB: 2Z5X). Surface coloring: white: neutral, green: lipophilic; magenta: hydrophilic.



**Figure 4** ROC-selected pharmacophores of MAO A and MAO B. **(A)** Overlay of compound **55 (ST-2043)** and MAO B pharmacophore model. **(B)** Overlay of compound **7 (ST-2013)** and MAO A pharmacophore model. Color code: green vectored sphere: hydrogen bond acceptor; orange vectored sphere: aromatic feature; blue sphere: hydrophobic feature.

A active site with respect to surface complementarity, showing that small alteration in the molecular structure can have a major impact on the modulation of the MAO isoform selectivity. The modeling results are further supported by ROC-selected pharmacophore models based on inhibitors presented here (see [Figure 4](#) and [supplemental material](#)). The essential predicted characteristics for MAO A and MAO B binding are a central hydrogen bond acceptor flanked by aromatic or hydrophobic features. This is in good accordance with the docking poses, with the limitation that the molecular docking showed no direct hydrogen bond interactions between the ligands and the amino acids of the binding pocket.

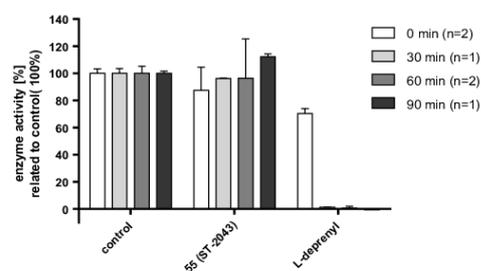
The most potent MAO B inhibitor **55 (ST-2043)** was further investigated to determine mode and type of inhibition. Reversibility studies with excess of substrate verified the expected reversible mode of inhibition. Compared to the suicide inhibitor *L*-deprenyl, inhibition by compound **55 (ST-2043)** (10-fold  $IC_{50}$  concentrations) preincubated with MAO B for 30, 60 or even 90 min was completely reversed after 50-fold dilution in assays mixture ([Figure 5](#)). It could be assumed, that compound **55** was readily displaced from the MAO B active side, while a more tight-binding interaction, e. g. as shown for safinamide, is considered to be more favorable in terms of pharmacological activity.<sup>9</sup>

Inhibition studies using different concentrations of **55 (ST-2043)** with seven appropriate substrate concentrations suggest a competitive inhibition type as demonstrated by Lineweaver–Burk plots ([Figure 6](#)). Compound **55 (ST-2043)** showed promising  $K_i$  values of 6.3 nM with 95%

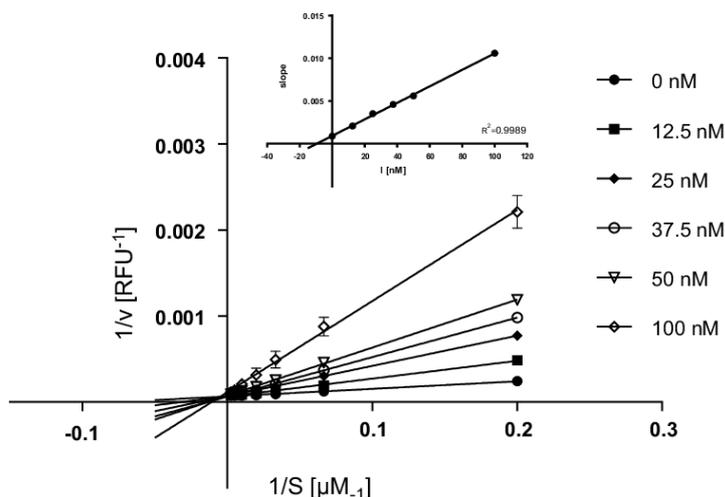
$CI = [5.0; 7.5]$  (Michaelis Menten fit “competitive inhibition”) and 9.5 nM (slopes from Lineweaver–Burk plots vs inhibitor concentration) for MAO B, respectively.

#### Cholinesterase Inhibition

Cholinesterase enzymes are of potential interest in MTL drug design for the treatment of neurodegenerative diseases.<sup>33</sup> Therefore, compound **55 (ST-2043)** was screened for inhibition of acetyl- and butyrylcholine esterases (AChE/BuChE). At a concentration of 1  $\mu$ M, **55 (ST-2043)** showed only moderate inhibition capacity with  $24 \pm 1.8\%$  and  $57 \pm 4.5\%$  for AChE and BuChE, respectively (see [Table S4](#) and [Figure S11](#) in [supplemental material](#)). Thus, no further characterization in this direction has been performed.



**Figure 5** Reversibility of inhibition after preincubation of **55 (ST-2043)** and *L*-deprenyl with MAO B. Inhibitors ( $10 \times IC_{50}$ ) were preincubated with enzyme for 0, 30, 60 or 90 min prior to 50-fold dilution in assays mixture containing kynuramine as substrate ( $10 \times K_M$ ). Data represent mean values  $\pm$  SD of *n* independent experiments, each performed in duplicates.



**Figure 6** Lineweaver-Burk plots of compound **55** (**ST-2043**) (12.5 to 100 nM) with seven suitable concentrations of kynuramine. Data represent mean values  $\pm$  SD of one representative experiment performed in duplicates.

## Conclusion

This study presented small anilides as MAO A and B inhibitors. Out of 66 screened compounds seven showed promising inhibition properties at a concentration of 1  $\mu$ m (>90% or >80% inhibition for MAO B and A, respectively). Evaluation of their  $IC_{50}$  values revealed six MAO B preferring (**31**, **33**, **34**, **55** (**ST-2043**), **65**) inhibitors and one MAO A preferring (**7** (**ST-2023**)) inhibitor with activities in low nanomolar concentration ranges. The MAO B preferring inhibitors showed  $IC_{50}$  values ranging from 56 nM to 128 nM with selectivity indices between 2.4 and >10. Computational analysis confirmed in vitro binding properties by demonstrating good surface complementarity of the inhibitors with the binding-pockets of the two MAO isoforms. The highest affinity for MAO A was found for **ST-2023** (**7**,  $IC_{50}$  = 126 nM) with 8.3-fold lower affinity towards MAO B. **ST-2043** (**55**) was identified as most potent MAO B inhibitor ( $IC_{50}$  = 56 nM,  $K_i$  = 6.3 nM) within this series, which demonstrated a similar inhibition capacity as the reference reversible MAO B inhibitor safinamide, but with rather low MAO selectivity (SI = 5.2). Further characterization suggested a competitive mode of MAO B inhibition for **55**, however, with a readily reversible binding rather than tight binding behavior as anticipated for pharmacological efficacy. Nevertheless, these small-sized ligands might be a promising starting point

for the design of new selective or multitargeting MAO inhibitors.

## Acknowledgments

This work was kindly supported by COST action CM1103, CA15135 and CA18133 as well as DFG INST 208/664e1 FUGG (Germany). Mohammad Khanfar and Holger Stark have been supported by the George Forster Research Fellowship granted by the Alexander von Humboldt-Foundation.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Tong J, Meyer JH, Furukawa Y, et al. Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: Implications for brain imaging studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(6):863–871. doi:10.1038/jcbfm.2013.19
- Ramsay RR, Albrecht A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *J Neural Transm.* 2018;125(11):1659–1683. doi:10.1007/s00702-018-1861-9
- Kim J, Kang S, Hong S, Yum S, Kim YM, Jung Y. Structure-activity relationship of salicylic acid derivatives on inhibition of TNF- $\alpha$  dependent NF $\kappa$ B activity: Implication on anti-inflammatory effect of N-(5-chlorosalicyloyl)phenethylamine against experimental colitis. *Eur J Med Chem.* 2012;48:36–44. doi:10.1016/j.ejmech.2011.11.030
- Hilton S, Jaber B, Ruch R. Moclobemide safety: Monitoring a newly developed product in the 1990s. *J Clin Psychopharmacol.* 1995;15(4):76S–83S. doi:10.1097/00004714-199508001-00013

5. Ulrich S, Ricken R, Adli M. Tranylcypromine in mind (Part I): Review of pharmacology. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017;27(8):697–713. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.05.007
6. Borštnar R, Repič M, Kržan M, Mavri J, Vianello R. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B by the antiparkinsonian medicines rasagiline and selegiline: A computational study. *Eur J Org Chem.* 2011;2011(32):6419–6433. doi:10.1002/ejoc.v2011.32
7. Bette S, Shpiner DS, Singer C, Moore H. Safinamide in the management of patients with Parkinson's disease not stabilized on levodopa: A review of the current clinical evidence. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:1737–1745. doi:10.2147/TCRM.S139545
8. Kumar B, Sheetal MAK, Kumar V. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of phenyl-benzhydrylpiperazine derivatives as potential MAO inhibitors. *Bioorg Chem.* 2018;77:252–262. doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.020
9. Reis J, Manzella N, Cagide F, et al. Tight-binding inhibition of human monoamine oxidase B by chromone analogs: A kinetic, crystallographic, and biological analysis. *J Med Chem.* 2018;61(9):4203–4212. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00357
10. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med.* 2018;7(1):3–17. doi:10.1186/s40169-017-0181-2
11. Mathew B, Parambi DGT, Mathew GE, et al. Emerging therapeutic potentials of dual-acting MAO and AChE inhibitors in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch Pharm.* 2019;352(11):1–13. doi:10.1002/ardp.201900177
12. Takao K, Yahagi H, Uesawa Y, Sugita Y. 3-(E)-Styryl-2H-chromene derivatives as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. *Bioorg Chem.* 2018;77:436–442. doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.036
13. Van Dyk AS, Petzer JP, Petzer A, Legoabe LJ. 3-Coumaranone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5479–5489. doi:10.2147/DDDT.S89961
14. Reis J, Cagide F, Chavarria D, et al. Discovery of new chemical entities for old targets: Insights on the lead optimization of chromone-based monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors. *J Med Chem.* 2016;59(12):5879–5893. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00527
15. Legoabe LJ, Petzer A, Petzer JP. 2-Acetylphenol analogs as potent reversible monoamine oxidase inhibitors. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3635–3644. doi:10.2147/DDDT.S86225
16. Ahmad S, Zaib S, Jalil S, et al. Synthesis, characterization, monoamine oxidase inhibition, molecular docking and dynamic simulations of novel 2,1-benzothiazine-2,2-dioxide derivatives. *Bioorg Chem.* 2018;80:498–510. doi:10.1016/j.bioorg.2018.04.012
17. Ai N, Wood RD, Yang E, Welsh WJ. Niclosamide is a negative allosteric modulator of Group I metabotropic glutamate receptors: implications for neuropathic pain. *Pharm Res.* 2016;33(12):3044–3056. doi:10.1007/s11095-016-2027-9
18. Kumar A, Narasimhan B, Kumar D. Synthesis, antimicrobial, and QSAR studies of substituted benzamides. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:4113–4124. doi:10.1016/j.bmc.2007.03.074
19. Li Y, Wang Y, Wang J. Microwave-promoted conversion of heterocyclic amines to corresponding amides under solvent-free conditions. *Heterocycl Commun.* 2007;13(4):251–256. doi:10.1515/HC.2007.13.4.251
20. Li L, Han J, Nguyen B, Burgess K. Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives. *J Org Chem.* 2008;73(5):1963–1970. doi:10.1021/jo702463f
21. Affini A, Hagenow S, Zivkovic A, Marco-Contelles J, Stark H. Novel indanone derivatives as MAO B/H3R dual-targeting ligands for treatment of Parkinson's disease. *Eur J Med Chem.* 2018;148:487–497. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.015
22. Mostert S, Petzer A, Petzer JP. Inhibition of monoamine oxidase by benzoxathione analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(4):1200–1204. doi:10.1016/j.bmcl.2016.01.034
23. Son S-Y, Ma J, Kondou Y, Yoshimura M, Yamashita E, Tsukihara T. Human monoamine oxidase A: Structure and control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(15):5739–5744. doi:10.1073/pnas.0710626105
24. Verdonk ML, Berdini V, Hartshorn MJ, et al. Virtual screening using protein-ligand docking: Avoiding artificial enrichment. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(3):793–806. doi:10.1021/ci034289q
25. Frédéric R, Dumont W, Ooms F, et al. Synthesis, structural reassignment, and biological activity of type B MAO inhibitors based on the 5H-indeno[1,2-c]pyridazin-5-one core. *J Med Chem.* 2006;49(12):3743–3747. doi:10.1021/jm051091j
26. La Regina G, Silvestri R, Artico M, et al. New pyrrole inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity. *J Med Chem.* 2007;50(5):922–931. doi:10.1021/jm060882y
27. European Medicines Agency [homepage on the Internet]. Human medicines highlights 2018. Authorisation of new medicines. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/human-medicines-highlights-2018>. Accessed September 5, 2019.
28. Tzvetkov NT, Stammer HG, Hristova S, Atanasov AG, Antonov L. (Pyrrolo-pyridin-5-yl)benzamides: BBB permeable monoamine oxidase B inhibitors with neuroprotective effect on cortical neurons. *Eur J Med Chem.* 2019;162:793–809. doi:10.1016/j.ejmech.2018.11.009
29. Tzvetkov NT, Stammer HG, Georgieva MG, et al. Carboxamides vs. methanimines: crystal structures, binding interactions, photophysical studies, and biological evaluation of (indazole-5-yl)methanimines as monoamine oxidase B and acetylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2019;179:404–422. doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.041
30. Vishnu MS, Pavankumar V, Kumar S, Raja AS. Experimental and computational evaluation of piperonylic acid derived hydrazones bearing isatin moieties as dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases. *Chem Med Chem.* 2019;14:1359–1376. doi:10.1002/cmdc.v14.14
31. Zhang C, Yang K, Yu S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of hydroxypyridinone-coumarin hybrids as multimodal monoamine oxidase B inhibitors and iron chelates against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2019;180:367–382. doi:10.1016/j.ejmech.2019.07.031
32. Pisani L, Iacobazzi RM, Catto M, et al. Investigating alkyl nitrates as nitric oxide releasing precursors of multitarget acetylcholinesterase-monoamine oxidase B inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2019;161:292–309. doi:10.1016/j.ejmech.2018.10.016
33. Ramsay RR, Majekova M, Medina M, Valoti M. Key targets for multi-target ligands designed to combat neurodegeneration. *Front Neurosci.* 2016;10. doi:10.3389/fnins.2016.000375
34. Desai KR, Shaikh MS, Coutinho EC. Molecular modeling studies, synthesis and biological evaluation of derivatives of N-phenylbenzamide as Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase (PfDHODH) inhibitors. *Med Chem Res.* 2011;20(3):321–332. doi:10.1007/s00044-010-9323-4
35. Xu X, Li P, Huang Y, Tong C, Yan YY, Xie Y. Atmospheric oxidative catalyst-free cross-dehydrogenative coupling of aldehydes with N-hydroxyimides. *Tetrahedron Lett.* 2017;58(18):1742–1746. doi:10.1016/j.tetlet.2017.03.064
36. Ferrins L, Gazdik M, Rahmani R, et al. Pyridyl benzamides as a novel class of potent inhibitors for the kinetoplastid Trypanosoma brucei. *J Med Chem.* 2014;57(15):6393–6402. doi:10.1021/jm500191u
37. Ockey DA, Dotson JL, Struble ME, et al. Structure-activity relationships by mass spectrometry: Identification of novel MMP-3 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(1):37–44. doi:10.1016/j.bmc.2003.10.053
38. Wen Q, Jin J, Mei Y, Lu P, Wang Y. Copper-mediated cyanation of aryl halides by activation of benzyl cyanide as the cyanide source. *Eur J Org Chem.* 2013;2013(19):4032–4036. doi:10.1002/ejoc.201300052

39. Deshidi R, Rizvi MA, Shah BA. Highly efficient dehydrogenative cross-coupling of aldehydes with amines and alcohols. *RSC Adv*. 2015;5(110):90521–90524. doi:10.1039/C5RA17425B
40. Hong G, Wu S, Zhu X, Mao D, Wang L. Peroxide-mediated direct synthesis of amides from aryl surrogates. *Tetrahedron*. 2016;72(3):436–441. doi:10.1016/j.tet.2015.11.063
41. Scarborough R, Jantzen H-M, Huang W, et al. Platelet ADP receptor inhibitors. European Patent EP 2314593A1. 2011.
42. Srinivasachari R, Ramaswami S, Asha K. Quinone imine route to benzimidazol-2-ylcarbamates. Part 1. Synthesis of open-chain and cyclic 5-acylamino derivatives. *J Chem Res Miniprint*. 1986;1657–1675.
43. Sun Y, Wang G, Guo W. Colorimetric detection of cyanide with N-nitrophenyl benzamide derivatives. *Tetrahedron*. 2009;65(17):3480–3485. doi:10.1016/j.tet.2009.02.023
44. Sheng WJ, Ye Q, Bin YW, et al. CuSO<sub>4</sub>-mediated decarboxylative C-N cross-coupling of aromatic carboxylic acids with amides and anilines. *Tetrahedron Lett*. 2015;56(4):599–601. doi:10.1016/j.tetlet.2014.12.085
45. Downer NK, Jackson YA, Indies W. Synthesis of benzothiazoles via ipso substitution of ortho-methoxythiobenzamides. *Org Biomol Chem*. 2004;2:3039–3043. doi:10.1039/b410373d
46. Carbone G, Burnley J, Moses JE. A catalytic and tert-butoxide ion-mediated amidation of aldehydes with para-nitro azides. *Chem Commun*. 2013;49(27):2759–2761. doi:10.1039/c3cc40452h
47. Basri AM, Lord RM, Allison SJ, et al. Bis-Picolinamide ruthenium (III) dihalide complexes: dichloride to diiodide exchange generates single trans isomers with high potency and cancer cell selectivity. *Chem - A Eur J*. 2017;23(26):6341–6356. doi:10.1002/chem.201605960
48. Martínez AM, Rodríguez N, Arrayás RG, Carretero JC. Copper-catalyzed ortho-C-H amination of protected anilines with secondary amines. *Chem Commun*. 2014;50(21):2801–2803. doi:10.1039/c3cc49633c
49. Rastelli G, Ferrari AM, Costantino L, Gamberini MC. Discovery of new inhibitors of aldose reductase from molecular docking and database screening. *Bioorg Med Chem*. 2002;10(5):1437–1450. doi:10.1016/S0968-0896(01)00410-2
50. Zhu ZW, Shi L, Ruan XM, et al. Synthesis and antiproliferative activities against Hep-G2 of salicylanilide derivatives: potent inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2011;26(1):37–45. doi:10.3109/14756361003671060
51. Guo L, Wang QL, Jiang QQ, Jiang QJ, Jiang YB. Anion-triggered substituent-dependent conformational switching of salicylanilides. New hints for understanding the inhibitory mechanism of salicylanilides. *J Org Chem*. 2007;72(26):9947–9953. doi:10.1021/jo701823d
52. Hsi RSP, Kalamazoo M. Alkylcarbamates of cyanosalicylanilides. United States Patent US 3317583. 1967.
53. Feng Z, Shen Z, Yuan C, et al. *p*-Nitroaniline compound, preparation method thereof, pharmaceutical composition and application. Chinese Patent CN107434770. 2017.
54. Nair PM, Asas RS, Venkataraman K. Condensation of 2,4-Dinitrochlorobenzene with *o*-Hydroxyarylamides. *Tetrahedron*. 1969;11:140–147. doi:10.1016/0040-4020(60)80063-4
55. Biagi G, Giorgi I, Livi O, et al. Synthesis and biological activity of novel substituted benzamides as potassium channel activators. *V. Eur J Med Chem*. 2004;39(6):491–498. doi:10.1016/j.ejmech.2004.02.006
56. Wood RD, Welsh WJ, Ekins S, Ni A. Glutamate Receptor Modulators and Therapeutic Agents. United States Patent US2009239919A1. 2009.
57. Zhang J, Ma Y, Ma Y. Synthesis of secondary amides through the Palladium(II)-Catalyzed aminocarbonylation of arylboronic acids with amines or hydrazines and carbon dioxide. *Eur J Org Chem*. 2018;2018(14):1720–1725. doi:10.1002/ejoc.201701802
58. Devi ES, Alanthadka A, Tamilselvi A, Nagarajan S, Sridharan V, Maheswari CU. Metal-free oxidative amidation of aldehydes with aminopyridines employing aqueous hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem*. 2016;14:8228–8231. doi:10.1039/C6OB01454B
59. Ronson TO, Renders E, Van Steijvoort BF, et al. Ruthenium-catalyzed reductive arylation of N-(2-Pyridinyl)amides with isopropanol and arylboronate esters. *Angew Chemie - Int Ed*. 2019;58(2):482–487. doi:10.1002/anie.v58.2
60. Lo WS, Hu WP, Lo HP, et al. Synthesis of sulfur-sulfur bond formation from thioamides promoted by 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone. *Org Lett*. 2010;12(23):5570–5572. doi:10.1021/ol102455x
61. Zuo M, Zheng YW, Lu SM, Li Y, Zhang SQ. Synthesis and biological evaluation of N-aryl salicylamides with a hydroxamic acid moiety at 5-position as novel HDAC-EGFR dual inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(14):4405–4412. doi:10.1016/j.bmc.2012.05.034
62. Islam AM, Hannout IB, Hassan EA, Ihsan AE. Synthesis of some substituted salicylanilides of expected biological activity. *J Für Prakt Chemie*. 1972;314:727–734. doi:10.1002/prac.19723140505
63. Lee IY, Gruber TD, Samuels A, et al. Structure-activity relationships of antitubercular salicylanilides consistent with disruption of the proton gradient via proton shuttling. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(1):114–126. doi:10.1016/j.bmc.2012.10.056
64. Muto S, Itai A. PAI-1 production inhibitor. European Patent EP2201946A1. 2008.
65. Waissner K, Bureš O, Holý P, et al. Relationship between the structure and antimicrobial activity of substituted salicylanilides. *Arch Pharm Pharm Med Chem*. 2003;336(1):53–71. doi:10.1002/ardp.200390004
66. Kang S, Min HJ, Kang MS, Jung MG, Kim S. Discovery of novel 2-hydroxydiarylamide derivatives as TMPRSS4 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(6):1748–1751. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.055
67. Kozic J, Novotná E, Volková M, Stolaříková J, Trejtnar F, Vinšová J. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of 2-methoxybenzanilides and their thioxo analogues. *Eur J Med Chem*. 2012;56:387–395. doi:10.1016/j.ejmech.2012.07.044
68. Paraskevopoulos G, Monteiro S, Vosátka R, et al. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(4):1524–1532. doi:10.1016/j.bmc.2017.01.016
69. Ozawa I, Takeuchi I, Yamamoto K, et al. Synthesis and antimicrobial activity of salicylanilide derivatives. II. *Chem Pharm Bull*. 1984;32(1):305–312. doi:10.1248/cpb.32.305
70. Muto S, Itai A. NF-KB activation inhibitors. European Patent EP1535609A1. 2005.
71. Mook RA, Chen M, Lu J, Barak LS, Lyerly HK, Chen W. Small molecule modulators of Wnt/β-catenin signaling. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(7):2187–2191. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.101
72. Calderone V, Coi A, Fiamingo FL, et al. Structural modifications of benzanilide derivatives, effective potassium channel openers. *X. Eur J Med Chem*. 2006;41(12):1421–1429. doi:10.1016/j.ejmech.2006.07.016
73. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, et al. Salicylanilide Inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE*. 2017;32(7):736–740.
74. Ríos Martínez CH, Nué Martínez JJ, Ebiloma GU, De Koning HP, Alkorta I, Dardonville C. Lowering the pKa of a bisimidazole lead with halogen atoms results in improved activity and selectivity against *Trypanosoma brucei* in vitro. *Eur J Med Chem*. 2015;101:806–817. doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.013
75. Saladih R, Gent G, Summac V, Nicoletti R, Fochet F, Spadard S. Researches on antiviral agents. 41. studies on the chemistry of acyloxypyrimidine derivatives as new acylation reagents and inhibitors of Uracil DNA glycosylases. *Tetrahedron*. 1994;50(11):3603–3618. doi:10.1016/S0040-4020(01)87037-X
76. Botta M, De Angelis F, Nicoletti R, Pani A, Marongiu ME, La Colla P. 6-Alkyl-2-hethoxy-4-(3h)-pyrimidinones in the transformation of pyrimidines: regioselective preparation, antitumor and antimicrobial activity of 4-O-acylated pyrimidine derivatives. New agents for selective acylation of amines. *Tetrahedron Lett*. 1988;29(22):2741–2744. doi:10.1016/0040-4039(88)85275-4

77. Dubey SK, Singh AK, Singh H, et al. Synthesis of substituted 1-Hydroxy-2-naphthylidene as potential cestocidal agents. *J Med Chem.* 1978;21(11):1178-1181. doi:10.1021/jm00209a020
78. Li BX, Yamanaka K, Xiao X. Structure – activity relationship studies of naphthol AS-E and its derivatives as anticancer agents by inhibiting CREB-mediated gene transcription. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(23):6811-6820. doi:10.1016/j.bmc.2012.09.056
79. Saikatsu H, Fukuda T, Okamoto H, et al. Production method of asymmetrical polyazo dyes with good heat and light resistance for color filters and liquid crystal displays. International Patent WO 2011/078163 A1. 2011.
80. Han SB, Achari R, Kim MH, Jong YS, Kim PH. Novel compound or pharmaceutically acceptable salt thereof and pharmaceutical composition for prevention or treatment of disease caused by influenza virus infection containing the same as an active ingredient. Korean Patent KR2016/21163. 2016.

#### Drug Design, Development and Therapy

Dovepress

#### Publish your work in this journal

Drug Design, Development and Therapy is an international, peer-reviewed open-access journal that spans the spectrum of drug design and development through to clinical applications. Clinical outcomes, patient safety, and programs for the development and effective, safe, and sustained use of medicines are a feature of the journal, which has also

been accepted for indexing on PubMed Central. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/drug-design-development-and-therapy-journal>

# Supplementary Material

## Reversible small molecule inhibitors of MAO A and MAO B with anilide motifs

Author name: Jens Hagenow,<sup>1</sup> Stefanie Hagenow,<sup>1</sup> Kathrin Grau,<sup>1</sup> Mohammad Khanfar,<sup>1,2,3</sup> Lena Hefke,<sup>4</sup> Ewgenij Proschak,<sup>4</sup> Holger Stark<sup>1,\*</sup>

### Author affiliations

<sup>1</sup> Heinrich Heine University Düsseldorf, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, The University of Jordan, P.O Box 13140, Amman 11942, Jordan

<sup>3</sup> College of Pharmacy, Alfaisal University, Al Takhassusi Rd, Riyadh, 11533, Saudi Arabia.

<sup>4</sup> Goethe University Frankfurt, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt, Germany

### \*Corresponding Author

Correspondence: Prof. Dr. Holger Stark

Heinrich Heine University Duesseldorf, Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

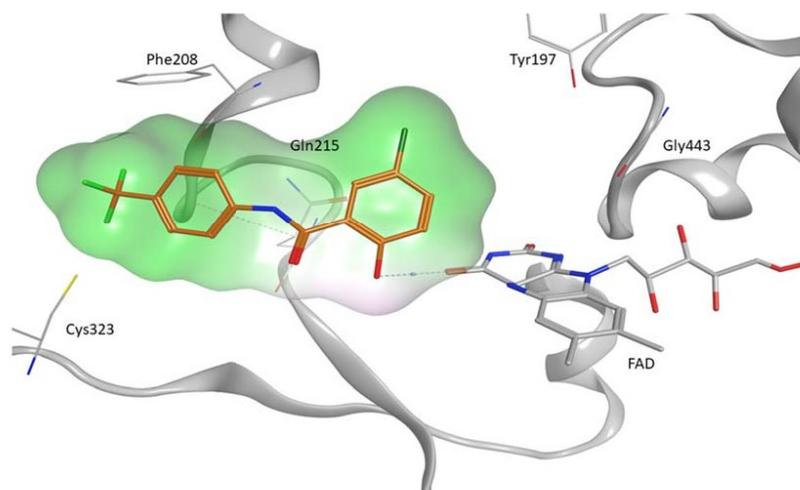
Tel +49 211 81-10478

Fax +49 211 81-13359

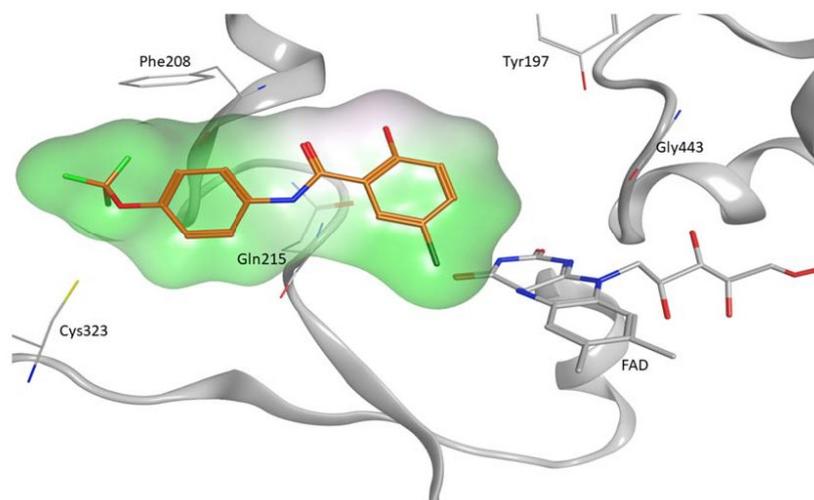
Email [stark@hhu.de](mailto:stark@hhu.de)

## Molecular Docking

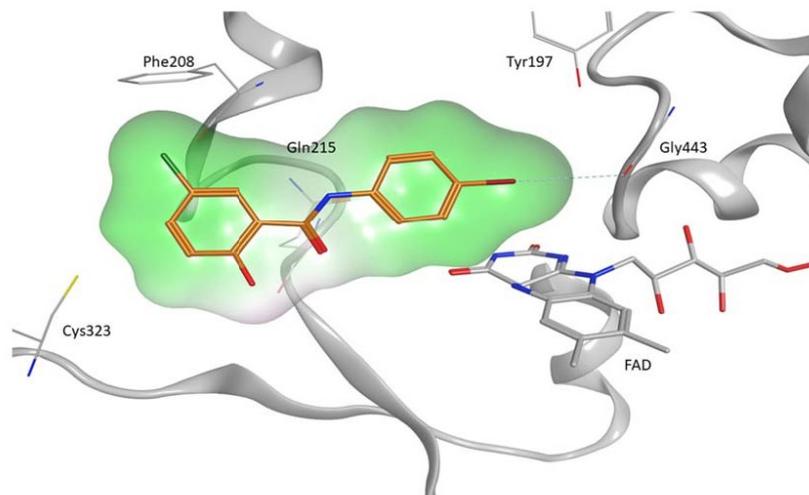
Docking poses of compounds 31, 33, 34, 39, and 65 within MAO A and B binding pockets.



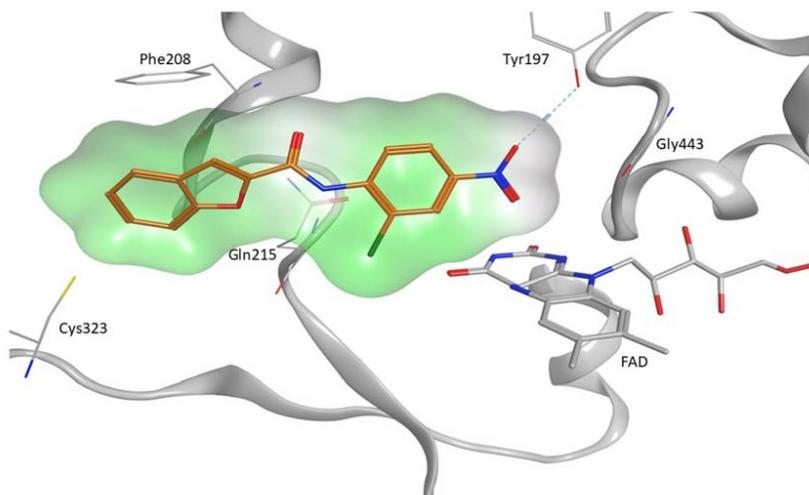
**Figure S1** Visualization of 31 in the binding pocket of MAO A.



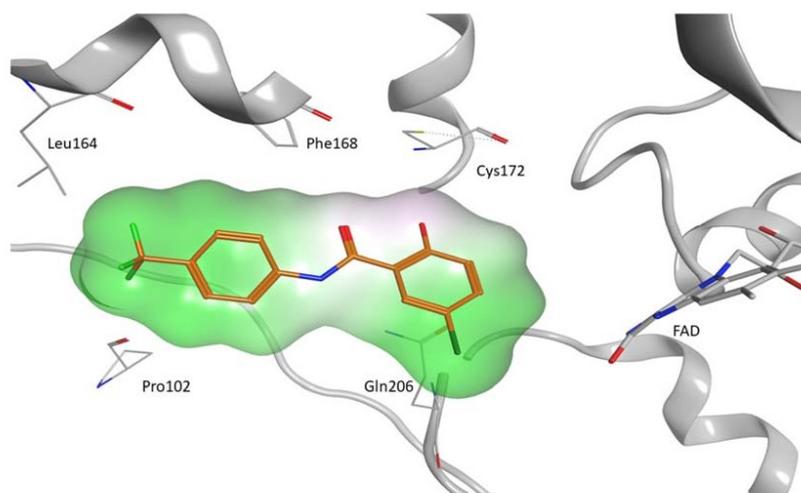
**Figure S2** Visualization of 33 in the binding pocket of MAO A.



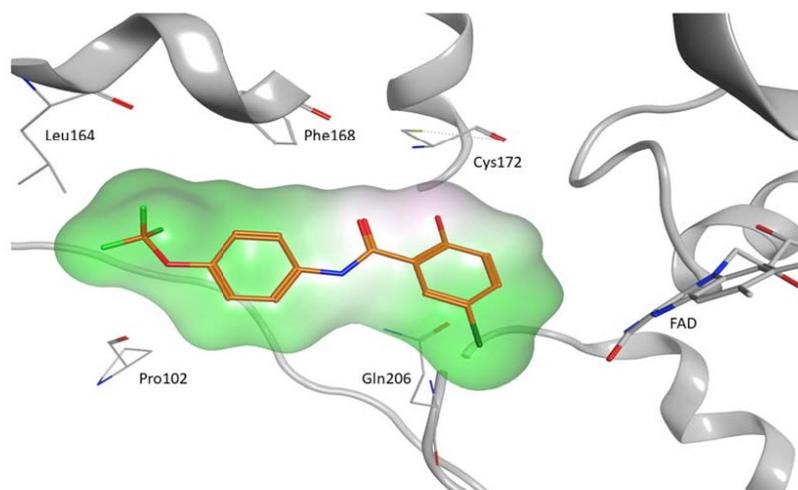
**Figure S3** Visualization of **34** in the binding pocket of MAO A.



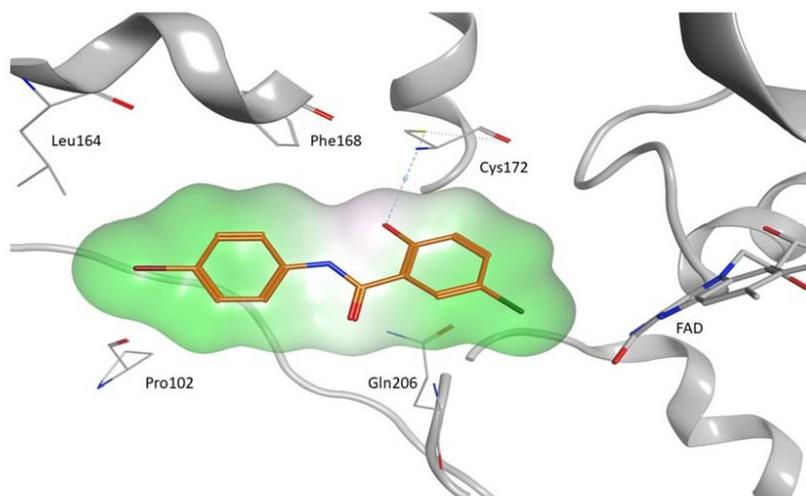
**Figure S4** Visualization of **65** in the binding pocket of MAO A.



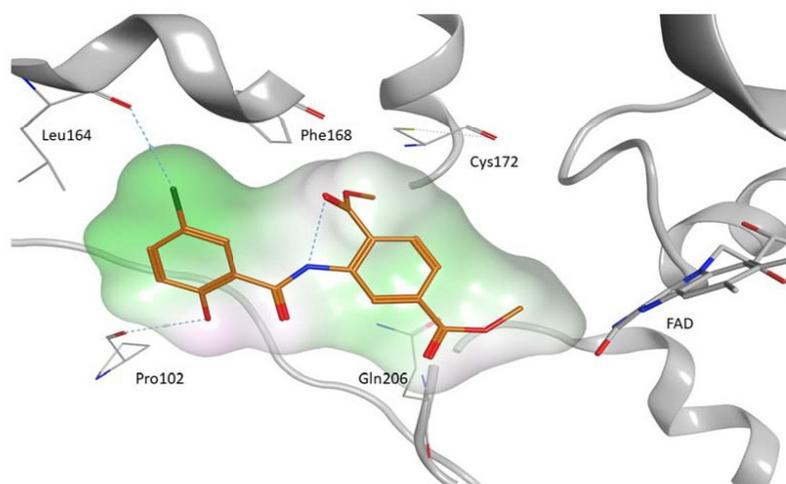
**Figure S5** Visualization of **31** in the binding pocket of MAO B.



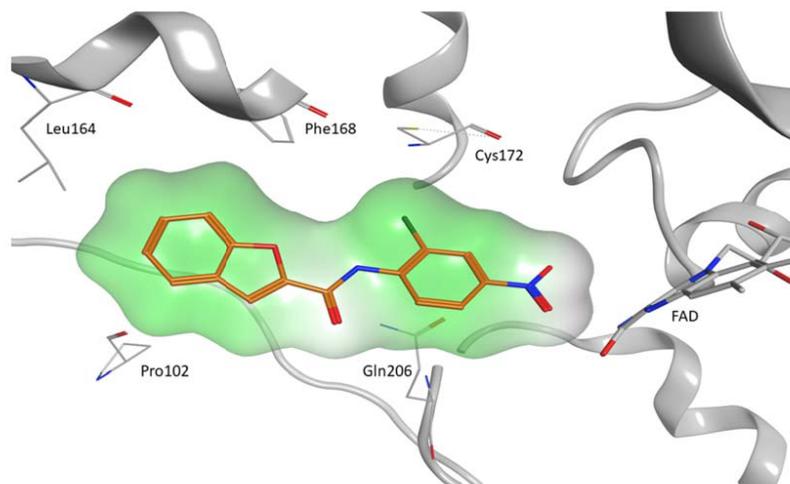
**Figure S6** Visualization of **33** in the binding pocket of MAO B.



**Figure S7** Visualization of **34** in the binding pocket of MAO B.



**Figure S8** Visualization of **39** in the binding pocket of MAO B.



**Figure S9** Visualization of **65** in the binding pocket of MAO B.

## Pharmacophore Modeling and ROC Analyses

HipHop module of Discovery studio software 2.5.5 was used to construct pharmacophoric hypotheses of MAO-A and MAO-B inhibitors. HipHop works by identifying the three-dimensional arrangements of chemical features that are mutual to active molecules. Principal and MaxOmitFeat parameters define how many compounds must map completely or partially to the pharmacophoric hypothesis. A subset of 25 representative compounds was selected for HipHop run. Table S1 describes the how training compounds were classified into active, moderately active, and inactive compounds.

Active ligands were assigned Principal and MaxOmitFeat values of 2 and 0, respectively, to ensure that all of their chemical features will be considered in building the pharmacophore space. Moderately active compounds were assigned a Principal value of 1 to ensure that they will be mapped at least once by each generated hypothesis, and a MaxOmitFeat value of 1 to allow

missing one feature in any generated model. Inactive compounds were assigned a Principal value of zero and MaxOmitFeat of two.

ROC analysis evaluates the ability of a particular pharmacophore model to classify the compounds in a testing list as actives or inactives. The performance of the considered model is judged based on the area under the curve (AUC) of the corresponding ROC as well as the overall specificity, overall accuracy, overall true positive rate, and overall false positive rate.

It was necessary to perform valid evaluation of structural database (testing set) that consists of an adequate list of decoy compounds in combination with diverse list of known active compounds.

The testing set included structurally diverse active inhibitors of 14 MAO A and 18 MAO B.<sup>1-3</sup> The decoy list was selected as depicted by Verdonk and co-workers.<sup>4</sup> Briefly, the decoy compounds were prepared relying on three basic one-dimensional (1D) characteristics that permit the estimation of distance (D) between two molecules (e.g., i and j), namely: (1) the number of hydrogen-bond donors (NumHBD); (2) number of hydrogen-bond acceptors (NumHBA) and (3) the number of nonpolar atoms (NP, known as the summation of Cl, F, Br, I, S and C atoms in a particular molecule).

For each active compound in the testing set, the distance to the nearest other active compound is detected using their Euclidean Distance (equation A):

$$D(i, j) = \sqrt{(\text{NumHBD}_i - \text{NumHBD}_j)^2 + (\text{NumHBA}_i - \text{NumHBA}_j)^2 + (\text{NP}_i - \text{NP}_j)^2} \quad (\text{A})$$

The minimum distances are averaged by calculating the mean over all active compounds (Dmin).

After that, for each active molecule in the testing set an average of 36 decoys were chosen in random way from the ZINC database. The decoys were selected in such a pattern that they did not exceed Dmin distance from their corresponding active members.

Additionally, to further diversify the actives compounds, i.e., to prevent close likeness among active compounds in the testing set, any active compound having zero distance D(i,j) from other active compound(s) in the testing set was eliminated. Active testing molecules were defined as those possessing MAO-A and MAO-B inhibitors affinities  $\leq 300$  nM. The MAO-A testing set

included 14 active compounds and 504 ZINC inactive compounds, while MAO-B testing set included 16 active compounds and 576 ZINC inactive compounds.

The decoy sets were screened by each pharmacophore for ROC curve analysis utilizing the "Best flexible search" option carried out in HYPOGEN, while the conformational spaces of the compounds were formed using the "Fast conformation generation option" applied in HYPOGEN. Compounds that are lacking one or more features were excluded from hit lists. Moreover, decoy set compounds were fitted against the selected pharmacophore and their fit values (best fit values) was determined by equation (B):

$$Fit = \sum \text{mapped hypothesis features} \times W [1 - \sum (\text{disp}/\text{tol})^2] \quad (\text{B})$$

ROC curves for corresponding pharmacophores were constructed using the hit lists. ROC curve analysis prescribes the sensitivity (Se or true positive rate, Equation C) for any probable change in the number of selected compounds (n) as a function of (1-Sp). Sp is known as specificity or true negative rate (Equation D).

$$Se = \frac{\text{Number of Selected Actives}}{\text{Total Number of Actives}} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (\text{C})$$

$$Sp = \frac{\text{Number of Discarded Inactives}}{\text{Total Number of Inactives}} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (\text{D})$$

Where, TP is the number of active compounds that are captured by the virtual screening method (true positives), FN is the number of active compounds ejected by the default screening, TN is the number of excluded decoys (considered inactives), while FP is the number of captured decoys (considered inactives).

A ROC curve is plotted by adjusting the score of the active molecule as the first threshold. After that, the number of decoy compounds within this cut-off is enumerated, and the corresponding Se and Sp pair is detected. This calculation is repeated for the active compound with the second

highest score and so on, until the scores of all actives are represented as a selection of thresholds.

The ROC curve expresses an ideal distribution, where overlapping between the scores of active molecules and decoys does not occur, starts from the origin to the upper-left corner until all the actives are recovered and Se comes the value of 1. Then, the ideal ROC curve keeps as a horizontal straight line to the upper-right corner where all active compounds and all decoy compounds are retrieved, which is indicated by Se = 1 and Sp = 0.

The success of a particular virtual screening workflow can be governed from the following criteria:

1) Area under the ROC curve (AUC): -In a successful ROC curve, an AUC value of 1 is perfect.

However, AUC value of 0.5 indicates random distributions. Virtual screening that carries out better than a random recognition of active compounds and decoys retrieve an AUC value between 0.5 and 1.

2) Overall accuracy (ACC): Indicates the percentage of molecules that were classified correctly by the screening protocol (Equation E). Testing compounds are appointed a binary score value of zero (compound captured) or one (compound not captured).

$$ACC = \frac{TP+TN}{N} = \frac{A}{N} \times Se + \left(1 - \frac{A}{N}\right) \times Sp \quad (E)$$

N is the total number of compounds in the testing database and A is the number of true active compounds in the testing database.

3) Overall specificity (SPC): Indicates the percentage of excluded inactive compounds by the particular virtual screening workflow. Inactive test compounds are appointed a binary score value of zero (compound captured) or one (compound not captured).

4) Overall true positive rate (TPR or overall sensitivity): Describes the fraction percentage of captured active compounds from the total number of active compounds. Active test compounds are assigned a binary score value of zero (compound captured) or one (compound not captured).

5) Overall false negative rate (FNR or overall percentage of excluded actives): Describes the fraction percentage of active compounds that were excluded by the virtual screening method.

Discarded active test compounds are assigned a binary score value of zero (compound captured) or one (compound not captured).

**Table S1** The training subsets employed in exploring the pharmacophoric space of MAO-A and MAO-B inhibitors

Training set	Active <sup>a</sup>	Moderately active <sup>b</sup>	Inactive <sup>c</sup>
MAO-A	7, 31, 64	9, 11, 14, 19, 24, 25, 33, 39, 44, 47, 53, 55, 65	17, 36, 42, 43, 50, 59, 60, 63, 66
MAO-B	11, 31, 33, 36, 39, 53, 55	7, 14, 17, 24, 42, 47, 50, 59, 60, 63, 64, 65, 66	9, 19, 25, 43, 44

**Notes:** <sup>a</sup>Active MAO-A inhibitors are defined for compounds with IC<sub>50</sub> value ≤ 300 nM; <sup>b</sup>moderately active inhibitors are defined for compounds that have % of inhibition (at 1 μM) less than 90 % and more than 10 % for MAO-A, and less than 80 % and more than 10 % for MAO-B; <sup>c</sup>inactive compounds are those that have % of inhibition less than 10 % (at 1 μM).

**Table S2** HipHop run parameters employed for exploring MAO-A and MAO-B pharmacophoric spaces

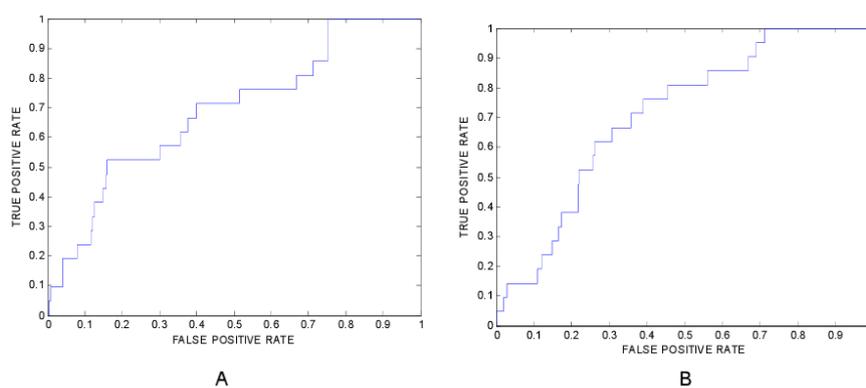
HipHop Run No.	Selected input features (types and ranges) <sup>a</sup>	Number of pharmacophoric features <sup>b</sup>
1	HBA (1 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	4 – 5
2	HBA (1 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	4 – 5
3	HBA (2 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	4 – 5
4	HBA (2 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	4 – 5
5	HBA (1 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	4 – 5
6	HBA (1 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	4 – 5
7	HBA (2 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	4 – 5
8	HBA (2 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	4 – 5
9	HBA (1 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	5 – 5
10	HBA (1 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	5 – 5
11	HBA (2 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	5 – 5
12	HBA (2 – 3), HBD (0 – 1), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	5 – 5
13	HBA (1 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	5 – 5
14	HBA (1 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	5 – 5
15	HBA (2 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3)	5 – 5
16	HBA (2 – 3), HBD (0 – 2), Hbic (0 – 1), RingArom (0 – 3), Exv (0 – 10)	5 – 5

**Notes:** <sup>a</sup>HBA: Hydrogen Bond Acceptor, HBD: Hydrogen Bond Donor, RingArom: Ring Aromatic, Hbic: Hydrophobic, Exv: excluded volumes, the allowed ranges of input features are in brackets. <sup>b</sup>Other parameters were set to their default values.

**Table S3** ROC performance of the highest ranked models for MAO-A and MAO-B inhibitors

Pharmacophore model	ROC –AUC <sup>a</sup>	ACC <sup>b</sup>	SPC <sup>c</sup>	TPR <sup>d</sup>
MAO-A	0.779	0.570	0.548	0.573
MAO-B	0.750	0.277	0.357	0.489

**Notes:** <sup>a</sup>AUC: area under the curve, <sup>b</sup>ACC: overall accuracy, <sup>c</sup>SPC: overall specificity, <sup>d</sup>TPR: overall true positive rate.



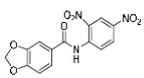
**Figure S10** ROC curves of the pharmacophore models of MAO-A and MAO-B, respectively.

## Cholinesterase Assays

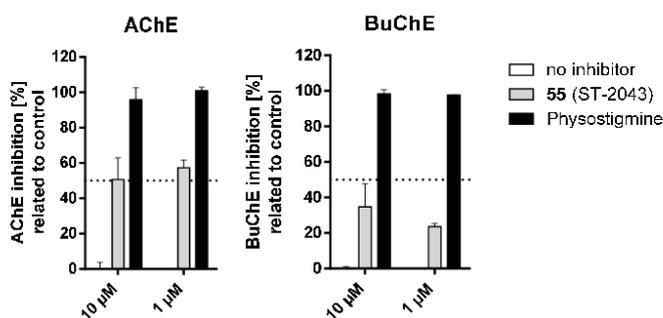
Cholinesterase inhibition screening was performed according to a modified Ellman's assay.<sup>5,6</sup> Test compounds ( $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M) were preincubated with electric eel acetylcholine esterase (eeAChE Type VI-S;  $0.0025 \text{ U mL}^{-1}$ ) or equine serum butyrylcholine esterase (eqBuChE;  $0.002 \text{ U mL}^{-1}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min in a total assay volume of  $200 \mu\text{L}$  ( $0.1 \text{ M}$  potassium phosphate buffer pH 8). The assay was started by adding a solution of dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB;  $0.5 \text{ mM}$ ) and the substrate acetylthiocholine iodide (ATCI;  $1 \text{ mM}$ ) and product formation was monitored

spectrophotometrically (412 nm) at 37°C over a period of 30 min (40 sec intervals). Percentage values were calculated relative to control and physostigmine was used as positive control.

**Table S4** AChE and BuChE inhibition rates of ST-2043 (test concentration 10 μM and 1 μM)

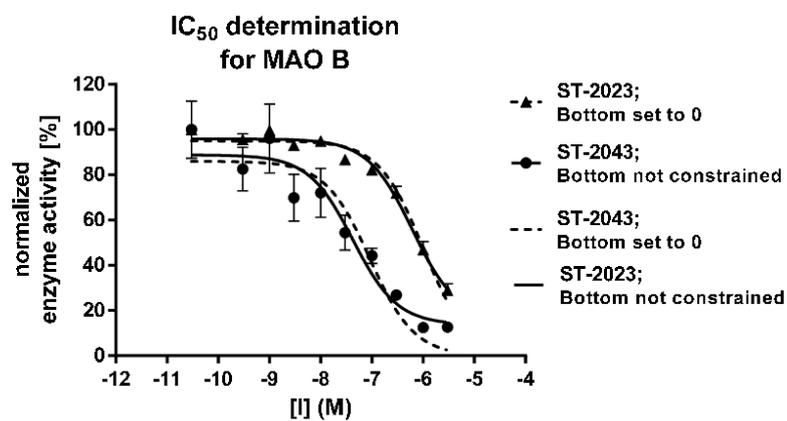
Structure	%Inhibition <sup>a</sup>	
	AChE	BuChE
	50.7±12.2 (@10 μM) 57.2±4.5 (@1 μM)	34.8±13.0 (@10 μM) 23.7±1.8 (@1 μM)

**Notes:** <sup>a</sup> Data represent mean values ± standard deviation of four independent experiments each performed in duplicates (global fit). Percentage values were calculated relative to control (set to 100% remained activity).



**Figure S11** Inhibition of AChE and BuChE after incubation with **55** (ST-2043) and Physostigmine as control. Data represent mean values ± standard deviation of four independent experiments, each performed in duplicates. Percentage values were calculated relative to control (set to 100% remained activity).

## MAO B IC<sub>50</sub> determination



**Figure S12** Normalized full inhibition curve for compound **ST-2023 (7)** and **ST-2043 (55)** with chosen (Bottom = 0 and Bottom not constrained for **7** and **55**, respectively) and alternative non-linear regression fit mode. Dashed lines represent non-linear fit with bottom plateau set to zero, while solid lines represent a fit with no constrained bottom plateau. Data represent mean values  $\pm$  standard deviation of four independent experiments, each performed in duplicates.

## References

1. Reis J, Cagide F, Chavarria D, et al. Discovery of New Chemical Entities for Old Targets: Insights on the Lead Optimization of Chromone-Based Monoamine Oxidase B (MAO-B) Inhibitors. *J Med Chem.* 2016;59(12):5879-5893.
2. Frédérick R, Dumont W, Ooms F, et al. Synthesis, structural reassignment, and biological activity of type B MAO inhibitors based on the 5H-indeno[1,2-c]pyridazin-5-one core. *J Med Chem.* 2006;49(12):3743-3747.
3. La Regina G, Silvestri R, Artico M, et al. New pyrrole inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity. *J Med Chem.* 2007;50(5):922-931.
4. Verdonk ML, Berdini V, Hartshorn MJ, et al. Virtual screening using protein-ligand docking: Avoiding artificial enrichment. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(3):793-806.
5. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
6. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules.* 2017;22(7):1192.

## 6: Experimenteller Teil

### 6.1: Material und Methoden

Reagenzien und Lösemittel wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland), Fisher Scientific (Hampton, USA), Alfa Aesar (Haverhill, USA) and Chemsolute (Renningen, Deutschland), Perkin Elmer Life, Analytical Sciences (Rodgau, Deutschland) oder Carbolution (St. Ingbert, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und  $^{19}\text{F-NMR}$  Spektren wurden entweder mit einem Bruker Avance III – 300 Spektrometer oder einem Bruker Avance III – 600 Spektrometer (Rheinstetten, Germany) in deuterierten Lösemitteln ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{DMF-}d_6$ ) aufgenommen. Die Auflistung der Daten erfolgte durch Angabe der chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) in ppm gegenüber dem internen Standard, der Multiplizität (s, Singulett; d, Dublett etc.), der Kopplungskonstante (J) in Hertz, Anzahl sowie Position der Protonen (bpy, BOPPY; but, Butyl, chin, Chinazolin; hex, Hexyl; im, Imidazol; ind, Indol; isochin, Isochinolin; mal, Maleat; nap, Naphthalin; ox, Oxazol; pen, Pentyl; ph, Phenyl; pht, Phthalimid; pip, Piperidin; prop, Propyl; prz, Piperazin; pyd, Pyridin; pyl, Pyrazol; pyr, Pyrimidin; tet, Tetralon). UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem infinite M1000 Pro microplate reader (Tecan Trading AG, Schweiz) vermessen. Es wurde zu jeder Fluorophorklasse mindestens eine repräsentative Verbindung vermessen. Die Wellenlängen der ermittelten Absorptions- und Emissionsmaxima wurden mit  $\lambda_{\text{maxAbs}}$  bzw.  $\lambda_{\text{maxEm}}$  angegeben. Die Elementaranalysen (C, H, N, S) wurden mit dem Gerät CHN-Rapid (Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) gemessen. Die Messwerte (bes.) sind in Prozent angegeben und liegen innerhalb von  $\pm 0.4\%$  der theoretischen Werte (theo.). LC-MS Analysen wurden mit einem Bruker Elute SP (Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Als chromatographische Säule wurde eine Intensity Solo C18 RP mit den Ausmaßen 100x2.1 mm verwendet; Eluent: Acetonitril (1-40%) in Wasser 0.1% Ameisensäure; Flussrate: 0.3 mL/min. Als Detektor diente das Massenspektrometer Bruker amaZon speed (Rheinstetten, Deutschland) mit Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) mit positiver Polarität. Die Daten sind angegeben als Retentionszeit ( $t_r$ ), Masse-zu-Ladung ( $m/z$ ) der geladenen Addukte (Bsp.  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und der prozentualen Reinheit. Die Chromatogramme der jeweiligen Verbindungen sind gezeigt. ESI-MS Spektren wurden mithilfe eines Ion-Trap-API-Massenspektrometer Finnigan LCQ Deca (Thermo Quest, Waltham, USA) aufgenommen. Die Daten wurden als Masse-zu-Ladung ( $m/z$ ) der geladenen Addukte (Bsp.  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und der

relativen Intensität (%) angegeben. APCI-MS wurden mithilfe eines Expression CMS Massenspektrometers (Advion, Ithaca, USA) vermessen. Die Daten wurden analog zur ESI-Messung angegeben. Schmelzpunkte wurden an einem M-564 Schmelzpunktmessgerät (Büchi, Essen, Deutschland) gemessen und unkorrigiert angegeben. Präparative Säulenchromatographie wurde (wenn nicht anders angegeben) mit Kieselgel (60 M, 0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Folien der Firma Macherey-Nagel verwendet (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Folien, Düren, Deutschland). Mikrowellensynthesen wurden in einem Biotage Initiator 2.0 Reaktor (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Bei Synthesen, die unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt wurden, wurde Stickstoff verwendet, welcher durch Leiten über Calciumchlorid getrocknet wurde.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute von Verbindung **18** wurden die Absorptionsspektren mit einem UV/VIS/NIR Lambda 19 Spektrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) und die Emissionsspektren mit einem LS55 Spektrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) aufgenommen. Die Quantenausbeute der untersuchten Substanz wurde in wässriger Lösung nach der Relativmethode mit Coumarin 153<sup>220</sup> als Standard vermessen. Zur Berechnung wurde die Methode von Fery-Forgues und Lavabre verwendet.<sup>221</sup> Demnach errechnet sich die Quantenausbeute  $\Phi_F$  wie folgt:

$$\Phi_{F(X)} = (A_S/A_X)(F_X/F_S) \left(\frac{n_X}{n_S}\right)^2 \Phi_{F(X)} \quad (2)$$

A ist hierbei die Absorbanz bei der Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluorophors, F der Flächeninhalt der korrigierten Emissionskurve und n der Brechungsindex des gewählten Lösemittels. Die Subskripte s und x stehen hierbei für Standard beziehungsweise die zu untersuchende Substanz.

## 6.2: Allgemeine Vorschriften

### 6.2.1: Amidierungen

#### 6.2.1.1: Methode A<sup>79</sup>

1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) (1 eq) wurde in THF gelöst. Zu dieser Lösung wurde die entsprechende Carbonsäure (1 eq) gelöst in THF hinzugegeben und die Mischung 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das entsprechende Amin (1.1 eq) gelöst in THF

hinzugegeben und nach weiteren 10 min Rühren bei Raumtemperatur zum Rückfluss erhitzt. Nach DC-Kontrolle wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat- und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Umkristallisation aus Toluol ergab das gewünschte Produkt.

#### 6.2.1.2: Methode B<sup>222</sup>

Die entsprechende Carbonsäure (1 eq) und das jeweilige primäre Amin (1 eq) wurden in DMF gelöst. Nach Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) (1.1 eq) und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) (0.1 eq) wurde die Reaktionsmischung für 12 h bei 60 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druckdestillativ entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Etwaig anfallender Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingeengt. Das gewünschte Produkt wurde durch säulenchromatographische Aufreinigung gewonnen.

#### 6.2.1.3: Methode C<sup>94</sup>

Das entsprechende primäre Amin (1 eq) wurde in Chloroform vorgelegt. Nach Zugabe des Sulfonsäurechlorids (1.5 eq) und Triethylamin (2 eq) wurde die Mischung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgefiltert und das Filtrat zur Trockne unter reduziertem Druck eingeengt und im Anschluss in möglichst wenig Chloroform gelöst. Durch Zugabe von HCl in Dioxan (2 M) wurde das Rohprodukt gefällt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

## 6.2.2: Nucleophile aromatische Substitution

#### 6.2.2.1: Methode D (Substitution an Di- bzw. Trichlorpyrimidinen)<sup>85</sup>

Das entsprechende Di- bzw. Trichlorpyrimidinderivat (1 eq) wurde in einem versiegelbaren Mikrowellengefäß in Isopropanol suspendiert. Nach Zugabe des entsprechendenamins (1.5 eq) und Diisopropylethylamin (2 eq) wurde der Reaktionsansatz für 2 h unter Rühren in der Mikrowelle auf 140 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die flüchtigen

Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

#### 6.2.2.2: Methode E (Substitution an Monochlorpyrimidinen)<sup>85</sup>

Das entsprechende Monochlorpyrimidinderivat (1 eq) wurde in einem versiegelbaren Mikrowellengefäß in Isopropanol suspendiert. Nach Zugabe des entsprechendenamins (3 eq) und Diisopropylethylamin (4 eq) wurde der Reaktionsansatz für 2 h unter Rühren in der Mikrowelle auf 165 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die flüchtigen Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Derivatisierung von 4,6-Dichlorchinazolinderivaten in 4-Position erfolgte analog.

#### 6.2.2.3: Methode F (Substitution mit CH-aciden Nucleophilen)<sup>223</sup>

Das CH-acide Nucleophil (1.2 eq) wurde in DMF gelöst und zu einer Suspension von Natriumhydrid (60% in Mineralöl; 2 eq) in DMF tropfenweise bei Raumtemperatur zugefügt und für 1 h gerührt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des zu substituierenden Pyrimidinderivats (1 eq) gelöst in DMF unter gelegentlicher Kühlung. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde der Überschuss an Natriumhydrid mit Wasser abreagiert und die Lösung mit Salzsäure (10 M) neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser und Diethylether gewaschen. Trocknen des Niederschlages ergab das gewünschte Produkt.

#### 6.2.2.4: Methode G (Substitution an 2,4,6-Trichlorchinazolin)<sup>224</sup>

2,4,6-Trichlorchinazolin (1 eq) wurde in Isopropanol vorgelegt. Nach Zugabe von Diisopropylethylamin (3 eq) und dem entsprechenden Amin (1 eq) wurde die Mischung bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Destillatives Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck und anschließende Säulenchromatographie erbrachte das gewünschte Produkt.

### 6.2.3: Synthese von Ethylacetoacetatderivaten

#### 6.2.3.1: Methode H<sup>225</sup>

Zu einer Lösung des entsprechenden Acetophenons (1 eq) in Toluol wurde Dimethylcarbonat (2 eq) und Natriumhydrid (60% in Mineralöl; 2 eq) gegeben und die Mischung für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen. Die Reinigungslösung wurde mit Ethylacetat extrahiert

und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erbrachten das gewünschte Produkt.

## 6.2.4: Synthese von Pyrimidonderivaten

### 6.2.4.1: Methode J<sup>226</sup>

In einer Mischung aus Ethanol und Toluol (6:1) wurde feingemörsertes Guanidin Carbonat (1 eq) für 1 h am Wasserabscheider refluxiert. Nach Zugabe des entsprechenden Ethylacetoacetatderivat (1 eq) wurde der Reaktionsansatz über Nacht refluxiert. Nach Zugabe von 2 Teilen Wasser wurde der Reaktionsansatz nach weiteren 45 min auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1N HCl neutralisiert. Kristallisation über Nacht bei 5 °C, Filtration und waschen mit Wasser und Diethylether erbrachte das gewünschte Produkt.

## 6.2.5: Alkylierungen

### 6.2.5.1: Methode J (Alkylierung von Aminen)<sup>227</sup>

Das entsprechende Amin (1.1 eq) wurde zusammen mit einem Halogenalkanderivat (1 eq), Kaliumcarbonat (2 eq) und Kaliumiodid (0.2 eq) in Aceton erhitzt und der Reaktionsendzeitpunkt mittels DC-Kontrolle bestimmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die anorganischen Bestandteile abgefiltert und das Filtrat unter reduziertem Druck eingengt. Der Rohextrakt wurde mittels Destillation, Extraktion oder Säulenchromatographie aufgereinigt.

### 6.2.5.2: Methode K (Williamson-Ethersynthese)<sup>228</sup>

Zur Bildung von Ethern wurde der entsprechende Phenolderivat (1 eq) mit dem jeweiligen Halogenalkan (1.7 eq) in Aceton gelöst. Der Lösung wurde Kaliumcarbonat (4 eq) und Kaliumiodid (0.2 eq) hinzugefügt und die Mischung für 24 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die anorganischen Bestandteile abgefiltert und das Filtrat unter reduziertem Druck eingengt. Der Rohextrakt wurde mittels Destillation, Extraktion oder Säulenchromatographie aufgereinigt.

### 6.2.5.3: Methode L (Mitsunobu Reaktion)<sup>229</sup>

Zu einer Lösung von Triphenylphosphin (1.5 eq) und Azodicarbonsäurediethylester (1.5 eq) in trockenem THF wurde der gewünschte Phenolderivat (1 eq) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des gewünschten Alkylalkohols

(1.5 eq). Der Reaktionsansatz wurde für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erbrachte das gewünschte Produkt.

## 6.2.6: Chlorierungen

### 6.2.6.1: Methode M (von Pyrimidonen)<sup>86</sup>

Das entsprechende Pyrimidonderivat (1 eq) wurde in Acetonitril suspendiert. Dem Reaktionsgemisch wurde Phosphoroxychlorid ( $\text{POCl}_3$ ) (5 eq) hinzugefügt und der Ansatz für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit und DC-Kontrolle wurde das Lösungsmittel und der Überschuss an  $\text{POCl}_3$  unter reduziertem Druck destillativ entfernt.

### 6.2.6.2: Methode N (von Alkoholen)<sup>227</sup>

Der entsprechende Alkohol (1 eq) wurde in THF gelöst und unter Eiskühlung Thionylchlorid (1.5 eq) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 65 °C gerührt. THF und der Überschuss an Thionylchlorid wurde destillativ entfernt und bei Bedarf das Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert.

### 6.2.6.3: Methode O (von Sulfonsäuren)<sup>94</sup>

Die entsprechende Sulfonsäure (1 eq) wurde in Toluol vorgelegt und zum Rückfluss erhitzt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Phosphorpentachlorid (1.8 eq) in vier gleichmäßigen Portionen im Abstand von 15 min. Nach Beendigung der Zugabe wurde der Ansatz für weitere 2 h unter Rückfluss gerührt und anschließend das Lösemittel destillativ unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Eiswasser aufgenommen. Abfiltrieren des Niederschlages und Trocknen unter reduziertem Druck erbrachte das gewünschte Produkt.

## 6.2.7: Synthese von Pyrazololderivaten

### 6.2.7.1: Methode P<sup>230</sup>

Halbkonzentrierte Schwefelsäure wurde auf 5 °C gekühlt und der entsprechende Phenylhydazinderivat (1 eq) hinzugegeben. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von Oxallessigsäure (1 eq) in Wasser hinzugefügt und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für

3 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Trocknen unter reduziertem Druck ergab das gewünschte Produkt.

## 6.2.8: Demethylierung von Methylphenylethern

### 6.2.8.1: Methode Q<sup>231</sup>

Der entsprechende Methylphenylether (1 eq) wurde in Essigsäure gelöst und im Anschluss HBr in Wasser (48 %, 10 eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 60 °C für 72 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit NaOH (2 M) neutralisiert und bei 7 °C auskristallisiert. Filtration und Trocknen des Niederschlags unter reduziertem Druck erbrachte das gewünschte Produkt.

## 6.2.9: Synthese von bor-haltigen Fluorophoren

### 6.2.9.1: Methode R<sup>168,195</sup>

Der Bor-chelatisierende Derivat (1 eq) wurde in Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Der Lösung wurde über Spritzen Triethylamin (3 eq) und Bortrifluorid Diethyletherat (3 eq) zugefügt und im Anschluss auf 40 °C erwärmt und für 8 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wurde der Reaktionsansatz mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erbrachte das Rohprodukt, welches mittels Säulenchromatographie aufgereinigt wurde.

## 6.2.10: Aldolkondensation von Tetralonderivaten

### 6.2.10.1: Methode S<sup>208</sup>

Der Tetralonderivat (1 eq) und der entsprechende Aldehyd (1 eq) wurden in Ethanol gelöst. Nach Zugabe von wässriger NaOH (15 M; 4.5 eq) wurde die Mischung für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung unter reduziertem Druck zur Trockne eingengt und in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde filtriert und mit gesättigter wässriger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Trocknen über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erbrachte das Rohprodukt, das mittels Säulenchromatographie aufgereinigt wurde.

## 6.2.11: Reduktionen

### 6.2.11.1: Methode T (Reduktion von Nitroaromaten)<sup>232</sup>

Der entsprechende Nitroaromat (1 eq) wurde in Ethanol gelöst und nach Zugabe von Hydrazin Monohydrat (10 eq) und Palladium auf Kohle (10%; 0.1 eq) für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Mischung über Kieselgur gefiltert und der Filter mehrmals mit Ethanol gespült. Verdampfen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erbrachte das gewünschte Produkt.

### 6.2.11.2: Methode U (Reduktion von Nitrilen)<sup>233</sup>

Zur Aktivierung von Raney-Nickel wurde zur Aluminium-Nickel-Legierung (10 eq) Natronlauge (2M, 200 eq) hinzugegeben und die Suspension für 2 h auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die wässrige Phase dekantierend entfernt und der Rückstand mit Wasser und im Anschluss mit Methanol gewaschen. Die Waschflüssigkeiten wurden ebenfalls dekantierend entfernt. Der aktivierte Raney-Nickel (10 eq) wurde in ammoniakalischen Methanol vorgelegt und das entsprechende Nitril (1 eq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Autoklav unter Wasserstoffatmosphäre (6 bar) bei 40 °C für 3 Tage gerührt. Im Anschluss wurde überschüssiger Raney-Nickel über Kieselgur abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck eingengt. Aus dem öligen Rohprodukt wurde das gewünschte Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt und abfiltriert.

## 6.2.12: Synthese von Oxazolonderivaten

### 6.2.12.1: Methode V (Erlenmeyer-Synthese)<sup>234</sup>

Eine Mischung von Acetylglycin (1 eq), dem entsprechenden Benzaldehyd (1 eq) und Natriumacetat (0.1 eq) wurde mit Essigsäureanhydrid (12 eq) in einem Mikrowellengefäß versiegelt und bei 190 °C für 4 min unter Mikrowellenstrahlung gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz für 2 Tage auskristallisiert und der Niederschlag im Anschluss abgefiltert und mit einer Wasser/Ethanol Mischung (1:1) gewaschen. Trocknen unter reduziertem Druck erbrachte das gewünschte Produkt.

## 6.2.13: Synthese von Imidazolonderivaten

### 6.2.13.1: Methode W<sup>235</sup>

Der entsprechende Oxazolonderivat (1 eq) wurde zusammen mit einem primären Amin (1eq) in Pyridin (10 eq) gelöst und in einem versiegelten Gefäß für 10 min bei 190 °C unter

Mikrowellenstrahlung gerührt. Im Anschluss wurde Pyridin unter reduziertem Druck destillativ entfernt und eine säulenchromatographische Aufreinigung erbrachte das gewünschte Produkt.

#### 6.2.14:        Synthese von BOPPY

##### *6.2.14.1: Methode X<sup>169</sup>*

Zu einer Mischung eines Pyrrol-2-carboxaldehyd Derivats (1 eq) und einem 2-Hydrazin-*N*-heteroaromaten (1 eq) in Dichlorethan wurde *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (0.25 eq) gegeben und das Reaktionsgemisch für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Zu der heißen Lösung wurde Diisopropylethylamin (10 eq) hinzugegeben und für weitere 10 min gerührt. Darauf folgte die Zugabe von Bortrifluorid Diethyletherat (15 eq) und weiteres Rühren unter Rückfluss für 4 h. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit einem halben Volumenanteil Dichlormethan verdünnt und einmal mit Wasser gewaschen. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nochmals mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, gefiltert und zur Trockne unter reduziertem Druck eingedampft. Säulenchromatographische Aufreinigung erbrachte das gewünschte Produkt.

#### 6.2.15:        Derivatisierung primärer Amine mit niedermolekularen Fluorophoren

##### *6.2.15.1: Methode Y (Derivatisierung mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol)<sup>236</sup>*

Das entsprechende primäre Amin (1 eq) wurde in THF gelöst und mit Triethylamin (4.5 eq) versetzt. Zu dieser Mischung wurde eine Lösung von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (2 eq) in THF tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für bis zu 72 h gerührt (DC-Kontrolle). Nach Entfernung von flüchtigen Bestandteilen unter reduziertem Druck wurde das gewünschte Produkt mittels Säulenchromatographie gewonnen.

##### *6.2.15.2: Methode Z (Derivatisierung mit Dansylchlorid)<sup>170</sup>*

Das entsprechende primäre Amin (1 eq) wurde in DMF gelöst und Dansylchlorid (1.6 eq) und Triethylamin (6 eq) wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 100 °C für 3 h gerührt und im Anschluss unter reduziertem Druck eingengt. Mittels Säulenchromatographie und anschließenden Waschen mit Diethylether wurde das gewünschte Produkt isoliert.

#### 6.2.15.3: Methode ZA (Derivatisierung mit BOPPY)<sup>169</sup>

BOPPY (0.2 – 1 eq) und das entsprechende primäre Amin (1 eq) wurden in Gegenwart von Triethylamin (2 eq) in DMF gelöst und bei 60 °C für 24 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Nach Waschen mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat Lösung wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung erbrachte das gewünschte Produkt.

### 6.2.16: Veresterung

#### 6.2.16.1: Methode ZB<sup>237</sup>

Die entsprechende Carbonsäure (1 eq) wurde in Methanol (50 eq) vorgelegt und unter Eiskühlung tropfenweise mit Thionylchlorid (1.1 eq) versetzt. Nach 10 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid destillativ entfernt und das gewünschte Produkt erhalten.

### 6.2.17: Esterspaltung

#### 6.2.17.1: Methode ZC<sup>224</sup>

Der entsprechende Ester (1 eq) wurde in Methanol suspendiert und mit einer wässrigen Lithiumhydroxidlösung (1 M; 2 eq) versetzt. Die Mischung wurde für 12 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss zur Trockne unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde in einer möglichst geringen Menge Wasser gelöst und mit halbkonzentrierter Salzsäure gefällt. Nach Filtrieren und Waschen des Niederschlags mit Wasser wurde dieser unter reduziertem Druck getrocknet und das gewünschte Produkt gewonnen.

### 6.2.18: Einfügen von Schutzgruppen

#### 6.2.18.1: Methode ZD (Phthalschutzgruppe)<sup>94</sup>

Zur Schützung des primärenamins von Taurin wurde Taurin (1 eq) fein gemörsert und zusammen mit Kaliumacetat (1.1 eq) in Essigsäure (6 eq) suspendiert und für 10 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von Phthalsäureanhydrid (1.1 eq) wurde weitere 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde auf 0 °C gekühlt und der entstandene

Niederschlag abfiltriert und mit Essigsäure und Ethanol gewaschen. Rekristallisation aus Wasser ergab das gewünschte Produkt.

### 6.2.19: Entfernen von Schutzgruppen

*6.2.19.1: Methode ZE (Phthalschutzgruppe)<sup>94</sup>*

Das phthalgeschützte Amin (1 eq) wurde in Ethanol gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Es folgte die Zugabe von Hydrazin Monohydrat (5 eq) und weiteres Erhitzen unter Rückfluss für 9 h. Der Reaktionsansatz wurde auf ein Fünftel eingengt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingengt und erbrachte das gewünschte Produkt.

### 6.2.20: Synthese von Chinazolinderivaten

*6.2.20.1: Methode ZF (2,4,6-Trichlorchinazolin)<sup>224</sup>*

2-Amino-5-chlorbenzoesäure (1 eq) wurde zusammen mit Harnstoff (10 eq) bei 160 °C geschmolzen und für 6 h gerührt. Im Anschluss wurde Wasser (60 eq) hinzugefügt und für 5 min bei 100 °C gerührt. Die entstandene Suspension wurde heiß gefiltert und der Niederschlag in NaOH (0.5 M, 10 eq) aufgenommen und kurz zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH = 2) und der entstehende Niederschlag abfiltriert. Waschen mit Wasser/Methanol (1:1) erbrachte das Zwischenprodukt.

Dieses wurde in Phosphoroxotrichlorid (6 eq) suspendiert und mit Diethylanilin (3 eq) versetzt. Die Mischung wurde zum Rückfluss erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und in Eiswasser gegossen. Der dabei entstandene Niederschlag wurde in Diethylether aufgenommen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck erbrachten das Produkt.

*6.2.20.2: Methode ZG (2-Amino-4-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-7-carbonsäuremethyl-ester)<sup>224</sup>*

2-Aminoterephthalat (1 eq) und Cyanamid (1.9 eq) wurden in Acetonitril gelöst und nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure (1.1 eq) bei 90 °C für 12 h gerührt. Nach Abkühlen auf

Raumtemperatur und Filtern wurde durch Trocknen unter reduziertem Druck das Zwischenprodukt gewonnen.

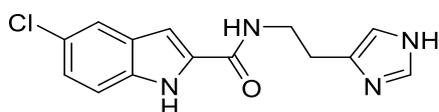
Im Anschluss wurde das Rohprodukt in Essigsäureanhydrid (10 eq) suspendiert und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Nach destillativer Entfernung von Essigsäureanhydrid wurde der Rückstand in Acetonitril aufgenommen, 1,2,4-Triazol (5 eq), Diisopropylethylamin (5 eq) und Phosphoroxotrichlorid (5 eq) hinzugefügt und für 16 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Acetonitril, Ethanol und Diethylether gewaschen und unter reduziertem Druck getrocknet.

Nach Suspendieren in Dioxan und Zugabe von *N*-Methylpiperazin (7.5 eq) wurde die Suspension für 1 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit wässriger Natronlauge (1 M) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ unter reduziertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt wurde durch Umkristallisation aus Isopropanol gewonnen.

### 6.3: Synthesevorschriften

#### 6.3.1: *N*-(2-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl)-5-chloro-1*H*-indol-2-carboxamid (1)

Gemäß Methode A wurde Verbindung **1** aus 5-Chlorindolcarbonsäure (195.6 mg; 1 mmol) und Histamin Dichlorid (202.5 mg, 1.1 mmol) unter Verwendung von CDI (162.2 mg; 1 mmol) und THF (5 mL) hergestellt. Abweichend zur Methode A wurde das Produkt als grauer Feststoff (179 mg; 62%) durch Fällung mit Wasser gewonnen.



Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub> O
Molekulargewicht	288.7
Schmelzpunkt	237 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 11.83 – 11.72 (m, 2H, im-NH, ind-NH), 8.67 (t, J = 5.6 Hz, 1H, CO-NH), 7.69 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ind-4H), 7.58 (s, 1H, im-5H), 7.44 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ind-7H), 7.18 (dd, J = 8.7, 142

2.1 Hz, 1H, ind-6H), 7.08 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ind-3H), 6.86 (s, 1H, im-3H), 3.59 – 3.43 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 2.79 (t, J = 7.4 Hz, 2H, im-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 160.57(CO), 134.72 (ind-2C, ind-7aC), 134.63 (im-2C, ind-3aC), 133.34 (im-4C), 128.10 (ind-5C), 124.12 (ind-6C), 123.23 (ind-4C), 120.46 (im-5C), 113.81 (Ind-7C), 101.79 (ind-3C), 39.04 (NH-CH<sub>2</sub>), 26.98 (im-CH<sub>2</sub>).

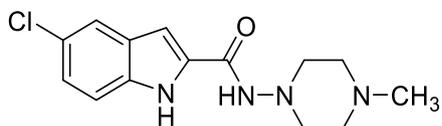
Elementaranalyse theo. C 58.24%; H 4.54%; N 19.40%.

bes. C 57.86%; H 4.33%; N 19.00%.

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 289.3 (100%).

### 6.3.2: 5-Chlor-N-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-indol-2-carboxamid (2)<sup>79</sup>

Gemäß Methode A wurde Verbindung **2** aus 5-Chlorindolcarbonsäure (1.173 g; 6 mmol) und 4-Amino-1-methylpiperazin (760.0 mg, 6.6 mmol) unter Verwendung von CDI (972.9 mg; 6 mmol) und THF (30 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (700 mg, 40%) gewonnen.



Summenformel C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O

Molekulargewicht 292.7

Schmelzpunkt 265 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.79 (s, 1H, ind-NH), 9.52 (s, 1H, CO-NH), 7.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ind-4H), 7.43 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ind-7H), 7.17 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H, ind-6H), 7.09 (s, 1H, ind-3H), 2.91 (t, J = 4.8 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.43 (s, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.19 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.56(CO), 134.73(ind-7aC), 132.21 (ind-2C), 128.00 (ind-3aC), 124.16 (ind-5C), 123.30 (ind-6C), 120.45 (ind-

4C), 113.80 (Ind-7C), 101.91 (ind-3C), 54.37 (prz-2,6C),  
53.78 (prz-3,5C), 45.45 (N-CH<sub>3</sub>).

Elementaranalyse

theo. C 57.44%; H 5.85%; N 19.14%.

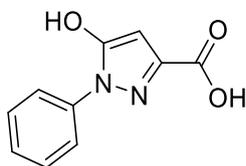
bes. C 57.04%; H 5.93%; N 19.45%.

APCI MS

[M+H]<sup>+</sup> = 293.0 (100%).

### 6.3.3: 5-Hydroxy-1-phenyl-pyrazol-3-carbonsäure(P1)<sup>230</sup>

Gemäß Methode P wurde Verbindung **P1** aus Oxalessigsäure (792.4 mg; 6 mmol) und Phenylhydrazin (648.8 mg; 6 mmol) in halbkonzentrierter Schwefelsäure (8 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (1.1 g; 90%) isoliert.



Summenformel

C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulargewicht

204.2

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

δ 7.78 – 7.71 (m, 2H, ph-2,6H), 7.55 – 7.46 (m, 2H ph-3,5H), 7.40 – 7.33 (m, 1H, ph-4H), 5.94 (s, 1H, pyl-4H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

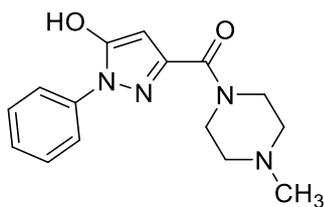
δ 163.27 (COOH), 153.26 (pyl-5C), 142.91 (pyl-3C), 138.16 (ph-1C), 128.96 (ph-3,5C), 126.82 (ph-4C), 122.04 (ph-2,6C), 89.22 (pyl-4C).

APCI MS

[M-H]<sup>-</sup> = 203.6 (100%).

### 6.3.4: N-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-hydroxy-1-phenyl-pyrazol-3-carboxamid (3)

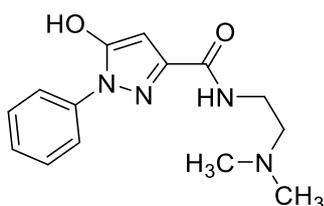
Gemäß Methode A wurde Verbindung **3** aus **P1** (204 mg, 1 mmol) und N-Methylpiperazin (0.15 mL; 1.1 mmol) unter Verwendung von CDI (162 mg; 1 mmol) in THF (3 mL) hergestellt. Das gewünschte Produkt wurde als weißer Feststoff (100 mg; 35%) isoliert.



Summenformel	$C_{15}H_{18}N_4O_2$
Molekulargewicht	286.3
Schmelzpunkt	250 °C (unkorrigiert)
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 7.83 – 7.74 (m, 2H, ph-2,6H), 7.52 – 7.43 (m, 2H, ph-3,5H), 7.34 – 7.25 (m, 1H, ph-4H), 5.69 (s, 1H, pyl-4H), 3.63 (m, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.47 (m, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.29 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
$^{13}C$ NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 162.02 (CON), 154.61 (pyl-5C), 146.05 (pyl-3C), 138.70 (ph-1C), 128.85 (ph-3,5C), 125.90 (ph-4C), 121.26 (ph-2,6C), 88.82 (pyl-4C), 54.76 (prz-2,6C), 54.08 (prz-3,5C), 45.07 (N-CH <sub>3</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 62.92%; H 6.34%; N 19.57%. bes. C 62.69%; H 6.15%; N 19.48%.
APCI MS	$[M+H]^+ = 287.5$ (100%).

### 6.3.5: *N*-(2-(Dimethylamino)ethyl)-5-hydroxy-1-phenylpyrazol-3-carboxamid (**4**)

Gemäß Methode A wurde Verbindung **4** aus **P1** (612 mg; 3 mmol) und *N,N*-Dimethylethyldiamin (0,5 mL; 3,3 mmol) unter Verwendung von CDI (486.3 mg; 3 mmol) in THF (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 8:2) als weißer Feststoff (274 mg; 30%) gewonnen.

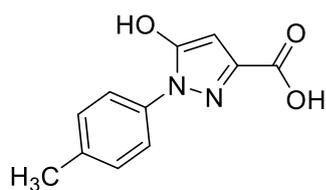


Summenformel	$C_{14}H_{18}N_4O_2$ 145
--------------	-----------------------------

Molekulargewicht	274.3
Schmelzpunkt	131 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d6)	δ 7.98 – 7.92 (m, 2H, ph-2,6H), 7.51 – 7.38 (m, 2H ph-3,5H), 7.31 – 7.19 (m, 1H, ph-4H), 5.60 (s, 1H pyl-4H), 3.42 (q, J = 6.2 Hz, 2H, NH-CH <sub>2</sub> ), 2.74 (t, J = 6.3 Hz, 2H, N-CH <sub>2</sub> ), 2.45 (s, 6H, N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d6)	δ 162.44 (CON), 158.26 (pyl-5C), 145.47 (pyl-3C), 139.51 (ph-1C), 128.58 (ph-3,5C), 125.17 (ph-4C), 120.80 (ph-2,6C), 85.99 (pyl-4C), 57.36 (NH-CH <sub>2</sub> ), 44.01 (N-CH <sub>2</sub> ), 35.23 (N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 61.30%; H 6.61%; N 20.42%. bes. C 60.95%, H 6.64%; N 20.02%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 275.2 (100%).

### 6.3.6: 5-Hydroxy-1-(*p*-tolyl)-pyrazol-3-carbonsäure (P2)

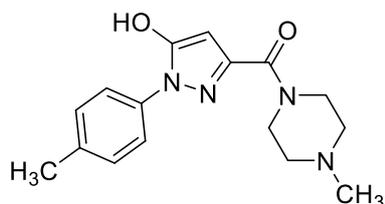
Gemäß Methode P wurde Verbindung **P2** aus Oxalessigsäure (1.58 g; 12 mmol) und Tolyhydrazin Hydrochlorid (1.90 g; 12 mmol) in halbkonzentrierter Schwefelsäure (16 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (2.3 g; 90%) isoliert.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulargewicht	218.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d6)	δ 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.30(d, J = 8.3 Hz, 2H, ph-3,5H), 5.91 (s, 1H, pyl-4H), 2.35 (s, 3H, ph-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M-H] <sup>-</sup> = 217.0 (100%).

### 6.3.7: *N*-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-Hydroxy-1-(*p*-tolyl)-pyrazol-3-carboxamid (5)

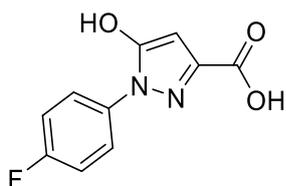
Gemäß Methode A wurde Verbindung **5** aus **P2** (872.8 mg; 4 mmol) und *N*-Methylpiperazin (0.6 mL; 3.3 mmol) unter Verwendung von CDI (648.4 mg; 4 mmol) in THF (12 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 9:2) und waschen mit MeOH als weißer Feststoff (240 mg; 20%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	300.4
Schmelzpunkt	252 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.70 – 7.55 (m, 2H, ph-2,6H), 7.35 – 7.22 (m, 2H, ph-3,5H), 5.72 (s, 1H, pyl-4H), 3.61 (m, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.39 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.34 (s, 3H, ph-CH <sub>3</sub> ), 2.23 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO)	δ 161.91 (CON), 145.86 (pyl-5C), 136.09 (pyl-3C), 135.48 (ph-1C), 129.29 (ph-3,5C), 121.46 (ph-4C), 88.94 (pyl-4C), 63.71 (prz-2,6C), 54.98 (prz-3,5C), 45.39 (N-CH <sub>3</sub> ). 21.30 (ph-CH <sub>3</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 63.98%; H 6.71%; N 18.65%. bes. C 64.17%; H 6.71%; N 18.60%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 301.4 (100%).

### 6.3.8: 1-(4-Fluorphenyl)-5-hydroxy-pyrazol-3-carbonsäure (**P3**)<sup>230</sup>

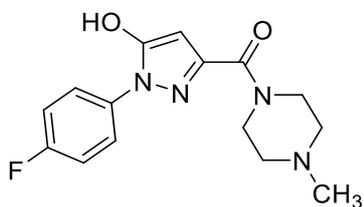
Gemäß Methode P wurde Verbindung **P3** aus Oxalessigsäure (792.4 mg; 6 mmol) und 4-Fluorphenylhydrazin Hydrochlorid (975.5 mg; 6 mmol) in halbkonzentrierter Schwefelsäure (8 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (1.2 g; 90%) isoliert.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulargewicht	222.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.81 – 7.71 (m, 2H, ph-2,6H), 7.41 – 7.29 (m, 2H, ph-3,5H), 5.92 (s, 1H, pyl-4H).
APCI MS	[M-H] <sup>-</sup> = 221.0 (100%).

### 6.3.9: *N*-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1-(4-fluorphenyl)-5-Hydroxy-pyrazol-3-carboxamid (6)

Gemäß Methode A wurde Verbindung **6** aus **P3** (1.11 g; 5 mmol) und *N*-Methylpiperazin (0.75 mL, 5.5 mmol) unter Verwendung von CDI (810.9 mg; 5 mmol) in THF (15 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (380 mg; 25%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	304.3
Schmelzpunkt	253 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.90 – 7.72 (m, 2H, ph-2,6H), 7.43 – 7.21 (m, 2H, ph-3,5H), 5.72 (s, 1H, pyl-4H), 3.62 (m, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.42 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.26 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 168.86 (CON), 161.86 (pyl-5C), 153.76 (pyl-3C), 146.14 (ph-2,6C), 123.47 (d, J = 8.4 Hz, ph-2,6C), 115.67 (d, J =

22.8 Hz, ph-4C), 88.86 (pyl-4C), 54.90 (prz-2,6C), 54.16(prz-2,6C), 45.26 (N-CH<sub>3</sub>).

Elementaranalyse

theo. C 59.20%; H 5.63%; N 18.41%.

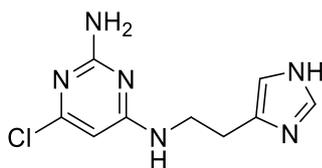
bes. C 59.27%; H 5.67%; N 18.01%.

APCI MS

[M+H]<sup>+</sup> = 305.1 (100%).

### 6.3.10: N<sup>4</sup>-(2-(1H-Imidazol-4-yl)ethyl)-6-chlorpyrimidin-2,4-diamin (P4)

Gemäß Methode D wurde Verbindung **P4** aus 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin (819.9 mg; 5 mmol) und Histamin Dihydrochlorid (1.37 g; 7.5 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.75 mL, 10 mmol) und Isopropanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9:1) als weißer Feststoff (600 mg; 50%) gewonnen.



Summenformel

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>6</sub>

Molekulargewicht:

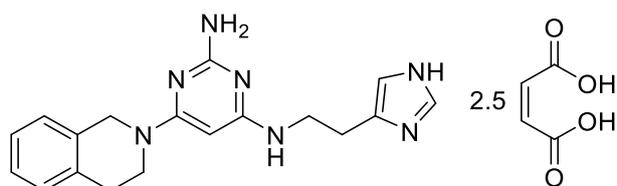
238.68

APCI

[M+H]<sup>+</sup> = 239.1 (100%).

### 6.3.11: N<sup>4</sup>-(2-(1H-Imidazol-4-yl)ethyl)-6-(3,4-dihydroisochinolin-2-yl)pyrimidin-2,4-diamin Hydrogenmaleat (7)

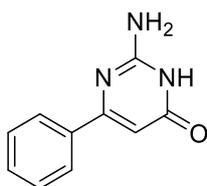
Gemäß Methode E wurde die Verbindung **7** aus **P4** (600 mg, 2.5 mmol) und Tetrahydroisochinolin (1.0 mL, 7.5 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (3.5 mL, 20 mmol) in Isopropanol (14 mL) hergestellt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) wurde das Produkt als gelber Feststoff (2.19 g, 58%) durch Fällung mit Maleinsäure aus Ethanol gewonnen.



Summenformel	$C_{18}H_{21}N_7 \cdot 2.5 C_4H_4O_4$
Molekulargewicht	625.7 (freie Base: 335.2)
Schmelzpunkt	95 °C (unkorrigiert)
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ 8.94 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, pyr-NH), 7.47 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, im-5H), 7.32 (s, 2H, pyr-NH <sub>2</sub> ), 7.23 (q, $J = 2.4$ Hz, 4H, isochin-5,6,7,8H), 6.10 (s, 5H, mal-H, im-3H), 5.38 (s, 1H, pyr-5H), 4.74 (s, 2H, isochin-1H <sub>2</sub> ), 3.81 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, NH-CH <sub>2</sub> ), 3.56 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, isochin-3H <sub>2</sub> ), 2.92 (dt, $J = 8.8, 6.3$ Hz, 4H, im-CH <sub>2</sub> , isochin-4H <sub>2</sub> ).
$^{13}C$ NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ 167.19 (pyr-2C), 153.79 (pyr-4C), 134.82 (im-2C), 134.76 (pyr-6C), 133.94 (im-4C), 132.96 (isochin-1a,5a-C), 130.69 (isochin-8C), 128.23 (isochin-5C), 126.73 (isochin-6C), 126.29 (isochin-7C), 126.21 (im-5C), 116.50 (pyr-5C), 46.10 (NH-CH <sub>2</sub> ), 39.85 (isochin-1C), 27.87 (isochin-3,4CH <sub>2</sub> ), 23.79 (im-CH <sub>2</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 53.76%; H 4.99%; N 15.67%. bes. C 53.73%; H 5.23%; N 15.39%.
APCI MS	$[M+H]^+ = 336.2$ (100%).

### 6.3.12: 2-Amino-6-phenylpyrimidin-4(3H)-on (P5)<sup>226</sup>

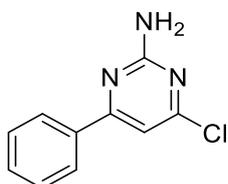
Gemäß Methode I wurde Verbindung **P5** aus Ethylbenzoylacetat (10 g; 52 mmol) und Guanidin Carbonat (4.7 g, 52 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (120 mL: 20 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (8 g; 83%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O
Molekulargewicht	187.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 10.81 (s, 1H, NH), 8.00 – 7.88 (m, 2H, ph-2,6H), 7.52 – 7.35 (m, 3H, ph-3,4,5H), 6.60 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.10 (s, 1H, OC-CH).

### 6.3.13: 4-Chlor-6-phenylpyrimidin-2-amin (P6)<sup>238</sup>

Gemäß Methode M wurde Verbindung **P6** aus **P5** (561 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (1.37 mL, 15 mmol) in Acetonitril (10 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand mit Acetonitril gewaschen und das Produkt als hellgelber Feststoff (400 mg; 65%) gewonnen.

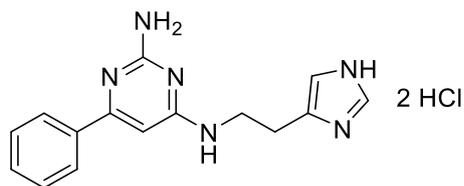


Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub>
Molekulargewicht	205.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.36 (s, 2H, pyr-NH <sub>2</sub> ), 7.93 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.66 – 7.50 (m, 3H, ph-3,4,5H), 6.36 (s, 1H, pyr-5H).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 206.2 (100%).

### 6.3.14: N<sup>4</sup>-(2-(1H-Imidazol-4-yl)ethyl)-6-phenylpyrimidin-2,4-diamin Dihydrochlorid (**8**)

Gemäß Methode E wurde Verbindung **8** aus **P6** (400 mg; 2 mmol) und Histamin Dihydrochlorid (1.10 g, 6 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.5 mL, 8 mmol) in

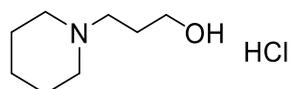
Isopropanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9:1) als gelber Feststoff (212 mg; 30%) gewonnen.



Formel	$C_{15}H_{16}N_6 \cdot 2 \text{ HCl}$
Molekulargewicht	353.3 (freie Base: 280.3)
Schmelzpunkt	187 °C (unkorrigiert)
$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 8.98 – 8.71 (m, 1H, pyr-NH), 8.54 (s, 1H, pyr-5H), 7.90 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, ph-4H), 7.68 (s, 1H, im-5H), 7.61 – 7.43 (m, 4H, ph-2,3,4,5H), 7.30 (s, 1H, im-NH), 6.52 (s, 1H, im-3H), 3.66 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, NH- $CH_2$ ), 2.93 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, im- $CH_2$ ).
$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 163.29 (pyr-2C), 158.15 (pyr-4C), 133.86 (im-2C, pyr-6C), 131.88 (im-4C), 131.19 (ph-2,6C), 129.02 (im-5C), 126.44 (ph-3,4,5C), 116.37 (Pyr-5C), 48.52 (NH- $CH_2$ ), 24.65 (im- $CH_2$ ).
Elementaranalyse	theo. C 51.00%; H 5.14%; N 23.79%. bes. C 51.39%; H 5.52%; N 23.57%.
APCI MS	$[M+H]^+ = 281.1$ (100%).

### 6.3.15: 3-(Piperidin-1-yl)propan-1-ol Hydrochlorid (P7)<sup>209</sup>

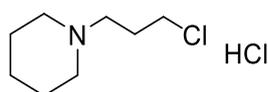
Gemäß Methode J wurde Verbindung **P7** aus Piperidin (5.11 g; 60 mmol) und 3-Chlorpropan-1-ol (4.73 g, 50 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (9.88 g; 0,1 mol) und Kaliumiodid (1.66 g; 10 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Kristallisation als Hydrochlorid aus Isopropanol ergab das Produkt als weißen Feststoff (5.5 g; 79%).



Summenformel	$C_8H_{17}NO \cdot HCl$
Molekulargewicht	179.7 (freie Base: 143.2)
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO-d6)	$\delta$ 10.54 (s, 1H, $NH^+$ ), 4.42 (s, 1H, OH), 3.44 (t, J = 5.9, 2H, prop-1 $H_2$ ), 3.38-3.33 (m, 2H, pip-2,6 $H_{\ddot{a}q}$ ), 3.02-2.95 (m, 2H, prop-3 $H_2$ ), 2.82-2.78 (m, 2H, pip-2,6 $H_{ax}$ ), 1.88-1.64 (m, 7H, prop-2 $H_2$ , pip-3,5 $H_2$ , pip-4 $H_{\ddot{a}q}$ ), 1.43-1.30 (m, 1H, pip-4 $H_{ax}$ ).

### 6.3.16: 1-(3-Chlorpropyl)piperidin Hydrochlorid (P8)<sup>209</sup>

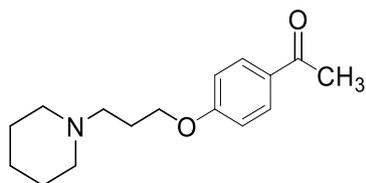
Gemäß Methode N wurde Verbindung **P8** aus **P7** (1.34 g; 8 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (0.77 mL; 12 mmol) in THF (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (1.48 g, quant.) gewonnen.



Summenformel	$C_8H_{16}ClN \cdot HCl$
Molekulargewicht	198.1 (freie Base: 161.7)
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO-d6)	$\delta$ 10.73 (s, 1H, $NH^+$ ), 3.73 (t, J = 6.4, 2H, prop-3 $H_2$ ), 3.40-3.35 (m, 2H, pip-2,6 $H_{\ddot{a}q}$ ), 3.10-3.03 (m, 2H, prop-1 $H_2$ ), 2.89-2.77 (m, 2H, pip-2,6 $H_{ax}$ ), 2.25-2.15 (m, 2H, prop-2 $H_2$ ), 1.87-1.65 (m, 5H, pip-3,5 $H_2$ , pip-4 $H_{\ddot{a}q}$ ), 1.41-1.31 (m, 1H, pip-4 $H_{ax}$ ).

### 6.3.17: 1-(4-(3-(Piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)ethan-1-on (P9)<sup>239</sup>

Gemäß Methode K wurde **P9** aus 4-Hydroxyacetophenon (1.36 g; 10 mmol) und **P8** (1.59 g; 8 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (2.76 g; 20 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde das Produkt in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und mit 5wt% wässriger Natronlauge (3 x 30 mL) gewaschen. Evaporation des organischen Lösemittels erbrachte das Produkt als weißen Feststoff (1.3 g; 50%).



Summenformel

$C_{16}H_{23}NO_2$

Molekulargewicht

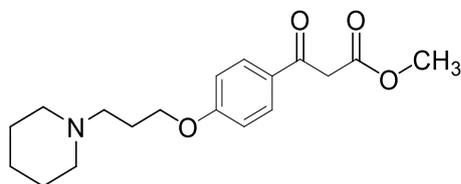
261.4

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$  7.91 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-2,6H), 7.01 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-3,5H), 4.08 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.51 (s, 3H, OC-CH<sub>3</sub>), 2.40 – 2.24 (m, 6H, pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>), 1.86 (tt,  $J = 6.5, 5.5$  Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.47 (m, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.41 – 1.30 (m, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

### 6.3.18: Methyl 3-oxo-3-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)propanoat (P10)

Gemäß Methode H wurde Verbindung **P10** aus **P9** (784 mg; 3 mmol) und Dimethylcarbonat (0.5 mL, 6 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (246 mg, 6 mmol) in Toluol (3 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als blass-gelbes Öl (430 mg; 40%).



Summenformel

$C_{18}H_{25}NO_4$

Molekulargewicht

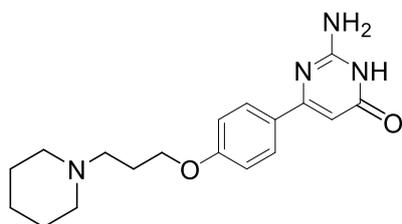
319.4

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$  7.92 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-2,6H), 7.04 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-3,5H), 4.17 – 4.05 (m, 4H, prop-3H<sub>2</sub>, OC-CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.40 - 2.25 (m, 6H, pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>), 1.87 (p,  $J = 6.7$  Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.49 (m, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.45 - 1.25 (m, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

### 6.3.19: 2-Amino-6-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)pyrimidin-4-on (P11)

Gemäß Methode I wurde Verbindung **P11** aus **P10** (1.2 g; 3.8 mmol) und Guanidin Carbonat (340 mg; 3.8 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (12 mL: 2 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (600 mg; 49%) gewonnen.



Summenformel

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Molekulargewicht

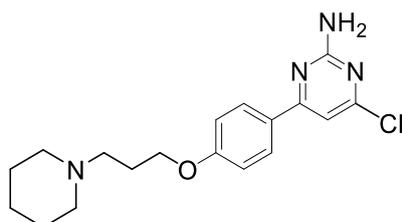
328.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

δ 10.72 (s, 1H, NH), 7.98 – 7.81 (m, 2H, ph-2,6H), 7.08 – 6.88 (m, 2H, ph-3,5H), 6.56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.02 (s, 1H, OC-CH), 4.04 (t, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.40 – 2.25 (m, 6H pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>), 1.98 – 1.74 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.50 (t, J = 5.5 Hz, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.38 (d, J = 5.5 Hz, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

### 6.3.20: 4-Chlor-6-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)pyrimidin-2-amin (P12)

Gemäß Methode M wurde Verbindung **P12** aus **P11** (985.2 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (1.37 mL; 15 mmol) in Acetonitril (10 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels und Waschen mit Acetonitril wurde das Rohprodukt als orangener Feststoff (656 mg, 63%) gewonnen, mittels DC (DCM/MeOH 95:5 R<sub>f</sub> = 0.24) die Reinheit bestimmt und weiterverwendet.



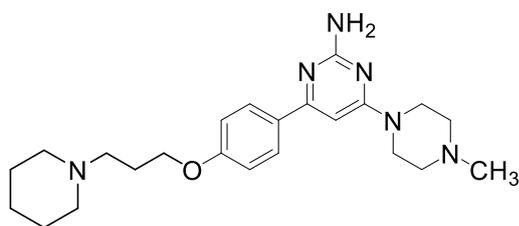
Summenformel

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>4</sub>O

Molekulargewicht 346.9

6.3.21: 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-6-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)pyrimidin-2-amin (9)

Gemäß Methode E wurde Verbindung **9** aus **P12** (1 g, 3 mmol) und *N*-Methylpiperazin (1.1 mL; 10 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (2 mL, 12 mmol) in Isopropanol (14 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als weißen Feststoff (605 mg; 50%).



Summenformel C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O

Molekulargewicht 410.6

Schmelzpunkt 129 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,5H), 6.51 (s, 1H, pyr-5H), 6.01 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.04 (t, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 3.70 – 3.51 (m, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.42 – 2.29 (m, 10H, pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.94 – 1.79 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.49 (q, J = 5.4 Hz, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.38 (q, J = 6.7, 6.3 Hz, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.61 (pyr-4C), 163.00 (pyr-6C), 162.67 (pyr-2C), 159.86 (ph-5C), 130.52 (ph-3,5C), 128.00 (ph-4C), 113.98 (ph-2,6C), 87.83 (pyr-5C), 65.96 (prop-3C), 55.08 (pip-2,6C), 54.38 (prop-1C), 54.06 (prz-2,6C), 45.76 (N-CH<sub>3</sub>), 43.37 (prz-3,5C), 26.22 (prop-2C), 25.54 (pip-3,5C), 24.08 (pip-4C).

LC-MS t<sub>r</sub> = 7.8 min; [M+H]<sup>2+</sup> = 205.8, [M+H]<sup>+</sup> = 411.1; 98.02%.

## Compound Spectrum List Report

### Analysis Info

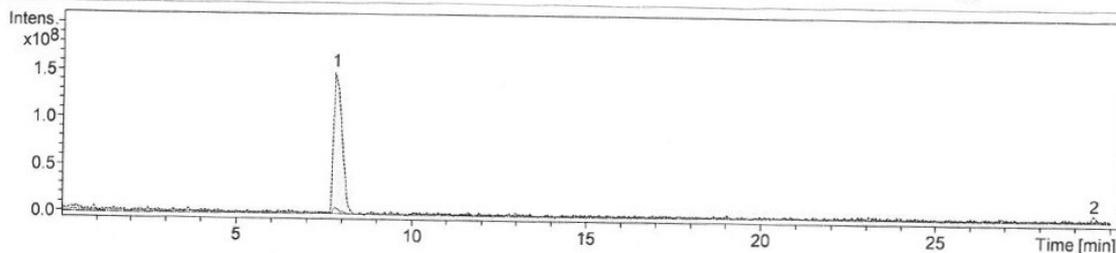
Analysis Name D:\Data\Reinheit\11062018\JHH4.11\_2\_01\_385.d  
 Method Reinheit\_Protonierung\_bis40\_complete\_385.m  
 Sample Name JH H4.11  
 Comment

Acquisition Date 6/11/2018 11:21:01 AM

Operator demo  
 Instrument amaZon speed ETD

### Acquisition Parameter

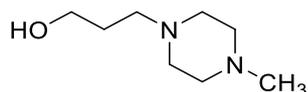
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z	Scan End	600 m/z
Accumulation Time	1466 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	47.2
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	7.8	2309403648	84.4	98.02	205.83
2	29.5	46699352	3.1	1.98	376.11

### 6.3.22: 3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propan-1-ol (P13)<sup>240</sup>

Gemäß Methode J wurde Verbindung **P13** aus *N*-Methylpiperazin (0.7 mL; 6 mmol) und 3-Chlorpropan-1-ol (473 mg, 5 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (988 mg; 10 mmol) und Kaliumiodid (166 mg; 1 mmol) in Aceton (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde destillativ als farbloses Öl (655 mg; 69%) gewonnen.



Summenformel C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O

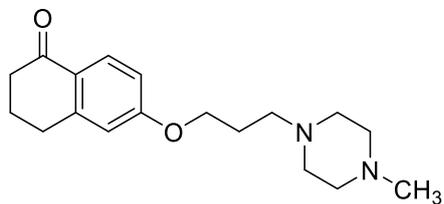
Molekulargewicht 158.3

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.42 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 3.37 (s, 1H, OH), 2.43 – 2.21 (m, 10H, prop-1H<sub>2</sub>, prz-2,3,5,6-H<sub>2</sub>), 2.13 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.49 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

### 6.3.23: 6-(3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propoxy)-tetralon (P14)<sup>241</sup>

Gemäß Methode L wurde Verbindung **P14** aus **P13** (712.4 mg; 4.5 mmol) und 6-Hydroxy-1-tetralon (486.6 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Triphenylphosphin (1.18 g; 4.5 mmol)

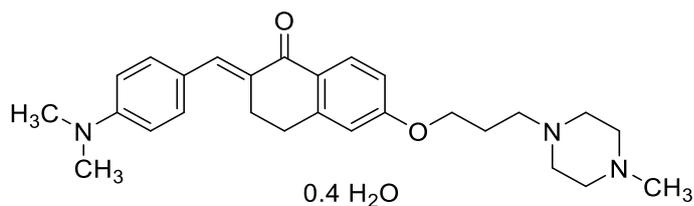
und Azodicarbonsäurediethylester (0.7 mL; 4.5 mmol) in trockenem THF (15 mL) hergestellt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 95:5) als farbloses Öl (710 mg; 78%) isoliert.



Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	302.4
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 7.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H, tet-8H), 6.74 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H, tet-7H), 6.62 (d, J = 2.4 Hz, 1H, tet-5H), 4.00 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 2.84 (t, J = 6.1 Hz, 2H, tet-2H), 2.57 – 2.30 (m, 12H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-2,3,5,6-H <sub>2</sub> , tet-4H), 2.23 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 2.08 – 1.97 (m, 2H, tet-3H), 1.91 (dt, J = 13.3, 6.5 Hz, 2H, prop-2H).

### 6.3.24: 2-(4-(Dimethylamino)benzyliden)-6-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy)-tetralon (10)

Gemäß Methode S wurde Verbindung **10** aus **P14** (906 mg; 3mmol) und *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (447.6 mg; 3mmol) unter Verwendung von Natronlauge (15M; 1.1 mL; 13.5 mmol) in Ethanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 98:2) als orangener Feststoff (416 mg; 32%) gewonnen.

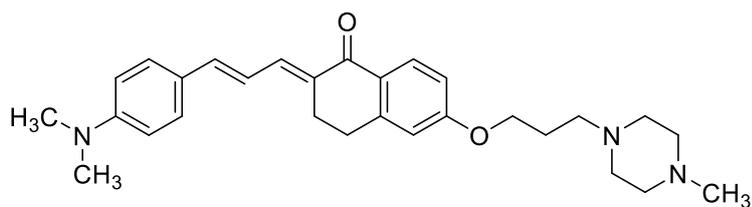


Summenformel	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 0.4 H <sub>2</sub> O
--------------	--

Molekulargewicht	440.8 (kristallwasserfrei: 433.6)
Schmelzpunkt	114 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 8.00 (d, J = 8.7 Hz, 1H, tet-8H), 7.74 (d, J = 1.7 Hz, 1H, tet-7H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.78 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H, tet-5H), 6.70 – 6.59 (m, 3H, ph-3,5H, tet-CH), 4.01 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 3.13 – 3.03 (m, 2H, tet-4H), 2.95 (s, 6H, N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.82 (dd, J = 7.6, 5.4 Hz, 2H, tet-3H), 2.56 – 2.33 (m, 10H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-2,3,5,6-H <sub>2</sub> ), 2.23 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.93 (dt, J = 8.1, 6.4 Hz, 2H, prop-2H).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 186.81 (tet-1C), 162.67 (tet-6C), 150.45 (ph-4C), 145.37 (tet-CH), 137.13 (tet-2C), 131.91 (tet-8aC), 131.31 (ph-2,6C), 130.50 (tet-8C), 127.40 (tet-4aC), 123.81 (ph-1C), 113.45 (tet-5C), 112.67 (tet-7C), 111.64 (ph-3,5C), 66.35 (prop-3C), 55.04 (prop-1C), 54.96 (prz-3,5C), 53.11 (prz-2,6C), 45.96 (N-CH <sub>3</sub> ), 40.19 (N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 29.21 (tet-3C), 27.40 (prop-2C), 26.64 (tet-2C).
UV/Vis	λ <sub>max</sub> Abs = 408 nm; λ <sub>max</sub> Em = 680 nm.
Elementaranalyse	theo. C 73.57%; H 8.19%; N 9.34%. bes. C 73.74%; H 8.38%; N 9.34%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 434.7 (100%).

### 6.3.25: 3-(4-(Dimethylamino)phenyl)allyliden)-6-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy)-tetralon (11)

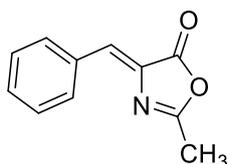
Gemäß Methode S wurde Verbindung **11** aus **P14** (906 mg; 3mmol) und *p*-Dimethylaminozimtaldehyd (525.7 mg; 3mmol) unter Verwendung von Natronlauge (15M; 1.1 mL; 13.5 mmol) in Ethanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 98:2) als roter Feststoff (414 mg; 30%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	459.6
Schmelzpunkt	128 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<p>δ 8.07 (d, J = 8.7 Hz, 1H, tet-8H), 7.60 – 7.50 (m, 1H, tet-7H), 7.41 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.98 – 6.91 (m, 2H, ph-3,5H), 6.84 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H, tet-5H), 6.75 – 6.63 (m, 3H, pen-1,2,3H), 4.08 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 3.00 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.95 (s, 4H, prz-3,5-H<sub>2</sub>), 2.64 – 2.43 (m, 8H, prop-1H<sub>2</sub>, prz-2,6-H<sub>2</sub>, tet-4H), 2.30 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.17 – 2.08 (m, 2H, tet-3H), 2.06 – 1.90 (m, 2H, prop-2H).</p>
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<p>δ 186.22 (tet-1C), 162.62 (tet-6C), 150.82 (ph-4C), 145.76 (pen-1C), 141.49 (pen-3C), 136.80 (tet-2C), 131.73 (ph-2,6C), 130.40 (tet-8C), 128.60 (tet-4aC), 127.58 (pen-2C), 124.93 (ph-1C), 119.22 (tet-5C), 113.45 (tet-7C), 112.85 (ph-3,5C), 112.08 (tet-8aC), 66.36 (prop-3C), 55.03 (prop-1C), 54.95 (prz-3,5C), 53.10 (prz-2,6C), 45.95 (N-CH<sub>3</sub>), 40.26 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 29.21 (tet-4C), 26.64 (prop-2C), 25.88 (tet-3C).</p>
UV/Vis	λ <sub>max</sub> Abs = 425 nm; λ <sub>max</sub> Em = 638 nm.
Elementaranalyse	<p>theo. C 75.78%; H 8.11%; N 9.14%.  bes. C 75.25%; H 8.69%; N 8.84%.</p>
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 460.3 (100%).

### 6.3.26: 4-Benzyliden-2-methyloxazol-5-on (P15)<sup>235</sup>

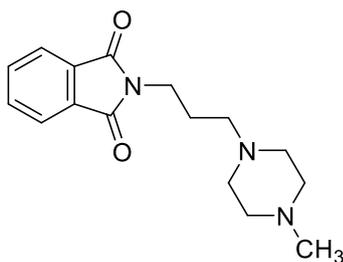
Gemäß Methode V wurde Verbindung **P15** aus Acetylglycin (1.17 g; 10 mmol) und Benzaldehyd (1.06 g; 10 mmol) unter Verwendung von Natriumacetat (82 mg; 1 mmol) in Essigsäureanhydrid (15 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelbes Pulver (880 mg; 47%) isoliert.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Molekulargewicht	187.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMF-d <sub>7</sub> )	δ 8.66 – 8.53 (m, 2H, ph-3,5H), 7.98 – 7.87 (m, 3H, ph-2,4,6H), 7.64 (s, 1H, ph-CH), 2.81 (s, 3H, ox-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.27: 2-(3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl)phthalimid (P16)<sup>242</sup>

Gemäß Methode J wurde Verbindung **P16** aus *N*-(3-Brompropyl)phthalimid (2.01 g, 7.5 mmol) und *N*-Methylpiperazin (1.65 g; 16.5 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (15 mmol) und Kaliumiodid (1.5 mmol) in Aceton (150 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl (1.4 g; 65%) isoliert.

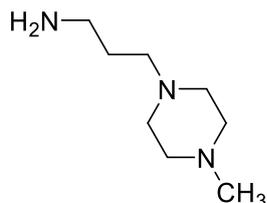


Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	287.4
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.92 – 7.75 (m, 4H, pht-2,3,4,5H), 3.61 (t, J = 6.7 Hz, 2H, prop-3H), 2.32 – 2.13 (m, 6H, prop-1H, prz-2,6H), 2.04 (s,

4H, prz-3,5H), 1.97 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.71 (p, J = 6.6 Hz, 2H, prop-2H).

### 6.3.28: 3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propan-1-amin (P17)<sup>242</sup>

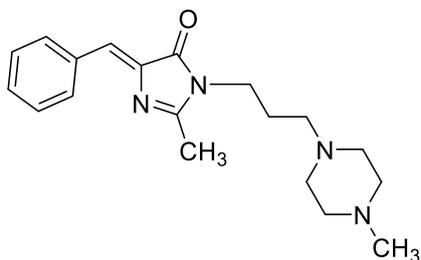
Gemäß Methode ZE wurde Verbindung **P17** aus **P26** (1.4 g; 4.9 mmol) unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat (1.2 mL; 24.5 mmol) in Ethanol (50 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelbes Öl (520 mg; 55%) isoliert.



Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>
Molekulargewicht	157.3
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 3.01 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 2.59 – 2.49 (m, 2H, prop-3H), 2.41 – 2.21 (m, 10H, prop-1H, prz-2,3,5,6H), 2.13 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.58 – 1.41 (m, 2H, prop-2H).

### 6.3.29: 5-Benzyliden-2-methyl-3-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-imidazol-4-on (12)

Gemäß Methode W wurde Verbindung **12** aus **P15** (1.12 g; 6 mmol) und **P17** (944 mg; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 5:1) erbrachte das Produkt als blassroten Feststoff (1.5 g; 46%).

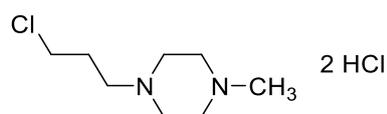


Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O
Molekulargewicht	326.4

Schmelzpunkt	100 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d6)	δ 8.26 – 8.15 (m, 2H, ph-3,5H), 7.51 – 7.35 (m, 3H, ph-1,4,6H), 6.95 (s, 1H, ph-CH), 3.60 (t, J = 6.9 Hz, 2H, prop-3H), 2.40 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 2.37 – 2.17 (m, 10H, prop-1H, prz-2,3,5,6H), 2.11 (s, 3H, ox-CH <sub>3</sub> ), 1.81 – 1.62 (m, 2H, prop-2H).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d6)	δ 169.99 (ox-4C), 164.29 (ox-2C), 138.83 (ph-1C), 134.10 (ox-5C), 131.78 (ph-2,6C), 129.81 (ph-3,5C), 128.59 (ph-4C), 124.44 (ph-CH), 54.76 (prz-3,5C), 54.55 (prz-2,6C), 52.45 (N-CH <sub>3</sub> ), 45.58 (prop-1C), 38.48 (prop-3C), 25.02 (prop-2C), 15.35 (ox-CH <sub>3</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 69.91%; H 8.03%; N 17.16%. bes. C 69.51%; H 8.21%. N 17.07%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 327.3 (100%).

### 6.3.30: 1-(3-Chlorpropyl)-4-methylpiperazin (P18)<sup>243</sup>

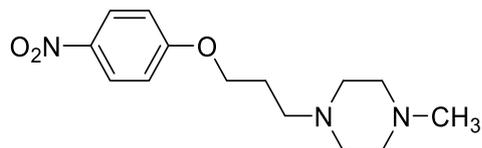
Gemäß Methode N wurde Verbindung **P18** aus **P13** (1.27 g; 8 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (0.77 mL; 12 mmol) in THF (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (2.00 g, quant.) gewonnen.



Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> · 2 HCl
Molekulargewicht	249.6 (freie Base: 176.7)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d6)	δ 11.99 (s, 2H, NH <sup>+</sup> ), 3.85 – 3.32 (m, 10H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-2,3,5,6H <sub>2</sub> ), 3.17 (s, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ), 2.82 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 2.10 – 1.72 (m, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ).

### 6.3.31: 1-Methyl-4-(3-(4-nitrophenoxy)propyl)piperazin (P19)<sup>244</sup>

Gemäß Methode K wurde Verbindung **P19** aus Nitrophenol (1.39 g; 10 mmol) und **P18** (2.00 g; 8 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (5.23 g; 40 mmol) und Kaliumiodid (266 mg; 1.6 mmol) in Aceton (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl (1.48 g; 53%) isoliert.



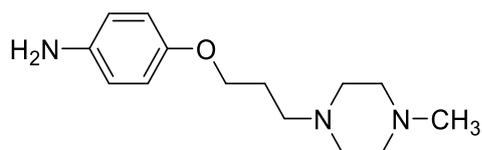
Summenformel  $C_{14}H_{21}N_3O_3$

Molekulargewicht 279.34

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.21 – 8.11 (m, 2H, ph-2,6H), 7.12 – 7.03 (m, 2H, ph-3,5H), 3.68 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.41 – 2.19 (m, 10H, prop-1H<sub>2</sub>, prz-2,3,5,6H<sub>2</sub>), 2.14 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.61 – 1.49 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

### 6.3.32: 4-(3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propoxy)anilin (P20)<sup>244</sup>

Gemäß Methode T wurde **P20** aus **P19** (1.48 g; 5.3 mmol) unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat (2.65 g; 53 mmol) und Palladium auf Kohle (10%; 500 mg) in Ethanol (20 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl (1.3 g; 98%) isoliert.



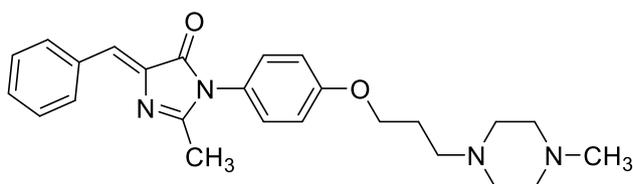
Summenformel  $C_{14}H_{23}N_3O$

Molekulargewicht 249.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6.68 – 6.62 (m, 2H, ph-2,6H), 6.55 – 6.47 (m, 2H, ph-3,5H), 4.54 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.42 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.43 – 2.21 (m, 10H, prop-1H<sub>2</sub>, prz-2,3,5,6H<sub>2</sub>), 2.13 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.49 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

6.3.33: 5-Benzyliden-2-methyl-3-(4-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy)phenyl)-imidazol-4-on (13)

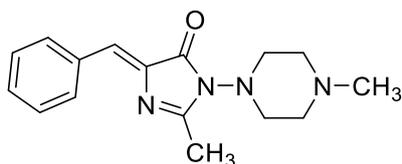
Gemäß Methode W wurde Verbindung **13** aus **P15** (1.12 g; 6 mmol) und **P20** (1.50 g; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 4:1) erbrachte das Produkt als gelber Feststoff (929 mg; 37%).



Summenformel	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	418.5
Schmelzpunkt	143 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.34 – 8.19 (m, 2H, ph1-3,5H), 7.54 – 7.39 (m, 3H, ph1-2,4,6H), 7.37 – 7.26 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.12 – 7.00 (m, 3H, ph2-3,5H, ph-CH), 4.05 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 2.49 – 2.23 (m, 10H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-2,3,5,6H <sub>2</sub> ), 2.19 (s, 3H, ox-CH <sub>3</sub> ), 2.15 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.89 (t, J = 6.8 Hz, 2H, prop-2H).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 169.33 (ox-C4), 163.33 (ox-C5), 158.59 (ph2-4C), 138.38 (ph1-1C), 134.03 (ox-2C), 131.88 (ph1-3,5C), 130.04 (ph1-2,6C), 128.92 (ph2-2,6C), 128.69 (ph1-4C), 125.78 (ph2-1C), 125.29 (ph1-CH), 115.02 (ph2-3,5C), 66.12 (prop-3C), 54.73 (prop-1C), 54.30 (prz-3,5C), 52.69 (prz-2,6C), 45.71 (N-CH <sub>3</sub> ), 26.14 (prop-2C), 16.09 (ox-CH <sub>3</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 71.74%; H 7.23%; N 13.39%. bes. C 71.55%; H 7.10%; N 13.19%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 419.5 (100%).

### 6.3.34: 5-Benzyliden-2-methyl-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-imidazol-4-on (14)

Gemäß Methode W wurde Verbindung **14** aus **P15** (1.12 g; 6 mmol) und 4-Amino-1-methylpiperazin (691 mg; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 4:1) erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (546 mg; 32%).

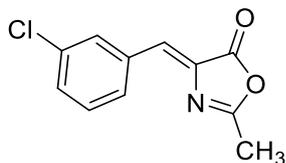


Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O
Molekulargewicht	284.4
Schmelzpunkt	173 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.30 – 8.13 (m, 2H, ph-3,5H), 7.55 – 7.36 (m, 3H, ph-1,4,6H), 6.92 (s, 1H, ph-CH), 3.68 (s, 2H, prz-2,6H <sub>äq</sub> ), 2.94 (m, 2H, prz-2,6H <sub>ax</sub> ), 2.74 (m, 2H, prz-3,5H <sub>äq</sub> ), 2.29 (d, J = 0.6 Hz, 2H, prz-3,5H <sub>ax</sub> ), 2.20 (s, 3H, ox-CH <sub>3</sub> ), 2.10 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 168.65 (ox-4C), 164.64 (ox-2C), 136.86 (ph-1C), 133.88 (ox-5C), 131.90 (ph-3,5C), 130.02 (ph-2,6C), 128.64 (ph-4C), 125.03 (ph-CH), 54.71 (prz-2,6C), 50.61 (prz-3,5C), 45.45 (ox-CH <sub>3</sub> ), 14.64 (N-CH <sub>3</sub> ).
Elementaranalyse	theo. C 67.58%; H 7.09%; N 19.70%. bes. C 67.55%; H 6.87%; N 19.47%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 284.3 (100%).

### 6.3.35: 4-(3-Chlorbenzyliden)-2-methyloxazol-5-on (P21)<sup>245</sup>

Gemäß Methode V wurde Verbindung **P21** aus Acetylglycin (2.34 g; 20 mmol) und 3-Chlorbenzaldehyd (2.3 mL; 20 mmol) unter Verwendung von Natriumacetat (164 mg;

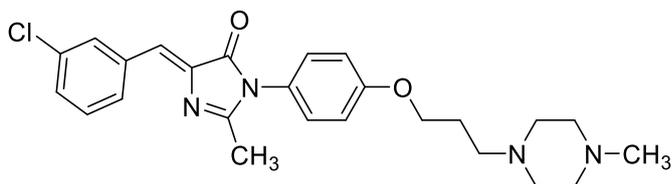
2 mmol) in Essigsäureanhydrid (20 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff (2.48 g; 56%) isoliert.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> ClNO <sub>2</sub>
Molekulargewicht	221.6
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.34 – 8.25 (m, 1H, ph-6H), 8.19 – 8.06 (m, 1H, ph-2H), 7.60 – 7.50 (m, 2H, ph-4,5H), 7.23 (s, 1H, ph-CH), 2.42 (s, 3H, ox-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.36: 5-(3-Chlorbenzyliden)-2-methyl-3-(4-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy)phenyl)-imidazol-4-on (15)

Gemäß Methode W wurde Verbindung **15** aus **P21** (1.12 g; 6 mmol) und **P20** (1.50 g; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 4:1) erbrachte das Produkt als roter Feststoff (1.14 g; 42%).



Summenformel	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	452.0
Schmelzpunkt	141 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.42 (m, 1H, ph1-6H), 8.25 – 8.05 (m, 1H, ph1-2H), 7.50 (d, J = 5.7 Hz, 2H, ph1-4,5H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ph2-2,6H), 7.06 (d, J = 8.2 Hz, 3H, ph1-CH, ph2-3,5H), 4.05 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 2.47 – 2.25 (m, 10H, prop-1H, pr-

2,3,5,6H<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, ox-CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.88 (p, J = 6.5 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 169.17 (ox-4C), 164.46 (ox-2C), 158.65 (ph2-4C), 139.40 (ph1-1C), 136.14 (ph1-3C), 133.33 (ox-5C), 130.81 (ph1-5C), 130.48 (ph2-2,6C), 130.45 (ph1-4C), 129.56 (ph1-6C), 128.92 (ph1-2C), 125.61 (ph2-1C), 123.28 (ph2-3,5C), 115.03 (ph1-CH), 66.12 (prop-3C), 54.69 (prop-1C), 54.28 (prz-3,5C), 52.64 (prz-2,6C), 45.65 (ox-CH<sub>3</sub>), 26.13 (N-CH<sub>3</sub>), 16.16 (prop-2C).

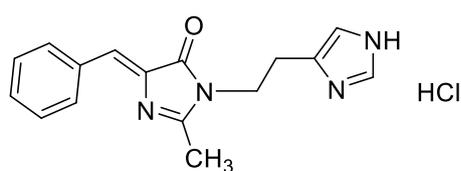
Elementaranalyse theo. C 66.29%; H 6.45%; N 12.37%.

bes. C 66.04%; H 6.40%; N 12.09%.

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 452.9 (100%).

### 6.3.37: 3-(2-(1H-Imidazol-4-yl)ethyl)-5-benzyliden-2-methyl--imidazol-4-on Hydrochlorid (16)

Gemäß Methode W wurde Verbindung **16** aus **P15** (1.12 g; 6 mmol) und Histamin Dihydrochlorid (1.11 g; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 4:1) erbrachte das Produkt als weißen Feststoff (706.4 mg; 52%).



Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O · HCl

Molekulargewicht 316.8 (freie Base: 280.3)

Schmelzpunkt 48 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.52 (s, 1H, im-5H), 7.61 – 7.49 (m, 2H, ph-3,5H), 7.45 – 7.27 (m, 3H, ph-2,4,6H), 7.13 (s, 1H, ph-CH), 7.01 (s, 1H,

im-3H), 3.40 (q, J = 6.6 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.77 (t, J = 7.0 Hz, 2H, im-CH<sub>2</sub>), 2.02 (s, 3H, ox-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 169.54 (ox-4C), 164.92 (ox-2C), 134.11 (im-3C), 134.00 (ph-1C), 132.95 (im-1C), 130.18 (ox-5C), 129.30 (ph-2,3,5,6C), 128.47 (ph-4C), 127.33 (im-5C), 116.32 (ph-CH), 38.74 (N-CH<sub>2</sub>), 25.41 (im-CH<sub>2</sub>), 22.84 (ox-CH<sub>3</sub>).

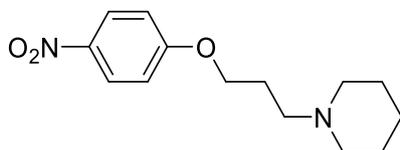
Elementaranalyse theo. C 60.66%; H 5.41%; N 17.69%.

bes. C 61.04%; H 5.50%; N 17.89%.

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 281.4 (100%).

### 6.3.38: 1-(3-(4-Nitrophenoxy)propyl)piperidin (P22)<sup>246</sup>

Gemäß Methode K wurde Verbindung **P22** aus Nitrophenol (1.39 g; 10 mmol) und **P8** (1.59 g; 8 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (5.23 g; 40 mmol) und Kaliumiodid (266 mg; 1.6 mmol) in Aceton (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als braunes Öl (1.4 g; 53%) isoliert.



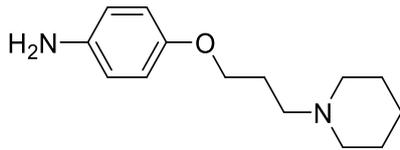
Summenformel C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulargewicht 264.3

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.20 – 8.12 (m, 2H, ph-2,6H), 7.14 – 7.06 (m, 2H, ph-3,5H), 4.11 (t, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.41 – 2.23 (m, 6H, pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>), 1.96 – 1.79 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.53 – 1.41 (m, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.40 – 1.28 (m, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

### 6.3.39: 4-(3-(Piperidin-1-yl)propoxy)anilin (P23)<sup>246</sup>

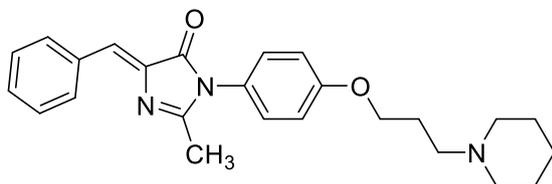
Gemäß Methode T wurde **P23** aus **P22** (1.4 g; 5.3 mmol) unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat (2.65 g; 53 mmol) und Palladium auf Kohle (10%; 500 mg) in Ethanol (20 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als braunes Öl (1.2 g; 97%) isoliert.



Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O
Molekulargewicht	234.3
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 6.67 – 6.60 (m, 2H, ph-2,6H), 6.54 – 6.47 (m, 2H, ph-3,5H), 4.55 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.83 (t, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 2.39 – 2.25 (m, 6H, pip-2,6H <sub>2</sub> , prop-1H), 1.78 (tt, J = 7.9, 6.4 Hz, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ), 1.54 – 1.43 (m, 4H, pip-3,5H <sub>2</sub> ), 1.42 – 1.33 (m, 2H, pip-4H <sub>2</sub> ).

#### 6.3.40: 5-Benzyliden-2-methyl-3-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)-imidazol-4-on (17)

Gemäß Methode W wurde Verbindung **17** aus **P15** (1.12 g; 6 mmol) und **P23** (1.41 g; 6 mmol) in Pyridin (4.8 mL, 60 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 5:1) erbrachte das Produkt als gelber Feststoff (920 mg; 38%).



Summenformel	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	403.5
Schmelzpunkt	136 °C (unkorrigiert)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.27 (dt,  $J = 6.3, 1.7$  Hz, 2H, ph1-3,5H), 7.55 – 7.38 (m, 3H, ph1-1,4,6H), 7.37 – 7.26 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.12 – 6.99 (m, 3H, ph2-3,5H, ph-CH), 4.05 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.36 (dt,  $J = 15.5, 6.2$  Hz, 6H, pip-2,6H<sub>2</sub>, prop-1H), 2.19 (s, 3H, ox-CH<sub>3</sub>), 1.95 – 1.81 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>), 1.49 (q,  $J = 5.4$  Hz, 4H, pip-3,5H<sub>2</sub>), 1.39 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H, pip-4H<sub>2</sub>).

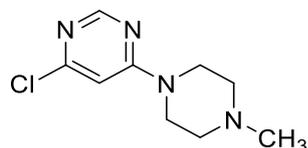
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.33 (ox-4C), 163.32 (ox-5C), 158.61 (ph2-4C), 138.38 (ph1-1C), 134.03 (ox-2C), 131.87 (ph1-3,5C), 130.03 (ph1-2,6C), 128.91 (ph2-2,6C), 128.68 (ph1-4C), 125.76 (ph2-1C), 125.29 (ph1-CH), 115.01 (ph2-3,5C), 66.23 (prop-3C), 55.06 (prop-1C), 54.09 (pip-2,6C), 26.23 (pip-3,5C), 25.59 (ox-CH<sub>3</sub>), 24.13 (prop-2C), 16.09 (pip-4C).

Elementaranalyse  
theo. C 74.41%; H 7.24%; N 10.41%.  
bes. C 74.58%; H 7.03%; N 10.39%.

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 404.7 (100%).

### 6.3.41: 4-Chlor-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin (P24)<sup>247</sup>

Gemäß Methode D wurde **P24** aus 4,6-Dichlorpyrimidin (888 mg; 6 mmol) und *N*-Methylpiperazin (1 mL, 9 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (2 mL, 12 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 95:5) als weißer Feststoff (954 mg; 75%) gewonnen.



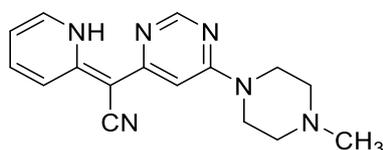
Summenformel C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>

Molekulargewicht 212.7

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.32 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, pyr-2H), 6.95 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, pyr-5H), 3.63 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.37 – 2.32 (m, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

6.3.42: (2-(6-(4-Methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)-2-(pyridin-2(1H)-yliden)acetonitril (P25)

Gemäß Methode F wurde Verbindung **P25** aus 2-Pyridylacetonitril (305 mg; 2.6 mmol) und **P24** (500 mg; 2.35 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (192.7 mg, 4.7 mmol) in DMF (3 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt (346 mg; 50%) als weißen Feststoff.



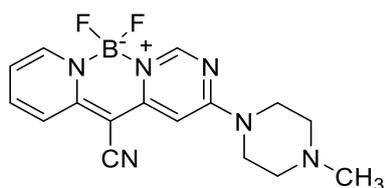
Summenformel  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_6$

Molekulargewicht 294.4

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  15.69 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, pyr-2H), 8.16 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, pyd-6H), 7.66 (ddd,  $J$  = 8.7, 7.0, 1.7 Hz, 1H, pyd-3H), 7.17 (dt,  $J$  = 8.7, 1.0 Hz, 1H, pyd-4H), 6.76 (ddd,  $J$  = 7.0, 5.9, 1.0 Hz, 1H, pyd-5H), 6.07 (s, 1H, pyr-5H), 3.56 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.42 – 2.34 (m, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

6.3.43: 11,11-Difluor-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-pyrido[1,2-c]pyrimido[6,1-f][1,3,2]diazaborinin-5-carbonitril (18)

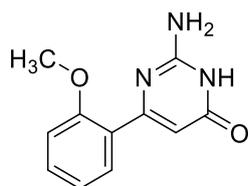
Gemäß Methode R wurde **P25** (588.7 mg; 2 mmol) in DCM (5 mL) gelöst und Triethylamin (0.4 mL, 6 mmol) und Bortrifluorid Diethyletherat (851.4 mg; 6 mmol) hinzugefügt. Das Produkt **18** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) als gelber Feststoff (103 mg; 15%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>6</sub>
Molekulargewicht	342.2
Schmelzpunkt	208 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.46 (s, 1H, pyr-2H), 8.14 (s, 1H, pyd-6H), 7.86 (dt, J = 8.8, 7.0, 1H, pyd-3H), 7.30 (d, J = 8.8 Hz, 1H, pyd-4H), 7.04 – 6.94 (m, 1H, pyd-5H), 6.09 (s, 1H, pyr-5H), 3.64 (s, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.34 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.16 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 158.49 (pyd-2C), 150.75 (pyr-4C), 150.24 (pyr-2C), 150.16 (pyd-4,6C), 141.16 (pyd-3C), 138.20 (pyr-5C), 118.90 (CN), 118.31 (pyr-6C), 115.41 (pyd-5C), 86.67 (NC-C), 53.94 (prz-2,6C), 45.48 (prz-3,5C), 43.96 (N-CH <sub>3</sub> ).
<sup>19</sup> F NMR (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ -139.49 (d, J = 30.7 Hz), -139.71 (d, J = 30.7 Hz).
UV/Vis	λ <sub>max</sub> Abs = 402 nm; λ <sub>max</sub> Em = 487 nm.
Elementaranalyse	theo. C 56.17%; 5.01%; 24.56%. bes. C 55.92%; 5.05%; 24.28%.
ESI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 343.2 (100%).

#### 6.3.44: 2-Amino-6-(2-methoxyphenyl)pyrimidin-4(3H)-on (P26)<sup>226</sup>

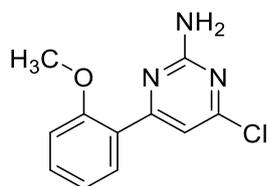
Gemäß Methode I wurde Verbindung **P26** aus Ethyl 3-(2-Methoxyphenyl)-3-oxopropanoat (844.4 mg; 3.8 mmol) und Guanidin Carbonat (340 mg; 3.8 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (12 mL: 2 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (437 mg; 53%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	217.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 10.80 (s, 1H, NH), 7.80 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1H, ph-3H), 7.51 (ddd, J = 8.4, 7.5, 1.8 Hz, 1H, ph-4H), 7.20 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, ph-6H), 7.05 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, ph-5H), 6.59 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.12 (s, 1H, OC-CH), 3.87 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ).

#### 6.3.45: 4-Chlor-6-(2-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amin (P27)<sup>248</sup>

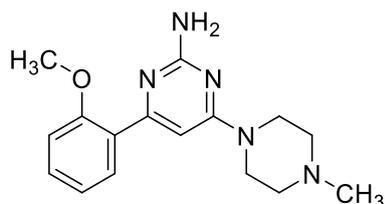
Gemäß Methode M wurde **P27** aus **P26** (657 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (1.37 mL; 15 mmol) in Acetonitril (10 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels und Waschen mit Acetonitril wurde das Produkt als orangener Feststoff (707 mg; quant.) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O
Molekulargewicht	235.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.81 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1H, ph-3H), 7.50 (ddd, J = 8.4, 7.5, 1.8 Hz, 1H, ph-4H), 7.18 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, ph-6H), 7.15 (s, 1H, pyr-5H), 7.07 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, ph-5H), 3.87 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ).

6.3.46: 4-(2-Methoxyphenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin  
(P28)<sup>88</sup>

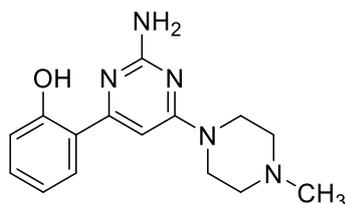
Gemäß Methode E wurde **P28** aus **P27** (506 mg; 2.2 mmol) und *N*-Methylpiperazin (606 mg; 6.6 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.3 mL; 8.8 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung ergab das Produkt als gelben Feststoff (359 mg; 55%).



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	299.4
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.70 (dd, J = 7.6, 1.9 Hz, 1H, ph-3H), 7.41 (ddd, J = 8.3, 7.6, 1.9 Hz, 1H, ph-4H), 7.13 (dd, J = 8.3, 1.0 Hz, 1H, ph-6H), 7.04 (td, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H, ph-5H), 6.49 (s, 1H, pyr-5H), 6.06 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.85 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ), 3.58 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.39 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.25 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).

6.3.47: 2-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenol (P29)<sup>249</sup>

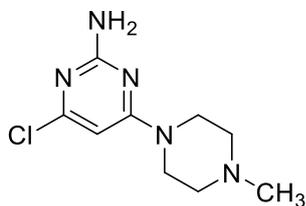
Gemäß Methode Q wurde **P29** durch Demethylierung von **P28** (359.3mg; 1.2 mmol) unter Verwendung von HBr in Wasser (48%; 3 mL) in Essigsäure 2 mL hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff (285 mg; 83%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	285.4



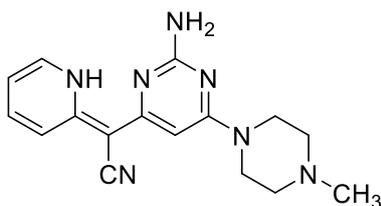
12 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 95:5) als weißer Feststoff (850 mg; 68%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>
Molekulargewicht	227.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 6.47 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.08 (s, 1H, pyr-5H), 3.52 (t, J = 4.88, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.30 (t, J = 5.00, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.18 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.50: 2-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)-2-(pyridin-2(1H)-yliden)acetonitril (20)

Gemäß Methode F wurde Verbindung **20** aus 2-Pyridylacetonitril (305 mg; 2.6 mmol) und **P30** (533 mg; 2.35 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (192.7 mg, 4.7 mmol) in DMF (3 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt (305 mg; 42%) als weißen Feststoff.



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub>
Molekulargewicht	309.4
Schmelzpunkt	215 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 15.39 (s, 1H, NH), 8.14 (dtd, J = 5.5, 1.8, 1.0 Hz, 1H, pyd-6H), 7.58 (ddd, J = 8.8, 7.2, 1.8 Hz, 1H, pyd-3H), 7.23 – 7.00 (m, 3H, pyd-4H, pyr-NH<sub>2</sub>), 6.72 (ddd, J = 7.2, 5.5, 1.0 Hz, 1H, pyd-5H), 5.50 (s, 1H, pyr-5H), 3.51 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.35 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 160.89 (pyd-2C), 156.94 (pyr-4C), 156.83 (pyr-2C), 154.91 (pyd-4C), 143.09 (pyd-3C), 137.30 (pyd-4C), 122.36 (pyr-6C), 117.33 (CN), 113.41 (pyd-5C), 79.01 (NC-C), 63.78 (pyr-5C), 54.21 (prz-2,6C), 45.67 (prz-3,5C), 43.48 (N-CH<sub>3</sub>).

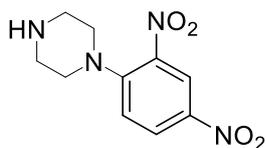
Elementaranalyse theo. C 62.12%; H 6.19%; N 31.69%.

bes C 62.21%; H 6.28%; N 31.39%.

ESI MS [M+H]<sup>+</sup> = 310.5 (75%); [2M+H]<sup>+</sup> = 617.6 (100%).

### 6.3.51: 1-(2,4-Dinitrophenyl)piperazin (P31)<sup>250</sup>

In Anlehnung an Methode Y wurde Verbindung **P31** aus Piperazin (2.58 g; 30 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (404 mg; 2 mmol) in Dichlormethan (20 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (DCM/MeOH 92:8) als gelber Feststoff (577 mg; quant) gewonnen werden.



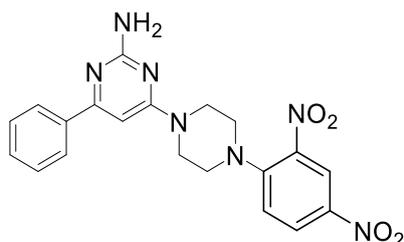
Summenformel C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molekulargewicht 252.2

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.58 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.24 (dd, J = 9.5, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.39 (d, J = 9.5 Hz, 1H, ph-6H), 3.24 – 3.17 (m, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.85 – 2.76 (m, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>).

6.3.52: 4-(4-(2,4-Dinitrophenyl)piperazin-1-yl)-6-phenylpyrimidin-2-amin  
(21)

Gemäß Methode E wurde Verbindung **21** aus **P6** (617 mg; 3 mmol) und **P31** (2.59 g; 9 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (2 mL; 12 mmol) in Isopropanol (12 mL) hergestellt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH 95:5) aufgereinigt und als gelber Feststoff (122 mg; 10%) isoliert.

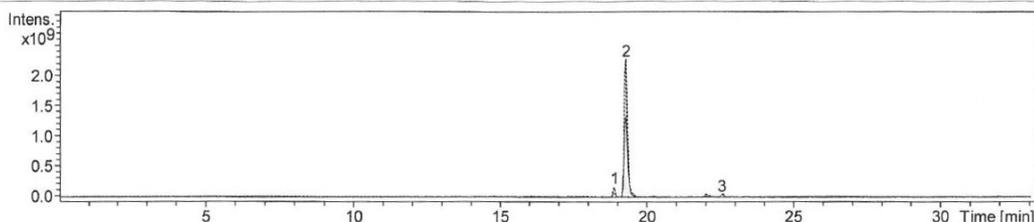


Summenformel	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	421.4
Schmelzpunkt	127 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.65 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph2-3H), 8.30 (dd, J = 9.4, 2.8 Hz, 1H, ph2-5H), 8.05 (dt, J = 5.9, 2.7 Hz, 2H, ph1-3,5H), 7.55-7.35 (m, 4H, ph1-2,4,6H, ph2-6H), 6.58 (s, 1H, pyr-5H), 6.22 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.91-3.80 (m, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 3.53 – 3.42 (m, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 163.23 (pyr-4C), 162.87 (pyr-6C), 148.67 (pyr-2C), 138.06 (ph2-1,2C), 136.79 (ph2-4C), 136.28 (ph1-1C), 129.63 (ph1-3,5C), 128.27 (ph1-4C), 128.02 (ph2-6C), 126.61 (ph1-2,6C), 123.54 (ph2-5C), 119.46 (ph2-3C), 88.89 (pyr-5C), 49.11 (prz-2,6C), 42.52 (prz-3,5C).
LC-MS	t <sub>r</sub> = 19.3 min; [M+H] <sup>+</sup> = 422.1; 94.6%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	8/13/2018 2:28:08 PM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\13082018\JH4.13_9_01_571.d	Operator	demo
Method	Reinheit_prot_bis70_complete_571.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JH H4.13		
Comment			

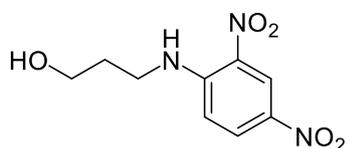
<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z	Scan End	600 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	47.3
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	18.9	911198336	145.6	5.13	377.14
2	19.3	16825741312	1978.8	94.64	422.12
3	22.6	41931604	18.7	0.24	591.18

### 6.3.53: 3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propan-1-ol (P32)<sup>236</sup>

Analog zu Methode Y wurde Verbindung **P32** aus Aminopropanol (2.25 g; 30 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (2.02 g; 10 mmol) mithilfe von Triethylamin (6.2 mL; 45 mmol) in Dichlormethan (110 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (2.3 g; 95%) gewonnen.



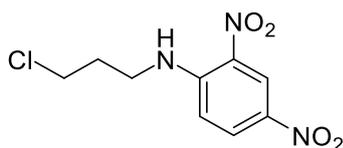
Summenformel  $C_9H_{11}N_3O_4$

Molekulargewicht 241.2

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.02 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.80 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.22 (dd, J = 9.7, 2.8, 1H, ph-5H), 7.18 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 3.63 – 3.48 (m, 4H, prop-1,3H<sub>2</sub>), 1.86 – 1.72 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

### 6.3.54: N-(3-Chlorpropyl)-2,4-dinitroanilin (P33)<sup>251</sup>

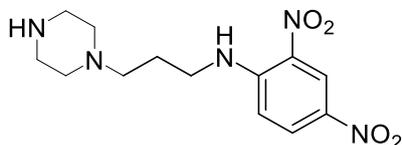
Gemäß Methode N wurde Verbindung **P33** aus **P32** (2.29 g; 9.5 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (1.1 mL; 14.3 mmol) in THF (100 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (2.47 g; quant) isoliert.



Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	259.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.89 (t, J = 6.1 Hz, 1H, NH), 8.83 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph-3H), 8.29 – 8.21 (m, 1H, ph-5H), 7.24 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 3.75 (t, J = 6.5 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 3.67 – 3.60 (m, 2H, prop-1H <sub>2</sub> ), 2.16 – 2.04 (m, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ).

### 6.3.55: 2,4-Dinitro-N-(3-(piperazin-1-yl)propyl)anilin (P34)

Gemäß Methode J wurde Verbindung **P34** aus **P33** (779 mg; 3 mmol) und Piperazin (2.58 g; 30 mmol) in Aceton (50 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels, Aufnehmen des Rückstands in Ethylacetat und Waschen mit gesättigter wässriger Kaliumcarbonatlösung wurde das Produkt als gelber Feststoff (588 mg; 63%) isoliert.

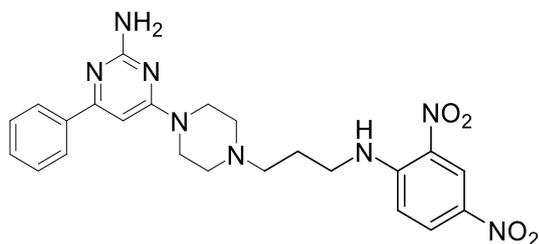


Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	309.3
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 9.10 (s, 1H, NH), 8.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.24 (dd, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.25 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 3.52 (t, J = 6.7 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 2.70 (t, J = 4.8 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.32 (dt, J = 18.4, 5.5 Hz, 6H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-3,5H <sub>2</sub> ), 1.79 (p, J = 6.6 Hz, 2H, prop-2H).

### 6.3.56: 4-(4-(3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propyl)piperazin-1-yl)-6-phenylpyrimidin-2-amin (22)

Gemäß Methode E wurde Verbindung **22** aus **P6** (617 mg; 3 mmol) und **P34** (2.78 g; 9 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (2 mL; 12 mmol) in Isopropanol (12 mL)

hergestellt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt und als gelber Feststoff (154 mg; 11%) isoliert.

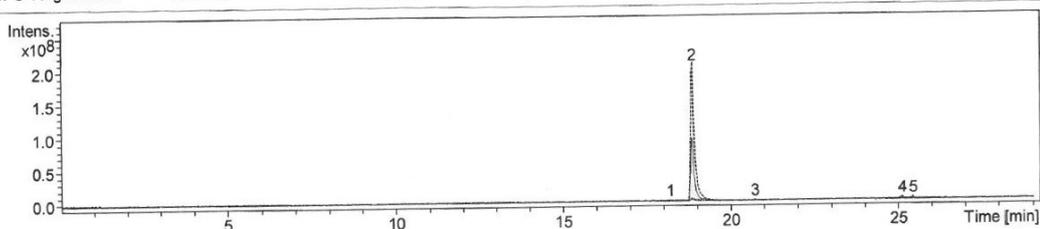


Summenformel	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	478.5
Schmelzpunkt	224 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 9.19 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 8.95 – 8.82 (m, 1H, ph2-3H), 8.28 (s, 1H, ph2-5H), 8.14 – 7.95 (m, 2H, ph1-3,5H), 7.44 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.28 (s, 1H, ph2-6H), 6.60 (s, 1H, pyr-5H), 6.16 – 6.02 (m, 3H, ph1-2,4,6H), 3.77 – 3.51 (m, 6H, prop-3H <sub>2</sub> , prz-2,6H <sub>2</sub> ), 3.40-3.25 (m, 6H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-3,5H <sub>2</sub> ), 1.99 – 1.74 (m, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 163.59 (pyr-4C), 163.12 (pyr-6C), 148.15 (pyr-2C), 138.36 (ph2-1C), 134.54 (ph1-1C, ph2-4C), 129.89 (ph2-2C), 129.53 (ph2-5C), 129.46 (ph1-3,5C), 128.20 (ph1-4C), 126.57 (ph1-2,6C), 123.61 (ph2-3C), 115.22 (ph2-6C), 88.84 (pyr-5C), 55.71 (prz-2,6C), 52.71 (prz-3,5C), 43.27 (prop-1C), 42.24 (prop-3C), 24.60 (prop-2C).
LC-MS	t <sub>r</sub> = 18.9 min; [M+2H] <sup>2+</sup> = 240.0, [M+H] <sup>+</sup> = 479.2; 97.6%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	9/4/2018 4:25:14 PM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\04092018\JHH4.14_6_01_674.d	Operator	demo
Method	protbis40prozWASH6times_674.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JHH4.14		
Comment			

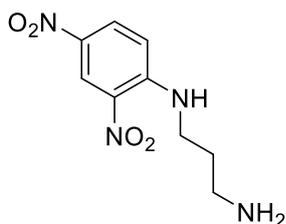
<b>Acquisition Parameter</b>			
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra
		Alternating Ion Polarity	on
		Scan End	600 m/z
		Trap Drive	47.3
			n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	18.2	2218456	2.0	0.13	430.19
2	18.9	1634850304	652.7	97.55	479.18
3	20.7	12371675	7.1	0.74	513.12
4	25.1	16413248	10.5	0.98	324.58
5	25.4	10089399	8.3	0.60	533.16

### 6.3.57: $N^1$ -(2,4-Dinitrophenyl)propan-1,3-diamin (P35)<sup>252</sup>

Analog zu Methode Y wurde Verbindung **P35** aus 1,3-Diaminopropan (7.4 g; 0.1 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (2.02 g; 10 mmol) in Dichlormethan (50 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (1.1 g; 46%) nach Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9:1) gewonnen.



Summenformel  $C_9H_{12}N_4O_4$

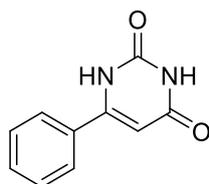
Molekulargewicht 240.2

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.80 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.21 (dd,  $J$  = 9.6, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.20 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, ph-6H), 3.52 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, prop-1H), 2.68 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, prop-3H), 1.70 (tt,  $J$  = 6.8, 6.3 Hz, 2H, prop-2H).

APCI MS  $[M+H]^+ = 241.1$  (100%).

### 6.3.58: 6-Phenylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (P36)<sup>253</sup>

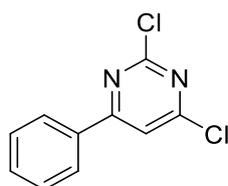
Verbindung **P36** wurde aus einer Mischung von Ethylbenzoylacetat (16.7 g; 86 mmol) und Harnstoff (6.7 g, 112 mmol) lösungsmittelfrei unter Mikrowellenstrahlung bei 165 °C für 20 min hergestellt. Fällung des Produkts mit Dichlormethan und Abfiltrieren und Trocknen des Niederschlages erbrachte das gewünschte Produkt als weißen Feststoff (5g, 31%).



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	188.2
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 11.12 (s, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, NH), 7.76 – 7.69 (m, 2H, ph-3,5H), 7.60 – 7.42 (m, 3H, ph-3,4,6H), 5.81 (d, J = 1.6 Hz, 1H, OC-CH).

### 6.3.59: 2,4-Dichlor-6-phenylpyrimidin (P37)<sup>254</sup>

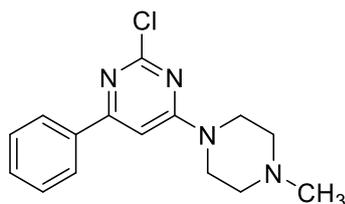
Gemäß Methode M wurde Verbindung **P37** aus **P36** (1 g; 5.3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (2.5 mL; 26.5 mmol) in Acetonitril (15 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als roter Feststoff (1.2 g; quant) gewonnen.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
Molekulargewicht	225.1
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.32 – 8.21 (m, 2H, ph-3,5H), 7.69 – 7.57 (m, 3H, ph-2,4,6H), 7.56 (s, 1H, pyr-5H).

### 6.3.60: 2-Chlor-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-6-phenylpyrimidin (P38)<sup>255</sup>

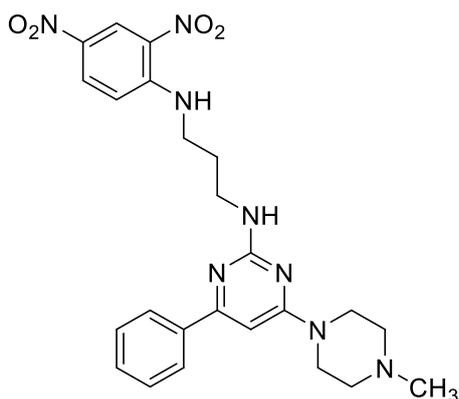
In analoger Weise zu Methode D wurde Verbindung **P38** aus **P37** (1.8 g; 8 mmol) und *N*-Methylpiperazin (900 mg; 9 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (2.7 mL; 16 mmol) in Ethanol (15 mL) innerhalb von 3 h Rühren bei Raumtemperatur hergestellt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 9:1) als weißer Feststoff (854.8 mg; 37%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>
Molekulargewicht	288.8
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.27 – 8.15 (m, 2H, ph-3,5H), 7.66 – 7.51 (m, 3H, ph-2,4,6H), 7.38 (s, 1H, pyr-5C), 3.87 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.48 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.30 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 290.0 (100%).

### 6.3.61: *N*<sup>1</sup>-(2,4-Dinitrophenyl)-*N*<sup>3</sup>-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)-6-phenylpyrimidin-2-yl)propan-1,3-diamin (23)

Nach Methode E wurde Verbindung **23** aus **P38** (180 mg; 0.6 mmol) und **P35** (288 mg; 1.2 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (0.4 mL; 2 mmol) in Isopropanol (2 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 95:5) erbrachte das Produkt als orangenen Feststoff (38 mg; 13%).

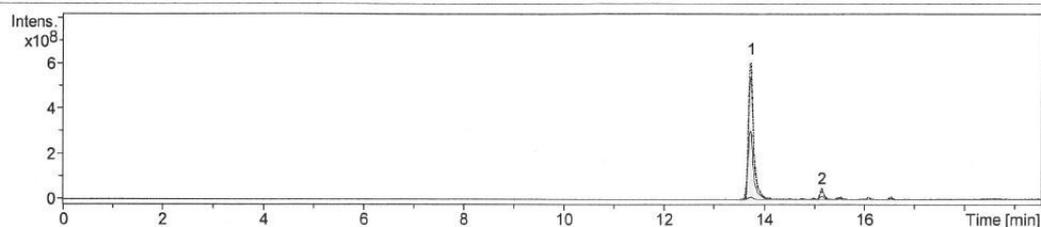


Summenformel	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	492.5
Schmelzpunkt	144 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	<p>δ 8.92 (t, J = 5.9 Hz, 1H, ph2-NH), 8.80 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph2-3H), 8.21 – 8.06 (m, 1H, ph2-4H), 8.02 (dt, J = 7.4, 3.7 Hz, 2H, ph1-3,5H), 7.54 – 7.34 (m, 3H, ph1-2,4,6H), 7.19 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph2-6H), 6.71 (s, 1H, pyr-NH), 6.53 (s, 1H, pyr-5H), 3,81 (s, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 3.68 – 3.48 (m, 6H, prop-3H<sub>2</sub>, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.35 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.92 (t, J = 6.5 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).</p>
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	<p>δ 163.38 (pyr-4C), 162.03 (pyr-6C), 148.13 (pyr-2C), 138.40 (ph2-1C), 134.56 (ph2-4C), 129.64 (ph1-1C, ph2-2C), 129.43 (ph2-5C), 128.13 (ph1-3,4,5C), 126.49 (ph1-2,6C), 123.51 (ph2-3C), 115.15 (ph2-6C), 88.63 (pyr-5C), 54.24 (prz-2,6C), 45.58 (prop-1C), 43.33 (prop-3C), 40.81 (prz-3,5C), 38.15 (N-CH<sub>3</sub>), 28.19 (prop-2C).</p>
LC-MS	t <sub>r</sub> = 13.7 min; [M+2H] <sup>2+</sup> = 247.0, [M+H] <sup>+</sup> = 493.2; 95.7%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	3/22/2019 10:26:09 AM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\22032019\JHH4.27.3_4_01_1858.d	Operator	demo
Method	ab2bis100_50LOOP_PASA_wash5EQ3min_1858.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JH H4.27.3		
Comment			

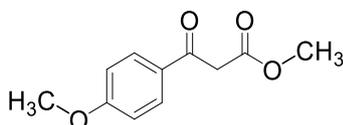
<b>Acquisition Parameter</b>			
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra
		Alternating Ion Polarity	on
		Scan End	1200 m/z
		Trap Drive	44.9
			n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	13.7	4602284544	1247.0	95.74	247.03
2	15.1	204585552	93.3	4.26	366.18

### 6.3.62: Methyl 3-(4-methoxyphenyl)-3-oxopropanoat (P39)<sup>256</sup>

Gemäß Methode H wurde Verbindung **P39** aus 4-Methoxyacetophenon (3.06 g; 20 mmol) und Dimethylcarbonat (3.2 mL; 40 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (60%; 1.64 g; 40 mmol) in Toluol (30 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (3.75 g; 90%) gewonnen.



Summenformel  $C_{11}H_{12}O_4$

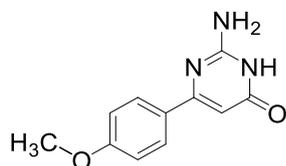
Molekulargewicht 208.2

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.06 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,4H), 4.14 (s, 2H, OC- $CH_2$ ), 3.85 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3.65 (s, 3H, OCO- $CH_3$ ).

APCI MS  $[M+H]^+ = 209.2$  (100%).

### 6.3.63: 2-Amino-6-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-4(3H)-on (P40)<sup>257</sup>

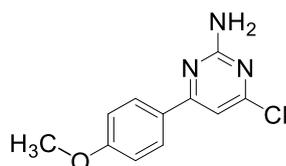
Gemäß Methode I wurde Verbindung **P40** aus **P39** (844.4 mg; 3.8 mmol) und Guanidincarbonat (340 mg; 3.8 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (12 mL: 2 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (437 mg; 53%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	217.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 10.70 (s, 1H, NH), 7.91 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.98 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,5H), 6.54 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.03 (s, 1H, OC-CH), 3.80 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.64: 4-Chlor-6-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amin (P41)<sup>257</sup>

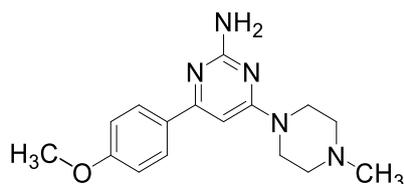
Gemäß Methode M wurde **P41** aus **P40** (657 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (1.37 mL; 15 mmol) in Acetonitril (10 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels und Waschen mit Acetonitril wurde das Produkt als orangener Feststoff (707 mg; quant.) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O
Molekulargewicht	235.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.08 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.19 (s, 1H, pyr-5H), 7.09 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,5H), 3.83 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 236.7 (100%).

6.3.65: 4-(4-Methoxyphenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin  
(P42)<sup>88</sup>

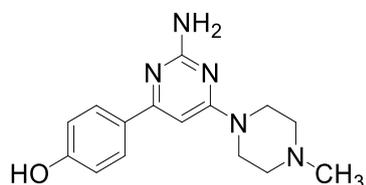
Gemäß Methode E wurde **P42** aus **P41** (506 mg; 2.2 mmol) und *N*-Methylpiperazin (606 mg; 6.6 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.3 mL; 8.8 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt als weißen Feststoff (375 mg; 57%).



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	299.4
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.98 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,5H), 6.51 (s, 1H, pyr-5H), 6.01 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.81 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ), 3.60 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.35 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.21 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 300.5 (100%).

6.3.66: 4-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenol (P43)

Gemäß Methode Q wurde **P43** durch Demethylierung von **P42** (3.6 g; 12 mmol) unter Verwendung von HBr in Wasser (48%; 30 mL) in Essigsäure 20 mL hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff (2.98 g; 87%) gewonnen.



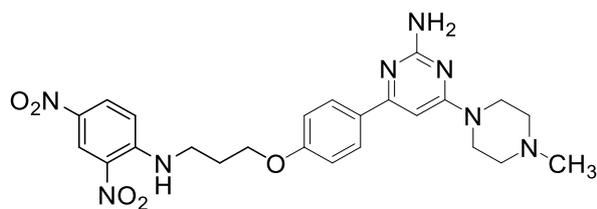
Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	285.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)      δ 7.94 – 7.84 (m, 2H, ph-2,6H), 6.83 – 6.77 (m, 2H, ph-3,5H), 6.45 (s, 1H, pyr-5H), 5.96 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 1H ph-OH), 3.58 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.34 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

APCI MS      [M+H]<sup>+</sup> = 286.4 (100%).

### 6.3.67:      4-(4-(3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (24)

Gemäß Methode K wurde Verbindung **24** aus **P33** (779 mg; 3 mmol) und **P43** (500 mg; 1.75 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (483.7 mg; 3.5 mmol) und Kaliumiodid (58 mg; 0.35 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Säulenchromatographische (DCM/MeOH 9:1) Aufreinigung erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (290 mg; 19%).



Summenformel      C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>

Molekulargewicht      508.5

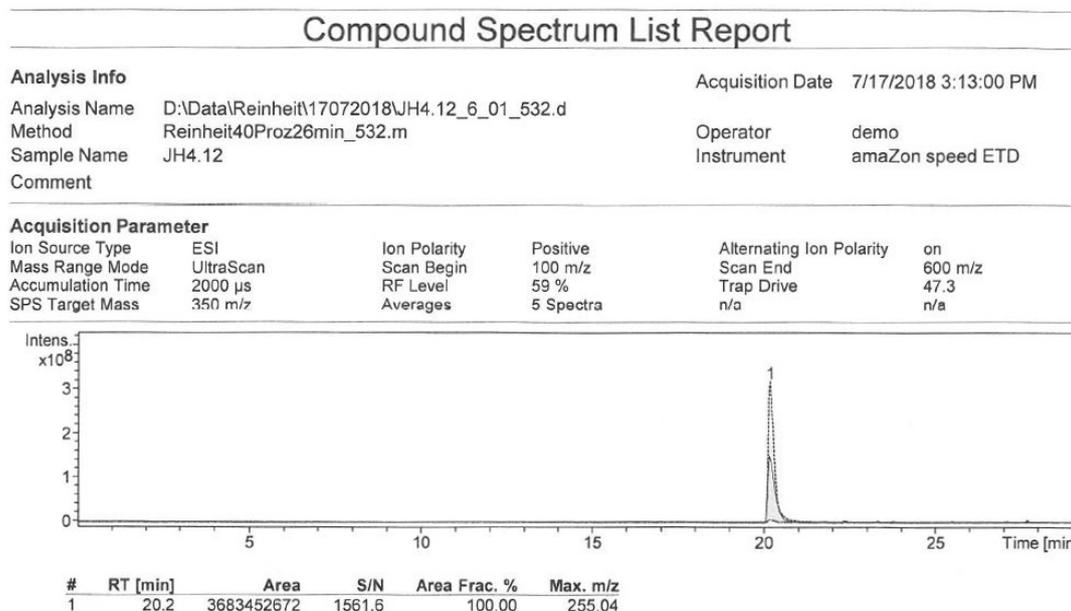
Schmelzpunkt      137 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)      δ 9.02 (t, J = 5.8 Hz, 1H, ph1-NH), 8.88 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph1-3H), 8.32 – 8.23 (m, 1H, ph1-5H), 8.08 – 7.97 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.28 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph1-6H), 7.07 – 6.95 (m, 2H, ph2-3,5H), 6.52 (s, 1H, pyr-5H), 6.01 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.17 (t, J = 5.8 Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 3.70 (q, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 3.60 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.36 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.14 (q, J = 6.2 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  163.58 (pyr-4C), 162.96 (pyr-6C), 162.54 (pyr-2C), 159.60 (ph2-4C), 148.09 (ph1-1C), 134.68 (ph1-4C), 130.71 (ph1-2C), 129.94 (ph1-5C), 129.74 (ph2-2,6C), 128.00 (ph2-1C), 123.63 (ph1-3C), 115.13 (ph1-6C), 113.99 (ph2-3,5C), 87.90 (pyr-5C), 65.80 (prop-1C), 54.30 (prop-3C), 45.63 (prz-2,6C), 43.28 (prz-3,5C), 40.69 (N-CH<sub>3</sub>), 27.70 (prop-2C).

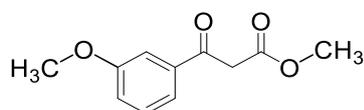
UV/Vis  $\lambda_{\text{maxAbs}} = 335 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{maxEm}} = \text{nicht bestimmbar}$ .

LC-MS  $t_r = 20.2 \text{ min}$ ;  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 255.0$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 509.3$ ; 100%.



### 6.3.68: Methyl 3-(3-methoxyphenyl)-3-oxopropanoat (P44)<sup>258</sup>

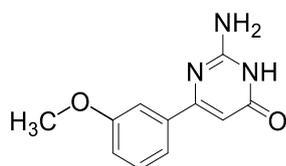
Gemäß Methode H wurde Verbindung **P44** aus 3-Methoxyacetophenon (3.06 g; 20 mmol) und Dimethylcarbonat (3.2 mL; 40 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (60%; 1.64 g; 40 mmol) in Toluol (30 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (3.74 g; 90%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	208.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.56 (ddd, J = 8.0, 1.6, 1.0 Hz, 1H, ph-6H), 7.50 – 7.43 (m, 2H, ph-2,5H), 7.25 (ddd, J = 8.0, 2.7, 1.0 Hz, 1H, ph-4H), 4.22 (s, 2H, OC-CH <sub>2</sub> ), 3.83 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ), 3.66 (s, 3H, OCO-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.69: 2-Amino-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-4(3H)-on (P45)<sup>226</sup>

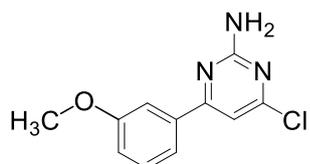
Gemäß Methode I wurde Verbindung **P45** aus **P44** (844.4 mg; 3.8 mmol) und Guanidin Carbonat (340 mg; 3.8 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (12 mL: 2 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (437 mg; 53%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	217.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 10.71 (s, 1H, NH), 7.67 – 7.55 (m, 2H, ph-2,6H), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ph-5H), 7.02 (ddd, J = 7.9, 2.6, 1.0 Hz, 1H, ph-4H), 6.54 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.03 (s, 1H, OC-CH), 3.89 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ).

### 6.3.70: 4-Chlor-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amin (P46)<sup>248</sup>

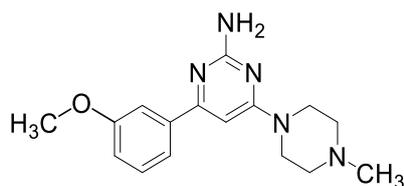
Gemäß Methode M wurde **P46** aus **P45** (657 mg; 3 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (1.37 mL; 15 mmol) in Acetonitril (10 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels und Waschen mit Acetonitril wurde das Produkt als orangener Feststoff (706 mg; quant.) gewonnen. Nach DC- und MS-Kontrolle wurde mit dem Rohprodukt weitergearbeitet.



Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O
Molekulargewicht	235.7
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 236.5 (100%).

**6.3.71: 4-(4-Methoxyphenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin  
(P47)<sup>88</sup>**

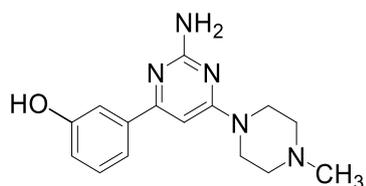
Gemäß Methode E wurde **P47** aus **P46** (506 mg; 2.2 mmol) und *N*-Methylpiperazin (606 mg; 6.6 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.3 mL; 8.8 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt als weißen Feststoff (369 mg; 56%).



Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	299.4
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.66 – 7.56 (m, 2H, ph-2,6H), 7.35 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ph-5H), 7.01 (ddd, J = 7.9, 2.6, 1.0 Hz, 1H, ph-4H), 6.62 (s, 1H, pyr-5H), 6.21 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.82 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ), 3.72 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H), 2.60 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-3,5H), 2.37 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 300.5 (100%).

### 6.3.72: 3-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenol (P48)<sup>259</sup>

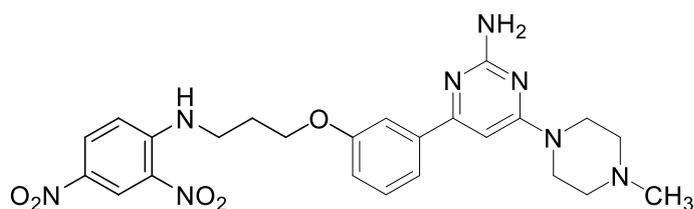
Gemäß Methode Q wurde **P48** durch Demethylierung von **P47** (3.6 g; 12 mmol) unter Verwendung von wässriger HBr (48%; 30 mL) in Essigsäure 20 mL hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff (3.00 g; 88%) gewonnen. Nach DC- und MS-Kontrolle wurde das Rohprodukt direkt weiterverarbeitet.



Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O
Molekulargewicht	285.4
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 286.3 (100%).

### 6.3.73: 4-(3-(3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (25)

Gemäß Methode K wurde Verbindung **25** aus **P33** (779 mg; 3 mmol) und **P48** (500 mg; 1.75 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (483.7 mg; 3.5 mmol) und Kaliumiodid (58 mg; 0.35 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Säulenchromatographische (DCM/MeOH 9:1) Aufreinigung erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (280 mg; 18%).

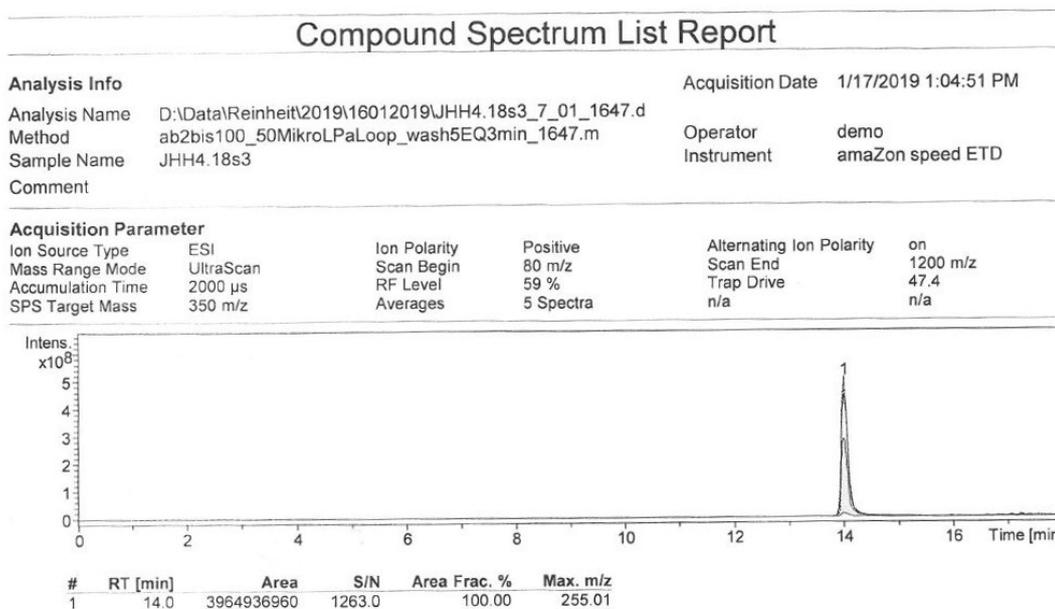


Summenformel	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
Molekulargewicht	508.5
Schmelzpunkt	117 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 9.04 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.87 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph1-3H), 8.25 (dd, J = 9.7, 2.7 Hz, 1H, ph1-5H), 7.66 – 7.58 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.35 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ph2-5H), 7.28 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph1-6H), 7.03 (ddd, J = 8.1, 2.5, 1.0 Hz, 1H, ph2-4H), 6.55 (s, 1H, pyr-5H), 6.08 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.18 (t, J = 5.7 Hz, 2H, prop-1H), 3.71 (q, J = 6.5 Hz, 2H, prop-3H), 3.63 (s, 4H, prz-2,6H), 2.39 (s, 4H, prz-3,5H), 2.24 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.15 (t, J = 6.1 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

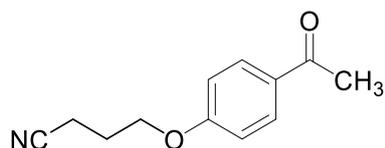
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d6) δ 171.96 (pyr-4C), 163.58 (pyr-6C), 163.03 (pyr-2C), 162.81 (ph2-3C), 158.44 (ph1-1C), 148.11 (ph2-1C), 139.87 (ph1-4C), 134.67 (ph1-2C), 130.52 (ph1-5C), 129.95 (ph2-5C), 129.75 (ph1-3C), 129.25 (ph2-6C), 115.13 (ph1-6C), 112.56 (ph2-4C), 106.01 (ph2-2C), 99.54 (pyr-5C), 65.76 (prop-1C), 54.31 (prop-3C), 45.68 (prz-2,6C), 43.31 (prz-3,5C), 40.75 (N-CH<sub>3</sub>), 26.91 (prop-2C).

LC-MS  $t_r = 14.0$  min;  $[M+2H]^{2+} = 255.0$ ,  $[M+H]^+ = 509.2$ ; 100%.



### 6.3.74: 4-(4-Acetylphenoxy)butannitril (P49)<sup>260</sup>

Gemäß Methode K wurde Verbindung **P49** aus 4-Brombutyronitril (7.4 g; 50 mmol) und 4-Hydroxyacetophenon (6.8 g; 50 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (13.8 g; 0.1 mol) in Aceton (100 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (9.14 g; 90%) isoliert.



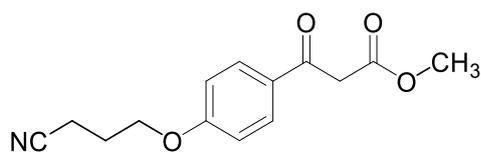
Summenformel  $C_{12}H_{13}NO_2$

Molekulargewicht 203.2

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H<sub>2</sub>), 7.10 – 7.00 (m, 2H, ph-3,5H<sub>2</sub>), 4.13 (t, J = 6.0 Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 2.67 (t, J = 7.1 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.52 (s, 3H, OC-CH<sub>3</sub>), 2.14 – 1.99 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

### 6.3.75: Methyl 3-(4-(3-cyanopropoxy)phenyl)-3-oxopropanoat (P50)

Gemäß Methode H wurde Verbindung **P50** aus **P49** (10.0 g; 50 mmol) und Dimethylcarbonat (8.5 mL; 0.1 mmol) unter Verwendung von Natriumhydrid (60%; 4.0 g; 0.1 mol) in Toluol (100 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als braunes Öl (13.1 g; quant) gewonnen.



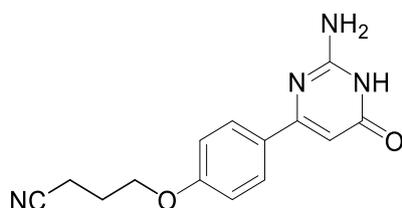
Summenformel  $C_{14}H_{15}NO_4$

Molekulargewicht 261.3

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.08 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ph-3,5H), 4.19 – 4.12 (m, 4H, OC-CH<sub>2</sub>, prop-1H<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.67 (t, J = 7.1 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.13 – 1.97 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

6.3.76: 4-(4-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-yl)phenoxy)butannitril  
(P51)

Gemäß Methode I wurde Verbindung **P51** aus **P50** (13.1 g; 50 mmol) und Guanidin Carbonat (4.5 g; 50 mmol) in einer Ethanol/Toluol-Mischung (30 mL: 5 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (8.11 g; 60%) gewonnen.



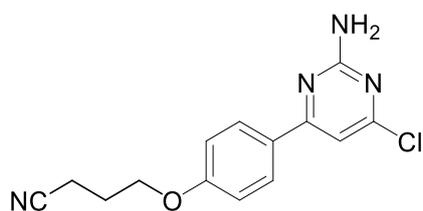
Summenformel  $C_{14}H_{14}N_4O_2$

Molekulargewicht 270.3

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.71 (s, 1H, NH), 7.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H, ph-3,5H), 6.56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.03 (s, 1H-OC-CH), 4.14 (t, J = 6.0 Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 2.67 (t, J = 7.1 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.22 – 1.94 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

6.3.77: 4-(4-(2-Amino-6-chlorpyrimidin-4-yl)phenoxy)butannitril (P52)

Gemäß Methode M wurde **P52** aus **P51** (7.0 g; 25 mmol) unter Verwendung von Phosphoroxotrichlorid (10 mL; 113 mmol) in Acetonitril (60 mL) hergestellt. Nach Entfernen des Lösemittels und Waschen mit Acetonitril wurde das Produkt als orangenes Öl (7.2 g; quant.) gewonnen. Nach DC-Kontrolle ( $R_f$  = 0.43 (DCM/MeOH 99:1) und MS-Kontrolle wurde mit dem Rohprodukt weitergearbeitet.



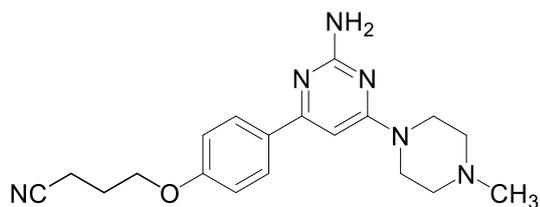
Summenformel  $C_{14}H_{13}ClN_4O$

Molekulargewicht 288.7

APCI MS  $[M+H]^+ = 289.1$  (100%).  
197

6.3.78: 4-(4-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenoxy)butannitril (P53)

Gemäß Methode E wurde **P53** aus **P52** (7.2 g; 25 mmol) und *N*-Methylpiperazin (7.51 g; 75 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (10 mL; 57 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt als gelbes Öl (4.41 g; 50%).



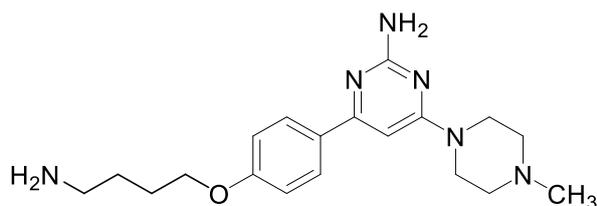
Summenformel  $C_{14}H_{13}ClN_4O$

Molekulargewicht 352.4

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.03 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-2,6H), 7.00 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, ph-3,5H), 6.56 (s, 1H, pyr-5C), 6.12 (s, 2H,  $NH_2$ ), 4.10 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H, prop-1 $H_2$ ), 3.67 (t,  $J = 4.9$  Hz, 4H, prz-2,6 $H_2$ ), 2.68 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H, prop-3 $H_2$ ), 2.52 – 2.48 (m, 4H, prz-3,5H), 2.31 (s, 3H, N- $CH_3$ ), 2.12 – 2.00 (m, 2H, prop-2H).

6.3.79: 4-(4-(4-Aminobutoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (P54)

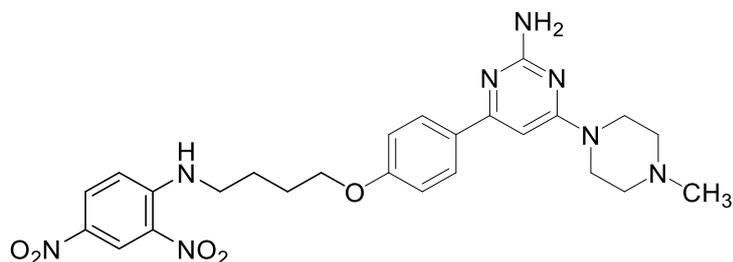
Gemäß Methode U wurde **P54** durch Reduktion von **P53** (4.3 g; 12 mmol) unter Verwendung von aktiviertem Raney-Nickel (860 mg; 10 eq) in ammoniakalischen Methanol (30 mL) unter Wasserstoffatmosphäre (6 bar) im Autoklaven hergestellt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff (3.59 g; 84%) isoliert.



Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O
Molekulargewicht	356.5
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.01 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ph-2,6H), 6.97 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ph-3,5H), 6.51 (s, 1H, pyr-5H), 6.01 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 4.04 (s, 2H, but-4H <sub>2</sub> ), 3.60 (s, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.81 (s, 2H, but-1H <sub>2</sub> ), 2.35 (s, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.21 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.74 (d, J = 23.5 Hz, 4H, but-2,3H <sub>2</sub> ).

**6.3.80: 4-(4-(4-((2,4-Dinitrophenyl)amino)butoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (26)**

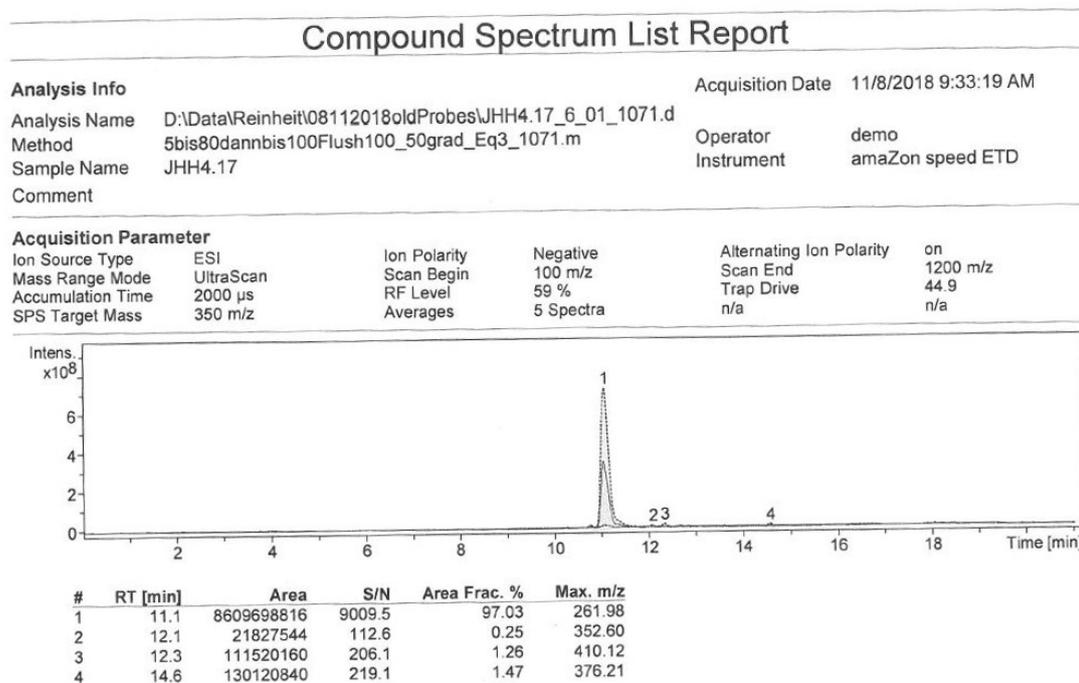
Gemäß Methode Y wurde Verbindung **26** aus **P54** (250 mg; 0.7 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (300 mg, 1.5 mmol) unter Verwendung von Triethylamin (2.7 mL, 2 mmol) in THF (105 mL) hergestellt. Säulenchromatographie (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (311 mg; 85%).



Summenformel	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
Molekulargewicht	522.6
Schmelzpunkt	216 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.93 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.86 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph1-3H), 8.26 (dd, J = 9.7, 2.7 Hz, 1H, ph1-5H), 8.05 – 7.94 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.27 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph1-6H), 7.02 – 6.92 (m, 2H, ph2-3,5H), 6.52 (s, 1H, pyr-5H), 6.05 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 4.16 – 4.00 (m, 2H, but-1H), 3.70 – 3.52 (m, 6H, but-4H <sub>2</sub> , prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.44 (s, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.27 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.83 (dd, J = 6.6, 3.2 Hz, 4H, but-2,3H <sub>2</sub> ).

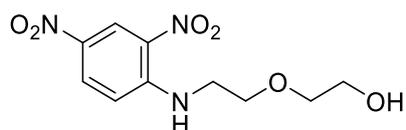
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  163.53 (pyr-4C), 162.86 (pyr-6C), 159.80 (pyr-2C), 148.11 (ph2-4C), 134.60 (ph1-1C), 130.42 (ph1-4C), 129.90 (ph1-2C), 129.66 (ph1-5C), 128.02 (ph2-2,6C), 123.70 (ph2-1C), 115.25 (ph1-3C), 114.00 (ph1-6C), 95.81 (ph2-3,5C), 87.91 (pyr-5C), 54.15 (but-1C), 45.40 (prz-2,6C), 45.36 (but-4C), 43.14 (prz-3,5C), 42.38 (N-CH<sub>3</sub>), 25.88 (but-2C), 24.70 (but-3C).

LC-MS  $t_r = 11.1$  min;  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 262.0$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 523.2$ ; 97.03%.



### 6.3.81: 2-(2-((2,4-Dinitrophenyl)amino)ethoxy)ethan-1-ol (P55)

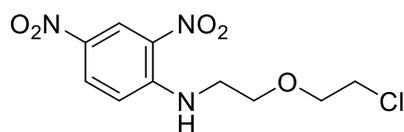
Analog zu Methode Y wurde Verbindung **P55** aus Aminoethoxyethanol (3.15 g; 30 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (2.02 g; 10 mmol) mithilfe von Triethylamin (6.2 mL; 45 mmol) in Dichlormethan (110 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (2.7 g; quant) gewonnen.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht	271.2
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.97 – 8.72 (m, 2H, NH, ph-3H), 8.24 (dd, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H, ph5-H), 7.27 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 4.62 (s, 1H, OH), 3.68 (m, 4H, HN-CH <sub>2</sub> , HO-CH <sub>2</sub> ), 3.57 – 3.45 (m, 4H, H <sub>2</sub> C-O-CH <sub>2</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 272.1 (100%).

### 6.3.82: N-(2-(2-Chlorethoxy)ethyl)-2,4-dinitroanilin (P56)

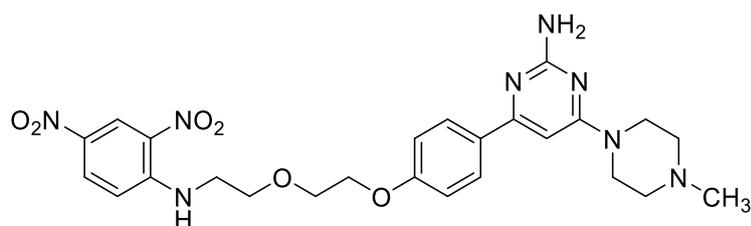
Gemäß Methode N wurde Verbindung **P56** aus **P55** (1.9 g; 8 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (0,9 mL, 12 mmol) in THF (50 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (2.1 g, 92%) isoliert. Nach DC- und MS-Kontrolle wurde mit dem Rohprodukt weitergearbeitet.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
Molekulargewicht	289.7
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 290.1 (100%).

### 6.3.83: 4-(4-(2-(2-((2,4-Dinitrophenyl)amino)ethoxy)ethoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (27)

Gemäß Methode K wurde Verbindung **27** aus **P56** (869 mg; 3 mmol) und **P43** (500 mg; 1.75 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (483.7 mg; 3.5 mmol) und Kaliumiodid (58 mg; 0.35 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Säulenchromatographische (DCM/MeOH 9:1) Aufreinigung erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (371 mg; 23%).

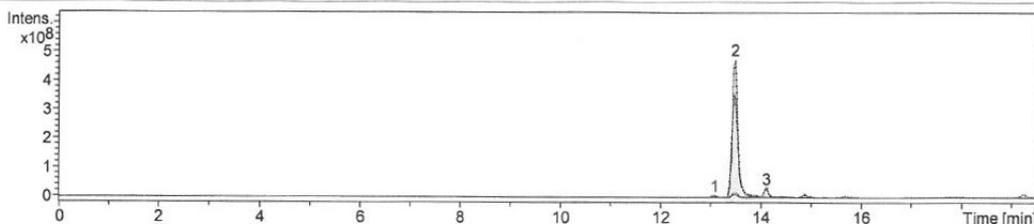


Summenformel	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht	538.6
Schmelzpunkt	208 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	<p>δ 8.88 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.83 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph1-3H), 8.23 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H, ph1-5H), 8.01 – 7.95 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.28 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ph1-6H), 7.00 – 6.90 (m, 2H, ph2-3,5H), 6.53 (s, 1H, pyr-5H), 6.08 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.15 (dd, J = 5.7, 3.4 Hz, 2H, ph-O-CH<sub>2</sub>), 3.83 (t, J = 4.5 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 3.79 (t, J = 5.2 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 3.73 – 3.63 (m, 4H H<sub>2</sub>C-O-CH<sub>2</sub>), 2.51 (t, J = 5.2 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.33 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).</p>
<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	<p>δ 163.95 (pyr-4C), 163.22 (pyr-6C), 162.82 (pyr-2C), 160.21 (ph2-4C), 148.85 (ph1-1C), 135.34 (ph1-4C), 130.85 (ph1-2C), 130.31 (ph1-5C), 130.11 (ph2-2,6C), 128.50 (ph2-1C), 124.00 (ph1-3C), 116.12 (ph1-6C), 114.49 (ph2-3,5C), 88.52 (pyr-5C), 69.34 (ph-O-CH<sub>2</sub>), 68.85 (ph-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 67.62, HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 45.61 (prz-2,6C), 43.44 (prz-3,5C), 43.12 (HN-CH<sub>2</sub>), 40.51 (N-CH<sub>3</sub>).</p>
LC-MS	t <sub>r</sub> = 13.5 min; [M+2H] <sup>2+</sup> = 270.0, [M+H] <sup>+</sup> = 539.2; 96.8%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	5/21/2019 2:42:21 PM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\21052019\JHH4.30-s9_5_01_2168.d	Operator	demo
Method	ab2bis100LONG_50LOOP_PASA_wash5EQ3min_2168.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JHH4.30-s9		
Comment			

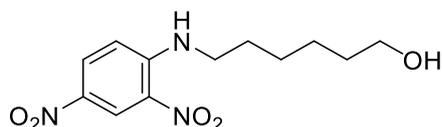
<b>Acquisition Parameter</b>			
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra
		Alternating Ion Polarity	on
		Scan End	1200 m/z
		Trap Drive	44.9
			n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	13.1	31313452	67.1	0.73	539.20
2	13.5	4135744256	4847.5	96.78	270.00
3	14.1	106491840	224.1	2.49	306.06

### 6.3.84: 6-((2,4-Dinitrophenyl)amino)hexan-1-ol (P57)<sup>261</sup>

Analog zu Methode Y wurde Verbindung **P57** aus Aminohexanol (3.52 g; 30 mmol) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (2.02 g; 10 mmol) mithilfe von Triethylamin (6.2 mL; 45 mmol) in Dichlormethan (110 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (2.58 g; 91%) gewonnen.



Summenformel  $C_{12}H_{17}N_3O_4$

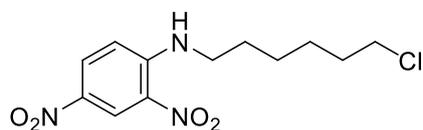
Molekulargewicht 283.3

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.02 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.80 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.22 (dd, J = 9.6, 2.8, 1H, ph-5H), 7.18 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 3.63 – 3.48 (m, 4H, Hex-1,6H<sub>2</sub>), 1.86 – 1.72 (m, 4H, Hex-2,5H), 1.52-1.45 (m, 4H, Hex-3,4H).

APCI MS  $[M+H]^+ = 284.2$  (100%).

### 6.3.85: N-(6-Chlorhexyl)-2,4-dinitroanilin (P58)

Gemäß Methode N wurde Verbindung **P58** aus **P57** (2.69 g; 9.5 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (1.1 mL; 14.3 mmol) in THF (100 mL) hergestellt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (DCM/Hexan 1:1) als gelbes Öl (2.87 g; quant) isoliert.



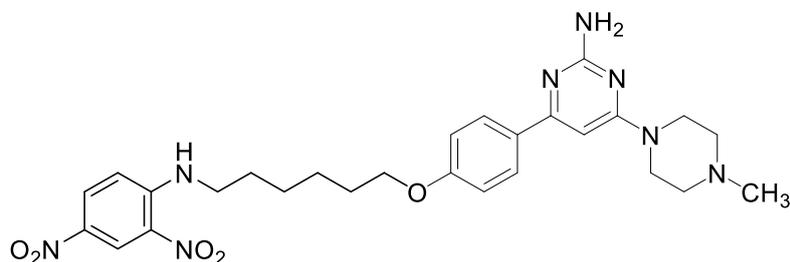
Summenformel  $C_{12}H_{16}ClN_3O_4$

Molekulargewicht 301.7

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.87 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H, NH), 8.82 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, ph-3H), 8.30 – 8.20 (m, 1H, ph-5H), 7.24 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, ph-6H), 3.75 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, Hex-1 $H_2$ ), 3.68 – 3.61 (m, 2H, Hex-6 $H_2$ ), 1.85-1.73 (m, 4H, Hex-2,5 $H_2$ ), 1.52-1.45 (m, 4H, Hex-3,4 $H_2$ ).

### 6.3.86: 4-(4-((6-((2,4-Dinitrophenyl)amino)hexyl)oxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (28)

Gemäß Methode K wurde Verbindung **28** aus **P58** (779 mg; 3 mmol) und **P43** (500 mg; 1.75 mmol) unter Verwendung von Kaliumcarbonat (483.7 mg; 3.5 mmol) und Kaliumiodid (58 mg; 0.35 mmol) in Aceton (30 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (156 mg; 16%).



Summenformel  $C_{27}H_{34}N_8O$

Molekulargewicht 550.6

Schmelzpunkt 176 °C (unkorrigiert)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

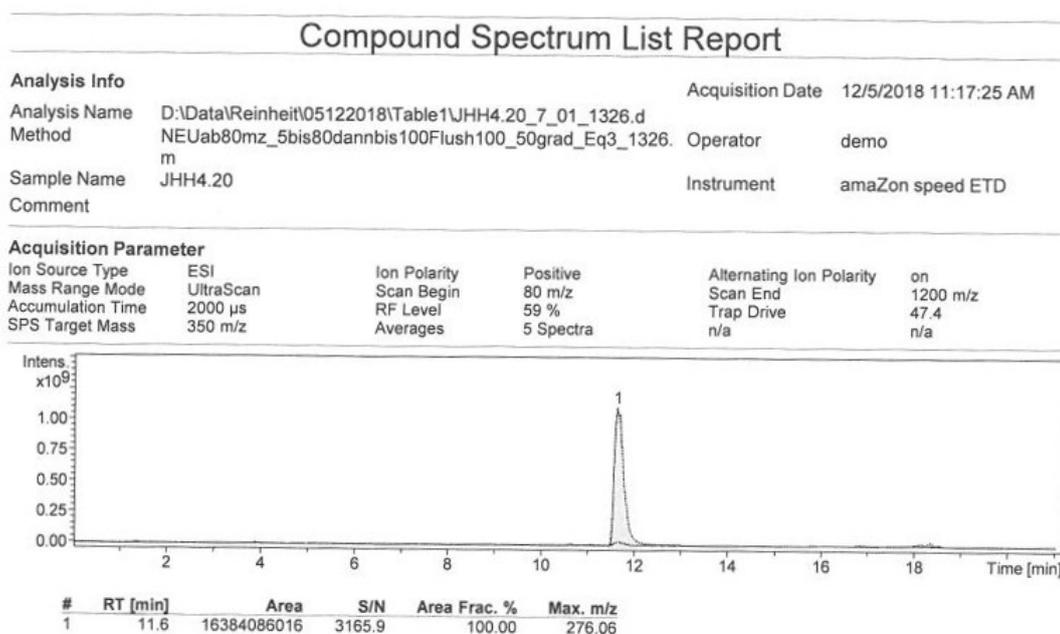
δ 9.06 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph1-3H), 8.48 (s, 1H, NH), 8.19 (dd, J = 9.6, 2.7 Hz, 1H, ph1-5H), 7.87 – 7.72 (m, 2H, ph2-2,6H), 7.00 – 6.75 (m, 3H, ph1-6H, ph2-3,5H), 6.22 (s, 1H, pyr-5H), 4.79 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.95 (t, J = 6.2 Hz, 2H, Hex-1H<sub>2</sub>), 3.61 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 3.35 (td, J = 7.0, 5.2 Hz, 2H, Hex-6H<sub>2</sub>), 2.41 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-3,5H), 2.27 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.76 (q, J = 7.0 Hz, 4H, Hex-2,5H<sub>2</sub>), 1.49 (dt, J = 6.9, 3.7 Hz, 4H, Hex-3,4H<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 163.79 (pyr-4C), 162.61 (pyr-6C), 160.43 (pyr-2C), 148.34 (ph2-4C), 135.98 (ph1-1C), 130.79 (ph1-4C), 130.36 (ph1-2C), 130.28 (ph1-5C), 128.25 (ph2-2,6C), 124.39 (ph2-1C), 114.37 (ph1-3C), 113.84 (ph1-6C), 89.65 (ph2-3,5C), 77.23 (pyr-5C), 67.63 (Hex-1C), 54.77 (prz-2,6C), 46.19 (Hex-6C), 43.95 (prz-3,5C), 43.47 (N-CH<sub>3</sub>), 29.01 (Hex-2C), 28.64 (Hex-5C), 26.67 (Hex-3C), 25.72 (Hex-4C).

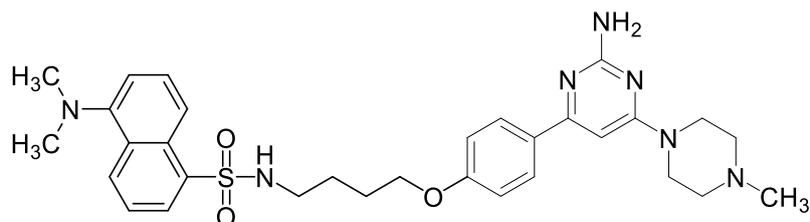
LC-MS

t<sub>r</sub> = 11.6 min; [M+2H]<sup>2+</sup> = 276.1, [M+H]<sup>+</sup> = 551.3; 100%.



6.3.87: *N*-(4-(4-(2-Amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenoxy)butyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid (29)

Gemäß Methode Z wurde Verbindung **29** aus **P54** (120 mg; 0.3 mmol) und Dansylchlorid (130 mg; 0.5 mmol) unter Verwendung von Triethylamin (60 mg; 0.6 mmol) in DMF (2 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als orangenen Feststoff (124 mg; 70%).



Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S
Molekulargewicht	589.8
Schmelzpunkt	110 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 8.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H, nap-4H), 8.24 (d, J = 8.5 Hz, 1H, nap-8H), 8.18 (dd, J = 7.4, 1.3 Hz, 1H, nap-2H), 7.81 – 7.69 (m, 2H, ph-2,6H), 7.46 (ddd, J = 19.2, 8.6, 7.4 Hz, 2H, nap-3,7), 7.11 (d, J = 7.4 Hz, 1H, nap-6H), 6.77 – 6.67 (m, 2H, ph-3,5H), 6.21 (s, 1H, pyr-5H), 5.01 – 4.85 (m, 4H, but-1H <sub>2</sub> , NH <sub>2</sub> ), 3.75 (t, J = 6.0 Hz, 2H, but-4H <sub>2</sub> ), 3.61 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.88 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.81 (s, 6H, N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.41 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.27 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.64 – 1.55 (m, 2H, but-2H <sub>2</sub> ), 1.54 – 1.45 (m, 2H, but-3H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 163.66 (pyr-4C), 160.27 (pyr-6C), 152.05 (pyr-2C), 134.76 (ph-4C), 130.44 (nap-5C), 129.91 (nap-1C), 129.65 (nap-8aC), 129.63 (nap-4,7C), 128.42 (ph-2,6C), 128.30 (nap-3C), 123.21 (ph-1C), 118.68 (nap-2,8C), 115.19 (nap-6C), 114.39 (ph-3,5C), 89.75 (pyr-5C), 67.21 (but-1C),

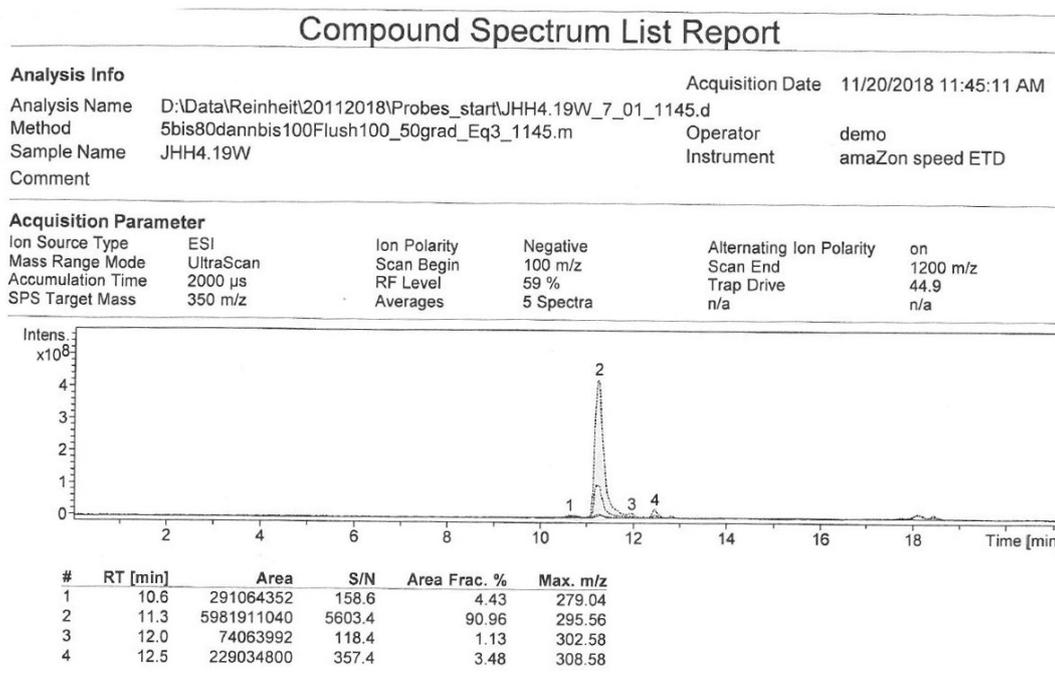
54.75 (prz-2,6C), 46.16 (but-4C), 45.43 (prz-3,5C), 43.98 (N-CH<sub>3</sub>), 42.97 (N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.46 (but-2C), 26.12 (but-3C).

UV/Vis

$\lambda_{\text{maxAbs}} = 325 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{maxEm}} = 500 \text{ nm}$ .

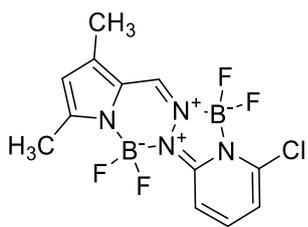
LC-MS

$t_r = 11.3 \text{ min}$ ;  $[M+2H]^{2+} = 295.6$ ,  $[M+H]^+ = 590.3$ ; 91.0%.



6.3.88: 10-Chlor-5,5,12,12-tetrafluor-1,3-dimethyl-5*H*,12*H*-pyrido[1',2':4,5][1,2,4,3]triazaborolo[2,1-*a*]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4,3]triazaborinin (BOPPY; P59)<sup>169</sup>

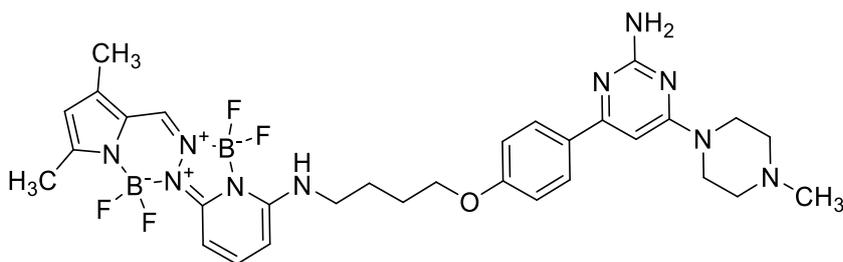
Gemäß Methode X wurde BOPPY (P59) aus 3,5-Dimethylpyrrol-2-carboxaldehyd (246.3 mg; 2 mmol) und 2-Chlor-6-hydrazinylpyridin (287 mg; 2 mmol) unter Verwendung von *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (90 mg; 0.5 mmol), Diisopropylethylamin (3 mL) und Bortrifluorid Diethyletherat (4 mL) in Dichlorethan (60 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/Hexan 1:1) ergab das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (250 mg; 36%).



Summenformel	$C_{12}H_{11}B_2ClF_4N_4$
Molekulargewicht	344.3
$^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$ )	$\delta$ 7.65 (dd, $J = 9.0, 7.4$ Hz, 1H, bpy-8H), 7.58 (s, 1H, bpy-2H), 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, bpy-9H), 6.77 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, bpy-7H), 6.10 (s, 1H, bpy-4H), 2.42 (s, 3H, bpy-5CH <sub>3</sub> ), 2.24 (s, 3H, bpy-3CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	$[M-F]^+ = 325.1$ (100%); $[M+H]^+ = 345.3$ (76%).

### 6.3.89: 4-(4-(4-(BOPPY)amino)butoxy)phenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-amin (30)

Gemäß Methode ZA wurde Verbindung **30** aus **P54** (356 mg; 1 mmol) und **P59** (230 mg; 0.7 mmol) unter Verwendung von Triethylamin (1 mL) in DMF (50 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 95:5) ergab das Produkt als orangenen Feststoff (172 mg; 37%).



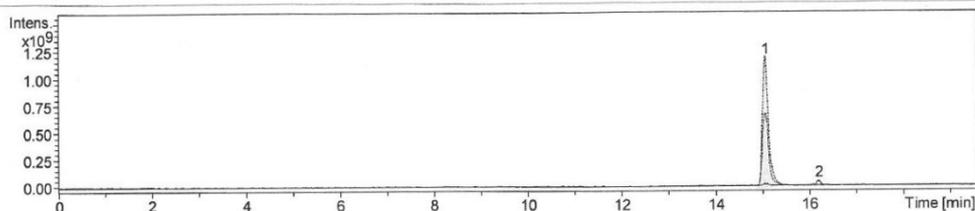
Summenformel	$C_{31}H_{38}B_2F_4N_{10}O$
Molekulargewicht	664.3
Schmelzpunkt	153 °C (unkorrigiert)

$^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 7.80 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, NH, ph-2,6H), 7.56 – 7.43 (m, 2H, ph-3,5H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, bpy-2H), 6.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, bpy-8H), 6.21 (s, 1H, bpy-7H), 6.03 (s, 1H, pyr-5H), 5.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, bpy-9H), 5.25 (s, 1H, bpy-4H), 5.03 (s, 2H, $\text{NH}_2$ ), 3.97 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, but-1 $H_2$ ), 3.60 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, prz-2,6 $H_2$ ), 3.25 (s, 3H, bpy-3 $\text{CH}_3$ ), 2.39 (d, $J = 4.2$ Hz, 6H, but-4 $H_2$ , prz-3,5 $H_2$ ), 2.25 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 2.19 (s, 3H, bpy-5 $\text{CH}_3$ ), 1.91 – 1.72 (m, 4H, but-2,3 $H_2$ ).
$^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 163.73 (pyr-4C), 163.31 (pyr-6C), 162.35 (pyr-2C), 160.32 (ph-4C), 151.43 (bpy-2C), 146.31 (bpy-6bC), 144.59 (bpy-10C), 134.91 (bpy-5C), 130.65 (ph-2,6C), 127.19 (ph-1C), 117.17 (bpy-8C), 114.46 (ph-3,5C), 95.97 (bpy-4C), 94.47 (bpy-3C), 89.65 (bpy-2aC), 77.47 (pyr-5C), 77.04 (bpy-7C), 76.62 (bpy-9C), 67.32 (but-1C), 54.71 (prz-2,6C), 46.06 (bpy-3 $\text{CH}_3$ ), 44.00 (bpy-5 $\text{CH}_3$ ), 42.46 (prz-3,5C), 26.28 (but-4C), 25.65 (N- $\text{CH}_3$ ), 13.85 (but-2C), 10.76 (but-3C).
$^{19}\text{F}$ NMR (565 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ -141.25 (d, $J = 25.8$ Hz), -141.36 (d, $J = 24.9$ Hz), -147.33 (d, $J = 26.8$ Hz), -147.43 (d, $J = 26.2$ Hz).
UV/Vis	$\lambda_{\text{maxAbs}} = 455$ nm; $\lambda_{\text{maxEm}} = 480$ nm.
LC-MS	$t_r = 15.0$ min; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 323.1$ , $[\text{M}+\text{H}]^+ = 665.3$ ; 96.5%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	3/22/2019 9:50:16 AM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\22032019\JH H 4.28_3_01_1856.d	Operator	demo
Method	ab2bis100_50LOOP_PASA_wash5EQ3min_1856.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JH H 4.28		
Comment			

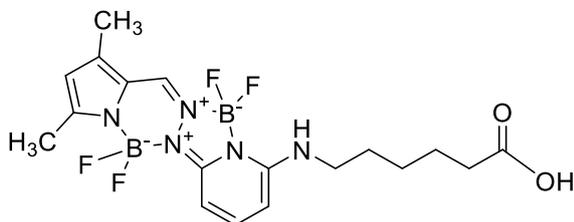
<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z	Scan End	1200 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	44.9
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	15.0	11064421376	5626.3	96.53	323.14
2	16.2	397191008	224.4	3.47	340.16

### 6.3.90: 6-(BOPPY)-Aminocaprinsäure (P60)

Gemäß Methode ZA wurde Verbindung **P60** aus Aminocaprinsäure (1.0 g; 8 mmol) und **P59** (550 mg; 1.6 mmol) in Gegenwart von Triethylamin (0.6 mL) in DMF (5 mL) hergestellt. Säulenchromatographie (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 95:5) erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (100 mg; 14%).



Summenformel  $C_{18}H_{24}B_2F_4N_5O_2$

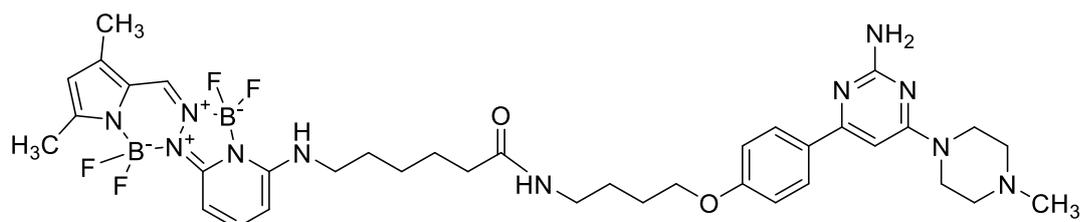
Molekulargewicht 439.0

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.99 (s, 1H, COOH), 8.37 (s, 1H, NH), 7.78 (t, J = 8.4 Hz, 1H, bpy-8H), 6.89 (s, 1H, bpy-2H), 6.39 (d, J = 8.1 Hz, 1H, bpy-9H), 6.28 (d, J = 8.4 Hz, 1H, bpy-7H), 6.21 (s, 1H, bpy-4H), 3.32 (q, J = 7.0 Hz, 3H, bpy-3CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, bpy-5CH<sub>3</sub>), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H, hex-1H<sub>2</sub>), 1.65 – 1.48 (m, 4H, hex-2,5H<sub>2</sub>), 1.41 – 1.27 (m, 2H, hex-3H<sub>2</sub>).

APCI MS  $[M-H]^- = 438.2$  (100%).

6.3.91: *N*-(4-(4-(2-amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenoxy)butyl)-6-(BOPPY-amino)hexanamid (31)

Gemäß Methode B wurde Verbindung **31** aus **P54** (82 mg; 0.2 mmol) und **P60** (100 mg; 0.2 mmol) in Gegenwart von EDC (50 mg; 0.3 mmol) und DMAP (5 mg) in DMF (5 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 95:5) erbrachte das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (25 mg; 14%).

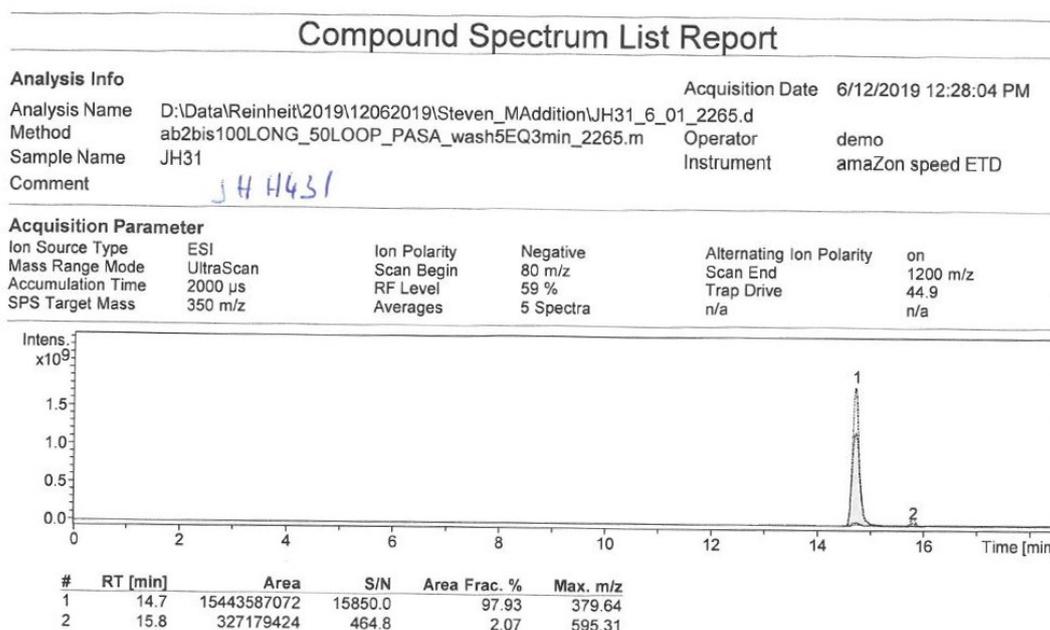


Summenformel	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> B <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	777.5
Schmelzpunkt	123 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<p>δ 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ph-2,6H), 7.53 – 7.44 (m, 2H, ph-3,5H), 6.83 (d, J = 8.8 Hz, 2H, bpy-2H), 6.55 (d, J = 8.3 Hz, 1H, bpy-8H), 6.21 (s, 1H, bpy-7H), 6.04 (s, 1H, pyr-5H), 5.87 – 5.71 (m, 2H, bpy-9H, OC-NH), 5.14 (t, J = 5.6 Hz, 1H, bpy-4H), 5.03 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.92 (t, J = 6.0 Hz, 2H, but-1H<sub>2</sub>), 3.60 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 3.23 (q, J = 6.6 Hz, 2H, but-4H<sub>2</sub>), 3.13 (q, J = 6.5 Hz, 2H, Hex-5H<sub>2</sub>), 2.42-2.36 (m, 7H, bpy-3CH<sub>3</sub>, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.25 (s, 3H, bpy-5H<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.08 (t, J = 7.4 Hz, 2H, hex-1H<sub>2</sub>), 1.78-1.67 (m, 2H, but-2H<sub>2</sub>), 1.60 (td, J = 8.2, 4.1 Hz, 6H, but-3H<sub>3</sub>, hex-2,4H<sub>2</sub>), 1.38-1.25 (m, 2H, hex-3H).</p>

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.55 (O=C-N), 163.70 (pyr-4C), 163.12 (pyr-6C), 162.22 (pyr-2C), 160.48 (ph-4C), 151.46 (bpy-2C), 150.32 (bpy-6bC), 146.31 (bpy-10C), 144.58 (bpy-5C), 134.89 (bpy-8C), 130.36 (ph-2,6C), 128.30 (ph-1C), 127.12 (bpy-4C), 122.75 (bpy-3C), 117.18 (bpy-2aC), 114.47 (ph-3,5C), 95.83 (bpy-7C), 94.54 (bpy-9C), 89.63 (pyr-5C), 67.56 (but-1C), 54.70 (prz-2,6C), 46.04 (but-4C), 44.01 (hex-5C), 42.61 (prz-3,5H), 39.10 (bpy-3CH<sub>3</sub>), 36.33 (bpy-5CH<sub>3</sub>), 28.41 (hex-1C), 26.61 (N-CH<sub>3</sub>), 26.37 (but-2C), 26.31 (but-3C), 25.10 (hex-4C), 13.83 (hex-2C), 10.74 (hex-3C).

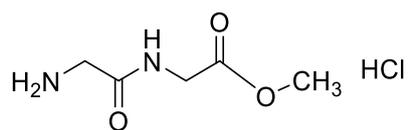
$^{19}\text{F}$  NMR (565 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -141.10 – -141.36 (m), -147.43 (dd, J = 58.4, 26.4 Hz).

LC-MS  $t_r$  = 14.7 min;  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  = 379.6,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 778.4; 97.9%.



### 6.3.92: Methylglycylglycinat Hydrochlorid (P61) <sup>237</sup>

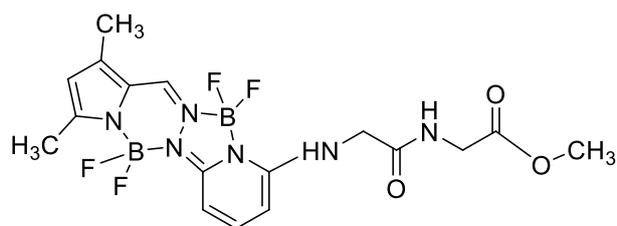
Gemäß Methode ZB wurde Verbindung **P61** durch die Veresterung von Glycylglycin (1 g; 7.5 mmol) unter Verwendung von Thionylchlorid (0.6 mL; 8.2 mmol) in Methanol (25 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (1.4 g; quant) isoliert und mit dem Rohprodukt weitergearbeitet.



Summenformel	$C_5H_{10}N_2O_3 \cdot HCl$
Molekulargewicht	182.6 (freie Base: 146.1)
APCI MS	$[M+H]^+ = 147.1$ (100%).

### 6.3.93: Methyl-(BOPPY)-glycylglycinat (P62)

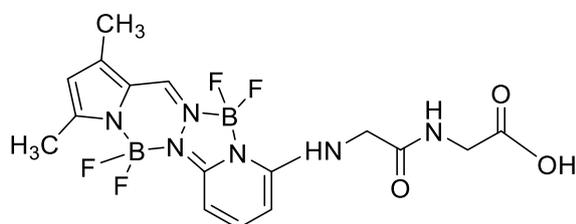
Gemäß Methode ZA wurde Verbindung **P62** aus **P59** (250 mg; 0.7 mmol) und **P61** (140 mg; 0.8 mmol) unter Verwendung von Triethylamin (0.3 mL) in DMF (5 mL) hergestellt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 98:2) als gelber Feststoff (170 mg; 52%) isoliert.



Summenformel	$C_{17}H_{21}B_2F_4N_6O_3$
Molekulargewicht	454.0
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 8.59 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, bpy-2H), 7.82 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, bpy-8H), 6.96 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, bpy-7H), 6.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, bpy-9H), 6.22 (s, 1H, bpy-4H), 6.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, OC-NH), 4.06 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, $O_2C-CH_2$ ), 3.93 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, HN- $CH_2$ ), 3.65 (s, 3H, $OCOCH_3$ ), 2.37 (s, 3H, bpy-3 $CH_3$ ), 2.34 – 2.27 (m, 3H, bpy-5 $CH_3$ ).
APCI MS	$[M+H]^+ = 455.2$ (100%).

### 6.3.94: (BOPPY)-glycylglycin (P63)

Gemäß Methode ZC wurde Verbindung **P63** aus **P62** (160 mg; 0.35 mmol) unter Verwendung von Lithiumhydroxid (15 mg; 0.7 mmol) in einer Methanol/Wasser-Mischung (4 mL: 1 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (150 mg; quant) isoliert.



Summenformel  $C_{16}H_{19}B_2F_4N_6O_3$

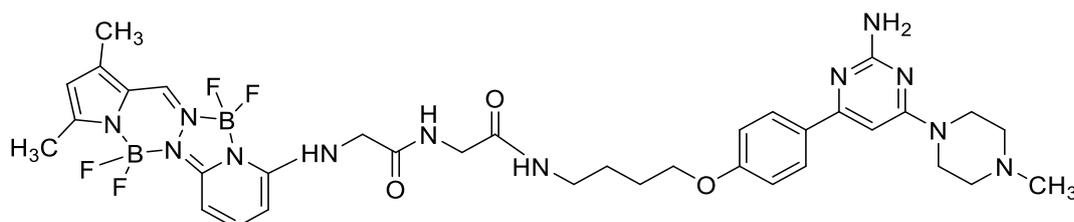
Molekulargewicht 440.0

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.50 – 8.45 (m, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, bpy-2H), 7.80 (t, J = 8.3 Hz, 1H, bpy-8H), 6.94 (t, J = 5.5 Hz, 1H, bpy-7H), 6.47 (d, J = 8.1 Hz, 1H, bpy-9H), 6.23 (s, 1H, bpy-4H), 6.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H, OC-NH), 4.04 (d, J = 5.4 Hz, 2H,  $O_2C-CH_2$ ), 3.83 (d, J = 5.8 Hz, 2H, HN- $CH_2$ ), 2.37 (s, 3H, bpy-3 $CH_3$ ), 2.31 (s, 3H, bpy-5 $CH_3$ ).

APCI MS  $[M-H]^- = 439.2$  (100%).

### 6.3.95: N-(4-(4-(2-amino-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)phenoxy)butyl)-2-(BOPPY)-amino)acetamido)acetamid (32)

Gemäß Methode B wurde Verbindung **32** aus **P54** (124 mg; 0.35 mmol) und **P63** (150 mg; 0.35 mmol) in Gegenwart von EDC (74 mg; 0.4 mmol) und DMAP (5 mg) in DMF (5 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 8:2) erbrachte das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (30 mg; 11%).

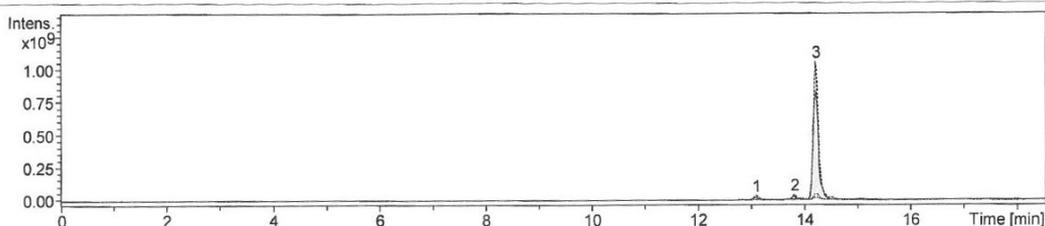


Summenformel	$C_{35}H_{45}B_2F_4N_{12}O_3$
Molekulargewicht	777.4
Schmelzpunkt	204 °C (Zersetzung, unkorrigiert)
$^1H$ NMR (300 MHz, DMSO-d6)	$\delta$ 8.46 – 8.36 (m, 1H, bpy-NH), 8.14 (s, 1H, bpy-2H), 8.05 – 7.91 (m, 3H, ph-2,6H), 7.81 (t, J = 8.3 Hz, 1H, bpy-8H), 7.03 – 6.93 (m, 2H, ph-3,5H), 6.90 (t, J = 5.5 Hz, 1H, bpy-7H), 6.53 (s, 1H, bpy-4H), 6.47 (d, J = 8.2 Hz, 1H, bpy-9H), 6.22 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H OC-NH), 6.05 (s, 1H, pyr-5H), 4.09 – 3.97 (m, 4H, bpy-HN-CH <sub>2</sub> , HN-OC-CH <sub>2</sub> ), 3.79 – 3.70 (m, 2H, but-1H <sub>2</sub> ), 3.63 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 3.20 – 3.11 (m, 2H, but-4H <sub>2</sub> ), 2.47 – 2.41 (m, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.37 (s, 3H, bpy-3CH <sub>3</sub> ), 2.31 (s, 3H, bpy-5CH <sub>3</sub> ), 2.27 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.81 – 1.66 (m, 2H, but-2H <sub>2</sub> ), 1.59 (q, J = 7.0 Hz, 2H, but-3H <sub>2</sub> ).
$^{13}C$ NMR (75 MHz, DMSO-d6)	$\delta$ 168.21 (O=C-N), 167.72 (O=C-N), 163.57 (pyr-4C), 162.83 (pyr-6C), 162.53 (pyr-2C), 159.93 (ph-4C), 151.24 (bpy-2C), 149.15 (bpy-6bC), 145.32 (bpy-10C), 144.38 (bpy-5C), 134.92 (bpy-8C), 130.39 (ph-2,6C), 128.92 (bpy-4C), 128.04 (ph-1C), 124.29 (bpy-3C), 116.88 (bpy-2aC), 114.06 (ph-3,5C), 96.42 (bpy-7C), 94.33 (bpy-9C), 88.02 (pyr-5C), 54.16 (bpy-HN-CH <sub>2</sub> ), 52.62 (HN-OC-CH <sub>2</sub> ), 50.86 (but-1C), 45.39 (prz-2,6C), 44.72 (but-4C), 43.21 (prz-3,5C), 38.20 (bpy-3CH <sub>3</sub> ), 26.11 (bpy-5CH <sub>3</sub> ), 25.76 (N-CH <sub>3</sub> ), 13.49 (but-2C), 10.51 (but-3C).
LC-MS	$t_r = 14.2$ min; $[M+2H]^{2+} = 380.1$ , $[M+H]^+ = 779.4$ ; 95.8%.

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	6/17/2019 1:25:05 PM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\17062019\JH32_3_01_2318.d	Operator	demo
Method	ab2bis100LONG_50LOOP_PASA_wash5EQ3min_2318.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JH 32		
Comment	JH 44.32		

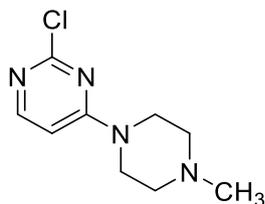
<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z	Scan End	1200 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	44.9
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	13.1	100501776	191.6	1.34	379.14
2	13.8	216399264	366.8	2.88	279.04
3	14.2	7204335104	9053.3	95.79	380.12

### 6.3.96: 2-Chlor-4-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin (P64)<sup>240</sup>

Gemäß Methode D wurde Verbindung **P64** aus 2,4-Dichlorpyrimidin (700 mg; 4.7 mmol) und *N*-Methylpiperazin (0.7 mL; 7.1 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.6 mL; 9.4 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 95:5) ergab das gewünschte Produkt als weißen Feststoff (500 mg; 50%).



Summenformel  $C_9H_{13}ClN_4$

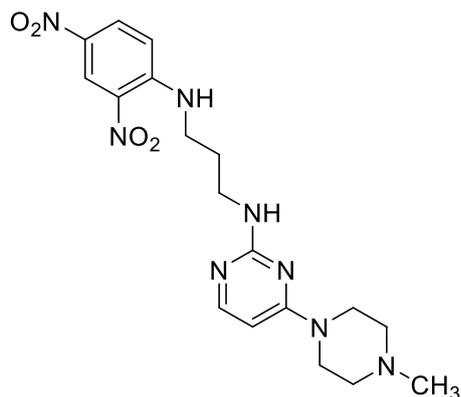
Molekulargewicht 212.7

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.10 (d, J = 6.2 Hz, 1H, pyr-6H), 6.87 (d, J = 6.2 Hz, 1H, pyr-5H), 3.69 (s, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.59 (t, J = 5.2 Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.35 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 214.0 (100%).

6.3.97: *N*<sup>1</sup>-(2,4-Dinitrophenyl)-*N*<sup>3</sup>-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)propan-1,3-diamin (33)

Gemäß Methode E wurde **33** aus **P64** (500 mg; 2.4 mmol) und **P35** (1.6 g; 7.1 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.2 mL; 7.1 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 9:1) ergab das Produkt als gelben Feststoff (310 mg; 31%).



Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	416.6
Schmelzpunkt	119 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 9.08 (s, 1H, pyr-NH), 8.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ph-3H), 8.20 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.79 (d, J = 5.9 Hz, 1H, pyr-6H), 7.21 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ph-6H), 6.66 (s, 1H, ph-NH), 6.00 (s, 1H, pyr-5H), 3.54 (d, J = 6.4 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 3.47 (s, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 3.31 (q, J = 6.4 Hz, 2H, prop-1H <sub>2</sub> ), 2.29 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.19 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.91 – 1.72 (m, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 162.51 (pyr-4C), 162.41 (pyr-2C), 156.98 (pyr-6C), 148.58 (ph-1C), 134.96 (ph-2,4C), 130.26 (ph-5C), 130.12 (ph-3C), 124.14 (ph-6C), 115.69 (pyr-5C), 54.70 (prop-3C), 46.18 (prz-2,6C), 43.53 (prop-1C), 40.97 (prz-3,5C), 38.20 (N-CH <sub>3</sub> ), 28.73 (prop-2C).

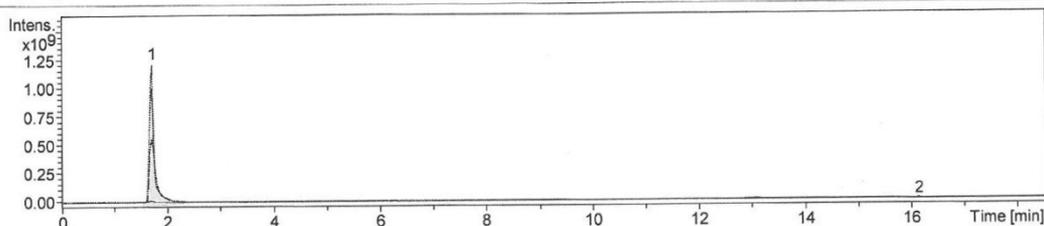
LC-MS

 $t_r = 1.7 \text{ min}; [M+H]^+ = 417.2; 100\%$ .

## Compound Spectrum List Report

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\26022019\Test2\JHH4.26_4_01_1745.d	2/26/2019 1:19:15 PM	
Method	ab2bis100_50PICKUP_wash5EQ3min_1745.m	Operator	demo
Sample Name	JHH4.26	Instrument	amaZon speed ETD
Comment			

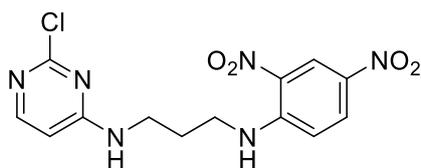
Acquisition Parameter					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z	Scan End	1200 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	44.9
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	1.7	8121254912	4035.1	98.08	417.20
2	16.1	159195552	42.2	1.92	406.21

### 6.3.98: $N^1$ -(2-Chlorpyrimidin-4-yl)- $N^3$ -(2,4-dinitrophenyl)propan-1,3-diamin (P65)

In Anlehnung an Methode D wurde **P65** aus 2,4-Dichlorpyrimidin (700 mg; 4.7 mmol) und **P35** (1.1 g; 4.7 mmol) bei Raumtemperatur unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1.6 mL; 9.4 mmol) in Isopropanol (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographie (DCM/MeOH 98:2) erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (400 mg; 24%).



Summenformel  $C_{13}H_{13}ClN_6O_4$

Molekulargewicht 352.7

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.91 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H, ph-NH), 8.87 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, ph-3H), 8.32 – 8.20 (m, 1H, ph-5H), 7.97 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, ph-6H), 7.89 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, pyr-6H), 7.25 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 6.43 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, pyr-5H), 3.57 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H,

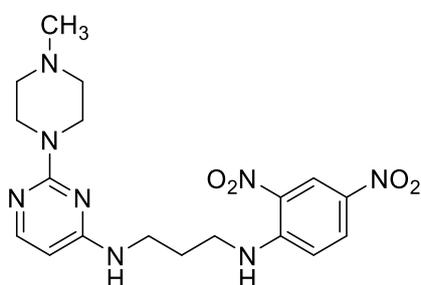
prop-1H<sub>2</sub>), 3.46 – 3.33 (m, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 1.96 – 1.82 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

APCI MS

[M+H]<sup>+</sup> = 353.8 (100%).

6.3.99: *N*<sup>1</sup>-(2,4-Dinitrophenyl)-*N*<sup>3</sup>-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)propan-1,3-diamin (**34**)

Nach Methode E wurde Verbindung **34** aus **P65** (400 mg; 1.2 mmol) und *N*-Methylpiperazin (400 mg; 4 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL, 5 mmol) in Isopropanol (3 mL) hergestellt. Säulenchromatographie (DCM/MeOH 95:5) erbrachte das Produkt als orangenen Feststoff (250 mg; 50%).



Summenformel

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

Molekulargewicht

416.4

Schmelzpunkt

71 °C (unkorrigiert)

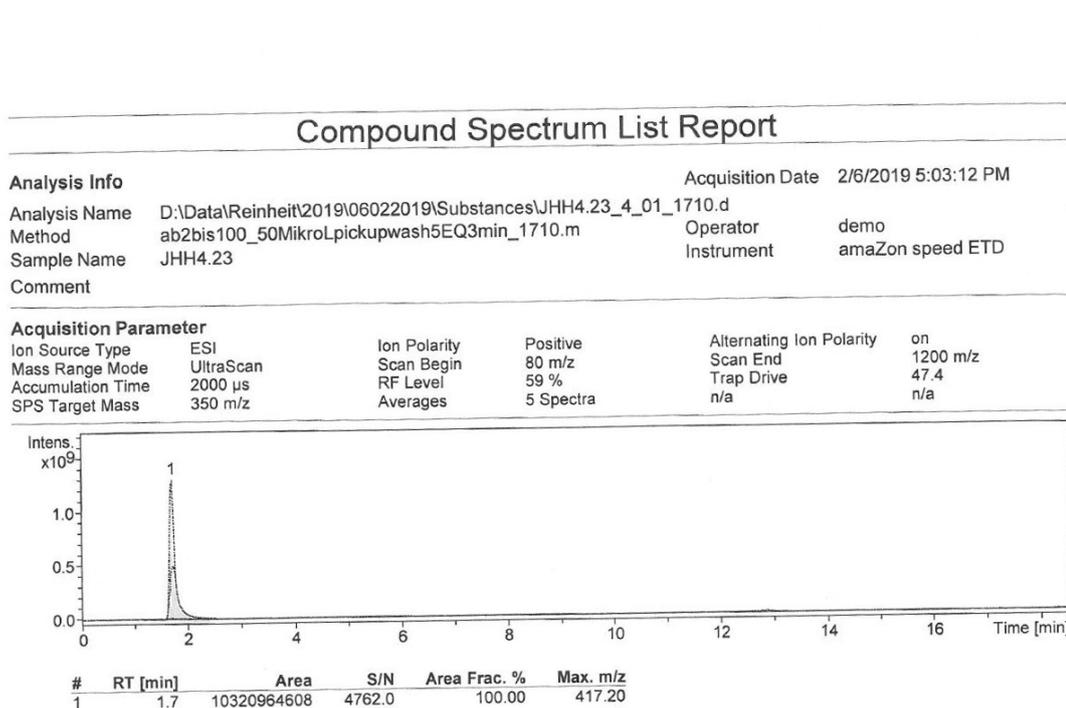
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

δ 8.89 (t, J = 6.0 Hz, 1H, ph-NH), 8.84 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph-3C), 8.21 (dd, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.68 (d, J = 5.7 Hz, 1H, pyr-6H), 7.20 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 7.04 (s, 1H, pyr-NH), 5.72 (d, J = 5.7 Hz, 1H, pyr-5H), 3.63 – 3.50 (m, 6H, prop-1H<sub>2</sub>, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.23 (t, J = 5.0 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.16 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.88 (p, J = 6.8 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  162.40 (pyr-4C), 161.19 (pyr-6C), 157.42 (ph-1C), 154.81 (pyr-2C), 148.08 (ph-4C), 134.68 (ph-2C), 129.77 (ph-5C), 123.54 (ph-2C), 115.12 (ph-6C), 95.18 (pyr-5C), 54.80 (prop-3H), 54.48 (prz-2,6C), 45.80 (prop-1C), 43.11 (prz-3,5C), 37.33 (N-CH<sub>3</sub>), 27.89 (prop-2C).

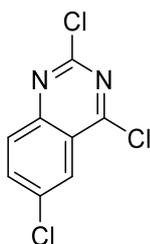
LC-MS

$t_r = 1.7$  min;  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 417.2$ ; 100%.



### 6.3.100: 2,4,6-Trichlorchinazolin (P66)<sup>94</sup>

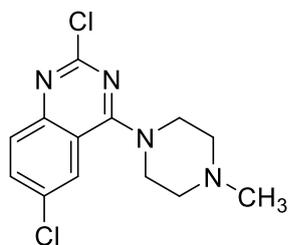
Gemäß Methode ZF wurde 2,4,6-Trichlorchinazolin (**P66**) aus 2-Amino-5-chlorbenzoesäure (860 mg; 5 mmol) und Harnstoff (3 g; 50 mmol) und der anschließenden Chlorierung mit Phosphoroxotrichlorid (2.3 mL, 24 mmol) und Diethylanilin (2.2 g; 15 mmol) hergestellt. Das Produkt wurde als roter Feststoff (934 mg; 80%) isoliert.



Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub>
Molekulargewicht	233.5
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.34 (d, J = 2.3 Hz, 1H, chin-5H), 8.20 (dd, J = 9.0, 2.3 Hz, 1H, chin-7H), 8.09 (d, J = 9.0 Hz, 1H, chin-8H).

### 6.3.101: 2,6-Dichlor-4-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin (P67)

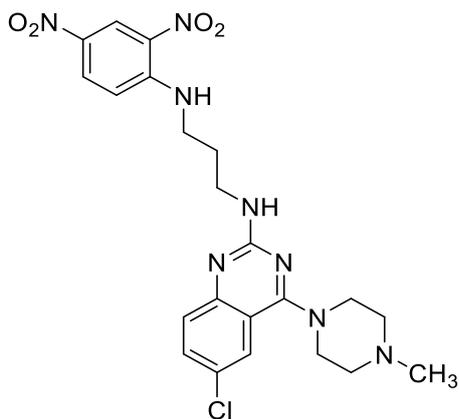
Analog zu Methode D wurde Verbindung **P67** aus **P66** (590 mg; 2.5 mmol) und *N*-Methylpiperazin (253 mg; 2.5 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL; 5 mmol) in Isopropanol (3 mL) durch Rühren für 2 h bei Raumtemperatur hergestellt. Säulenchromatographie (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 9:1) erbrachte das Produkt als weißen Feststoff (450 mg; 60%).



Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>
Molekulargewicht	297.2
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 7.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H, chin-5H), 7.82 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, chin-7H), 7.70 (d, J = 8.9 Hz, 1H, chin-8H), 3.84 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.51 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.25 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ).
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 298.3 (100%).

### 6.3.102: *N*<sup>1</sup>-(6-Chlor-4-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-2-yl)-*N*<sup>3</sup>-(2,4-dinitrophenyl)propan-1,3-diamin (35)

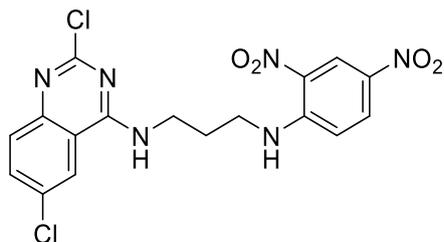
Nach Methode E wurde Verbindung **35** aus **P67** (450 mg; 1.5 mmol) und **P35** (678 mg; 2.8 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (0.8 mL; 4 mmol) in Isopropanol (3 mL) hergestellt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH 98:2) als orangener Feststoff (408 mg; 54%) gewonnen.



Summenformel	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	500.9
Schmelzpunkt	200 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMF-d <sub>7</sub> )	δ 8.93 (m, 2H, ph-NH, ph-3H), 8.24 (dd, J = 9.6, 2.7 Hz, 1H, ph-5H), 7.73 (d, J = 2.4 Hz, 1H, chin-5H), 7.54 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, chin-7H), 7.43 (d, J = 8.9 Hz, 1H, chin-8H), 7.32 (d, J = 9.6 Hz, 1H, ph-6H), 6.85 (t, J = 6.0 Hz, 1H, chin-NH), 3.77 (q, J = 6.4 Hz, 2H, prop-1H <sub>2</sub> ), 3.66 (m, 6H, prop-3H <sub>2</sub> , prz-2,6H <sub>2</sub> ), 2.61 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.34 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 2.15 (p, J = 6.5 Hz, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMF-d <sub>7</sub> )	δ 165.02 (chin-2C), 159.53 (chin-4C), 153.15 (ph-1C), 148.67 (chin-8aC), 135.42 (ph-4C), 132.62 (ph-2C), 130.39 (ph-5C), 129.79(chin-7C), 127.71 (chin-6C), 124.32 (chin-8C), 124.30 (chin-5C), 123.50 (ph-3C), 115.30 (chin-4aC), 99.98 (ph-6C), 54.71 (prop-1C), 49.57 (prz-2,6C), 45.37 (prop-3C), 41.38 (prz-3,5C), 38.69 (N-CH <sub>3</sub> ), 28.87 (prop-2C).
Elementaranalyse	theo. C 52.75%; H 5.03%; N 22.37%. bes. C 52.90%; H 5.08%; N 22.27%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 501.8 (100%).

6.3.103: *N*<sup>1</sup>-(2,6-Dichlorchinazolin-4-yl)-*N*<sup>3</sup>-(2,4-dinitrophenyl)propan-1,3-diamin (P68)

Analog zu Methode D wurde Verbindung **P68** aus **P66** (500 mg; 2.2 mmol) und **P35** (516 mg; 2.2 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL, 5 mmol) in Isopropanol (3 mL) bei Raumtemperatur hergestellt. Filtration und Waschen des Niederschlags mit Isopropanol erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (700 mg; 75%).



Summenformel

C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

Molekulargewicht

437.2

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

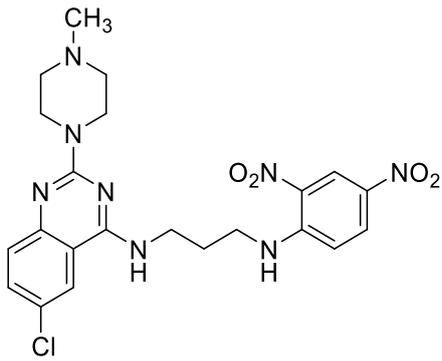
δ 8.91 (t, J = 6.0 Hz, 1H, chin-NH), 8.84 – 8.78 (m, 2H, ph-NH, ph-3H), 8.34 (d, J = 2.3 Hz, 1H, chin-5H), 8.19 (dd, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.80 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H, chin-7H), 7.61 (d, J = 8.9 Hz, 1H, chin-8H), 7.25 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 3.69 – 3.57 (m, 4H, prop-1,3H<sub>2</sub>), 2.03 (t, J = 6.7 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

APCI MS

[M+H]<sup>+</sup> = 438.2 (100%).

6.3.104: *N*<sup>1</sup>-(6-Chlor-2-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-4-yl)-*N*<sup>3</sup>-(2,4-dinitrophenyl)propan-1,3-diamin (36)

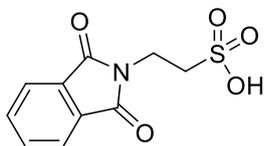
Nach Methode E wurde Verbindung **36** aus **P68** (700 mg; 1.6 mmol) und *N*-Methylpiperazin (600 mg; 6 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL; 5 mmol) in Isopropanol (4 mL) hergestellt. Filtern, Waschen mit Isopropanol und Trocknen unter reduziertem Druck erbrachte das Produkt als orangenen Feststoff (500 mg; 63%).



Summenformel	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Molekulargewicht	500.9
Schmelzpunkt	253 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMF-d <sub>7</sub> )	δ 9.05 (t, J = 6.0 Hz, 1H, ph-NH), 8.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ph-3H), 8.28 (dd, J = 9.5, 2.7 Hz, 1H, ph-5H), 8.20 (t, J = 5.5 Hz, 1H, chin-NH), 8.13 (d, J = 2.4 Hz, 1H, chin-5H), 7.55 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, chin-7H), 7.38 (d, J = 9.5 Hz, 1H, ph-6H), 7.35 (d, J = 8.9 Hz, 1H, chin-8H), 3.85 – 3.76 (m, 8H, prop-1,3H <sub>2</sub> , prz-1,6H <sub>2</sub> ), 2.35 (t, J = 5.1 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.22 (m, 5H, N-CH <sub>3</sub> , prop-2H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, DMF-d <sub>7</sub> )	δ 159.64 (chin-2C), 159.13 (chin-4C), 151.10 (ph-1C), 148.66 (chin-8aC), 135.21 (ph-4C), 132.60 (ph-2C), 130.11 (chin-7C), 129.93 (ph-5C), 127.27 (chin-8C), 124.57 (chin-6C), 123.65 (ph-3C), 122.05 (chin-5C), 115.40 (ph-6C), 111.68 (chin-4aC), 55.03 (prop-1C), 45.73 (prz-2,6H), 43.63 (prop-3C), 41.27 (prz-3,5C), 38.56 (N-CH <sub>3</sub> ), 27.83 (prop-2C).
Elementaranalyse	theo. C 52.75%; H 5.03%; N 22.37%. bes. C 52.58%; H 5.02%; N 22.11%.
APCI MS	[M+H] <sup>+</sup> = 502.0 (100%).

### 6.3.105: 2-(Phthalimid-2-yl)ethan-1-sulfonsäure (P69)<sup>262</sup>

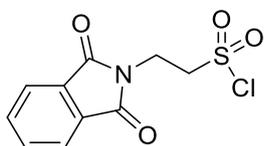
Gemäß Methode ZD wurde Verbindung **P69** durch Schützen von Taurin (8.45 g; 67 mmol) mit Phthalsäureanhydrid (10.7 g; 74 mmol) in Gegenwart von Kaliumacetat (7.1 g; 72 mmol) in Essigsäure (25 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (14 g, 82%) isoliert.



Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub> S
Molekulargewicht	255.24
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, D <sub>2</sub> O)	δ 7.73 (p, J = 2.2 Hz, 4H, pht-3,4,5,6H), 3.96 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-CH <sub>2</sub> ), 3.17 (t, J = 6.8 Hz, 2H, HO <sub>3</sub> S-CH <sub>2</sub> ).

### 6.3.106: 2-(Phthalimid-2-yl)ethan-1-sulfonylchlorid (P70)<sup>262</sup>

Gemäß Methode O wurde Verbindung **P70** aus **P69** (1 g; 3.4 mmol) unter Verwendung von Phosphorpentachlorid (1.3 g; 6.2 mmol) in Toluol (5 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (900 mg; 97%) gewonnen.

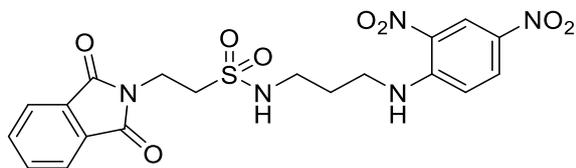


Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ClNO <sub>4</sub> S
Molekulargewicht	273.7
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 7.87 – 7.77 (m, 2H, pht-4,5H), 7.74 – 7.62 (m, 2H, pht-3,6H), 4.29 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N-CH <sub>2</sub> ), 4.02 (t, J = 6.5 Hz, 2H, ClO <sub>2</sub> S-CH <sub>2</sub> ).

### 6.3.107: N-(3-((2,4-Dinitrophenyl)amino)propyl)-2-(phthalimid-2-yl)ethan-1-sulfonamid (P71)

Gemäß Methode C wurden **P35** (1 g; 4.2 mmol) und **P70** (500 mg; 1.8 mmol) in Chloroform (20 mL) für 20 h bei Raumtemperatur in Gegenwart von Triethylamin (1 mL) gerührt.

Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM 100%; DCM/MeOH 95:5) erbrachte Verbindung **P71** als gelben Feststoff (500 mg; 58%).



Summenformel  $C_{19}H_{19}N_5O_8S$

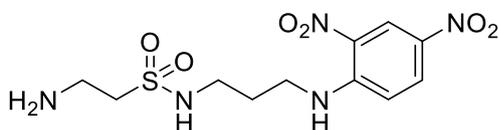
Molekulargewicht 477.5

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ -d)  $\delta$  8.10 – 8.04 (m, 1H, ph-NH), 8.03 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, ph-3H), 7.42 (dd,  $J = 9.6, 2.8$ , 2H, ph-5H), 7.10 – 6.96 (m, 4H, pht-3,4,5,6H), 6.60 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, ph-6H), 6.43 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H,  $O_2S-NH$ ), 3.19 – 3.03 (m, 2H, N- $CH_2$ ), 2.80 – 2.68 (m, 2H,  $O_2S-CH_2$ ), 2.62 – 2.52 (m, 2H, prop-1 $H_2$ ), 2.26 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, prop-3 $H_2$ ), 1.00 (p,  $J = 6.8$  Hz, 2H, prop-2 $H_2$ ).

APCI MS  $[M+H]^+ = 478.1$  (100%).

### 6.3.108: 2-Amino-*N*-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propyl)ethan-1-sulfonamid (P72)

Gemäß Methode ZE wurde Verbindung **P72** durch Entschützung von **P71** (500 mg, 1.1 mmol) unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat (0.15 mL; 5.5 mmol) hergestellt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (250 mg; 64%) isoliert.



Summenformel  $C_{11}H_{17}N_5O_6$

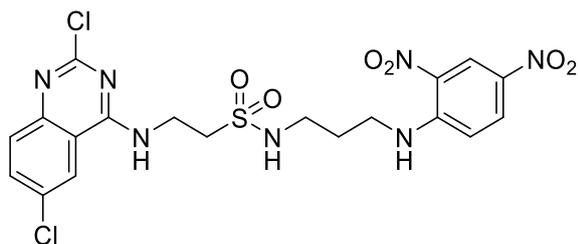
Molekulargewicht 347.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)      δ 8.99 – 8.72 (m, 2H, ph-NH, ph-3H), 8.24 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H, ph-5H), 7.27 (d, J = 9.7 Hz, 1H, ph-6H), 4.61 (d, J = 5.0 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.80 – 3.57 (m, 4H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>S-CH<sub>2</sub>), 3.60 – 3.44 (m, 6H, prop-1,2,3H<sub>2</sub>).

APCI MS      [M+H]<sup>+</sup> = 347.1 (100%).

### 6.3.109:      2-((2,6-Dichlorchinazolin-4-yl)amino)-N-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propyl)ethan-1-sulfonamid (P73)

Analog zu Methode D wurde Verbindung **P73** aus **P66** (500 mg; 2.2 mmol) und **P72** (250 mg; 0.7 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL, 5 mmol) in einer Mischung aus DMF und Isopropanol (20 mL/ 30 mL) bei Raumtemperatur hergestellt. Filtration und Waschen des Niederschlags mit Isopropanol erbrachte das Produkt als gelben Feststoff (330 mg; 87%).



Summenformel      C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S

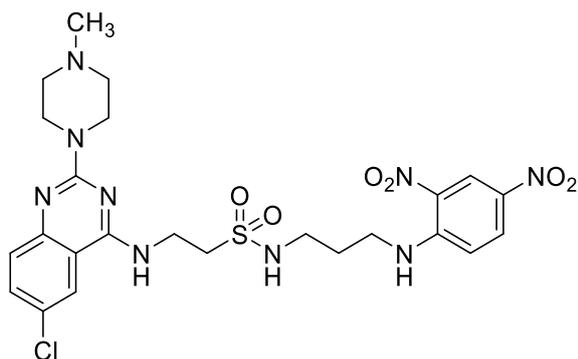
Molekulargewicht      544.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)      δ 9.01 (t, J = 5.4 Hz, 1H, ph-NH), 8.93 (d, J = 6.0 Hz, 1H, O<sub>2</sub>S-NH), 8.88 (d, J = 2.7 Hz, 1H, chin-5H), 8.39 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ph-3H), 8.31 – 8.22 (m, 1H, chin-7H), 7.90 – 7.86 (m, 1H, ph-5H), 7.69 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ph-6H), 7.46 (t, J = 5.9 Hz, 1H, chin-NH), 7.27 (d, J = 9.8 Hz, 1H, chin-8H), 3.89 (dt, J = 7.8, 5.7 Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 3.61 (q, J = 6.7 Hz, 2H, HN-CH<sub>2</sub>), 3.52 – 3.45 (m, 2H, O<sub>2</sub>S-CH<sub>2</sub>), 3.17 (q, J = 6.5 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 1.89 (p, J = 6.9 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

APCI MS      [M+H]<sup>+</sup> = 544.1 (100%).

6.3.110: 2-((6-Chlor-2-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-4-yl)amino)-*N*-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propyl)ethan-1-sulfonamid (37)

Nach Methode E wurde Verbindung **37** aus **P73** (330 mg; 0.6 mmol) und *N*-Methylpiperazin (400 mg; 4 mmol) unter Verwendung von Diisopropylethylamin (1 mL; 5 mmol) in Isopropanol (4 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (graduell: DCM/MeOH 9:1; DCM/MeOH (NH<sub>3</sub>) 95:5) ergab das Produkt als orangenen Feststoff (43 mg; 12%).



Summenformel	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>9</sub> O <sub>6</sub> S
Molekulargewicht	608.1
Schmelzpunkt	218 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 8.91 – 8.78 (m, 2H, O <sub>2</sub> S-NH, ph-NH), 8.24 – 8.13 (m, 2H, chin-5,7H), 8.01 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ph-3H), 7.48 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ph-5H), 7.34 (s, 1H, chin-NH), 7.22 (m Hz, 2H, chin-8H, ph-6H), 3.87 – 3.70 (m, 6H, prop-1H <sub>2</sub> , prz-2,6H <sub>2</sub> ), 3.53 (q, J = 6.6 Hz, 2H, HN-CH <sub>2</sub> ), 3.42 – 3.35 (m, 2H, O <sub>2</sub> S-CH <sub>2</sub> ), 3.05 (q, J = 6.1 Hz, 2H, prop-3H <sub>2</sub> ), 2.31 (t, J = 4.9 Hz, 4H, prz-3,5H <sub>2</sub> ), 2.18 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 1.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H, prop-2H <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 158.82 (chin-2C), 158.43 (chin-7C), 150.47 (ph-1C), 148.02 (chin-8aC), 134.77 (ph-2,4C), 132.56 (chin-5C), 129.80 (ph-5C), 127.01 (chin-8C), 124.10 (chin-6C), 123.52 (ph-3C), 121.80 (chin-5C), 115.01 (ph-6C), 111.06 (chin-4aC), 54.57 (prop-1C, prz-2,6C), 49.53 (HN-CH <sub>2</sub> ),

45.78 (O<sub>2</sub>S-CH<sub>2</sub>), 43.33 (prop-3C), 39.77 (prz-3,5C), 35.59 (N-CH<sub>3</sub>), 28.63 (prop-2C).

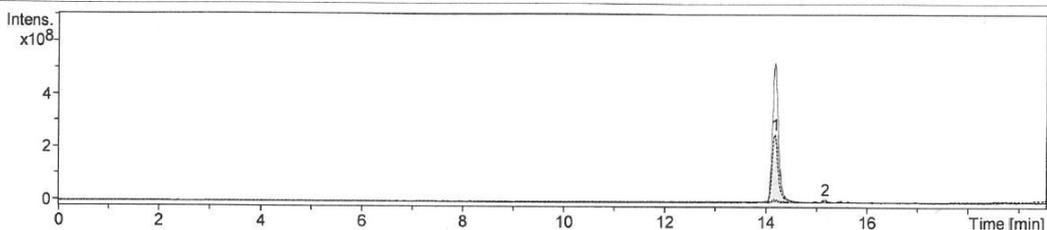
LC-MS

$t_r = 14.2$  min;  $[M+2H]^{2+} = 304.5$ ,  $[M+H]^+ = 608.2$ ; 100%.

### Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	4/3/2019 2:38:06 PM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\03042019\JHH4.29_3_01_1910.d	Operator	demo
Method	ab2bis100_50LOOP_PASA_wash5EQ3min_1910.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JHH4.29		
Comment			

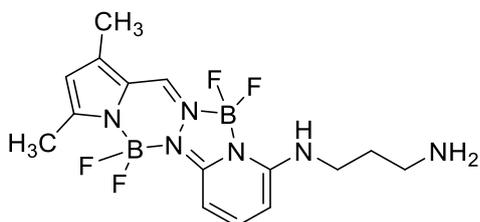
<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z	Scan End	1200 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	44.9
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	14.2	2259036928	1832.8	99.95	304.54
2	15.2	1078363	4.2	0.05	410.17

### 6.3.111: N-(BOPPY)-1,3-diaminopropan (P74)

Analog zu Methode ZA wurde Verbindung **P74** durch Zugabe von **P69** (250 mg; 0.7 mmol) gelöst in Dichlormethan (5 mL) zu 1,3-Diaminopropan (0.6 mL; 7 mmol) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) ergab das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (190 mg; 70%).



Summenformel  $C_{15}H_{21}B_2F_4N_6$

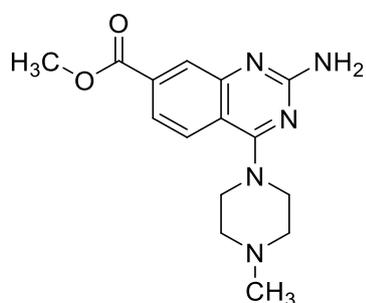
Molekulargewicht 382.0

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 8.43 (s, 1H, bpy-2H), 7.84 (t, J = 8.3 Hz, 1H, bpy-8H), 6.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, bpy-7H), 6.33 (d, J = 8.5 Hz, 1H, bpy-9H), 6.27 (s, 1H, bpy-4H), 3.45 (t, J = 6.6 Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 2.74 (t, J = 6.3 Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.42 (s, 3H, bpy-3CH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H, bpy-5CH<sub>3</sub>), 1.71 (tt, J = 6.6, 6.3 Hz, 2H, prop-2H<sub>2</sub>).

APCI MS [M+H]<sup>+</sup> = 383.2 (100%).

### 6.3.112: 2-Amino-4-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-7-carbonsäuremethylester (P75)<sup>224</sup>

Gemäß Methode ZG wurde Verbindung **P75** ausgehend von 2-Aminoterephthalat (1.82 g; 8.7 mmol) und Cyanamid (658 mg; 15.6 mmol) in Acetonitril (20 mL) und konzentrierter Salzsäure (0.8 mL) synthetisiert. Nach Isolierung des Zwischenproduktes wurde dieses in Essigsäureanhydrid (5 mL) refluxiert und im Anschluss mit 1,2,5-Triazol (3 g; 43 mmol) in Gegenwart von Phosphoroxotrichlorid (4 mL; 43 mmol) und Diisopropylethylamin (7.7 mL; 43 mmol) in Acetonitril (10 mL) in eine reaktive Spezies überführt, sodass nach Reaktion mit *N*-Methylpiperazin (7.3 mL; 65 mmol) in Dioxan (10 mL) das gewünschte Produkt als weißer Feststoff (838 mg; 32%) isoliert wurde.



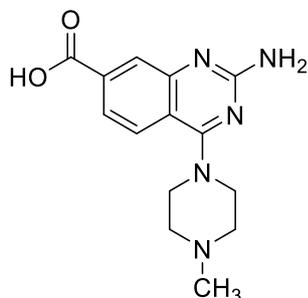
Summenformel C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Molekulargewicht 301.4

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 7.88 – 7.75 (m, 2H, chin-5,8H), 7.52 (dd, J = 8.5, 1.8 Hz, 1H, chin-6H), 6.55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, OCO-CH<sub>3</sub>), 3.58 (t, J = 4.8 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.61 – 2.44 (m, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.25 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

### 6.3.113: 2-Amino-4-(4-methylpiperazin-1-yl)chinazolin-7-carbonsäure (P76)<sup>224</sup>

Gemäß Methode ZC wurde **P76** aus **P75** (220 mg; 0.7 mmol) unter Verwendung von Lithiumhydroxid (35 mg; 1.4 mmol) in einer Methanol/Wasser-Mischung (20 mL: 1 mL) hergestellt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (210 mg; quant) isoliert.



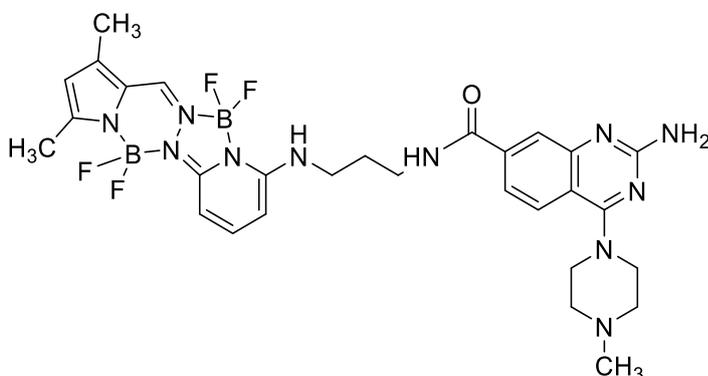
Summenformel  $C_{14}H_{17}N_5O_2$

Molekulargewicht 287.3

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.80 (s, 1H, chin-8H), 7.59 (d, J = 1.9 Hz, 2H, chin-5,6H), 6.23 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.53 (t, J = 4.5 Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 2.56 – 2.46 (m, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.25 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

### 6.3.114: 2-Amino-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-N-(BOPPYamino)propyl)chinazolin-7-carboxamid (38)

Gemäß Methode B wurde Verbindung **38** aus **P76** (150 mg; 0.5 mmol) und **P74** (190 mg; 0.5 mmol) in Gegenwart von EDC (105 mg; 0.6 mmol) und DMAP (5 mg) in DMF (5 mL) hergestellt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) erbrachte das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (5 mg; 2%).



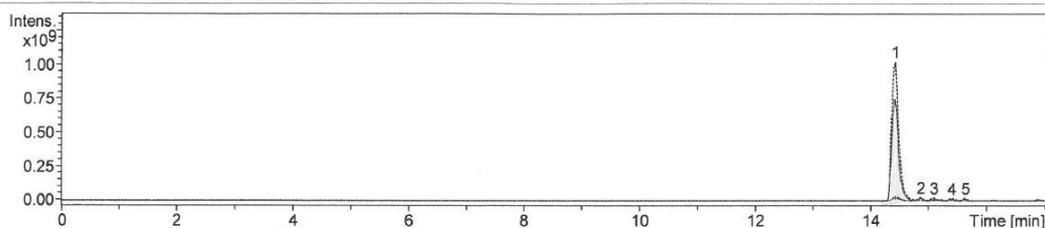
Summenformel  $C_{29}H_{36}B_2F_4N_{11}O$

Molekulargewicht	651.3
Schmelzpunkt	174 °C (unkorrigiert)
<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<p> <math>\delta</math> 7.88 (d, <math>J = 1.5</math> Hz, 1H, chin-8H), 7.72 – 7.57 (m, 2H, bpy, 2,8H), 7.54 – 7.42 (m, 2H, chin-5,6H), 6.50 (m, 1H, bpy-7,9H), 6.04 (s, 1H, bpy-4H), 5.88 (d, <math>J = 8.0</math> Hz, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.79 (t, <math>J = 4.9</math> Hz, 4H, prz-2,6H<sub>2</sub>), 3.53 (q, <math>J = 6.1</math> Hz, 2H, prop-1H<sub>2</sub>), 3.34 (q, <math>J = 6.4</math> Hz, 2H, prop-3H<sub>2</sub>), 2.50 (t, <math>J = 4.9</math> Hz, 4H, prz-3,5H<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3H, bpy-3CH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, bpy-5CH<sub>3</sub>), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.97 – 1.79 (m, 2H, prop-2H<sub>2</sub>). </p>
<sup>13</sup> C NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<p> <math>\delta</math> 165.52 (O=C-N), 163.56 (chin-4C), 155.88 (chin-2C), 150.37 (bpy-2C), 149.38 (bpy-10C), 146.49 (chin-8aC), 145.17 (bpy-6bC), 143.60 (chin-7C), 138.10 (bpy-8C), 133.87 (chin-8C), 126.33 (bpy-5C), 125.24 (bpy-3C), 121.78 (chin-5C), 120.66 (bpy-7C), 118.95 (chin-6C), 116.11 (bpy-2aC), 111.75 (chin-4aC), 94.81 (bpy-4C), 93.67 (bpy-9C), 53.79 (prz-2,6C), 48.40 (bpy-3CH<sub>3</sub>), 44.84 (bpy-5CH<sub>3</sub>), 39.36 (prop-1C), 36.42 (prz-3,5C), 27.66 (N-CH<sub>3</sub>), 12.89 (prop-3C), 9.84 (prop-2C). </p>
LC-MS	<p> <math>t_r = 14.4</math> min; <math>[M+2H]^{2+} = 316.6</math>, <math>[M+H]^+ = 652.3</math>; 96.7%. </p>

## Compound Spectrum List Report

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	7/4/2019 12:42:54 AM
Analysis Name	D:\Data\Reinheit\2019\03072019\Probe_neu\JH33_5_01_2534.d	Operator	demo
Method	ab2bis100_50MikroLPaLoop_wash5EQ3min_2534.m	Instrument	amaZon speed ETD
Sample Name	JH33		
Comment			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	on
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	80 m/z	Scan End	1200 m/z
Accumulation Time	2000 $\mu$ s	RF Level	59 %	Trap Drive	44.9
SPS Target Mass	350 m/z	Averages	5 Spectra	n/a	n/a



#	RT [min]	Area	S/N	Area Frac. %	Max. m/z
1	14.4	8903437312	8917.1	96.65	316.59
2	14.9	182940496	216.4	1.99	333.60
3	15.1	80167064	138.3	0.87	333.62
4	15.4	28351774	62.7	0.31	350.58
5	15.6	17472206	50.3	0.19	425.20

### 6.4: Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurde die Absorption von **18** bei 402 nm in unterschiedlichen Konzentrationen und für den Standard Coumarin-153 bei 423 nm (Abbildung 55 **A** und **B**) gemessen. Durch Interpolieren wurde die Absorbanz beider Verbindungen bei einer Konzentration von  $c = 1.69 \mu\text{M}$  bestimmt. Dabei wurde eine Absorbanz von  $A_{18} = 0.045$  für Verbindung **18** und  $A_S = 0.038$  für den Standard erhalten. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurden von Verbindung **18** und dem Standard Fluoreszenzspektren im Messbereich von 430 – 840 nm bei einer Anregung von  $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$  bei verschiedenen Konzentrationen gemessen (Abbildung 55 **C** und **D**). Die interpolierten Werte für die Fluoreszenzintensität bei  $c = 1.69 \mu\text{M}$  betragen  $F_{18} = 65937.469 \text{ RFU}$  und  $F_S = 192952.922 \text{ RFU}$ . Die Brechungsindizes für Wasser und Methanol lauten  $n_W = 1.330$  bzw.  $n_M = 1.329$ . Coumarin-153 weist eine tabellierte Quantenausbeute von  $\Phi_{F(S)} = 45\%$  auf.<sup>220</sup> Gemäß Formel (2) (Kapitel 6.1:) wurde eine Quantenausbeute der Verbindung **18** von  $\Phi_{F(18)} = 14\%$  bestimmt.

## 6.5: Pharmakologische Experimente

### 6.5.1: Radioliganden-Verdrängungsstudien an humanen H<sub>3</sub>R

Verdrängungsstudien mit Radioliganden an humanen H<sub>3</sub>R wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt mit den folgenden Modifikationen.<sup>198</sup> HEK-293 Zellen, die den humanen H<sub>3</sub>R stabil exprimieren wurden mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) geerntet und gewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert (3000 xg, 10 min, 4 °C) und in eisgekühlten Bindungspuffer (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl und 75 mM Tris/HCl, pH = 7.4) mit einem ULTRA-TURRAX T 25 digital (IKA, Germany) homogenisiert. Das Zellmembran-Homogenat wurde zweimal zentrifugiert (20 000 xg, 20 min, 4 °C). Nach Sonifizierung erfolgte die Lagerung der Zellmembranpräparationen bei -80°C in geeigneten Aliquots.

Vor Versuchsbeginn wurden diese konzentrierten Zellmembranpräparation aufgetaut, verdünnt und durch Sonifizieren homogenisiert. In einer Konzentration von 20 µg pro Well bei einem Endvolumen von 0.2 mL Bindungspuffer, wurden diese mit [<sup>3</sup>H]-N-α-Methylhistamin (2 nM, 78.3 Ci/mmol) (Perkin Elmer, MA, USA) inkubiert und unterschiedliche Mengen der zu untersuchenden Verbindungen hinzugefügt. Die Studien wurden mit mindestens sieben unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Verbindung durchgeführt. Die Proben wurden unter dauerhaftem Schütteln bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Pitolisant (10 µM) wurden genutzt, um die unspezifische Bindung zu quantifizieren. Die Radioaktivität wurde mittels flüssiger Szintillationszählung ermittelt. Zur Datenanalyse wurde GraphPad PRISM 6 benutzt und der nichtlineare Regressionsfit „one-site competition“ implementiert. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden mittels der Cheng-Prusoff-Gleichung errechnet. Die statistische Auswertung wurde auf Basis der -log K<sub>i</sub>-Werte durchgeführt. Mittelwerte und Konfidenzintervalle (95%) wurden in mikro- oder nanomolare Konzentrationen umgerechnet. Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte in mindestens drei unabhängigen Experimenten, jedes mit zwei bis drei Replikaten pro Konzentration.

### 6.5.2: Radioliganden-Verdrängungsstudien an humanen H<sub>4</sub>R

Zellmembranen mit humanen H<sub>4</sub>R (hH<sub>4</sub>R) wurden aus Sf-9-Zellen gewonnen, die zuvor mit hH<sub>4</sub>R-tragenden Baculoviren infiziert wurden. Die Verdrängungsstudien erfolgten wie bereits zuvor publiziert mit wenigen Modifikationen.<sup>197</sup> Die Aufreinigung und Messung erfolgte in einem geeigneten Bindungspuffer (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 75 mM Tris/HCl, pH = 7.4).

Vor dem Starten der Experimente wurden die Zellmembranen aufgetaut, zur Homogenisierung bei 4 °C mit einem Handplotter bearbeitet und unter Eiskühlung aufbewahrt. Die Membranpräparationen (40 µg/Well, 0.2 mL Endvolumen) wurden mit [<sup>3</sup>H]-Histamin (10 nM; 10.6 Ci/mmol) (Perkin Elmer, MA, USA) und dem Testliganden in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in der Gegenwart des Referenzliganden JNJ-7777120 (100 µM) bestimmt.<sup>263</sup> Die Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte und die statistische Auswertung erfolgte analog zu der für H<sub>3</sub>R.

## 7: Literatur

1. Arrowsmith CH, Audia JE, Austin C, et al. The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol.* 2015;11(8):536-541.
2. Ramsay RR. Monoamine Oxidases: The Biochemistry of the Proteins as Targets in Medicinal Chemistry and Drug Discovery. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(20):2189-2209.
3. Tong J, Meyer JH, Furukawa Y, et al. Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: Implications for brain imaging studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(6):863-871.
4. Ramsay RR, Albrecht A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *J Neural Transm.* 2018;125(11):1659-1683.
5. Bortolato M, Chen K, Shih JC. Monoamine Oxidase Inactivation: From Pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:1527-1533.
6. Hilton S, Jaber B, Ruch R. Moclobemide safety: monitoring a newly developed product in the 1990s. *J Clin Psychopharmacol.* 1995;15(4):76S-83S.
7. Borštinar R, Repič M, Kržan M, Mavri J, Vianello R. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B by the antiparkinsonian medicines rasagiline and selegiline: A computational study. *Eur J Org Chem.* 2011;(32):6419-6433.
8. Bette S, Shpiner DS, Singer C, Moore H. Safinamide in the management of patients with Parkinson's disease not stabilized on levodopa: A review of the current clinical evidence. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:1737-1745.
9. Schneider EH, Neumann D, Seifert R. Histamine H4-receptor expression in the brain? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015;388(1):5-9.
10. Schneider EH, Seifert R. The histamine H4-receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature. *Neuropharmacology.* 2016;106:116-128.
11. Hartwig C, Munder A, Glage S, et al. The histamine H4-receptor (H4R) regulates eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced experimental allergic asthma in mice.

*Eur J Immunol.* 2015;45(4):1129-1140.

12. Wunschel EJ, Schirmer B, Seifert R, Neumann D. Lack of Histamine H<sub>4</sub> -Receptor Expression Aggravates TNBS-Induced Acute Colitis Symptoms in Mice. *Front Pharmacol.* 2017;8:1-9.
13. O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1153-1162.
14. Mommert S, Ratz L, Stark H, Gutzmer R, Werfel T. The histamine H<sub>4</sub> receptor modulates the differentiation process of human monocyte-derived M1 macrophages and the release of CCL4/MIP-1 $\beta$  from fully differentiated M1 macrophages. *Inflamm Res.* 2018;67(6):503-513.
15. Lim HD, Van Rijn RM, Ling P, Bakker RA, Thurmond RL, Leurs R. Evaluation of histamine H<sub>1</sub>-, H<sub>2</sub>-, and H<sub>3</sub>-receptor ligands at the human histamine H<sub>4</sub> receptor: Identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H<sub>4</sub> receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(3):1310-1321.
16. Walter M, Stark H. Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. *Front Biosci S4.* 2012;(4):461-488.
17. Sanna MD, Ghelardini C, Thurmond RL, Masini E, Galeotti N. Behavioural phenotype of histamine H<sub>4</sub> receptor knockout mice: Focus on central neuronal functions. *Neuropharmacology.* 2017;114:48-57.
18. Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, et al. Localization of histamine H<sub>4</sub> receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res.* 2009;1250(847):41-48.
19. Igel P, Schnell D, Bernhardt G, Seifert R, Buschauer A. Tritium-labeled N<sup>1</sup>-[3-(1 H-imidazol-4-yl)propyl]-N<sup>2</sup>- propionylguanidine ([<sup>3</sup>H]UR-PI294), a high-affinity histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptor radioligand. *ChemMedChem.* 2009;4(2):225-231.
20. Panula P, Chazot PL, Cowart M, et al. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2015;67(3):601-655.
21. Zhu Y, Michalovich D, Wu HL, et al. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol.* 2001;59(3):434-

- 441.
22. Morse KL, Behan J, Laz TM, et al. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296(3):1058-1066.
  23. Liu C, Ma XJ, Jiang X, et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4 ) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol*. 2001;59(3):420-426.
  24. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, et al. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol*. 2001;59(3):427-433.
  25. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto SI. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(47):36781-36786.
  26. Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular Cloning and Characterization of a New Human Histamine Receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(2):615-620.
  27. Cogé F, Guénin SP, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP. Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(2):301-309.
  28. Murakami H, Sun-Wada GH, Matsumoto M, Nishi T, Wada Y, Futai M. Human histamine H2 receptor gene: Multiple transcription initiation and tissue-specific expression. *FEBS Lett*. 1999;451(3):327-331.
  29. De Backer MD, Loonen I, Verhasselt P, Neefs JM, Luyten WHML. Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem J*. 1998;335(3):663-670.
  30. van Rijn RM, van Marle A, Chazot PL, et al. Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor. *Biochem J*. 2008;414(1):121-131.
  31. Gallagher MJ, Yates SL. Histamine Receptor H4 Polynucleotides. WO 03/020907 A2. 13.03. 2003.
  32. Shin N, Coates E, Murgolo NJ, et al. Molecular modeling and site-specific mutagenesis

- of the histamine-binding site of the histamine H4 receptor. *Mol Pharmacol*. 2002;62(1):38-47.
33. Uveges AJ, Kowal D, Zhang Y, et al. The role of transmembrane helix 5 in agonist binding to the human H3 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(2):451-458.
  34. Jongejan A, Lim HD, Smits RA, De Esch IJP, Haaksma E, Leurs R. Delineation of agonist binding to the human histamine H4 receptor using mutational analysis, homology modeling, and ab initio calculations. *J Chem Inf Model*. 2008;48(7):1455-1463.
  35. Jongejan A, Bruysters M, Ballesteros JA, et al. Linking agonist binding to histamine H1 receptor activation. *Nat Chem Biol*. 2005;1(2):98-103.
  36. Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, de Esch IJP. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br J Pharmacol*. 2009;157(1):14-23.
  37. Wifling D, Löffel K, Nordemann U, et al. Molecular determinants for the high constitutive activity of the human histamine H4 receptor: functional studies on orthologues and mutants. *Br J Pharmacol*. 2015;172(3):785-798.
  38. Schneider EH, Schnell D, Papa D, Seifert R. High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H4-Receptor. *Biochemistry*. 2009;48(6):1424-1438.
  39. Schneider EH, Schnell D, Strasser A, Dove S, Seifert R. Impact of the DRY motif and the missing "ionic lock" on constitutive activity and G-protein coupling of the human histamine H 4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(2):382-392.
  40. Schnell D, Brunskole I, Ladova K, et al. Expression and functional properties of canine, rat, and murine histamine H4 receptors in Sf9 insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011;383(5):457-470.
  41. Wifling D, Pflieger C, Kaindl J, et al. Basal Histamine H4 Receptor Activation: Agonist Mimicry by the Diphenylalanine Motif. *Chem - A Eur J*. 2019;25(64):14613-14624.
  42. Werner T, Sander K, Tanrikulu Y, et al. In Silico Characterization of Ligand Binding Modes in the Human Histamine H4 Receptor and their Impact on Receptor Activation. *ChemBioChem*. 2010;11(13):1850-1855.

43. Oda T, Matsumoto SI, Matsumoto M, et al. Molecular cloning of monkey histamine H4 receptor. *J Pharmacol Sci.* 2005;98(3):319-322.
44. Oda T, Matsumoto SI, Masuho Y, et al. cDNA cloning and characterization of porcine histamine H4 receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1575:135-138.
45. Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299(1):121-130.
46. Jiang W, Lim HD, Zhang M, et al. Cloning and pharmacological characterization of the dog histamine H4 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2008;592(1-3):26-32.
47. Lim HD, Jongejan A, Bakker RA, Haaksma E, De Esch IJP, Leurs R. Phenylalanine 169 in the second extracellular loop of the human histamine H4 receptor is responsible for the difference in agonist binding between human and mouse H4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(1):88-96.
48. Liu C, Ma X, Jiang X, et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 2001;59(3):420-426.
49. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL. Histamine H4 Receptor Mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(3):1212-1221.
50. Ebenezer AJ, Arunachalam P, Elden BT. H4R activation utilizes distinct signaling pathways for the production of RANTES and IL-13 in human mast cells. *J Recept Signal Transduct.* 2016;37(2):133-140.
51. Ahmad SF, Ansari MA, Zoheir KMA, et al. Regulation of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation through the JAK/STAT signaling pathway downstream of histamine 4 receptor in a rat model of LPS-induced joint inflammation. *Immunobiology.* 2015;220(7):889-898.
52. Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H4 receptor. *Br J Pharmacol.* 2003;140(6):1117-1127.
53. Ling P, Ngo K, Nguyen S, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol.*

- 2004;142(1):161-171.
54. Gutzmer R, Diestel C, Mommert S, et al. Histamine H4 Receptor Stimulation Suppresses IL-12p70 Production and Mediates Chemotaxis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*. 2005;174(9):5224-5232.
  55. Barnard R, Barnard A, Salmon G, Liu W, Sreckovic S. Histamine-induced actin polymerization in human eosinophils: An imaging approach for histamine H4 receptor. *Cytom Part A*. 2008;73(4):299-304.
  56. Rosethorne EM, Charlton SJ. Agonist-biased signaling at the histamine H4 receptor: JNJ7777120 recruits  $\beta$ -arrestin without activating G proteins. *Mol Pharmacol*. 2011;79(4):749-757.
  57. Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: The search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(1):41-53.
  58. Bäumer W, Roßbach K. Histamin als Immunmodulator. *JDDG*. 2010;8(7):495-504.
  59. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, et al. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol*. 2001;59(3):427-433.
  60. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Type of Histamine Receptor Preferentially Expressed in Leukocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(47):36781-36786.
  61. Figueroa K, Shankley N, Bongers G, et al. *Histamine in Inflammation*. (Thurmond RL, ed.). Austin, Texas: Springer Landes Bioscience; 2010.
  62. Thakurdas SM, Melicoff E, Sansores-Garcia L, et al. The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *J Biol Chem*. 2007;282(29):20809-20815.
  63. Falcone FH, Knol EF, Gibbs BF. The role of basophils in the pathogenesis of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(7):939-947.
  64. Kalesnikoff J, Galli SJ. new developments in mast cell biology. *Nat Immunol*.

- 2008;9(11):1215-1223.
65. Piliponsky AM, Chen CC, Grimbaldston MA, et al. Mast cell-derived TNF can exacerbate mortality during severe bacterial infections in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice. *Am J Pathol.* 2010;176(2):926-938.
  66. Kay LJ, Suvarna SK, Peachell PT. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis of human lung mast cells. *Eur J Pharmacol.* 2018;837:38-44.
  67. Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006;147(SUPPL. 1):127-135.
  68. Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M, Zwingmann K, Stark H, Werfel T. The histamine H4 receptor is functionally expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):619-625.
  69. Schreeb A, Łażewska D, Dove S, Buschauer A. Histamine H 4 Receptor Ligands. In: Stark H, ed. *Histamine H4 Receptor: A Novel Drug Target For Immunoregulation and Inflammation.* De Gruyter Open; 2013:21-62.
  70. Kottke T, Sander K, Weizel L, Schneider EH, Seifert R, Stark H. Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H3/H4 receptor ligands. *Eur J Pharmacol.* 2011;654(3):200-208.
  71. Jablonowski JA, Grice CA, Chai W, et al. The First Potent and Selective Non-Imidazole Human Histamine H4 Receptor Antagonists. *J Med Chem.* 2003;46(19):3957-3960.
  72. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, et al. A Potent and Selective Histamine H4 Receptor Antagonist with Anti-Inflammatory Properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(1):404-413.
  73. Thurmond RL. The histamine H4 receptor: From orphan to the clinic. *Front Pharmacol.* 2015;6:1-11.
  74. McKellar QA, Scott EW. The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *J Vet Pharmacol Ther.* 1990;13(3):223-247.
  75. Boiani M, Gonzalez M. Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic

- Agents. *Mini-Reviews Med Chem*. 2005;5(4):409-424.
76. Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. ChemInform Abstract: Benzimidazole: A Medicinally Important Heterocyclic Moiety. *Med Chem Res*. 2012;21:269-283.
77. Lane CAL, Hay D, Mowbray CE, et al. Synthesis of novel histamine H4 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(2):1156-1159.
78. Mowbray CE, Bell AS, Clarke NP, et al. Challenges of drug discovery in novel target space. The discovery and evaluation of PF-3893787: A novel histamine H4 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(21):6596-6602.
79. Terzioglu N, van Rijn RM, Bakker RA, De Esch IJP, Leurs R. Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H4 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:5251-5256.
80. Lee-Dutra A, Arienti KL, Buzard DJ, et al. Identification of 2-arylbenzimidazoles as potent human histamine H4 receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(23):6043-6048.
81. Edwards JP, Kindrachuk DE, Mapes CM, Pippel DJ, Venable JD. Benzoimidazol-2-yl Pyrimidines and Pyrazines as Modulators of the Histamine H4 Receptor. US2007244126A1. 30.03. 2007.
82. Kollmeier AP, Barnathan ES, O'Brien C, et al. A phase 2a study of toreforant, a histamine H4 receptor antagonist, in eosinophilic asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2018;121(5):568-574.
83. Gaul MD, Zhao B-P, Zhu X. Substituted Nitrogen-containing Heteroaryl Derivatives Useful As Modulators Of The Histamine H4 Receptor. US20090069305A1. 11.09. 2008.
84. Cai H, Chavez F, Dunford PJ, et al. Diamino-Pyridine, Pyrimidine, and Pyridazine Modulators of the H4 Receptor. WO2009152325A1. 17.06. 2009.
85. Sander K, Kottke T, Tanrikulu Y, et al. 2,4-Diaminopyrimidines as histamine H4 receptor ligands-Scaffold optimization and pharmacological characterization. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(20):7186-7196.
86. Savall BM, Chavez F, Tays K, et al. Discovery and SAR of 6-Alkyl-2,4-diaminopyrimidines

- as Histamine H4 Receptor Antagonists. *J Med Chem.* 2014;57(6):2429-2439.
87. Savall BM, Meduna SP, Tays K, et al. Diaminopyrimidines, diaminopyridines and diaminopyridazines as histamine H4 receptor modulators. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(4):956-959.
88. Altenbach RJ, Adair RM, Bettencourt BM, et al. Structure-activity studies on a series of a 2-aminopyrimidine-containing histamine H4 receptor ligands. *J Med Chem.* 2008;51(20):6571-6580.
89. Cai H, Chavez F, Edwards JP, et al. 2-Aminopyrimidine Modulators Of The Histamine H4 Receptor. US20080194577A1. 14.02. 2008.
90. Cowart MD, Altenbach RJ, Liu H, et al. Rotationally constrained 2,4-diamino-5,6-disubstituted pyrimidines: a new class of histamine H4 receptor antagonists with improved druglikeness and in vivo efficacy in pain and inflammation models. *J Med Chem.* 2008;51(20):6547-6557.
91. Zhuo J, Maduskuie TP, Qian D, Yao W. Substituted Heterocyclic Compounds. US2010240671A1. 08.07. 2010.
92. Smits RA, Lim HD, Hanzer A, et al. Fragment based design of new H4 receptor-ligands with anti-inflammatory properties in vivo. *J Med Chem.* 2008;51(8):2457-2467.
93. Smits RA, De Esch IJP, Zuiderveld OP, et al. Discovery of quinazolines as histamine H4 receptor inverse agonists using a scaffold hopping approach. *J Med Chem.* 2008;51(24):7855-7865.
94. Smits RA, Adami M, Istyastono EP, et al. Synthesis and QSAR of Quinazoline Sulfonamides As Highly Potent Human Histamine H4 Receptor Inverse Agonists. *J Med Chem.* 2010;53(6):2390-2400.
95. Smits RA, Lim HD, Stegink B, Bakker RA, De Esch IJP, Leurs R. Characterization of the histamine H4 receptor binding site. Part 1. Synthesis and pharmacological evaluation of dibenzodiazepine derivatives. *J Med Chem.* 2006;49(15):4512-4516.
96. Bartole E, Littmann T, Tanaka M, Ozawa T, Buschauer A, Bernhardt G. [3H]UR-DEBa176: A 2,4-Diaminopyrimidine-Type Radioligand Enabling Binding Studies at the Human,

- Mouse, and Rat Histamine H4 Receptors. *J Med Chem*. 2019;62(17):8338-8356.
97. Mirzahosseini A, Kovács M, Kánai K, Csutora P, Dalmadi B. BODIPY® FL histamine as a new modality for quantitative detection of histamine receptor upregulation upon IgE sensitization in murine bone marrow-derived mast cells. *Cytom Part A*. 2015;87(1):23-31.
  98. Mocking TAM, Verweij EWE, Vischer HF, Leurs R. Homogeneous, real-time NanoBRET binding assays for the histamine H3 and H4 receptors on living cells. *Mol Pharmacol*. 2018;94(6):1371-1381.
  99. Thurmond RL, Chen B, Dunford PJ, et al. Clinical and Preclinical Characterization of the Histamine H4 Receptor Antagonist JNJ-39758979. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(2):176-184.
  100. Werfel T, Layton G, Yeadon M, et al. Efficacy and safety of the histamine H4 receptor antagonist ZPL-3893787 in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(5):1830-1837.e4.
  101. Petremann M, Gueguen C, Delgado Betancourt V, Wersinger E, Dyhrfjeld-Johnsen J. Effect of the novel histamine H4 receptor antagonist SENS-111 on spontaneous nystagmus in a rat model of acute unilateral vestibular loss. *Br J Pharmacol*. 2019:1-11.
  102. Carceller Gonzales E, Medina Fuentes EM, Soliva Soliva R, Virgili Bernado M, Marti Via J. 4-Amino-Pyrimidine Derivatives. WO2009080721A2. 18.12. 2008.
  103. Godot V, Arock M, Garcia G, et al. H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):827-834.
  104. Jemima EA, Prema A, Thangam EB. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. *Mol Immunol*. 2014;62(1):19-28.
  105. Dijkstra D, Stark H, Chazot PL, et al. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. *J Invest Dermatol*. 2008;128(7):1696-1703.
  106. Gschwandtner M, Rossbach K, Dijkstra D, et al. Murine and human Langerhans cells express a functional histamine H4 receptor: modulation of cell migration and function. *Allergy*. 2010;65(7):840-849.

107. Wang M, Han J, Domenico J, Shin YS, Jia Y, Gelfand EW. Combined Blockade of the Histamine H1 and H4 Receptor Suppresses Peanut-Induced Intestinal Anaphylaxis by Regulating Dendritic Cell Function. *Allergy*. 2016;71(11):1561-1574.
108. Cai W-K, Zhang J-B, Chen J-H, et al. The HRH4 rs11662595 mutation is associated with histamine H4 receptor dysfunction and with increased epithelial-to-mesenchymal transition progress in non-small cell lung cancer. *BBA - Mol Basis Dis*. 2017;1863(11):2954-2963.
109. Yamamoto K, Okui R, Yamatodani A. Activation of orexinergic and histaminergic pathway involved in therapeutic effect of histamine H4 receptor antagonist against cisplatin-induced anorexia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019;392(8):925-936.
110. Sterle HA, Nicoud MB, Massari NA, et al. Immunomodulatory role of histamine H4 receptor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2019;120(1):128-138.
111. Nicoud MB, Formoso K, Medina VA. Pathophysiological Role of Histamine H4 Receptor in Cancer: Therapeutic Implications. *Front Pharmacol*. 2019;10:1-15.
112. He GH, Ding JQ, Zhang X, et al. Activation of histamine H4 receptor suppresses the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via both metabolism and non-metabolism signaling pathways. *J Mol Med*. 2018;96(9):951-964.
113. Abiuso AMB, Varela ML, Haro Durand L, et al. Histamine H4 receptor as a novel therapeutic target for the treatment of Leydig-cell tumours in prepubertal boys. *Eur J Cancer*. 2018;91:125-135.
114. Salem A, Almahmoudi R, Listyarifah D, et al. Histamine H4 receptor signalling in tongue cancer and its potential role in oral carcinogenesis - a short report. *Cell Oncol*. 2017;40(6):621-630.
115. Massari NA, Medina VA, Cricco GP, et al. Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. *J Dermatol Sci*. 2013;72(3):252-262.
116. Fernandes CEM, Serafim KR, Gianlorenço ACL, Mattioli R. Systemic injection of an H4

- receptor agonist induces a decrease in CREB and pCREB levels in the cerebellar vermis and prefrontal cortex in mice. *Brazilian J Med Biol Res.* 2019;52(5):1-5.
117. Dettori I, Gaviano L, Melani A, et al. A selective histamine H4 receptor antagonist, JNJ7777120, is protective in a rat model of transient cerebral ischemia. *Front Pharmacol.* 2018;9:1-11.
  118. Petri D, Schlicker E. A search for presynaptic inhibitory histamine receptors in Guinea-pig tissues: Further H3 receptors but no evidence for H4 receptors. *Neuropharmacology.* 2016;106:129-134.
  119. Karlstedt K, Jin C, Panula P. Expression of histamine receptor genes Hrh3 and Hrh4 in rat brain endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2013;170(1):58-66.
  120. Galeotti N, Sanna MD, Ghelardini C. Pleiotropic effect of histamine H4 receptor modulation in the central nervous system. *Neuropharmacology.* 2013;71:141-147.
  121. Feliszek M, Speckmann V, Schacht D, von Lehe M, Stark H, Schlicker E. A search for functional histamine H4 receptors in the human, guinea pig and mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015;388(1):11-17.
  122. Shan Y, Gao Y, Zhang L, Ma L, Shi Y, Liu X. H4 Receptor Inhibits Lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B Activation by Interacting with Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. *Neuroscience.* 2019;398:113-125.
  123. Sanna MD, Lucarini L, Durante M, Ghelardini C, Masini E, Galeotti N. Histamine H4receptor agonist-induced relief from painful peripheral neuropathy is mediated by inhibition of spinal neuroinflammation and oxidative stress. *Br J Pharmacol.* 2017;174(1):28-40.
  124. Sanna MD, Mello T, Masini E, Galeotti N. Activation of ERK/CREB pathway in noradrenergic neurons contributes to hypernociceptive phenotype in H4 receptor knockout mice after nerve injury. *Neuropharmacology.* 2018;128:340-350.
  125. Popiolek-Barczyk K, Łażewska D, Latacz G, et al. Antinociceptive effects of novel histamine H3 and H4 receptor antagonists and their influence on morphine analgesia of neuropathic pain in the mouse. *Br J Pharmacol.* 2018;175(14):2897-2910.

126. Sanna MD, Stark H, Lucarini L, Ghelardini C, Masini E, Galeotti N. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK, and P38 MAPK phosphorylation. *Pain*. 2015;156(12):2492-2504.
127. Desmadryl G, Gaboyard-Niay S, Brugeaud A, et al. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br J Pharmacol*. 2012;167(4):905-916.
128. Hagenow J, Stark H. Histamine H4 Receptor antagonists: A new approach for tinnitus treatment? *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2015;10(1):6-9.
129. Kaneko H, Ye F, Ijima R, et al. Histamine H4 receptor as a new therapeutic target for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Br J Pharmacol*. 2014;171(15):3754-3763.
130. The Nobel Prize in Chemistry. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/press-release/>. Zugriff: 05.08.2019.
131. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch Mikr Anat*. 1873;9(1):413–468.
132. Moerner WE, Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*. 1997;388(6640):355-358.
133. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. 2006;313(5793):1642-1645.
134. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egnér A, Hell SW. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(15):8206-8210.
135. Jabłoński A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Phys*. 1935;94(1-2):38-46.
136. Stokes GG. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc Lond*. 1852:463-562.
137. Condon E. A theory of intensity distribution in band systems. *Phys Rev*.

- 1926;28(6):1182-1201.
138. Condon EU. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys Rev.* 1928;32(6):858-872.
  139. Franck J. Elementary processes of photochemical reactions. *Trans Faraday Soc.* 1926;21:536-542.
  140. Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging.* Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2011.
  141. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3rd ed. New York: Springer Science+Business Media; 2006.
  142. Cox G. *Optical Imaging Techniques in Cell Biology.* 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRS Press Taylor & Francis Group; 2012.
  143. Kendall JM, Badminton MN. Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol.* 1998;16(5):216-224.
  144. Kremers G-J, Gilbert SG, Cranfill PJ, Davidson MW, Piston DW. Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(15):2676-2676.
  145. Los G, Encell LP, Mcdougall MG, et al. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem Biol.* 2008;3(6):373-382.
  146. Vernall AJ, Hill SJ, Kellam B. The evolving small-molecule fluorescent-conjugate toolbox for Class A GPCRs. *Br J Pharmacol.* 2014;171(5):1073-1084.
  147. Lavis LD, Raines RT. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chem Biol.* 2014;9(4):855-866.
  148. Sun WC, Gee KR, Haugland RP. Synthesis of novel fluorinated coumarins: Excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8(22):3107-3110.
  149. Riveiro M, De Kimpe N, Moglioni A, et al. Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. *Curr Med Chem.* 2010;17(13):1325-1338.
  150. Von Pechmann H, Duisberg C. Ueber die Verbindungen der Phenole mit Acetessigäther.

- Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft*. 1883;16(2):2119-2128.
151. Marmor MF, Ravin JG. Fluorescein angiography: Insight and serendipity a half century ago. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(7):943-948.
  152. *Apollo 4 Press Kitt*. Washington DC: National Aeronautics and Space Administration; 1967.
  153. Coons A, Kaplan M. Localization of antigen in tissue cells. *J Exp Med*. 1950;91:1-13.
  154. Lavis LD, Rutkoski TJ, Raines RT. Tuning the pKa of fluorescein to optimize binding assays. *Anal Chem*. 2007;79(17):6775-6782.
  155. Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjug Chem*. 1993;4(2):105-111.
  156. Waggoner A. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2006;10(1):62-66.
  157. Waggoner AS. Dye Indicators of Membrane Potential. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 2003;8(1):47-68.
  158. Rye HS, Yue S, Wemmer DE, et al. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: Properties and applications. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(11):2803-2812.
  159. Panigrahi M, Dash S, Patel S, Mishra BK. Syntheses of cyanines: A review. *Tetrahedron*. 2012;68(3):781-805.
  160. Ulrich G, Ziesel R, Harriman A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew Chemie - Int Ed*. 2008;47(7):1184-1201.
  161. Loudet A, Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem Rev*. 2007;107(11):4891-4932.
  162. Loudet A, Bandichhor R, Burgess K, et al. B, O-chelated azadipyromethenes as near-IR probes. *Org Lett*. 2008;10(21):4771-4774.
  163. Carlson JCT, Meimetis LG, Hilderbrand SA, Weissleder R. BODIPY-tetrazine derivatives

- as superbright bioorthogonal turn-on probes. *Angew Chemie - Int Ed.* 2013;52(27):6917-6920.
164. Tomasch M, Schwed JS, Paulke A, Stark H. Bodilisant - A Novel Fluorescent, Highly Affine Histamine H3 Receptor Ligand. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(2):269-273.
  165. Mitronova GY, Lukinavičius G, Butkevich AN, et al. High-Affinity Functional Fluorescent Ligands for Human  $\beta$ -Adrenoceptors. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-15.
  166. Stoddart LA, Vernall AJ, Bouzo-Lorenzo M, et al. Development of novel fluorescent histamine H1 -receptor antagonists to study ligand-binding kinetics in living cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-19.
  167. Ma RZ, Yao QC, Yang X, Xia M. Synthesis, characterization and photoluminescence properties of strong fluorescent BF<sub>2</sub> complexes bearing (2-quinolin-2-yl)phenol ligands. *J Fluor Chem.* 2012;137:93-98.
  168. Kubota Y, Hara H, Tanaka S, Funabiki K, Matsui M. Synthesis and fluorescence properties of novel pyrazine-boron complexes bearing a  $\beta$ -iminoketone ligand. *Org Lett.* 2011;13(24):6544-6547.
  169. Yu C, Huang Z, Wang X, et al. A Family of Highly Fluorescent and Unsymmetric Bis(BF<sub>2</sub>) Chromophore Containing Both Pyrrole and N-Heteroarene Derivatives: BOPPY. *Org Lett.* 2018;20(15):4462-4466.
  170. Amon M, Ligneau X, Camelin JC, Berrebi-Bertrand I, Schwartz JC, Stark H. Highly potent fluorescence-tagged nonimidazole histamine H3 receptor ligands. *ChemMedChem.* 2007;2(5):708-716.
  171. Bodo G, Muirhead H, Bohlmann F, Harkin J, Gröger D. *Naturstoffe.* 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 1966.
  172. Lakowicz JR, Gryczynski I, Laczko G, Wiczek W, Johnson ML. Distribution of distances between the tryptophan and the N-terminal residue of melittin in its complex with calmodulin, troponin C, and phospholipids. *Protein Sci.* 1994;3(4):628-637.
  173. Levoye A, Zwier JM, Jaracz-Ros A, et al. A broad G protein-coupled receptor internalization assay that combines SNAP-tag labeling, diffusion-enhanced resonance

- energy transfer, and a highly emissive terbium cryptate. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:1-11.
174. Takahira I, Fuchida H, Tabata S, et al. Design of a binuclear Ni(II)-iminodiacetic acid (IDA) complex for selective recognition and covalent labeling of His-tag fused proteins. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(13):2855-2858.
  175. Lai Y-T, Chang Y-Y, Hu L, et al. Rapid labeling of intracellular His-tagged proteins in living cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(10):2948-2953.
  176. Ma Z, Du L, Li M. Toward fluorescent probes for G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J Med Chem*. 2014;57(20):8187-8203.
  177. Mancina F, Brenner-Morton S, Siegel R, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies sensitive to conformation in the 5HT<sub>2c</sub> serotonin receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(11):4303-4308.
  178. Gupta A, Décaillot FM, Gomes I, et al. Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5116-5124.
  179. Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al. Interaction of Chemokine Receptor CCR5 with its Ligands: Multiple Domains for HIV-1 gp120 Binding and a Single Domain for Chemokine Binding. *J Exp Med*. 1997;186(8):1373-1381.
  180. Iliopoulos-Tsoutsouvas C, Kulkarni RN, Makriyannis A, Nikas SP. Fluorescent probes for G-protein-coupled receptor drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2018;13(10):933-947.
  181. Wang S, Clemmons A, Strader C, Bayne M. Evidence for hydrophobic interaction between galanin and the GalR1 galanin receptor and GalR1-mediated ligand internalization: Fluorescent probing with a fluorescein-galanin. *Biochemistry*. 1998;37(26):9528-9535.
  182. Schneider E, Mayer M, Ziemek R, et al. A simple and powerful flow cytometric method for the simultaneous determination of multiple parameters at G protein-coupled receptor subtypes. *ChemBioChem*. 2006;7(9):1400-1409.
  183. Loev B, Bender PE, Dowalo F, Macko E, Fowler PJ. Cannabinoids. Structure-Activity

- Studies Related to 1,2-Dimethylheptyl Derivatives. *J Med Chem.* 1973;16(11):1200-1206.
184. Makriyannis A, Lu D. Keto Cannabinoids with therapeutic indications. US2005/0074408 A1. 25.08. 2003.
185. Thireau J, Marteaux J, Delagrangre P, et al. Original design of fluorescent ligands by fusing BODIPY and melatonin neurohormone. *ACS Med Chem Lett.* 2014;5(2):158-161.
186. Tomasch M, Schwed JS, Kuczka K, et al. Fluorescent Human EP3 Receptor Antagonists. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(9):774-779.
187. Berque-Bestel I, Soulier JL, Giner M, Rivail L, Langlois M, Sicsic S. Synthesis and characterization of the first fluorescent antagonists for human 5-HT4 receptors. *J Med Chem.* 2003;46(13):2606-2620.
188. Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, et al. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(6):2693-2698.
189. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta$  9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199-215.
190. Davis AS, Richter A, Becker S, et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(6):405-423.
191. Srinivasan V, Brzezinski A, Oter S, Shillcutt SD. *Melatonin and Melatonergic Drugs in Clinical Practice.* 1st ed. New Dehli: Springer india; 2013.
192. Mikó T, Ligneau X, Pertz HH, et al. Structural variations of 1-(4-(phenoxyethyl)benzyl)piperidines as nonimidazole histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(10):2727-2736.
193. Galvan M, Boer R, Schudt C. Interaction of telenzepine with muscarinic receptors in mammalian sympathetic ganglia. *Eur J Pharmacol.* 1989;167(1):1-10.

194. Frizler M, Yampolsky I, Baranov MS, Stirnberg M, Gütschow M. Chemical introduction of the green fluorescence: Imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore. *Org Biomol Chem*. 2013;11(35):5913-5921.
195. Kubota Y, Tsuzuki T, Funabiki K, Ebihara M, Matsui M. Synthesis and fluorescence properties of a pyridomethene-BF<sub>2</sub> complex. *Org Lett*. 2010;12(18):4010-4013.
196. Ahmed S, Abdallah NA. Dansyl azide as a selective fluorescence tagging probe for click chemistry reactions and its application to monitor rasagiline in pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;165:357-365.
197. Bautista-Aguilera ÓM, Hagenow S, Palomino-Antolin A, et al. Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H<sub>3</sub>R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. *Angew Chemie - Int Ed*. 2017;56(41):12765-12769.
198. Affini A, Hagenow S, Zivkovic A, Marco-Contelles J, Stark H. Novel indanone derivatives as MAO B/H<sub>3</sub>R dual-targeting ligands for treatment of Parkinson's disease. *Eur J Med Chem*. 2018;148:487-497.
199. Sander K, Kottke T, Tanrikulu Y, et al. 2,4-Diaminopyrimidines as histamine H<sub>4</sub> receptor ligands-Scaffold optimization and pharmacological characterization. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(20):7186-7196.
200. Sadek B, Schreeb A, Schwed JS, Weizel L, Stark H. Drug-likeness approach of 2-aminopyrimidines as histamine H<sub>3</sub> receptor ligands. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1499-1513.
201. Nijmeijer S, Vischer HF, Sirici F, et al. Detailed analysis of biased histamine H<sub>4</sub> receptor signalling by JNJ 7777120 analogues. *Br J Pharmacol*. 2013;170(1):78-88.
202. Schultes S, Nijmeijer S, Engelhardt H, et al. Mapping histamine H<sub>4</sub> receptor-ligand binding modes. *MedChemComm*. 2013;4(1):193-204.
203. Istyastono EP, Nijmeijer S, Lim HD, et al. Molecular determinants of ligand binding modes in the histamine H<sub>4</sub> receptor: Linking ligand-based three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) models to in silico guided

- receptor mutagenesis studies. *J Med Chem.* 2011;54(23):8136-8147.
204. Lim HD, De Graaf C, Jiang W, et al. Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants. *Mol Pharmacol.* 2010;77(5):734-743.
205. Schultes S, Engelhardt H, Roumen L, et al. Combining Quantum Mechanical Ligand Conformation Analysis and Protein Modeling to Elucidate GPCR-Ligand Binding Modes. *ChemMedChem.* 2013;8(1):49-53.
206. Lutsenko K, Hagenow S, Affini A, Reiner D, Stark H. Rasagiline derivatives combined with histamine H3 receptor properties. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(19):126612.
207. Khanfar MA, Affini A, Lutsenko K, Nikolic K, Butini S, Stark H. Multiple targeting approaches on histamine H3 receptor antagonists. *Front Neurosci.* 2016;10:1-17.
208. Tomasch M, Schwed JS, Weizel L, Stark H. Novel chalcone-based fluorescent human histamine H3 receptor ligands as pharmacological tools. *Front Syst Neurosci.* 2012;6:14.
209. Lipani L, Odadzic D, Weizel L, Schwed JS, Sadek B, Stark H. Studies on molecular properties prediction and histamine H3 receptor affinities of novel ligands with uracil-based motifs. *Eur J Med Chem.* 2014;86:578-588.
210. Karton Y, Bradbury BJ, Jacobson KA, Baumgold J, Paek R. Functionalized Congener Approach to Muscarinic Antagonists: Analogues of Pirenzepine. *J Med Chem.* 1991;34(7):2133-2145.
211. Tahtaoui C, Parrot I, Klotz P, et al. Fluorescent pirenzepine derivatives as potential bitopic ligands of the human M1 muscarinic receptor. *J Med Chem.* 2004;47(17):4300-4315.
212. Zhuo J, Maduskuie TP, Qian D, Yao W. Substituted Heterocyclic Compounds. US2013296327A1. 08.07. 2013.
213. Reiner D, Stark H. Ligand binding kinetics at histamine H3 receptors by fluorescence-polarization with real-time monitoring. *Eur J Pharmacol.* 2019;848(2019):112-120.
214. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med.*

- 2018;7(1):3.
215. Kumar B, Sheetal, Mantha AK, Kumar V. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of phenyl-/benzhydrylpiperazine derivatives as potential MAO inhibitors. *Bioorg Chem.* 2018;77:252-262.
  216. Van Dyk AS, Petzer JP, Petzer A, Legoabe LJ. 3-Coumaranone Derivatives As Inhibitors of Monoamine Oxidase. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5479-5489.
  217. Reis J, Cagide F, Chavarria D, et al. Discovery of New Chemical Entities for Old Targets: Insights on the Lead Optimization of Chromone-Based Monoamine Oxidase B (MAO-B) Inhibitors. *J Med Chem.* 2016;59(12):5879-5893.
  218. Legoabe LJ, Petzer A, Petzer JP. 2-Acetylphenol Analogs As Potent Reversible Monoamine Oxidase Inhibitors. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3635-3644.
  219. Ahmad S, Zaib S, Jalil S, et al. Synthesis, characterization, monoamine oxidase inhibition, molecular docking and dynamic simulations of novel 2,1-benzothiazine-2,2-dioxide derivatives. *Bioorg Chem.* 2018;80:498-510.
  220. Boens N, Qin W, Basarić N, et al. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal Chem.* 2007;79(5):2137-2149.
  221. Fery-Forgues S, Lavabre D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. *J Chem Educ.* 1999;76(9):1260-1264.
  222. Khanfar MA, Reiner D, Hagenow S, Stark H. Design, synthesis, and biological evaluation of novel oxadiazole- and thiazole-based histamine H<sub>3</sub>R ligands. *Bioorg Med Chem.* 2018;26(14):4034-4046.
  223. Liu Y, Duan J, Qi F, et al. Optical properties and mechanofluorochromism of new BODIPY dyes based on the pyridine-pyrimidine hybrid structure. *Dalt Trans.* 2017;46(31):10332-10338.
  224. Smits RA, Lim HD, van der Meer T, et al. Ligand based design of novel histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists; fragment optimization and analysis of binding kinetics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(1):461-467.

225. Jiang Y, Chen X, Zheng Y, et al. Highly diastereoselective and enantioselective synthesis of  $\alpha$ -hydroxy  $\beta$ -amino acid derivatives: Lewis base catalyzed hydrosilylation of  $\alpha$ -acetoxy  $\beta$ -enamino esters. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(32):7304-7307.
226. Skulnick HI, Weed SD, Eidson EE, Renis HE, Wierenga W, Stringfellow DA. Pyrimidinones. 1. 2-Amino-5-halo-6-aryl-4(3H)-pyrimidinones. Interferon-Inducing Antiviral Agents. *J Med Chem.* 1985;28(12):1864-1869.
227. Meier G, Apelt J, Reichert U, et al. Influence of imidazole replacement in different structural classes of histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonists. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(3):249-259.
228. Isensee K, Amon M, Galaparti A, et al. Fluorinated non-imidazole histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(8):2172-2175.
229. Mitsunobu O. The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis (Stuttg).* 1981:1-28.
230. Ruf S, Buning C, Schreuder H, et al. Novel  $\beta$ -Amino Acid Derivatives as Inhibitors of Cathepsin A. *J Med Chem.* 2012;55(17):7636-7649.
231. Coelho PJ, Carvalho LM, Rodrigues S, et al. Synthesis and photochromic behaviour of novel 2H-chromenes derived from fluorenone. *Tetrahedron.* 2002;58(5):925-931.
232. Li L, Han J, Nguyen B, Burgess K. Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives. *J Org Chem.* 2008;73(5):1963-1970.
233. Hackling A, Ghosh R, Perachon S, et al. N-( $\omega$ )-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)alkyl)carboxamides as dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptor ligands. *J Med Chem.* 2003;46(18):3883-3899.
234. Baskar B, Pandian NG, Priya K, Chadha A. Deracemisation of aryl substituted  $\alpha$ -hydroxy esters using *Candida parapsilosis* ATCC 7330: Effect of substrate structure and mechanism. *Tetrahedron.* 2005;61(52):12296-12306.
235. Chopra B, Dhingra AK, Kapoor RP, Parsad DN. Microwave assisted synthesis of some 5-substituted imidazolone analogs as a new class of non purine xanthine oxidase inhibitors. *Der Pharma Chem.* 2015;7(9):145-152.

236. Maier T, Pfeleiderer W. Nucleotides. Part LXXVIII: Double labeling of nucleosides and nucleotides. *Helv Chim Acta*. 2010;93(12):2365-2392.
237. Dalton N, Gordon CP, Boyle TP, et al. The discovery of allyltyrosine based tripeptides as selective inhibitors of the HIV-1 integrase strand-transfer reaction. *Org Biomol Chem*. 2016;14(25):6010-6023.
238. Santoso KT, Cheung CY, Hards K, Cook GM, Stocker BL, Timmer MSM. Synthesis and Investigation of Phthalazinones as Antitubercular Agents. *Chem - An Asian J*. 2019;14(8):1278-1285.
239. Kumaria N, Dwivedi AK, Maikhuri JP, et al. Substituted acrylophenones and related mannich bases as possible spermicides and inhibitors of HIV envelope glycoprotein-CD4 interaction. *Eur J Med Chem*. 2002;37(11):855-864.
240. Tasler S, Müller O, Wieber T, et al. Substituted 2-arylbenzothiazoles as kinase inhibitors: Hit-to-lead optimization. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(18):6728-6737.
241. Chackal S, Houssin R, Hénichart JP. An efficient synthesis of the new benzo[c]pyrido[2,3,4-kl]acridine skeleton. *J Org Chem*. 2002;67(10):3502-3505.
242. Qian J, Cuerrier D, Davies PL, Li Z, Powers JC, Campell RL. Co-crystal structures of primed side-extending alpha-ketoamide inhibitors reveal novel calpain-inhibitor aromatic interaction. *J Med Chem*. 2008;51(17):5264-5270.
243. Hromatka O, Grass I, Sauter F. Über unsymmetrisch substituierte Piperazine. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*. 1956;87(6):701-707.
244. Huang SX, Li HY, Liu JY, Morisseau C, Hammock BD, Long YQ. Incorporation of piperazino functionality into 1,3-disubstituted urea as the tertiary pharmacophore affording potent inhibitors of soluble epoxide hydrolase with improved pharmacokinetic properties. *J Med Chem*. 2010;53(23):8376-8386.
245. Dalla V, Cotellet P, Catteau JP. Chemocontrolled reduction of aromatic  $\alpha$ -ketoesters by NaBH<sub>4</sub>: Selective synthesis of  $\alpha$ -hydroxy esters or 1,2-diols. *Tetrahedron Lett*. 1997;38(9):1577-1580.

246. Martin MW, Newcomb J, Nunes JJ, et al. Novel 2-aminopyrimidine carbamates as potent and orally active inhibitors of Lck: Synthesis, SAR, and in vivo antiinflammatory activity. *J Med Chem*. 2006;49(16):4981-4991.
247. Sengmany S, Lebre J, Le Gall E, Léonel E. Selective mono-amination of dichlorodiazines. *Tetrahedron*. 2015;71(29):4859-4867.
248. Matasi JJ, Caldwell JP, Zhang H, et al. 2-(2-Furanyl)-7-phenyl[1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine analogs: Highly potent, orally active, adenosine A2A antagonists. Part 1. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(16):3670-3674.
249. Cowart MD, Altenbach RJ, Liu H, et al. Method for Pain Treatment. US2008194538A1. 28.09. 2007.
250. Um IH, Im LR, Kang JS, Bursey SS, Dust JM. Mechanistic assessment of SNAr displacement of halides from 1-Halo-2,4-dinitrobenzenes by selected primary and secondary amines: Brønsted and Mayr analyses. *J Org Chem*. 2012;77(21):9738-9746.
251. Mamalis P, Reigate S, Outred DJ. 1,2-Dihydro-1,3,5-triazin-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Arzneipräparaten. DE1957769A1. 17.09. 1969.
252. Pirkle WH, Readnour RS. Chromatographic Approach to the Measurement of the Interstrand Distance for Some Chiral Bonded Phases. *Anal Chem*. 1991;63(1):16-20.
253. Chapman TM, Wallace C, Gillen KJ, et al. N-Hydroxyimides and hydroxypyrimidinones as inhibitors of the DNA repair complex ERCC1-XPF. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(19):4104-4108.
254. Zhang Z, Wallace MB, Feng J, et al. Design and synthesis of pyrimidinone and pyrimidinedione inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *J Med Chem*. 2011;54(2):510-524.
255. Hammer SG, Gobleder S, Naporra F, et al. 2,4-Diaminopyrimidines as dual ligands at the histamine H1 and H4 receptor—H1/H4-receptor selectivity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(2):292-300.
256. Jurberg ID. An Aminocatalyzed Stereoselective Strategy for the Formal  $\alpha$ -Propargylation of Ketones. *Chem - A Eur J*. 2017;23(41):9716-9720.

257. B-Rao C, Kulkarni-Almeida A, Katkar K V., et al. Identification of novel isocytosine derivatives as xanthine oxidase inhibitors from a set of virtual screening hits. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(9):2930-2939.
258. Cohen N, Banner BL, Blount JF, Tsai M, Saucy G. Steroid Total Synthesis. X. Optically Active Estrone Precursors and Racemic Equilenin Methyl Ether. *J Org Chem*. 1973;38(19):3229-3239.
259. Hiroki S, Fukushima K, Shimazaki M, et al. 2-Aminopyrimidine Derivatives. EP1505064A1. 2005.
260. Wang C, Liu RH, Tian MQ, Hu XH, Loh TP. Regioselective Copper-Catalyzed Oxidative Coupling of  $\alpha$ -Alkylated Styrenes with Tertiary Alkyl Radicals. *Org Lett*. 2018;20(13):4032-4035.
261. Will DW, Pritchard CE, Brown T. The synthesis of oligonucleotides that contain 2,4-dinitrophenyl reporter groups. *Carbohydr Res*. 1991;216:315-322.
262. Shin KJ, Yoo KH, Kim DJ, et al. Synthesis and biological properties of new 1 $\beta$ -methylcarbapenems. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8(13):1607-1612.
263. Frank A, Abu-Lafi S, Adawi A, Schwed JS, Stark H, Rayan A. From medicinal plant extracts to defined chemical compounds targeting the histamine H4 receptor: Curcuma longa in the treatment of inflammation. *Inflamm Res*. 2017;66(10):923-929.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation ist in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht worden. Bisher wurden von mir keine Promotionsversuche (weder erfolglos noch erfolgreich) unternommen.

Düsseldorf,

(Jens Hagenow)