

**Darstellung neuer Hydrogele zur Anwendung im
*tissue engineering***

-

Studien zur Darstellung neuer Kinaseinhibitoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Nick Dibbert
geboren am 02.02.1987 in Berlin

2017

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Plettenburg

Tag der Promotion: 09.12.2016

Zusammenfassung

Nick Dibbert

Darstellung neuer Hydrogele zur Anwendung im *tissue engineering* - Studien zur Darstellung neuer Kinaseinhibitoren

Schlagworte: Polysaccharide - *tissue engineering* - Hydrogele - Kinaseinhibitoren -
SUZUKI Kreuzkupplung

Die Verwendung von myokardialen Stammzellen stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Züchtung von künstlichem Herzgewebe dar. Die Nutzung von verschiedenen Polymeren als Materialien zur Nachbildung einer extrazellulären Matrix ist dabei Grundlage der Forschungsbemühungen der letzten Jahrzehnte.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bildung von Hydrogelen über die Quervernetzung verschiedener Polysaccharide mittels Hydrazon-Bildung zur Anwendung der Materialien als extrazelluläre Matrix im *tissue engineering*. Es konnten erfolgreich verschiedene Modifizierungen der Polysaccharide Dextran, Pullulan, Lentinan, Lichenin, Glykogen, Cellulose und Fucoidan durchgeführt werden. Diese wurden in einer Carboxymethylierungs-Hydrazid-Bildungssequenz zur Hydrazid- bzw. über eine Oxidation zur Aldehyd-Komponente modifiziert. Zur Unterstützung der analytischen Daten wurden diese Reaktionen ebenfalls an monomeren Ausschnitten eines Polysaccharids nachempfunden. Neben der Charakterisierung der Einzelkomponenten konnten die gebildeten Hydrogele rheologisch untersucht und so Abhängigkeiten der Eigenschaften der Hydrogele vom durchschnittlichen Molekulargewicht der Einzelkomponenten festgestellt werden. Weiterhin wurden Modifizierungen zur Verbesserung der Biokompatibilität und zur Untersuchung des enzymatischen Abbaus durchgeführt.

Ein weiteres Teilprojekt entwickelte sich aus der Synthese des Inhibitors A 83-01 für einen Kooperationspartner. Dieser inaktiviert den TGF- β -Signalweg und bewirkt so einen Eingriff in die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen. Durch Derivatisierung in 1*H*-Position des Pyrazols konnte die Stabilität des Harnstoffstrukturmotivs verbessert und den Derivaten Inhibitoraktivität auf verschiedene Kinasen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte ein erfolgreicher Ansatz zur divergierenden Darstellung verschiedener Pyrazolderivate über SUZUKI-Kreuzkupplungen realisiert werden.

Abstract

Nick Dibbert

Synthesis of new Hydrogels for application in die field of *tissue engineering* -

Studies towards the synthesis of new kinase inhibitors

key words: polysaccharides - *tissue engineering* - hydrogels - kinase inhibitors -

SUZUKI cross-coupling

The application of myocardial stem cells represents a promising approach for the cultivation of artificial heart tissue. The research of the last few decades is based on the use of various polymers as materials to imitate the natural extracellular matrix.

This work is primarily concerned with the formation of new hydrogel materials using a hydrazone-crosslink between two different modified Polysaccharides as an application as extracellular matrix for *tissue engineering*. In this context different Polysaccharides like dextran, pullulan, lentinan, lichenin, glycogen, cellulose and fucoidan were successfully modified. Either via carboxymethylation-hydrazide formation sequence or oxidation of the corresponding active site for the hydrazone crosslink was effectively prepared. These reaction conditions were applied on a monomeric model system to support the analytical data and improve the precision and assertion. Besides the characterization of the single components the gels were analyzed via rheological measurements to determine the effect of average molecular weight on the hydrogel properties. Furthermore, various modifications to enhance the biocompatibility and examine the enzymatic digestion of the hydrogels were performed.

Another instance was developed during the synthesis of the kinase inhibitor A 83-01 as a collaborative project. This substrate inhibits different kinases of the TGF- β -pathway and is used for the manipulation of the differentiation of pluripotent stem cells. Due to a derivatization in 1*H*-position of the pyrazole, stabilization of the urea subunit was achieved. However, those derivatives showed to be active against certain kinases. In addition a divergent synthesis was developed that involved Suzuki cross-coupling reactions for derivatization of A 83-01.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 ALLGEMEINE ANMERKUNG ZU DEN DURCHGEFÜHRTEN STUDIEN.....	4
2 EINLEITUNG	5
2.1 <i>TISSUE ENGINEERING</i> UND REGENERATIVE MEDIZIN.....	5
2.2 MYOKARDIALES <i>TISSUE ENGINEERING</i>	8
2.3 HYDROGELE UND IHRE CHARAKTERISIERUNG	9
2.3.1 MATERIALIEN FÜR HYDROGELE	10
2.3.2 VERNETZUNGSMÖGLICHKEITEN	12
2.4 METHODEN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN	16
2.5 EINGRIFF IN DEN TGF- β SIGNALWEG	18
2.6 STRUKTURELLE ANALYSE DER BEKANNTEN TGF- β -REZEPTOR-KINASE-INHIBITOREN	22
3 ZIELSETZUNGEN	24
3.1 ZIELSETZUNG ZUR DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM TE.....	24
3.2 ZIELSETZUNG ZU DEN STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASE INHIBITOREN	25
4 DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM <i>TISSUE ENGINEERING</i>	27
4.1 MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN	27
4.1.1 OXIDATION VON DEXTRAN UND PULLULAN	29
4.1.2 CARBOXYMETHYLIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN.....	33
4.1.3 HYDRAZIDBILDUNG AN CARBOXYMETHYLIERTEM DEXTRAN UND PULLULAN	37
4.1.4 MONOMER-UNTERSUCHUNGEN EINES POLYSACCHARIDAUSSCHNITTS.....	40
4.2 DARSTELLUNG VON HYDROGELEN.....	46
4.2.1 RHEOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AUSGEWÄHLTER HYDROGELE	52
4.2.2 ANWENDUNG DER HYDROGELE ZUR EINBETTUNG VON MYOKARDIALEN STAMMZELLEN	55
4.3 WEITERFÜHRENDE MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN	60
4.3.1 OXIDATION VON CARBOXYMETHYLIERTEM DEXTRAN UND PULLULAN	60
4.3.2 MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN ZUR ERHÖHUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT	62
4.3.3 STUDIEN ZUM ABBAU VON MODIFIZIERTEN DEXTRAN-HYDROGELEN.....	66
4.4 MODIFIZIERUNG ANDERER POLYSACCHARIDE ZUM AUFBAU VON HYDROGELEN	69
4.4.1 STUDIEN ZUR ANWENDUNG DER METHODIK AN GLYKOGEN	69
4.4.2 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON LENTINAN.....	72
4.4.3 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON LICHENIN.....	74
4.4.4 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON FUCOIDAN	76
4.4.5 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON CHITOSAN	78

5	STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASEINHIBITOREN	81
5.1	STUDIEN ZUR DARSTELLUNG DES TGF- β -INHIBITORS A 83-01.....	81
5.1.1	STABILITÄTSTESTS DES INHIBITORS A 83-01	82
5.1.2	DARSTELLUNG UND UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER DERIVATE VON A 83-01	98
5.2	UNTERSUCHUNG DER INHIBITORAKTIVITÄT DER DARGESTELLTEN DERIVATE.....	103
5.2.1	STUDIEN ZUR AKTIVITÄT DER INHIBITOREN AN ISOLIERTEN KINASEN	103
5.2.2	EINSATZ AUSGEWÄHLTER DERIVATE ZUM DIFFERENZIERUNGSSTOPP VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN	110
5.2.3	BERECHNUNGEN ZU BINDUNGSSITUATION AN DEN KINASEN ALK2 UND ALK4	112
5.2.4	UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON 140 AUF HUMANES TUMORLYSAT.....	116
5.3	STUDIEN ZUM DIVERGENTEN AUFBAU EINER WIRKSTOFF-BIBLIOTHEK.....	117
5.3.1	STUDIEN ZU KREUZKUPPLUNGS-REAKTIONEN AN 3,4-DIBROM PYRAZOLDERIVATEN.....	117
5.3.2	STUDIEN ZUM AUFBAU DES PYRAZOL-GRUNDGERÜSTS UNTER VERWENDUNG EINER [1,3]-DIPOLAREN CYCLOADDITION	123
5.3.3	WEITER ANSÄTZE ZUM AUFBAU EINER DIVERGENTEN DARSTELLUNG EINER WIRKSTOFFBIBLIOTHEK	126
5.3.4	AUFBAU EINES FLUOR-BROM-PYRAZOL-GERÜSTS	127
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	132
6.1	DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM TISSUE ENGINEERING	132
6.1.1	ZUSAMMENFASSUNG	132
6.1.2	AUSBLICK	134
6.2	STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASEINHIBITOREN	134
6.2.1	ZUSAMMENFASSUNG	134
6.2.2	AUSBLICK	136
7	EXPERIMENTELLER TEIL	139
7.1	ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN CHEMISCH SYNTHETISCHEN ARBEITEN	139
7.2.	DARSTELLUNG VON MODIFIZIERTEN POLYSACCHARIDEN	142
7.3	DARSTELLUNG UND UNTERSUCHUNG EINES MONOMER-MODELLS VON POLYSACCHARIDEN.....	147
7.4	DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 5.1	156
7.5	DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 5.3	175
8	ANHANG	196
8.1	SPEKTRENANHANG ZU KAPITEL 4.....	196
8.2	SPEKTRENANHANG ZU KAPITEL 5.....	231
8.3	LITERATURVERZEICHNIS.....	290
	LEBENSLAUF.....	297
	Danksagung	299

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
β	beta
δ	Chemische Verschiebung
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
Äq.	Äquivalente
Ar	aromatischer Substituent
ATP	Adenosintriphosphat
BCT	<i>basal chorionic trophoblast</i>
BDE	Bindungs-Dissoziations-Energien
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	<i>bovines serumalbumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
CM	carboxymethyl
cod	1,5-Cyclooctadien
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CyJohnPhos	2-(Dicyclohexylphosphin) biphenyl
d	Tage, <i>NMR</i> : Dublett
DEPT	<i>distorsionless enhancement by polarisation transfer</i>
deion. H ₂ O	deionisiertes Wasser
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino) pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMFDMA	Dimethformamidimidmethylacetal
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino) ferrocen
DS	Substitutionsgrad (<i>engl. degree of substitution</i>)
DMEM	<i>Dublecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>engl. extracellular matrix</i>)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere (<i>latein et alii</i>)
EtOAc	Essigsäureethylester
G	Gibbs-Energie

G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunden
His	Hystidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence/correlation</i>
Hyd	Hydrazid
<i>i</i>	iso
iPCs	Induzierte pluripotente Stammzellen (<i>engl. induced pluripotent stem cells</i>)
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
<i>J</i>	Spin-Spin-Kopplungskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
KHMDS	Kaliumhexamethylendisilazid
LCMS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
m	Masse; <i>NMR</i> : Multiplett
M	Molar ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MHz	Megahertz
MIDA	
min	Minuten
MLK	<i>mixed-lineage kinase</i>
mmol	Milimol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NE	Naturstoffextrakt
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Nu	Nukleophil
OMe	Methoxy
Ox	oxidiert
<i>p</i>	para
Pa	Pascal
PE	Petrolether

PEPPSI™-IPr	[1,3-Bis(2,6-Diisopropylphenyl)imidazol-2-yliden](3-chlorpyridyl) palladium(II) dichlorid
Ph	Phenyl
PhNCS	Phenylisothiocyanat
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
ppm	<i>parts per million</i>
q	<i>NMR</i> : Quartett
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RGDfK	<i>L</i> -Arginin- <i>L</i> -Glycin- <i>L</i> -Asparaginsäure- <i>D</i> -Phenylalanin- <i>L</i> -Lysin
RIPK	<i>receptor-interacting protein kinase</i>
RM	Regenerative Medizin
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (<i>engl. structure-activity relationship</i>)
SEPHADEX	<i>separation pharmacia dextran</i>
SM	Startmaterial
SPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl
t	Zeit; <i>NMR</i> : Triplett
T	Temperatur
TAB	<i>TAK-binding proteins</i>
TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAT	Tetrabutylammonium (triphenyl) difluorsilicat
TE	<i>tissue engineering</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tol	Toluol
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
Ts	Tosyl
W	Watt
ZAK	<i>zipper- and sterile α motif-containing kinase</i>
z. B.	zum Beispiel

1 ALLGEMEINE ANMERKUNG ZU DEN DURCHGEFÜHRTEN STUDIEN

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Fachgebiet des *tissue engineering*. Dabei werden zunächst die Arbeiten zu den Studien zur Darstellung neuer Hydrogele diskutiert, welche für die Bildung von menschlichem Gewebe eingesetzt werden sollten. Wegen der Zugehörigkeit zum Exzellenz-Cluster REBIRTH (from Regenerative Biology to Reconstructive Therapy) und dadurch gegebenen engen Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von INA GRUH wurde der Fokus dieser Untersuchungen auf die Forschung zur Züchtung von Herzgewebe durch die Verwendung von myokardialen Stammzellen gelegt.^[1] Die entwickelten Hydrogele sollten also als ECM (engl. *extracellular matrix*) für das myokardiale *tissue engineering* verwendet werden.

Weiterhin werden die durchgeführten Studien zur Darstellung neuer TGF- β -Rezeptor-Kinasen diskutiert. Hierbei wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis um ROBERT ZWEIGERDT zunächst die Darstellung eines bekannten Inhibitors (A 83-01) angedacht. Dieser wird von HENNING KEMPF aus dem Arbeitskreis ZWEIGERDT zur Unterdrückung der Bildung eines MIXL1-Transkriptionsfaktors verwendet. Die Bildung dieses Transkriptionsfaktors ist ein bekannter Indikator für die Bildung des embryonalen Primitivstreifens. Hierbei handelt es sich um die Zusammenlagerung von verschiedenen Zellen. Der Primitivstreifen ist im menschlichen Körper für die Bildung von Gewebe verantwortlich.

2 EINLEITUNG

2.1 TISSUE ENGINEERING UND REGENERATIVE MEDIZIN

Der Begriff „*tissue engineering*“ (TE, deutsch Gewebekonstruktion) wurde 1987^[2] für die Rekonstruktion von defektem oder entferntem Gewebe eingeführt. Die Geschichte dieses Forschungsgebietes geht jedoch bis 3000 v. Chr. zurück. Bereits in indischen Sanskrit-Texten war von einer Hauttransplantation die Rede. Die erste nachweisbare medizinische Anwendung kann hingegen auf die Mitte des 19. Jahrhunderts zurückgeführt werden.^[3] Hier wurde die sogenannte REVERDIN-Transplantation^[4], die Transplantation von frischem Hautgewebe, von dem Schweizer Chirurgen JACQUES-LOUIS REVERDIN entwickelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden kreisrunde Eigenhautimplantate auf die betroffene Stelle gebracht, um auf diese Weise das zerstörte Gewebe zu rekonstruieren.

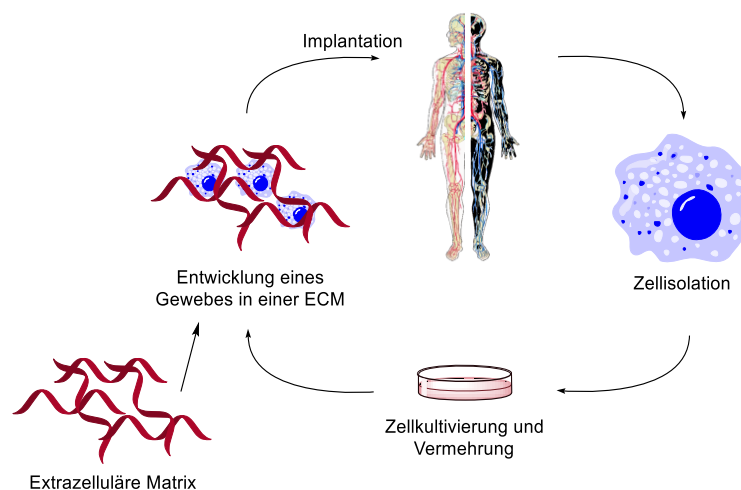


Abbildung 1: Allgemeines Konzept zur Bildung von künstlichem Gewebe im *tissue engineering*.

In den Folgejahren fand die Entwicklung von biochemischen Methoden wie beispielsweise die Zellkultivierung aus der menschlichen Epidermis statt.^[5] Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Extrazelluläre Matrix (ECM, engl. *extracellular matrix*) genauso wichtig ist wie die verwendeten Zellen, um Materialien für die Regenerative Medizin (RM) herzustellen und gezielt einzusetzen (Abbildung 1). Auch wenn die Begriffe RM und TE oft als Zusammenfassung eines Forschungsgebietes genannt werden, so sind doch Unterschiede in der Herangehensweise zur Darstellung von Gewebe nachempfundenen Konstrukten zu vermerken.^[6] So stellt RM einen Oberbegriff dar, unter den die Regeneration von Organen oder Organ-Teilen *in vivo* oder *ex vivo* fällt. Der Begriff TE hingegen ist weitaus präziser und als Teil der RM definiert. Diese Definition beruht auf der Tatsache, dass TE ausschließlich die

Gewebekonstruktion *ex vivo* durch Zellkultivierung in einer ECM beinhaltet.^[7] Die Entwicklung der Methodik zur *in vitro*-Kultivierung von humanen Stammzellen^[8] stellen einen weiteren Meilenstein der Entwicklung des TE dar. Hierdurch konnten induzierte pluripotente Stammzellen (iPCs, *engl.* induced pluripotent stem cells) gezielt differenziert und kultiviert werden, um in eine ECM eingebracht und zur Gewebekonstruktion eingesetzt zu werden.

Tabelle 1: Derzeitige Anwendungsbeispiele des TE in der RM.

Gewebe	Funktion	TE-Ansatz
Haut ^[9,10]	Körperbarriere	Implantation einer Matrix zur Regeneration des Gewebes
Cornea ^[11,12]	Transparente Barriere der Augen	<i>ex vivo</i> generierte Matrix-Implantate
Leber ^[13,14]	Entgiftung	extrakorporale Bioreaktoren und Hepatozyten zur Gewebszüchtung
Pankreas ^[15,16]	Insulinabscheidung	Implantate zur Insulinabsonderung
Knorpel ^[17,18]	Verbindung zwischen Knochen	Implantation einer Matrix zur Richtungsweisung der Regeneration
Herz ^[1,19]	Blutzirkulation	Direkte Gewebszüchtung durch Kardiomyozyten aus iPCs
Nieren ^[20,21]	pH-Regulation und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten	Nephronen aus <i>ex vivo</i> -Kultivierung von Stammzellen
Nerven ^[22,23]	elektrische Signalübermittlung zur Steuerung von Körperfunktionen	Materialien in Röhrenform zur Regeneration der Nervenbahnen

Auf diesem Wege erweiterten sich die Möglichkeiten der Implantation und Regeneration von verletztem Gewebe. Derzeit liegen die Forschungsbemühungen auf verschiedenen Anwendungsgebieten^[4] des TE (Tabelle 1). Diese Anwendungen unterscheiden sich in zwei Punkten wesentlich voneinander. Zum einen ist die die Art der verwendeten Zellen von entscheidender Bedeutung für Form und Funktion des zu bildenden Gewebes. Hierfür wurde der Meilenstein von THOMSON *et al.*^[24] gelegt, die zeigen konnten, dass Stammzellen in verschiedene Zelltypen differenziert werden können. Zum anderen spielt aber auch die Wahl der ECM eine entscheidende Rolle für die Bildungs- und Funktionsfähigkeit des gewünschten

Gewebes. Dies zeigten VACANTI *et al.*^[25] indem sie auf Basis einer Polymer-basierten ECM in der Lage waren, ein Knorpelgewebe in Form eines menschlichen Ohres auf dem Rücken einer Maus zu bilden.

Die Wahl der ECM ist neben der Wahl der Zellen der wichtigste Faktor zur erfolgreichen Konstruktion von artifiziellem und funktionsfähigem Gewebe. Daher ist das erklärte Ziel des TE, ein *Scaffold* (*engl.* Rückgrat) zu entwerfen, das sich in biophysikalischen, biomechanischen und biochemischen Eigenschaften dem originalen Gewebe ähnelt.^[26] Dabei sind die Hauptanforderungen die Biokompatibilität, um eine post-operative Entzündung zu vermeiden, die Biomimetik sowie die Biodegradierbarkeit. Das verwendete Material sollte sich bei der Neubildung des Gewebes vollständig und nicht toxisch degradieren lassen und so lediglich das Gerüst darstellen.^[27]

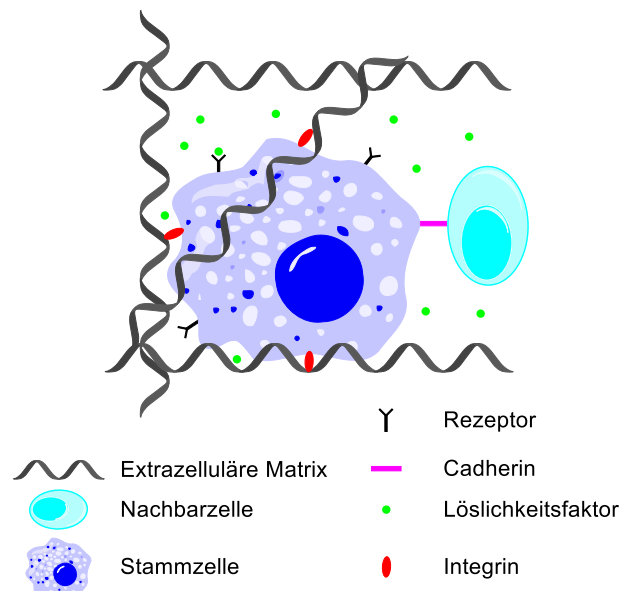


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Stammzelle in einer ECM mit den Faktoren und Proteinen, die für eine erfolgreiche Adhäsion an die ECM notwendig sind. Diese Abbildung wurde einer Abbildung von PEPPAS *et al.*^[27] nachempfunden.

Die ECM sollte also einen Anker für die zu verwendenden Zellen darstellen und ihnen gleichzeitig ein dreidimensionales Netzwerk (*Scaffold*) bieten, um das gewünschte Gewebe in der vorgegebenen Form zu bilden (Abbildung 2). Hierbei ist es wichtig, dass das *Scaffold* sowohl spezielle Motive zur erleichterten Zelladhäsion beinhaltet, als auch die Signalwege durch Anbindung verschiedener Wachstumsfaktoren unterstützt.^[28,29] In diesem Zusammenhang werden oft Peptide mit charakteristischen Integrin-Bindungs-Motiven (RGD, HHLGGAKQAGDV und andere^[30]) am *Scaffold* angebracht.^[31] Aber nicht nur die Anbindung selbst, sondern auch die Ähnlichkeit mit dem bevorzugten Umfeld der jeweiligen Zellen ist

entscheidend für den erfolgreichen Aufbau eines medizinisch verwendbaren Gewebes. So ist bekannt, dass die Steifheit des *Scaffolds* einen Einfluss auf die Zell-Differenzierung und deren Proliferation hat.^[32,33] Daher sollte eine ideale artifizielle ECM und das zu ersetzende Gewebe bestmöglich miteinander übereinstimmen.^[34] Die Anforderungen an ein Material sind zudem abhängig von der Art der vorgesehenen therapeutischen Methode und den Einsatzort. In Bezug auf den Herzmuskel ist beispielsweise die Hauptanforderung an die ECM das Ermöglichen der zelleigenen Kontraktion.

2.2 MYOKARDIALES TISSUE ENGINEERING

Das menschliche Herz kann nicht durch Reparationsmechanismen eine eigene Regeneration von defektem oder nekrotischem Gewebe einleiten, da die ausgereiften kardialen Myozyten, die Zellen des Herzmuskelgewebes, nicht mehr in der Lage sind, sich zu replizieren.^[35] Nach einem Herzinfarkt, der einen Verlust an Kardiomyozyten, Entzündungen und Narbenbildung mit sich bringt,^[36,37] muss demnach das Herz unterstützt werden, indem das defekte Gewebe ausgetauscht wird. Dies kann durch drei verschiedene Ansätze realisiert werden. Eine Möglichkeit stellt die direkte Einbringung von Kardiomyozyten in den Infarktbereich dar.^[38] Hierbei wird durch eine erhöhte Population der myokardialen Zellen und der Zugabe von Zelltypen, die bekannt dafür sind nekrotisches Gewebe zu ersetzen, eine Regeneration des Herzgewebes vorangetrieben.

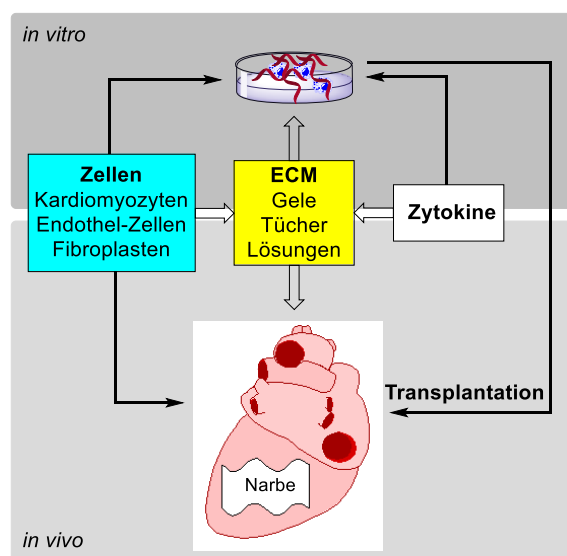


Abbildung 3: Prinzipielle Herangehensweisen zur regenerativen Therapie durch myokardiales *tissue engineering*.

Ein zweiter, aktueller Ansatz beschäftigt sich mit einer therapeutischen Möglichkeit, bei der die kürzlich entdeckten im Herz enthaltenen Stammzellen differenziert werden und dadurch zum Aufbau von neuem Herzgewebe beitragen sollen. Der dritte und ebenfalls sehr aktuelle Ansatz basiert auf den Methoden des *tissue engineering* (Abbildung 3). Hierbei können die prinzipiellen Herangehensweisen in *in vitro* und *in vivo* Methoden unterschieden werden, deren grundlegender Unterschied die Art der Gewebekonstruktion und der Gewebetransplantation ist. Die *in vitro* Methodik setzt einen gewebekonstruierenden Prozess vor der eigentlichen Transplantation voraus, z. B. durch Zellkultivierung in einer Extrazellulären Matrix, Degradierung dieser und Bildung eines daraus ergebenden Gewebes. Die *in vivo* Methodik hingegen zielt auf die Transplantation einer Matrix sowohl ohne als auch mit Zellen, und die Bildung eines Gewebes im Körper des Patienten ab. Dabei können sowohl Matrizen als vorgefertigtes *Scaffold* transplantiert, als auch eine injizierbare Matrix minimalinvasiv platziert werden. Dieser Ansatz bietet klare Vorteile durch die Bildung des gewünschten Gewebes unter natürlichen Bedingungen, wohingegen die Kontrolle der Form, Größe, Funktion und Art der enthaltenen Zellen nur über eine *in vitro* Methode gegeben ist.

2.3 HYDROGELE UND IHRE CHARAKTERISIERUNG

Eine Materialklasse, die ein großes Potential besitzt, für das myokardiale *tissue engineering* eingesetzt zu werden, sind die Hydrogele. Ein Hydrogel ist ein dreidimensionales Netzwerk, welches die Fähigkeit besitzt, Wasser aufzunehmen und zu halten. Dabei wird unter drei verschiedenen Arten der Wasseradsorption^[39] bzw. -bindung unterschieden (Abbildung 4).

Das sogenannte „gebundene Wasser“ oder auch „primär-gebundene Wasser“ bezeichnet die Wassermoleküle, welche beim Ersteintritt in das dreidimensionale Netzwerk die polarsten Gruppen der Matrix koordinieren und eine Hydrathülle um diese bilden. Sind alle polaren Gruppen hydratisiert, quillt das Netzwerk auf und legt die weniger polaren Abschnitte frei. Diese weniger polaren Regionen können ebenfalls Wechselwirkungen mit Wassermolekülen aufbauen. Dadurch entsteht das „hydrophob-gebundene“ oder „halb-gebundene Wasser“ bzw. das „sekundär-gebundene Wasser“. Beide Spezies des gebundenen Wassers werden oftmals zusammengefasst als „gebundenes Wasser“ bezeichnet. Nachdem die polaren und

unpolaren Regionen hydratisiert wurden, führt der osmotische Druck zu einer weiteren Quellung des Netzwerkes durch die Einlagerung des „freien Wassers“.

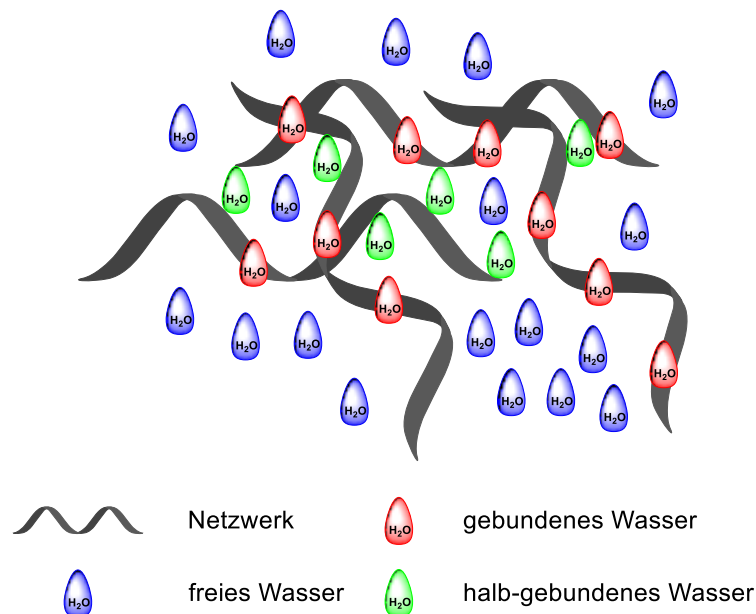


Abbildung 4: Unterschiedliche Arten der Wasseraufnahme bei der Quellung eines Hydrogels.

Diese Einlagerung ist nur durch physikalische Eigenschaften des Netzwerkes beschränkt. Bei einer kleinen Porengröße ist die Einlagerung des freien Wassers geringer als bei hoch elastischen Netzwerken. Die eigentliche Festigkeit sowie die mechanischen Eigenschaften eines Hydrogels werden jedoch durch das „gebundene Wasser“ bestimmt. Untersuchungen von BARBUCCI *et al.* konnten zeigen, dass Hydrogele mit einem höherer Anteil an „gebundenem Wasser“ eine größere Festigkeit aufwiesen als solche mit einem höheren Anteil an „sekundär-gebundenem Wasser“.^[40]

Die Messung dieser Festigkeit wird über ein Rheometer durchgeführt. Hierbei werden Scherkräfte auf das Gel übertragen und die Parameter G' (Speichermodul) und G'' (Verlustmodul) gemessen. Hier liefert das Verlustmodul eine Aussage über den viskoelastischen Charakter und das Speichermodul eine Einordnung der Festigkeit eines Materials wieder.^[41]

2.3.1 MATERIALIEN FÜR HYDROGELE

Hydrogele für medizinische Anwendungen werden allgemein auch als Biomaterialien bezeichnet. Biomaterialien sind nach dem AMERICAN NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH^[42]

„synthetische oder natürliche Materialien, die für einen bestimmten Zeitraum jedes Gewebe im menschlichen Körper teilweise oder vollständig zu ersetzen, ohne dabei die Lebensqualität des Individuums zu vermindern“.

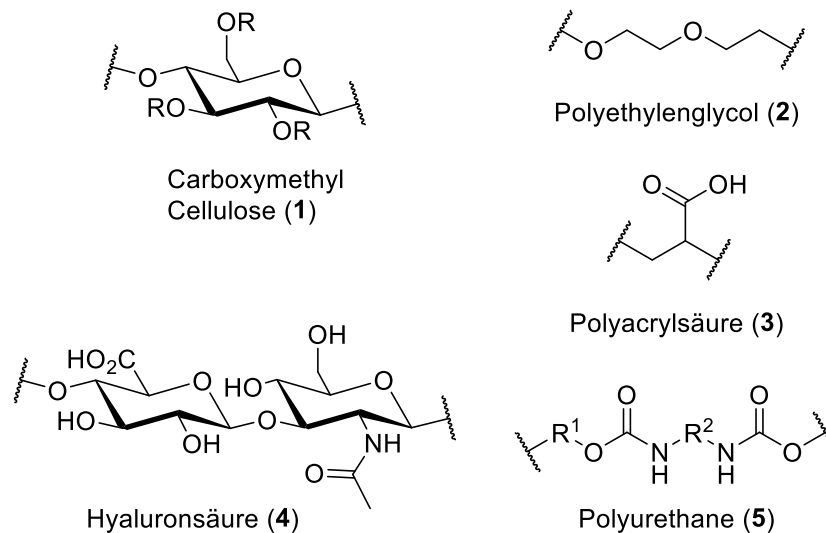


Abbildung 5: Natürliche und synthetische Polysaccharide zur Darstellung von Hydrogelen für medizinische Anwendungen.

In diesem Zusammenhang wird oft die Biokompatibilität genannt. Laut Definition^[43] sind biokompatible Materialien solche, die „eine Funktionsweise bei einer angemessenen Akzeptanz des Trägers erlauben“. Dabei können auch Materialien verwendet werden, die keine explizite Biokompatibilität aufweisen, jedoch durch gezielte Veränderung der Oberfläche eine Biokompatibilität generiert wird.^[44] Dies wird, wie oben beschrieben, durch Anbringung von verschiedenen Faktoren wie der RGD-Sequenz oder durch Nachahmung einer biologischen Struktur realisiert.

Tabelle 2: Verwendungsmöglichkeiten für Hydrogele aus unterschiedlichen Polymeren.

Medizinische Anwendung	Natürliche Polymere	Synthetische Polymere
Wundheilung ^[45-47]	Xanthan, Carboxymethylcellulose, Hyaluronsäure	Polyurethan, Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidinon
Wirkstofftransport ^[48,49]	Chitosan, Hydroxypropylmethylcellulose, Stärke	Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol, Acrylsäure
Zahnmedizin ^[50]	Hydrocolloide aus Kerensis Gummi	Peptide
tissue engineering Implantate ^[51,52]	Hyaluronsäure, Kollagen	Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure

Seit Beginn der Forschung an Hydrogelen in den 1930er Jahren^[53] wurde eine Vielzahl an synthetischen Materialien oder Materialien mit ein biologischem Ursprung (Abbildung 5) zur Bildung von Hydrogele verwendet (Tabelle 2). Die wohl bekanntesten und am meisten

verwendeten Materialien sind dabei Hyaluronsäure, Carboxymethyl Cellulose und die verschiedenen Derivate von Polyethylenglycol, Polyacrylsäure und Polyurethan. Diese Vielzahl an unterschiedlichen Grundstrukturen zeigen, dass der Ursprung eines Polymers keine entscheidende Rolle für den späteren Anwendungsbereich spielt. Vielmehr ist es die Kenntnis über das zu ersetzende Gewebe und die eingestellten physikalischen Eigenschaften sowie die generierte Biokompatibilität, die über Erfolg oder Misserfolg eines Biomaterials im TE entscheidet.

Dabei spielt die Quervernetzung der Polymere eine entscheidende Rolle, da sie die Porengröße und damit auch die physikalischen Eigenschaften direkt beeinflusst. Eine perfekte Nachahmung eines Gewebes setzt somit exakte Kenntnisse über dessen Beschaffenheit voraus.

2.3.2 VERNETZUNGSMÖGLICHKEITEN

Die Art der Quervernetzung ist ein weiterer Faktor, der die Stabilität von Hydrogelen beeinflusst. Allgemein werden die Vernetzungsmöglichkeiten in physikalische und chemische Quervernetzung unterteilt.^[54]

1.3.2.1 PHYSIKALISCHE VERNETZUNGEN

Eine Variante der physikalischen Quervernetzung ist das Vernetzen durch Erhitzen und Abkühlen einer Lösung von dem jeweiligen Polymer. Hierbei sind es oftmals Sulfatgruppen-tragende Polymere, die bei höheren Temperaturen zunächst ungeordnete Verteilung annehmen, sich beim Abkühlen in Helices anordnen^[55] und somit ein Netzwerk bzw. ein Hydrogel ausbilden (Abbildung 6).

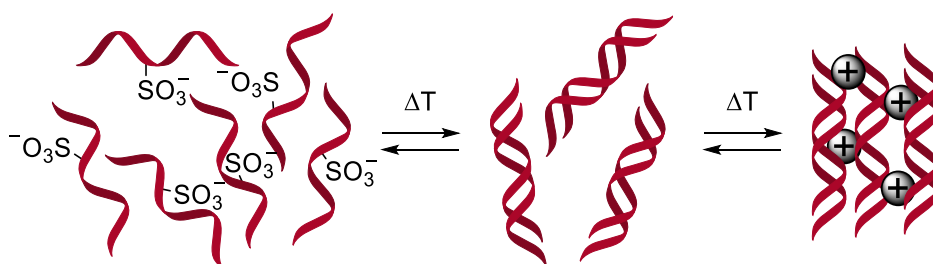


Abbildung 6: Physikalische Vernetzung durch Erhitzen und Abkühlen der Netzwerkcomponenten.

Durch die Anwesenheit von Ionen wie Na^+ oder K^+ werden die Sulfatgruppen elektrostatisch verbunden und das Netzwerk zusätzlich stabilisiert. Beispiele für diese Methode sind Hydrogele bestehend aus Polyethylenoxid und Polypropylen^[56], sowie Polyethylenglycol und Polymilchsäuren.^[57]

Diese Art der Wechselwirkung unterscheidet sich nur durch das notwendige Erhitzen der Polymerlösung (Abbildung 6) von einer physikalischen Quervernetzung, die ausschließlich auf ionische Wechselwirkungen beruht. Polysaccharide wie z. B. Alginat sind dafür bekannt, durch Zugabe von Calcium-Ionen ein dreidimensionales Netzwerk und somit ein Hydrogel^[52] auszubilden (Abbildung 7). Hierbei sind es die freien Säurefunktionen, die mit diesem Kation dann eine ionische Wechselwirkung aufbauen.

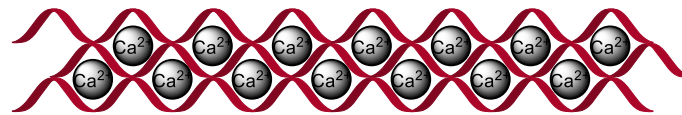


Abbildung 7: Quervernetzung über ionische Wechselwirkungen.

Eine stabile Wechselwirkung kann aber auch zwischen den einzelnen Säurefunktionen aufgebaut werden. Versetzt man z. B. eine Lösung des Natriumsalzes der Carboxymethyl Cellulose mit 0.1 M HCl,^[58] so werden die Carboxylgruppen protoniert und bilden ein Netzwerk über stabile Wasserstoffbrückenbindungen aus (Abbildung 8).

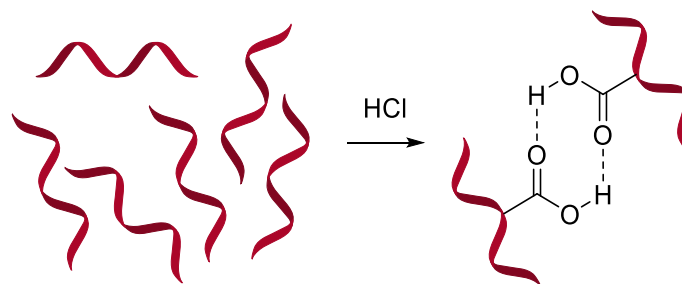


Abbildung 8: Aufbau eines Hydrogels über stabile Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Carbonylfunktionen an Polysacchariden können aber auch für die Bildung von *Blend*-Materialien verwendet werden. Als Blend-Materialien werden Materialien bezeichnet, die sich durch die Mischung von zwei unterschiedlichen Komponenten ergeben. Diese Vereinigung zieht eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften, verglichen mit demselben Material aus nur einer Komponente, nach sich. Bei der Vermengung von positiv und negativ geladenen Polymeren bilden diese ebenfalls elektrostatische Wechselwirkungen aus.^[59] Auf diesem Weg können ebenfalls Hydrogele aus wässrigen Lösungen gebildet werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Mischung des Polyanions Xanthan und des

Polykations Chitosan. Aber auch die kristalline Struktur kann eine Vernetzung fördern. Ein Gemisch aus Xanthan und Polyvinylalkohol z. B. kann nach mehreren Gefrier-trocknungs-Zyklen mikrokristalline Strukturen ausbilden, die in der Lage sind zu Quellen und Wasser aufzunehmen ohne selbst in Lösung zu gehen.^[60]

1.3.2.2 Chemische Vernetzungen

Bei der chemischen Vernetzung von Polymeren zum Aufbau eines Hydrogels handelt es sich meistens um irreversible Reaktionen, bei denen zwei modifizierte Polymere miteinander verbunden werden können. Diese Reaktion kann entweder über die gleichartige Funktionalisierung der Polymere und einem Linker-Molekül, oder über die direkte Reaktion der funktionellen Gruppen realisiert werden. Im Fall der in Abbildung 9 dargestellten Vernetzungsmöglichkeiten handelt es sich um Reaktionen, die einen Linker benötigen. Dabei wird über die Reaktion eines Aldehyds mit den Alkohol-Funktionalitäten des Polymers ein Acetal (Abbildung 9, 1) generiert, das im wässrigen Medium stabil ist und so für den Aufbau einer dreidimensionalen Struktur sorgt.^[61] Aber auch die Hydrazone-Bildung (Abbildung 9, 2) wird oftmals als schnelle Quervernetzung genutzt.^[62]

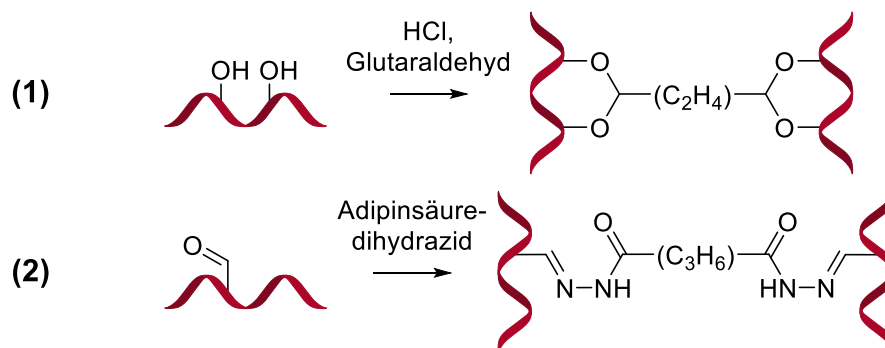


Abbildung 9: Darstellung verschiedener Methoden zur chemischen Vernetzung von Polymeren.

Diese Methoden bergen jedoch den Nachteil, dass das überschüssige Vernetzungsmittel (Glutaraldehyd bzw. Adipinsäuredihydrazid) nur noch über weitere Reinigungsschritte aus dem Hydrogel entfernt werden kann. Dies schließt eine *in vivo* Gelierung dieser Materialien aus. Ein weiterer Nachteil ist, dass auch funktionelle Gruppen des gleichen Polymer-Strangs miteinander reagieren können und somit keine Verdopplung des Molekulargewichts erfolgt und die Produkte eine kleinere Porengröße aufweisen.

Eine erfolgreiche Alternative bieten die Vernetzungen über [1,3]-dipolare Cycloadditionen. Dabei werden die unterschiedlichen Polysaccharide mit den korrespondierenden reaktiven

Gruppen modifiziert, um diese dann unter physiologischen Bedingungen miteinander reagieren zu lassen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine Reaktion eines Polymerstrangs mit sich selbst ausgeschlossen werden kann und jede Reaktion der funktionellen Gruppen eine Verdopplung des Molekulargewichts und somit eine Vergrößerung der Matrix nach sich zieht. Bei dieser Methode der Reaktionsführung wird oftmals auf die Huisgen-Reaktion, oder „Click-Chemie“ zurückgegriffen, die bei hohen Temperaturen Azide mit Alkinen in einer [1,3]-dipolaren Cycloaddition zur Reaktion bringt.^[63] Durch die hohen Temperaturen ist diese Reaktion jedoch nicht für die Präparation von Hydrogelen geeignet (Abbildung 10, 1). Die Verwendung von Kupfer kann hier zwar die Reaktionstemperatur verringern, jedoch ist sie in biologischen Systemen auf Grund der Cytotoxizität des Kupfers zu vermeiden.^[64] Die Entwicklung von Kupfer-freien „Click“-Varianten ermöglichte die biokompatible Anwendung dieser Methodik zum Aufbau von dreidimensionalen, biokompatiblen Netzwerken.^[65]

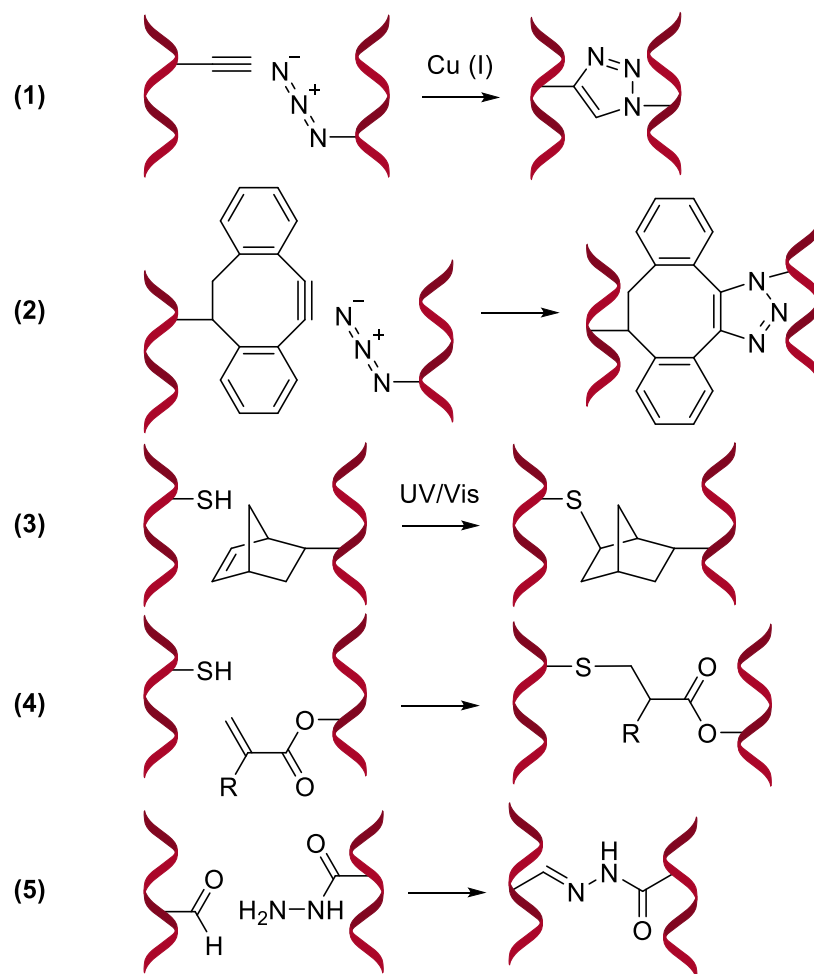


Abbildung 10: Anwendung der „Click-Chemie“ zum Aufbau von Hydrogelen.

Um Kupfer-freie-„Click“-Reaktionen zu ermöglichen, wurden Substrate entwickelt, die eine gespannte und darum aktivierte Dreifachbindung enthalten (Abbildung 10, 2). Diese haben

den Vorteil, dass sie bei Raumtemperatur mit hoher Geschwindigkeit miteinander reagieren. Jedoch haben die großen, meist aliphatischen Reste einen negativen Einfluss auf die Polarität der Polymere und damit auch auf deren Wasserlöslichkeit.^[66] Neben den Cycloadditionen wurden auch nukleophile Substitutionen wie 1,4-Additionen (Abbildung 10, 4) und Amin-Kondensationen (Abbildung 10, 5) verwendet. Auch photoinduzierte „Click“-Reaktionen wurden entwickelt. (Abbildung 10, 3) Diese können jedoch nicht in Gegenwart von Zellen angewendet werden, da das meist benötigte UV-Licht die Zellen schädigen würde. Diese Reaktionen werden aufgrund des „Click“-Charakters der Chemie trotz der Abwesenheit einer [1,3]-dipolaren Cycloaddition, pseudo-„Click“-Reaktionen genannt.

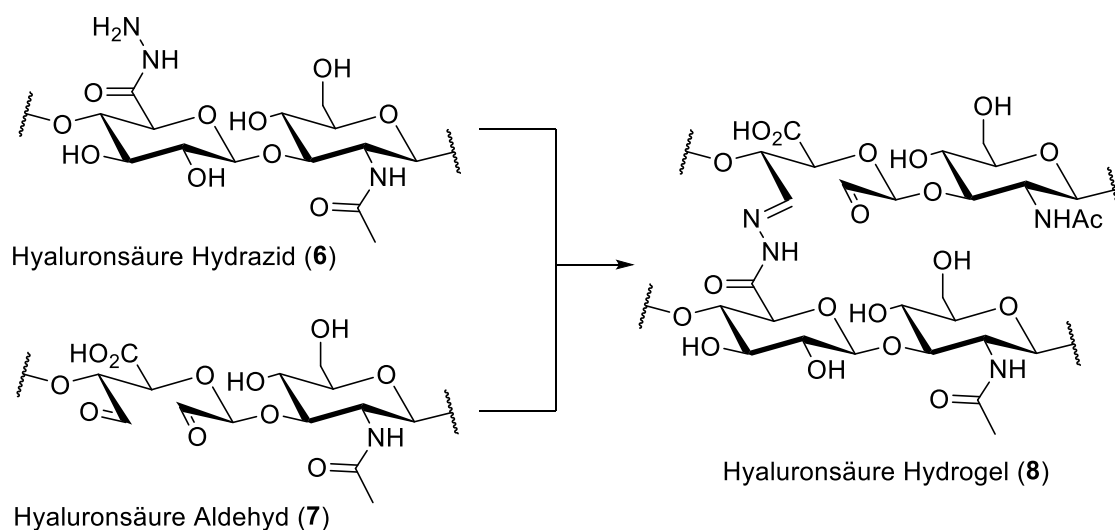


Abbildung 11: Bildung von Hydrogelen (8) aus Hyaluronsäure Hydrazid (6) und Hyaluronsäure Aldehyd (7) nach KIRSCHNING *et al.*^[67] unter wässrigen Bedingungen.

In diesem Zusammenhang zeigten die Arbeiten von ANDREAS KRAUSE^[68], dass Hyaluronsäure über eine Peptidkupplungs-Sequenz zu dem Hyaluronsäure Hydrazid (6) umgewandelt werden kann und dann mit dem Aldehyd der Hyaluronsäure ein biokompatibles Hydrogel bildet (Abbildung 11).

2.4 METHODEN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN

Seit PERCIVAL POTT 1775 zum ersten Mal die Verbindung zwischen eingeatmeten Rußpartikeln und dem sogenannten „Schornsteinfegerkrebs“ aufstellte^[69], durchlief die Krebsforschung eine bemerkenswerte Entwicklung. Ähnlich wie die Vielzahl an Methoden zur Behandlung von Krebserkrankungen, z. B. die erste radikale Mastektomie WILLIAM HALSTED im Jahr 1882, oder der erste Gebrauch der Strahlentherapie zur

Tumorbehandlung durch GOLDBERG und LONDON, stiegen auch die Zahlen der erkrankten Patienten. So zeigt die Entwicklung der Zahlen der Neuerkrankungen und der Mortalitätsraten von verschiedenen Krebsarten nach einer regelmäßigen, weltweiten statistischen Erhebung der INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) in der GLOBOCAN-Serie, dass im Jahr 2002^[70] etwa 10.9 Millionen Neuerkrankungen und etwa 6.7 Millionen Todesfälle, 2012^[71] hingegen etwa 14.1 Millionen Krebsneuerkrankungen mit einer Mortalitätsrate von 58 % (8.1 Millionen Fälle) verzeichnet wurden.

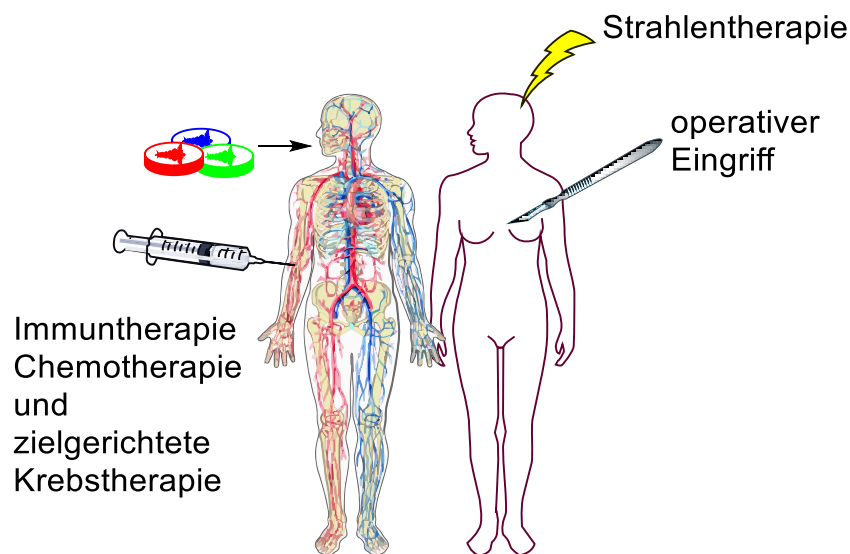


Abbildung 12: Methoden der derzeitigen Krebstherapie.

Derzeit wird bei der angewandten Krebstherapie zwischen fünf Behandlungsmethoden^[72] unterschieden (Abbildung 12). Der direkte Eingriff, also die operative Entfernung des Tumorgewebes, z. B. bei Brustkrebsbehandlungen^[73], sowie die Strahlentherapie^[74] stellen dabei örtlich begrenzte Therapieansätze dar. Bei beiden Herangehensweisen kann ein Tumor bzw. das infizierte Gewebe nur lokal entfernt bzw. abgetötet werden. Im Gegensatz dazu stehen die oral bzw. intravenös verabreichten Anti-Tumor-Medikamente. Dabei wird zwischen der allgemeinen Chemotherapie und der gezielten Krebstherapie unterschieden. Der erste Einsatz der Chemotherapie fand durch ALFRED GILMAN und LOUIS GOODMAN statt.^[75] Die beiden Pharmakologen behandelten im Jahr 1941 den ersten Patienten mit dem sogenannten Stickstoff-Lost (**9**, Abbildung 13) (*engl. nitrogen mustard*) und konnten binnen zwei Monaten einen massiven Rückgang des Tumorgewebes verzeichnen. Dabei werden im Körper zyklische Aziridine gebildet, die in der Lage sind die DNA an den Guanin-Basen zu methylieren. Durch diese Methylierung werden zwischen den einzelnen Strängen Vernetzungen ermöglicht, die schließlich zur Apoptose der Zellen führen.^[76,77] Ein großer

Nachteil der Chemotherapie ist die geringe Selektivität oder auch hohe Zytotoxizität der Medikamente. Dagegen steht die gezielte Krebstherapie, bei der zielgerichtet verschiedene Mechanismen der Tumorzellen genutzt und angesteuert werden. Der erste eingesetzte Inhibitor war Tamoxifen (**10**).^[78] Dieser bindet gezielt an den Östrogen Rezeptor der Tumorzellen und verhindert so das Wachstum von Brustkrebszellen.

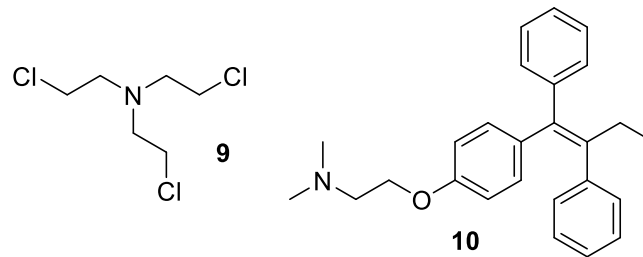


Abbildung 13: Die ersten anti-Tumor-Medikamente Stickstoff-Lost (**9**) und Tamoxifen (**10**).

Der Grundstein der fünften derzeit angewandten therapeutischen Methode wurde bereits 1909 von PAUL EHRLICH^[79] gesetzt. Hierbei geht es um die Unterstützung des Immunsystems durch monoklonale Antikörper wie Eculizumab^[80] und Trastuzumab. Dies führt wiederum zu einer Bekämpfung der Krebszellen und des Tumorgewebes.^[81,82]

Aufgrund der hohen Zytotoxizität der Chemotherapie und des eingeschränkten Anwendungsbereichs eines direkten Eingriffs, oder Strahlentherapie zur Krebsbehandlung, werden große wissenschaftliche Anstrengungen betrieben, um die gezielte Krebstherapie und die Immuntherapie voranzutreiben und klinisch wirkungsvoll und anwendbar zu machen.

2.5 EINGRIFF IN DEN TGF- β SIGNALWEG

Der Eingriff in bestimmte Signalwege des Zellzyklus^[83] bildet die Basis der gezielten Krebstherapie. Hierbei werden gezielt Kinasen inhibiert oder überexprimiert um Apoptose^[84], Autophagozytose^[85], oder Nekroptose^[86] einzuleiten. Nach einer Betrachtung des allgemeinen Zyklus zur Bildung von Krebszellen und Tumoren nach WEINBERG *et al.*^[87] durchlaufen Tumorzellen eine Entwicklung wie in Abbildung 14 dargestellt. Hierbei hat jeder Tumor oder charakteristischen Ausprägungen der einzelnen Einwirkungen auf die Zelle. Die gezielte Therapie durch Kinaseinhibitoren stellt dabei einen sehr vielversprechenden Ansatz dar. Es möglich, das Tumorwachstum bzw. die Signalübermittlung in Tumorzellen gezielt zu

unterdrücken indem die zuständigen Kinasen selektiv inhibiert werden.^[88] Dabei spielen besonders die Tyrosin-Kinasen eine entscheidende Rolle, weil sie gehäuft im Wachstumsfaktor-Signalweg der Zellen involviert sind.^[89]

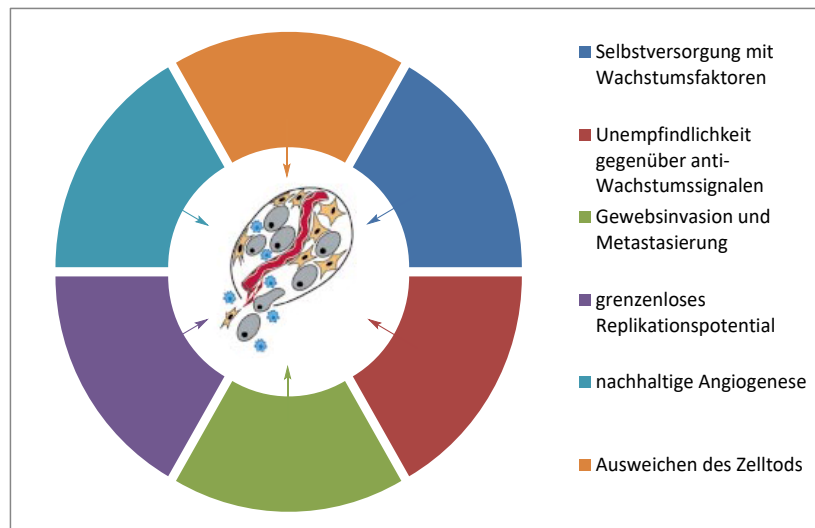


Abbildung 14: Einflussfaktoren zur Bildung von Krebszellen nach WEINBERG *et al.* bis hin zur Metastasierung.

Ein sehr vielversprechender Signalweg im Hinblick auf essentielle Funktionsweisen der Zellen und im speziellen von Krebszellen, ist der TGF β -Signalweg. Über diesen ist bekannt, dass er in gesundem Gewebe und in Krebszellen einen weitreichenden Einfluss auf das Epithel, Endothel, Immunzellen und Fibroblasten zeigt.^[90] So reguliert dieser im Epithel die Apoptose, Zelladhäsionen, die Produktion der extrazellulären Matrix (ECM) und im Endothel die Migration der Tumorzellen in die Blutbahn, die Wachstumskontrolle und somit Wachstum und die Metastasierung von Krebszellen (Abbildung 15).

Da der TGF- β -Signalweg in viele Prozesse der Tumorgewebsbildung involviert ist, rückte dieser in den Fokus wissenschaftlicher Bemühungen zur Krebstherapieentwicklung. Derzeit ist bekannt, dass der TGF- β -Signalweg sowohl für prä-tumorale Therapien, als auch für Therapien im fortgeschrittenen Krebsstadium genutzt werden kann.^[91] So zeigt sich, dass der TGF- β -Signalweg durch seine Tumor-Supressor-Eigenschaft^[92] im Frühstadium und seine Tumor-Promotor-Eigenschaft^[93] im späteren Stadium der Tumorbildung ein sogenanntes „TGF- β -Paradoxon“^[94] aufzeigt. Im Frühstadium der Krebsentwicklung ist dieser verantwortlich für die Krebszell-Apoptose und den Zellarrest. Im späteren Krankheitsverlauf hingegen wird über den TGF- β -Signalweg die Krebszellneubildung^[95] an sich und die Ausbildung eines günstigen Mikroumfelds^[96] für diese reguliert. Außerdem verbessert eine

Aktivität dieses Signalwegs in Krebszellen die Tumorerinfiltration, Metastasierung und die Unterdrückung der körpereigenen Immunantwort.^[97]

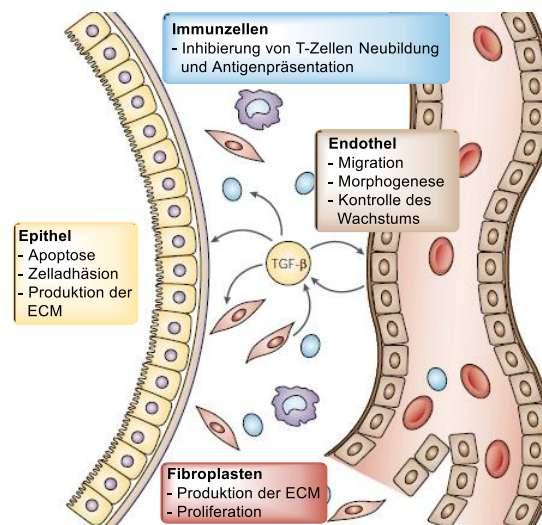


Abbildung 15: Darstellung der verschiedenen Einflüsse des TGF- β -Signalwegs auf die unterschiedlichen Schichten von menschlichem Gewebe. Die Abbildung wurde der aus einer Publikation von MASSAGUÉ *et al.*^[90] nachempfunden.

Um in Hinblick auf eine Krebstherapie in den TGF- β -Signalweg (Abbildung 16) einzugreifen kann also im Frühstadium gezielt eine Aktivierung herbeigeführt werden. Diese bewirkt dann eine bessere Abstoßung der Krebszellen. Im fortgeschrittenen Stadium führt eine Inhibition des TGF- β -Signalwegs zu einer Unterdrückung der Metastasierung. Darauf abgezielt gibt es derzeit drei Ansätze, welche bereits die präklinischen Studien durchlaufen haben und sich derzeit in den unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung befinden.^[98]

Diese Ansätze zielen dabei auf die zwei Kommunikationskaskaden im TGF- β -Signalweg ab (Abbildung 16). Der Smad-abhängige Signalweg des TGF- β -Signalwegs verläuft über eine Signaltransduktion der TGF- β Rezeptoren an kleinere Proteine, die Smad-Proteine. Diese sind intrazelluläre Proteine der TGF- β -Familie, die wiederum die Signale in den Zellkern weiterleiten und somit die Transkription bestimmter Gene aktivieren.^[99] Bei einer Unterbrechung dieses Signalweges z. B. über die Oligomerisierung der TGF- β -Rezeptoren, wird der Smad-unabhängige Signalweg aktiviert. Dadurch bildet sich ein TAB1/TAK1-Komplex (*engl. TAK binding protein/TGF- β -activated kinase-complex*).^[100,101] Dieser kann durch die Aktivierung von Kinasen wie der p38 (Abbildung 16) weitere physiologische TGF- β -Antworten wie Apoptose und Zellwachstum bewirken, ohne dabei den Smad-abhängigen Signalweg einzuschlagen.^[102]

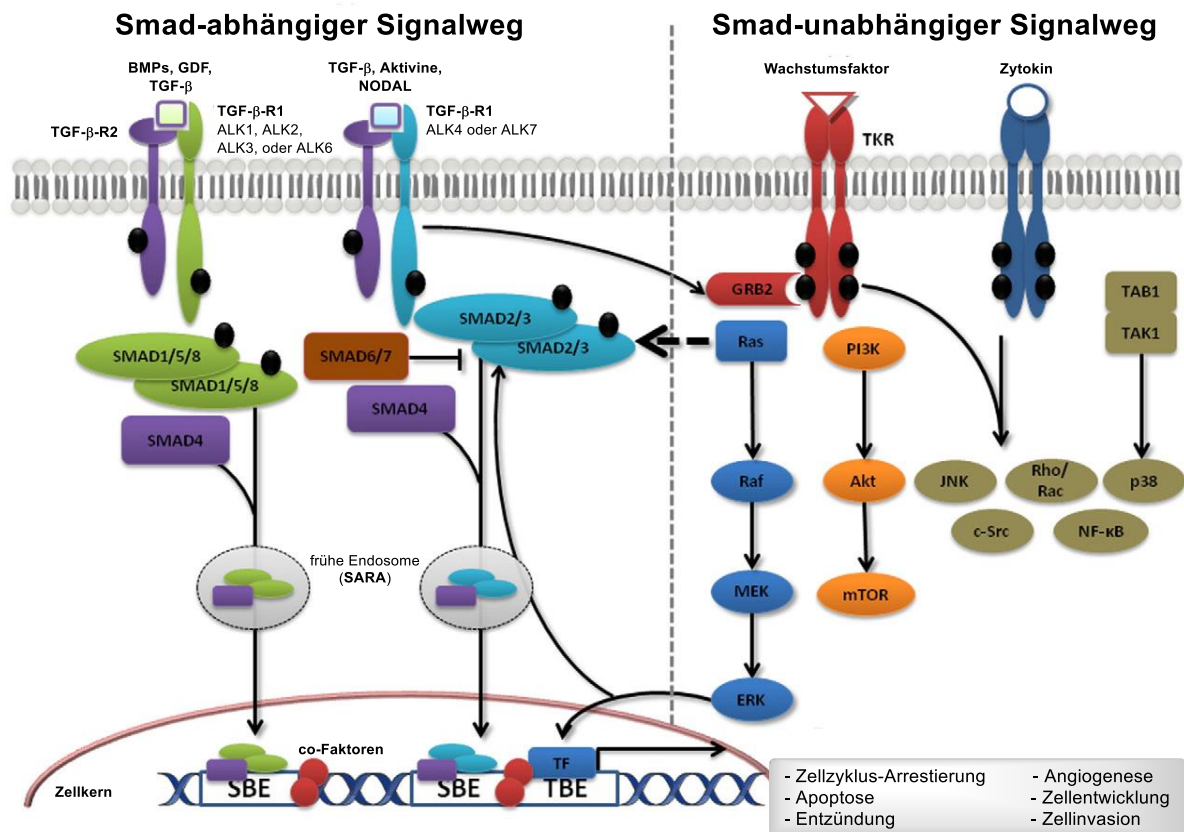


Abbildung 16: Abbildung des TGF- β -Signalweges unter Berücksichtigung des SMAD-abhängigen und SMAD-unabhängigen Verlaufes. Die Abbildung wurde der einer Publikation von DE GRAMONT *et al.*^[91] nachempfunden.

Innerhalb dieses TGF- β -Signalweges zielt ein therapeutischer Ansatz auf die Unterbrechung auf dem Liganden-Level ab. Das heißt, dass Wirkstoffe wie dem Oligonukleotid Trabedersen (AP 12009)^[103] und Lucanix® (belagenpumatucel-L)^[104] eine Unterdrückung der Produktion von TGF- β -Proteinen führt. Das wiederum führt dazu, dass das TGF- β -Protein nicht mit dem TGF- β -Rezeptor kommunizieren kann und somit der TGF- β -Signalweg unterbrochen wird. Das Medikament Trabedersen (AP 12009) scheiterte zunächst an der klinische Studie Phase III, die Untersuchungen dieses Oligonukleotids zur kombinierten Chemotherapie werden jedoch fortgesetzt.^[105]

Der zweite therapeutische Ansatz basiert auf der Unterdrückung der Signalübertragung auf dem Liganden-Rezeptor-Level. Dabei werden TGF- β -Antikörper wie Fresolimumab^[106] und IMC-TR1 (LY3022859)^[107] eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Liganden zu verhindern und somit den TGF- β -Signalweg zu unterdrücken.

Die dritte und für diese Arbeit grundlegende Methode, in den TGF- β -Signalweg einzugreifen, ist die Inhibition von TGF- β -Rezeptor-Kinasen. Mehrere dieser Rezeptor-Kinasen sorgen für eine Kommunikation mit bestimmten Smad-Proteinen und somit für die Aktivierung der

Transkription relevanter Gene. Zu diesen Kinasen gehören die Aktivin-Rezeptor-ähnlichen Kinasen ALK-1, ALK-2, ALK-3, ALK-4, ALK-5, ALK-6 und ALK-7.^[108] Die derzeitigen wissenschaftlichen Bemühungen aus industrieller und akademischer Forschung bestehen darin Kinase-Inhibitoren darzustellen die eine gute Stabilität im menschlichen Organismus zeigen, um eine hohe Bioverfügbarkeit zu garantieren. Außerdem sollen die Inhibitoren möglichst hohe Selektivitäten gegenüber den einzelnen Kinasen zeigen um ungewollte Nebenreaktionen auszuschließen.

2.6 STRUKTURELLE ANALYSE DER BEKANNTEN TGF- β -REZEPTOR-KINASE-INHIBITOREN

Die Inhibierung der TGF- β -Rezeptor-Kinasen werden wie oben beschrieben zur Unterbrechung des TGF- β -Signalweges genutzt und durch kleine synthetische Wirkstoffe (Abbildung 17) wie Galunisertib (LY2157299, **11**)^[109], LY2109761 (**12**)^[110], SD 208 (**13**)^[111], A 83-01 (**14**)^[112] und A 77-01 (**16**) inhibiert.

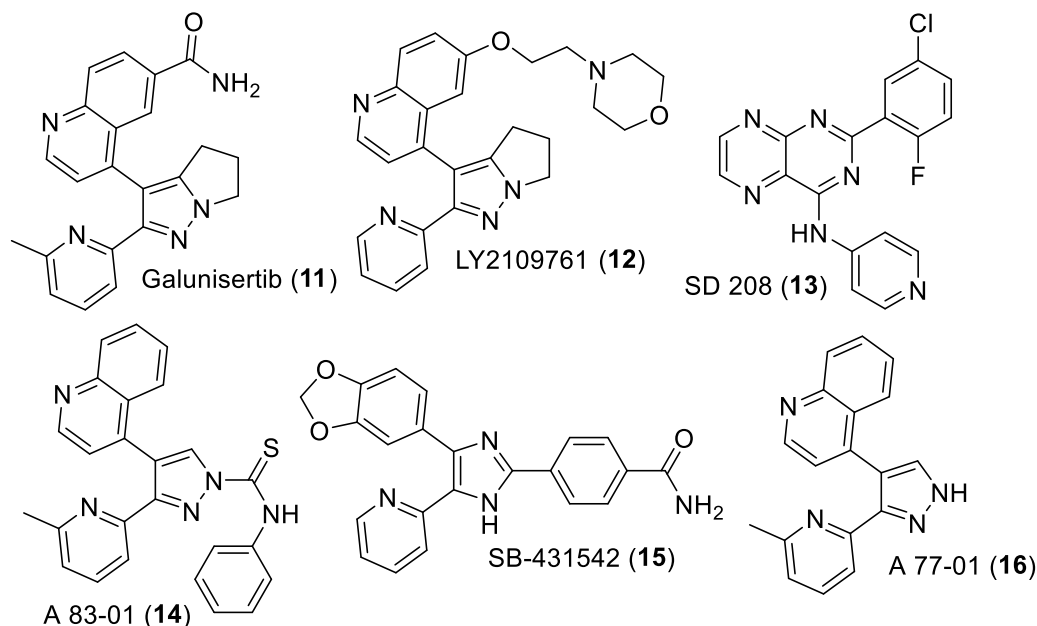


Abbildung 17: Auswahl bekannter TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitoren.

Bei der Betrachtung verschiedener TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitoren zeigt sich, dass alle unterschiedliche Stickstoffheterozyklen als Strukturmotiv tragen wobei oftmals Pyrazol und Piperidin-Derivate vertreten sind. So auch bei dem Inhibitor A 83-01 (**14**), welcher dem Inhibitor A 77-01 (**16**) von der Grundstruktur stark ähnelt, jedoch durch einen Thioharnstoff-

Substituenten in 1*H*-Position des Pyrazols erweitert wurde. Betrachtet man die Aktivität dieser beiden Kinase-Inhibitoren, so zeigt sich in der Literatur ein ähnliches Kinase-Profil. In einem zellbasierten Luziferase-Assay nach IMAMURA *et al.*^[112] zeigt A 77-01 (**16**) eine Luziferase-Restaktivität von 1.4 % und A 83-01 (**14**) eine Restaktivität von 0.68 %, bei einer Konzentration von 1.0 μ M in DMEM-Puffer. Neben der bekannten Aktivität des Wirkstoffs A 83-01 (**14**) konnte gezeigt werden, dass diese Substanz auch die Kinasen ALK4 (IC_{50} = 45 nM) und ALK7 (IC_{50} = 7.5 nM) inhibiert. Die ALK1, ALK2, ALK3, ALK6 und MAPK werden von dem Inhibitor **14** ebenfalls inhibiert. Jedoch liegt der ermittelte IC_{50} Wert in einem Bereich, bei dem **14** bereits cytotoxische Effekte zeigt (10 μ M). Derzeit befindet sich A 83-01 (**14**) jedoch noch in den vorklinischen Studien.^[113] Dennoch wird dieser Inhibitor aufgrund seiner Inhibitoraktivität verwendet, um die gezielte Differenzierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSCs) zu stoppen.^[114]

3 ZIELSETZUNGEN

3.1 ZIELSETZUNG ZUR DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM TE

Ziel dieser Arbeit war die Übertragung der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Hydrazid-Bildung an Hyaluronsäure (4) auf carboxymethyliertes Dextran (17). Dieses sollte dann mit dem Aldehyd der Hyaluronsäure (7) in einer pseudo-„Click“-Reaktion zum Aufbau eines Hydrogels verwendet werden (Abbildung 18).

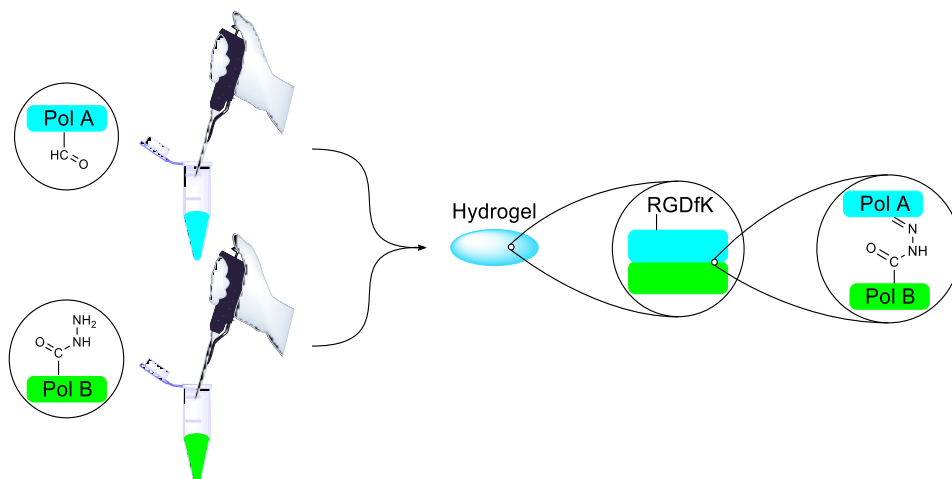


Abbildung 18: Strategie zur Modifizierung von Polysacchariden und Aufbau von Hydrogelen mittels Hydrazon-Bildung.

Außerdem sollten in diesem Zusammenhang auch andere Polysaccharide ohne Säure-Funktionen auf die Anwendbarkeit dieser Methodik hin untersucht werden. Die dargestellten Hydrogele sollten weiterhin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von INA GRUH auf Biokompatibilität bzw. Cytotoxizität untersucht werden.

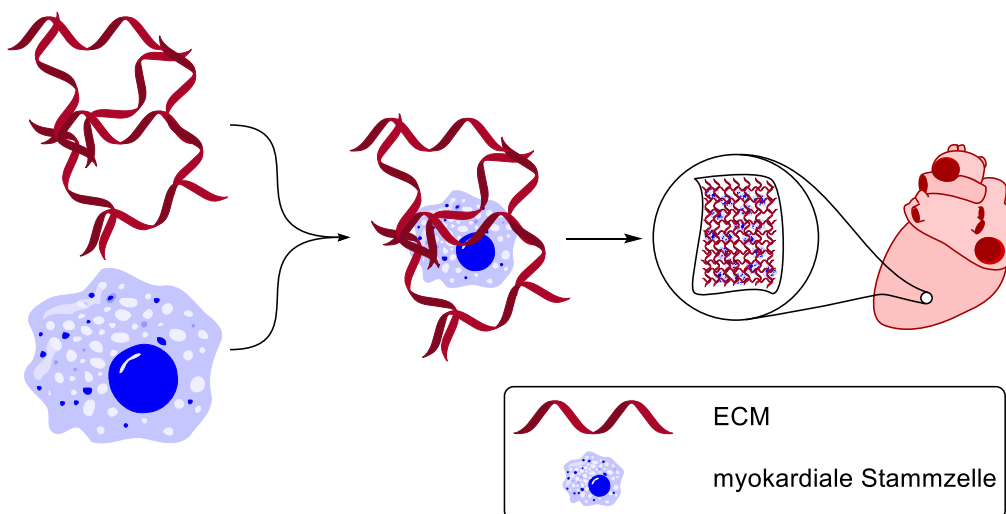


Abbildung 19: Zielsetzung des myokardialen *tissue engineering* dieser Arbeit.

Bei hinreichender Zellkompatibilität sollten diese Hydrogele anschließend eingesetzt werden, um durch die Kultivierung mit myokardialen Stammzellen als Extrazelluläre Matrix (ECM) zu dienen und ein künstliches Herzmuskelgewebe zu generieren. Dabei sollte die Verwendung von Collagen vermieden werden, um zu prüfen, ob die modifizierten Polysaccharide als ECM geeignet sind (Abbildung 19).

3.2 ZIELSETZUNG ZU DEN STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASE INHIBITOREN

Das Ziel des zweiten Abschnitts dieser Arbeit war es zunächst, den TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitor A83-01 (**14**) für die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ZWEIGERDT über die literaturbekannte, fünfstufige Synthese^[115] (Abbildung 20) herzustellen.

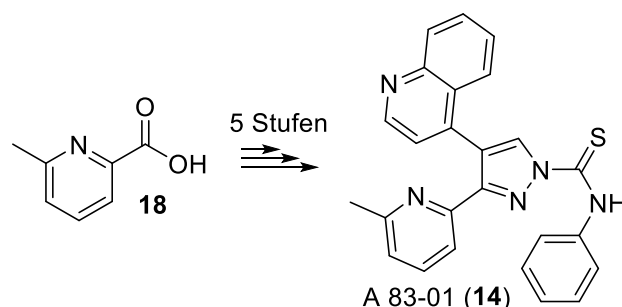


Abbildung 20: Allgemeine Darstellung der literaturbekannten Syntheseroute des Inhibitors A 83-01 (**14**).

Darüber hinaus sollte eine flexible und divergente Syntheseroute zu **14** entwickelt werden. Dabei sollten regioselektive Kreuzkupplungsreaktion und eine kontinuierliche Reaktionsführung zur Darstellung von **14** und verschiedener Derivate etabliert werden (Abbildung 21).

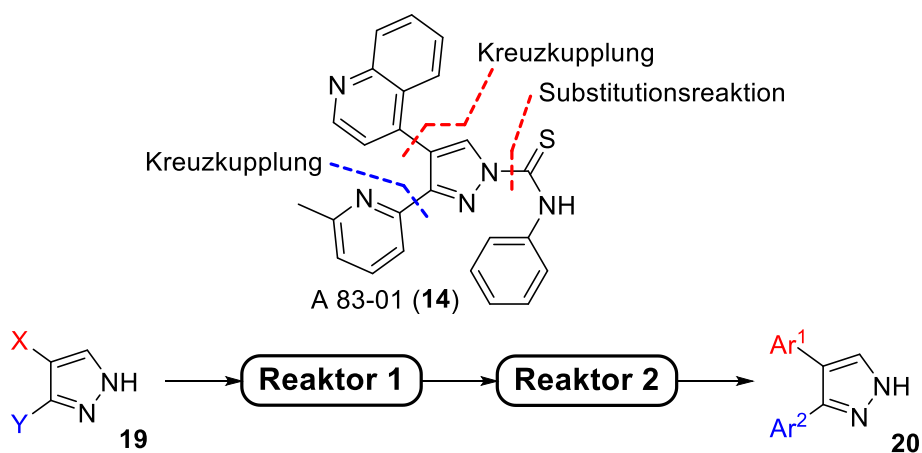


Abbildung 21: Strategie zur Darstellung des A 83-01 (**14**) unter Bedingungen der kontinuierlichen Reaktionsführung.

Hierfür sollte in zwei verschiedenen Reaktoren, gefüllt mit immobilisierten Palladium-Katalysatoren, nacheinander und selektiv die aromatischen Substituenten eingeführt und letztlich A 77-01 (**16**), oder an der 3- bzw. der 4-Position modifizierten Derivate (Abbildung 21) synthetisiert werden. Eine nachträgliche Substitutionsreaktion sollte dann zu einer Wirkstoffbibliothek aus Derivaten von A 83-01 (**14**) führen.

4 DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM *TISSUE ENGINEERING*

4.1 MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN

Im Folgenden werden die durchgeführten Modifizierungen der Polysaccharide Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) beschrieben. Hierfür wurden intensive Studien an beiden Polysacchariden durchgeführt und diese einer präzisen analytischen Prüfung hinsichtlich des Substitutionsgrades unterzogen.

Der Name Dextran (**21**) wurde erstmals von SCHREIBLER^[116] als solcher verwendet. Das Polysaccharid wurde seitdem in verschiedenen Bereichen von medizinischen Therapien und der Forschung erfolgreich verwendet. So wird es z. B. als Additiv in Augentropfen eingesetzt und bewirkt einen Schmiermittel-Effekt. Die wohl bekannteste Anwendung von Dextran (**21**) ist die Anwendung als Blutserum-Ersatz. Hier wird Dextran (**21**) in der Blutbahn zu Glukose zersetzt und fungiert somit als Nährstofflieferant und Volumenexpander. Zum anderen wurde quervernetztes Dextran entwickelt, das als stationäre Phase für die Größenausschlusschromatographie Verwendung findet und unter dem Namen Sephadex® (*separation pharmacia dextran*) kommerziell erhältlich ist.

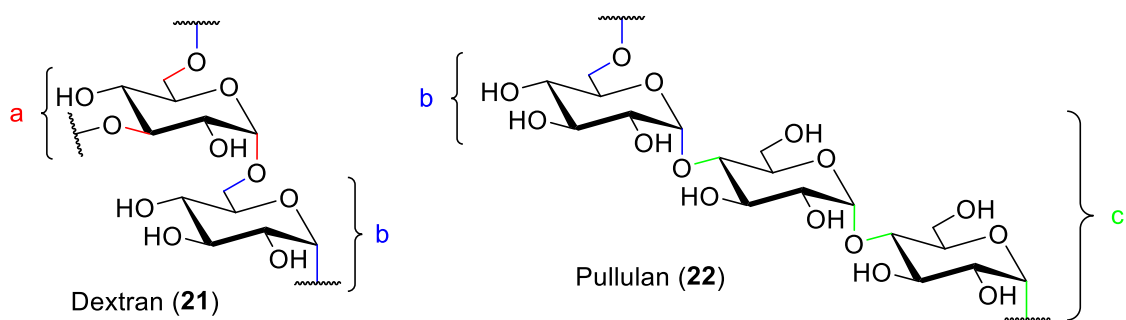


Abbildung 22: Strukturformel von Dextran und Pullulan. Die Verschiedenen glykosidischen Verknüpfungen sind durch farbige Illustration (a für α-1,3,6-glykosidische Bindung, b für α-1,6-glykosidische Bindung und c für α-1,4-glykosidische Bindung) dargestellt.

Dextran (**21**) selbst besteht überwiegend aus α-1,6-Glukoseeinheiten und je nach produzierendem Organismus^[116] auch aus wenigen α-1,3,6-Glukoseeinheiten (Abbildung 22). Aus diesem charakteristischen Aufbau des Polysaccharids ergibt sich leichte biologische Abbaubarkeit des Polysaccharids^[117], indem die α-1,6-glykosidischen Bindungen durch verschiedene Enzyme gespalten werden. Diese lässt sich jedoch mit steigender Denaturierung durch Modifizierung der Polymeren Grundstruktur erheblich verlangsamen^[118]. Daher war Dextran (**21**) ein idealer Kandidat für die Bildung eines

Hydrogels als *Scaffold* für myokardiale Stammzellen qualifizierte. Für die Untersuchungen zur Gelbildung Dextran wurden mehrere kommerziell erhältliche Dextrane mit verschiedenen durchschnittlichen Molekulargewichten genutzt um Effekte der Kettenlänge auf den Modifikationsgrad und die Eigenschaften der gebildeten Hydrogele zu studieren. Hierbei beschränkte sich die Auswahl auf die Dextrane mit den durchschnittlichen Molekulargewichten von 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa.

Pullulan (**22**) hingegen besteht aus sich wiederholenden α -1,6-glykosidisch verbundenen Maltotriosen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa. Die einzelnen Glukose-Einheiten der Maltotriose sind wiederum durch α -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Durch diese strukturelle Besonderheit ergaben sich neben der exzellenten Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit^[117] auch die Möglichkeit der Einstellung des hydrophilen Charakters des Pullulans.^[119,120]

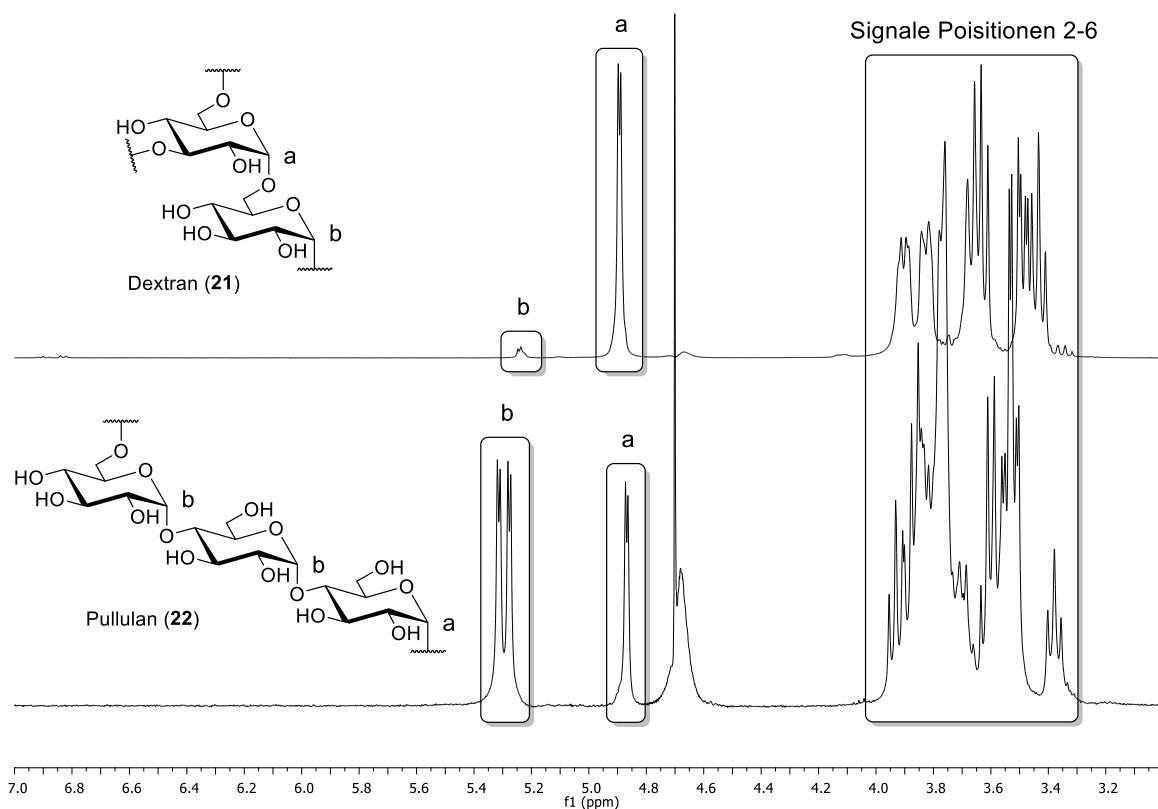


Abbildung 23: Vergleich der NMR-Spektren von kommerziellem Dextran (**21**) und Pullulan (**22**). Hervorgehoben sind die Signale der anomeren Protonen.

Anhand der aufgenommenen ¹H NMR-Spektren von Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) ließen sich strukturelle Unterschiede der beiden Polysaccharide zeigen. Das anomere Proton der 1,6-glykosidischen Verknüpfungen zeigte hier eine Verschiebung von ca. 4.90 ppm. Signale in diesem Bereich wurden sowohl beim Dextran, als auch beim Pullulan nachgewiesen.

Zusätzlich verfügt Pullulan über zwei anomere Protonen aus 1,4-glykosidischen Verknüpfungen. Diese zeigten im ^1H NMR-Spektrum eine Verschiebung zu tieferem Feld bei ca. 5.30 ppm. Diese Verschiebung findet sich schwach ausgeprägt auch im Dextran. Dies zeigt, dass das verwendete Dextran auch über einige wenige 1,3- bzw. 1,4-glykosidische Bindungen verfügt. Diese Signale wurden als Diagnostika für den Erfolg der folgenden Modifizierungen genutzt.

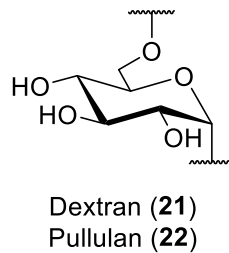
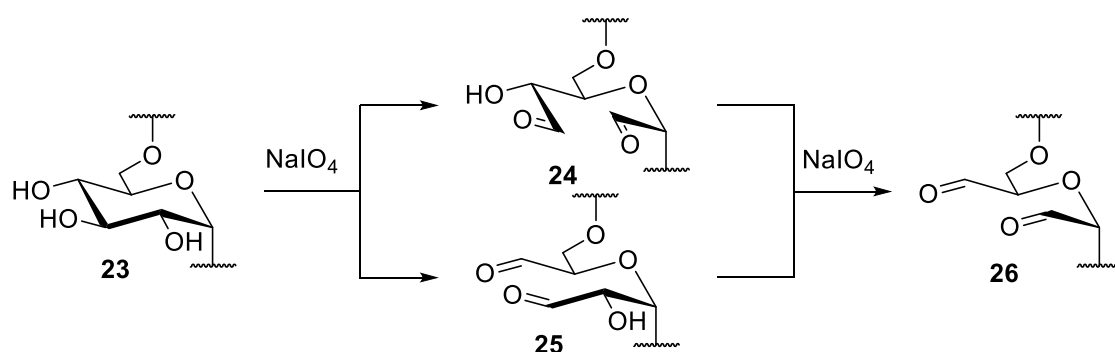


Abbildung 24: Vereinfachte Darstellung der Polysaccharide Dextran (21) und Pullulan (22).

In den folgenden Kapiteln zur chemischen Modifizierung ausgewählter Polysaccharide werden zur Veranschaulichung nur vereinfachte Strukturen verwendet. So wird für Dextran (21) und für Pullulan (22) ein α -1,6-verknüpfter Ausschnitt aus der Gesamtstruktur verwendet (Abbildung 24). Die Ausbeuten werden in den folgenden Kapiteln nicht als Prozentzahl angegeben, da zum Zeitpunkt der Isolierung kein durchschnittliches Molekulargewicht der Polymere und somit keine exakte Molarität bestimmt werden konnte.

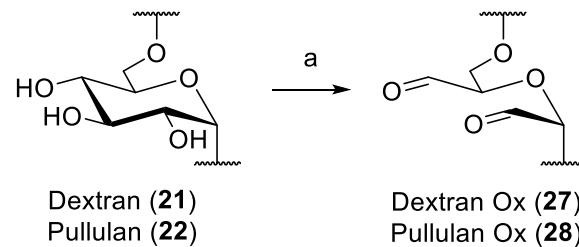
4.1.1 OXIDATION VON DEXTRAN UND PULLULAN

Zur Darstellung von Aldehyd-modifiziertem Dextran und Pullulan wurde die Methode der Periodat-Oxidation nach JEANES *et al.*^[121] genutzt.



Schema 1: Periodat-Oxidation der α -1,6-Glukose-Einheit von Polysacchariden.

Neben der literaturbekannten^[122] CC-Bindungsspaltung während der Reaktion von NaIO_4 mit 1,2-Diolen zeigen vicinale Triole in 1,6-Glukose-Einheiten (**23**) zwei mögliche Oxidationen^[123] und damit die Abspaltungen von Ameisensäure (Schema 1).



Schema 2: Periodatoxidation von Dextranen mit verschiedenen durchschnittlichen Molekulargewichten und von Pullulan. Exemplarisch ist die doppelte Oxidation von **21** gezeigt Reaktionsbedingungen: a) NaIO_4 , H_2O , RT, 12 h.

Diese Methode wurde an den Dextranen (**21**) mit dem mittleren Molekulargewichten 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa und an Pullulan angewendet (Schema 2). Zur Einordnung des Reaktionsumsatzes und Vorbereitung einer Bibliothek aus Materialien mit unterschiedlichen Substitutionsgraden wurden die jeweiligen Dextrane (**21**) und Pullulan (**22**) mit unterschiedlichen Äquivalenten von NaIO_4 behandelt.

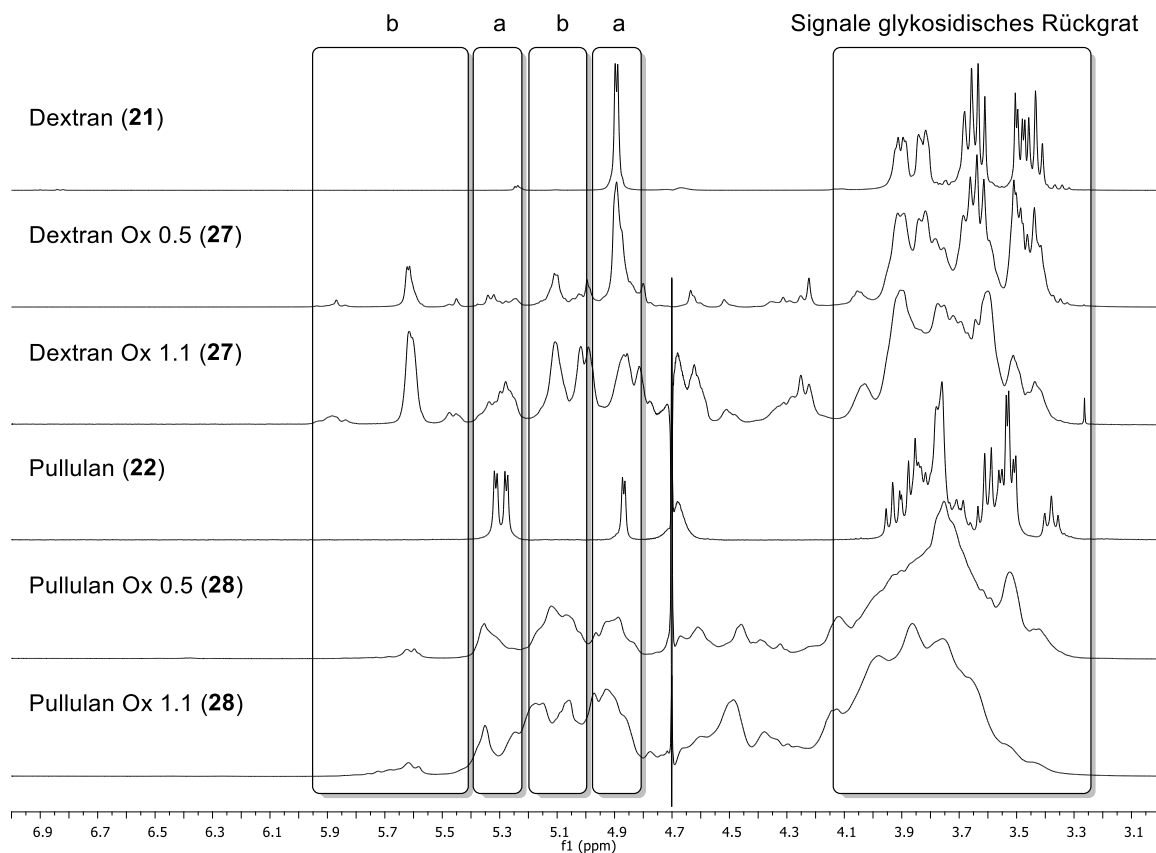
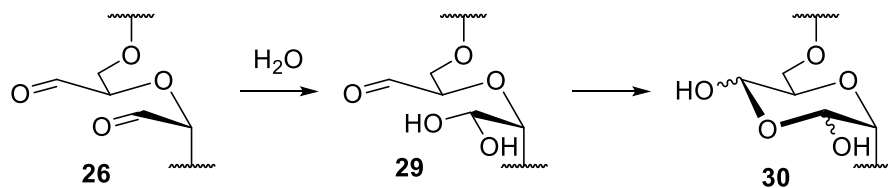


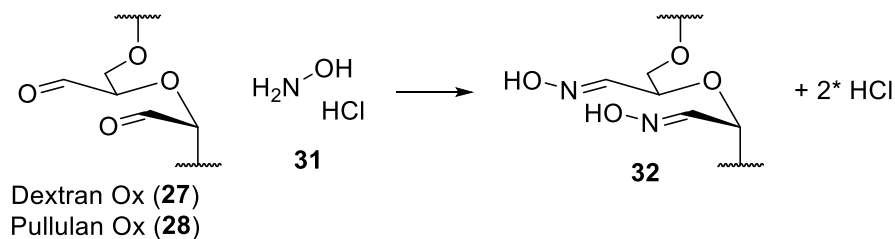
Abbildung 25: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) nach Oxidation mit unterschiedlichen Äquivalenten von NaIO_4 (**27** und **28**). Hervorgehoben sind die Signale der anomeren Protonen (**a**), der Bereich der Signale der Aldehyd-Hydrate (**b**) und des glykosidischen Rückgrats.

Die erzeugten, oxidierten Polysaccharide (**27**, **28**) wurden zunächst NMR-spektroskopisch untersucht, um eine Aussage über den Substitutionsgrad und die strukturelle Zusammensetzung der Materialien zu treffen. Es zeigte sich, dass die Wasserlöslichkeit mit steigenden Äquivalenten von NaIO_4 abnimmt. Wie in der Literatur^[124] beschrieben, zeigte keiner der untersuchten Aldehyd-modifizierten Polysaccharide ein ^1H NMR-Signal mit der für Aldehyde typischen Verschiebung von etwa 8.0 ppm (Abbildung 25). Allerdings wurden eine Vielzahl neuer Signale im Bereich 4.0 ppm bis 6.0 ppm nachgewiesen. Diese Signale deuteten auf die Bildung von Aldehyd-Hydraten in wässrigen Lösungen hin.



Schema 3: Bildung des Halbacetals (**30**) an oxidierten Polysacchariden in wässrigen Lösungen.

Diese Hydrate entstehen durch den nukleophilen Angriff von H_2O bzw. D_2O an den Aldehyd. Anschließend erfolgt ein intramolekularer Angriff des gebildeten Hydrates an einen zweiten Aldehyd, wodurch sich eine doppelte Halbacetal-Struktur (**30**) ergeben kann (Schema 3). Da das ^1H NMR-Spektrum nicht die Möglichkeit der Quantifizierung des Umsatzes ermöglichte, wurde eine andere Methode zur Quantifizierung von Aldehyden an Polysacchariden verwendet. Prinzipiell sind verschiedene Ansätze denkbar.



Schema 4: Darstellung der Reaktion von oxidiertem Dextran (**27**) bzw. oxidiertem Pullulan (**28**) mit Hydroxylaminhydrochlorid (**31**).

. So könnte das Purpald-Assay^[125] für niedermolekulare Aldehyde herangezogen werden, oder auch verschiedene Titrations unter Verwendung von 3,5-Dinitrosalicylsäure und Kalium-Natrium-Tartrat^[126] durchgeführt werden. Beide Methoden wurden von HEINDEL *et al.*^[127] an hochmolekularen Polysacchariden untersucht und zeigten inkonsistente Resultate. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hydroxylaminhydrochlorid-Methode reproduzierbare und damit verwendbarere Ergebnisse liefert. Daher wurde diese Methode für die Quantifizierung der Aldehyd-Funktionalisierung an Dextran (**21**) und

Pullulan (**22**) verwendet. Hierfür wurde der gebildete Aldehyd (**27**, **28**) zunächst mit Hydroxylaminhydrochlorid (**31**) unter Bildung des korrespondierenden Oxims zur Reaktion gebracht (Schema 4). Bei dieser Reaktion entstand ein Äquivalent HCl pro Aldehyd, welches anschließend gegen NaOH titriert werden konnte. Ein Mol verbrauchtes NaOH entsprach dabei einem Mol Aldehyd am Polysaccharid. Auf dieser Grundlage wurden anschließend verschiedene Dextrane mit unterschiedlichen durchschnittlichen Molekulargewichten sowie Pullulan untersucht (Abbildung 26).

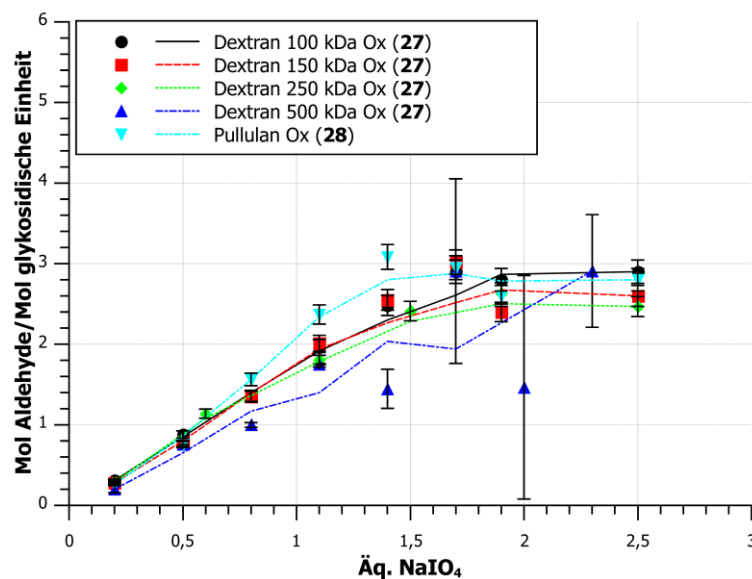


Abbildung 26: Auswertung der Titration von oxidiertem Dextran und Pullulan mit unterschiedlichen Äquivalenten NaIO₄.

In beiden Fällen wurden 0,2 Äq bis 2,5 Äq. NaIO₄ verwendet, um einen Zusammenhang zwischen eingesetztem NaIO₄ und generierten Aldehyden herzustellen. Es zeigte sich der gleiche systematische Fehler, den auch HEINDEL *et al.*^[127] beschrieben. Theoretisch sollte der Wert der vorhandenen Aldehyde nicht über 2,0 Mol Aldehyde/Mol glykosidischer Einheit steigen, da dies der maximale Wert ist den eine molekulare Architektur wie **32** (Schema 4) bei vollständiger Oxidation annehmen kann. Da jedoch pH-Wert-Änderungen durch eingeschlossene Formyl-Reste einen Einfluss auf den gemessenen Substitutionsgrad haben könnten, kommen gerade bei höheren Äquivalentverhältnissen von NaIO₄ über 2,0 mol Aldehyde/mol glykosidischer Einheit zustande. Es wird jedoch deutlich, dass schon bei geringen Mengen von NaIO₄ eine Überoxidation, also eine zweifache Oxidation je glykosidische Untereinheit, stattfand. Im idealen Fall würde ein Äquivalent NaIO₄ exakt zwei Mol Aldehyde generieren (Schema 1). Im Fall der gewählten Polysaccharide werden aber z. B. bei einem Einsatz von 0,5 Äq. NaIO₄ lediglich 0,8 Mol Aldehyde generiert, was auf einen

erhöhten Verbrauch von NaIO_4 durch zweifache Oxidation eines Glukose-Bausteins hinweist. Als zusätzliche Analytik wurde für die oxidierten Polysaccharide auch eine Verbrennungsanalyse bzw. Elementaranalyse (CHN-Analysen) angefertigt (Abbildung 27).

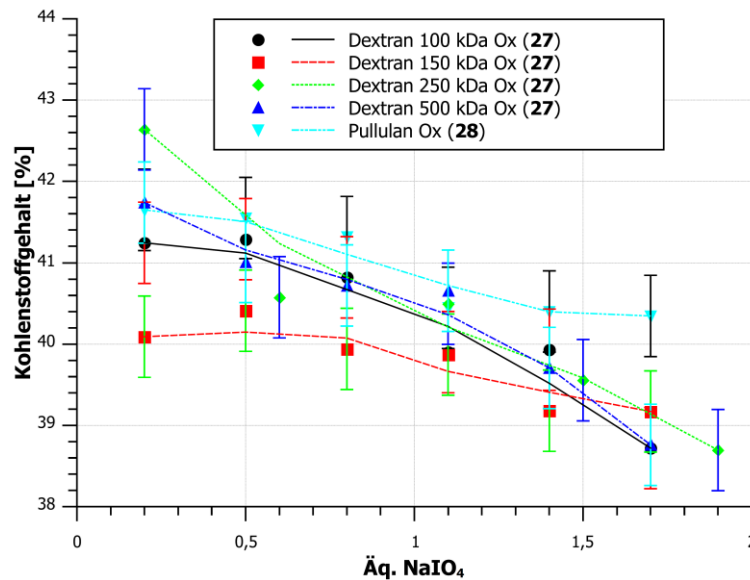


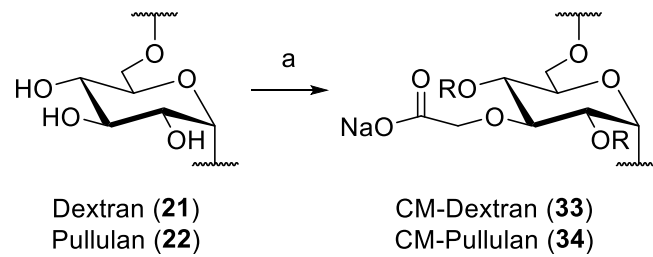
Abbildung 27: Zusammenfassung der elementaranalytischen Untersuchung der Oxidation von Dextran und Pullulan.

Hier zeigte sich, dass mit steigendem Einsatz an NaIO_4 der Kohlenstoffanteil fortwährend abnahm. Die hervorgehobenen Trendlinien zeigten zusätzlich, dass der Kohlenstoffanteil im Bereich von 0-1.0 Äq. NaIO_4 einen flachen Verlauf annahm. Im Bereich von 1.0 Äq. NaIO_4 konnte ein Wendepunkt des Trends und eine damit verbundene größere Abnahme des Kohlenstoffanteils verzeichnet werden. In diesem Bereich konnte die zweifache Oxidation gehäuft ablaufen und somit zu dem Abfall des Kohlenstoffanteils geführt haben. Eine Betrachtung der Dextran- und der Pullulan-Strukturen erlaubt Rückschlüsse auf die abgelaufenen Oxidationen. Demnach wurde zunächst ein Großteil der α -1,6-glykosidischen Subeinheiten einfach oxidiert und erst bei größeren Mengen des Oxidationsmittels reagierten diese Einheiten ein zweites Mal mit dem NaIO_4 .

4.1.2 CARBOXYMETHYLIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN

Um nach der Methode von KIRSCHNING *et al.*^[67] Dextran (21) und Pullulan (22) mit einer Hydrazid-Funktion auszustatten, mussten zunächst die korrespondierenden Carboxyfunktionen am Polysaccharid-Rückgrat angebracht werden. Hierbei wurde eine Variante von LANGER *et al.*^[128] verwendet, bei der das jeweilige Polysaccharid unter stark

basischen Bedingungen (8 M NaOH) mit Chloressigsäure zur Reaktion gebracht wurde (Schema 5).



Schema 5: Darstellung von carboxymethyliertem Dextran (**33**, CM-Dextran) und carboxymethyliertem Pullulan (**34**, CM-Pullulan) mit $R=CH_2CO_2Na$, oder H. Exemplarisch ist die Funktionalisierung an C-3 zeigt. Reaktionsbedingungen: a) Chloressigsäure, NaOH (8 M), H_2O , 62 °C, 1.5 h.

Das carboxymethylierte Polysaccharid (**33** und **34**) wurde nach der Reaktion durch Fällen aus Methanol erhalten. Um einen höheren Substitutionsgrad zu erhalten, wurden die jeweiligen carboxymethylierten Substrate erneut unter denselben Reaktionsbedingungen (Schema 5) umgesetzt. Diese repetitive Reaktionsführung wurde mit allen Dextranen (**21**, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und Pullulan (**22**) sechsmal angewendet.

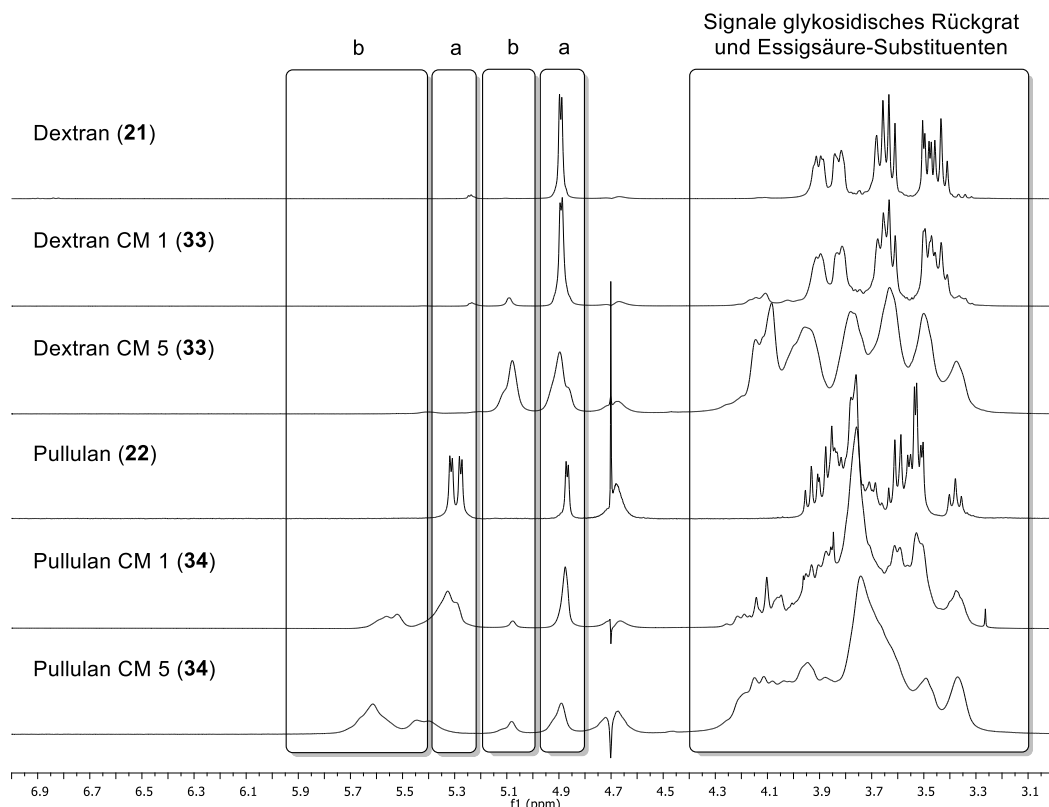


Abbildung 28: Gegenüberstellung der 1H NMR-Spektren von carboxymethyliertem Dextran (**33**) und carboxymethyliertem Pullulan (**34**) in D_2O . Hervorgehoben sind die Signale der anomeren Protonen unmodifizierter Subeinheiten (**a**), der anomeren Protonen von modifizierten glykosidischen Einheiten (**b**) und der CH_2 -Gruppe des eingebrachten Essigsäure-Rests sowie des glykosidischen Rückgrats.

Um die Funktionalisierung der unterschiedlichen Polysaccharide zu vereinheitlichen wurde folgende Nomenklatur verwendet. Zunächst wird das jeweilige Polysaccharid beschrieben, dann die Art der Reaktion und anschließend die Zahl der wiederholten Anwendungen der Reaktionen gemäß Schema 5. Daraus ergab sich für Dextran, welches fünfmal einer Carboxymethylierungs-Reaktion unterzogen wurde, der systematische Name Dextran CM 5.

Auch bei dieser Art der Modifizierung wurden die Proben zunächst mittels ^1H NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 28). Wie schon bei der Oxidation von Polysacchariden (Kapitel 4.1.1) festgestellt werden konnte, erwies sich die ^1H NMR-Spektroskopie auch bei der Carboxymethylierung von Polysacchariden nicht als geeignetes Mittel zur Quantifizierung des Substitutionsgrades. Die Ursache ist die hohe Anzahl verschiedener Substitutionsmöglichkeiten und die sich daraus ergebenden Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen am glykosidischen Rückgrat. Dies führte zu einer Signalverbreiterung. Zur Quantifizierung des Substitutionsgrades wurde in diesen Fällen ebenfalls eine Titrationsmethode herangezogen. Hierbei zeigten die Vorarbeiten von LECHNER *et al.*^[129] dass die direkte Titration von carboxymethylierten Polysacchariden aufgrund der Natrium-Ionen an der Carboxyl-Gruppe zu inkonsistenten Ergebnissen führte.

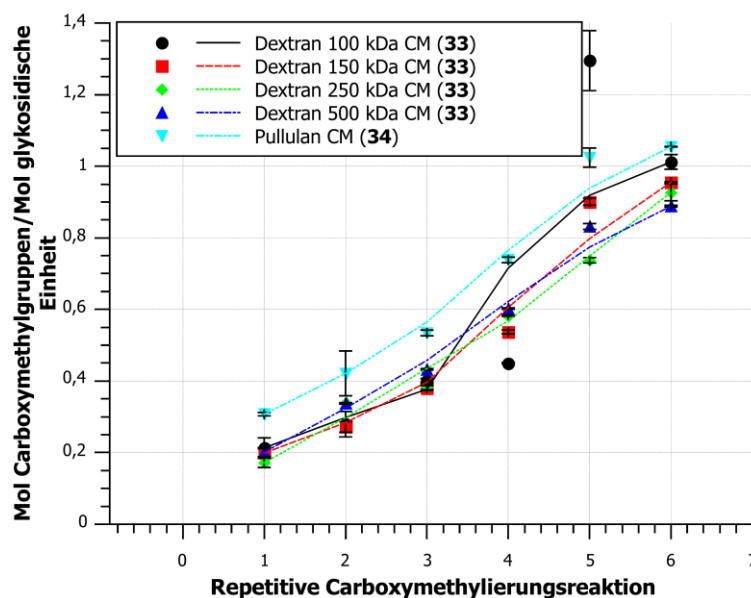


Abbildung 29: Auftragung der Ergebnisse der Titrations der carboxymethylierten Polysaccharide.

Aus diesem Grund wurden die carboxymethylierten Polysaccharide (**33** und **34**) nach einem Protokoll von ESTEVES *et al.*^[130] mit Methanol und Salpetersäure behandelt, um eine vollständige Protonierung der Carbonsäuren zu erreichen, mit MeOH gewaschen und die so vorbereiteten Polysaccharide anschließend in einer wässrigen NaOH-Lsg. gegen HCl zu

titrieren. Dabei repräsentierte die molare Differenz zwischen eingesetztem NaOH und gegentitriertem NaOH die Anzahl eingebrachter Carboxymethyl-Gruppen pro glykosidischer Einheit am Polysaccharid-Rückgrat. Dieses Verfahren wurde an allen Dextran CM-Derivaten (**33**, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und Pullulan CM-Derivaten (**34**) angewendet (Abbildung 29).

Es zeigte sich, dass der Substitutionsgrad gegen einen Wert von 1.0 mol Carboxymethyl-Gruppen/Mol glykosidischer Einheit verläuft, was auf eine sterische Hinderung der zweifach-Substitution einer einzelnen glykosidischen Einheit hindeutet. Unter Berücksichtigung der relativen Reaktivitäten der Hydroxygruppen von Glukose-Derivaten, wurde deutlich, warum nur eine Hydroxygruppe pro glykosidischer Einheit in der Carboxymethylierungsreaktion reagierte. Die 3-Position der Glukose ist, nach der durch glykosidische Bindungen belegten 6-Position, die Gruppe mit dem ausgeprägtesten nukleophilen Charakter.

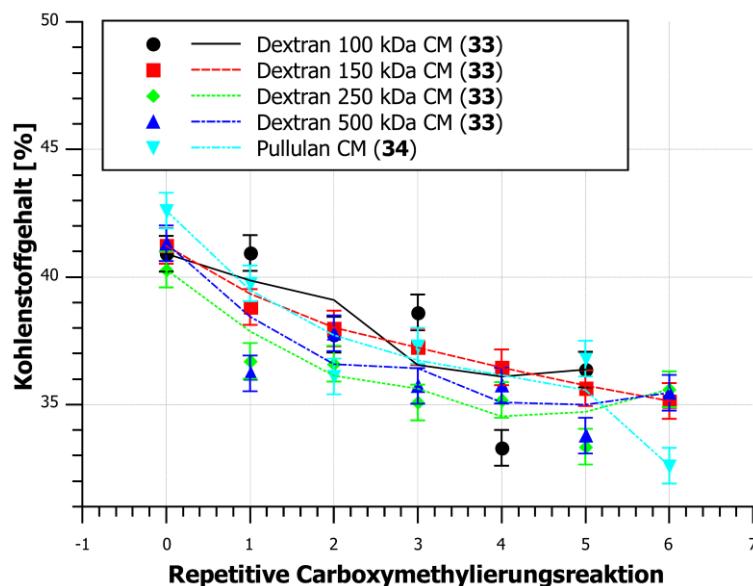


Abbildung 30: Zusammenfassung der elementaranalytischen Auswertung der Carboxymethylierung von Dextran (**33**) und Pullulan (**34**).

Bei Erstsubstitution der 3-Position wären somit die 2- und 4-Position sterisch noch mehr gehindert, so dass eine zweite Substitution in der gleichen glykosidischen Einheit weniger realistisch wird.^[131]

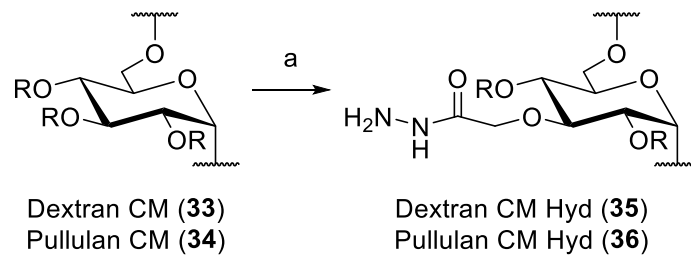
Wie schon die oxidierten Polysaccharide (**27**, **28**) wurden die carboxymethylierten Derivate (**33**, **34**) mittels Elementaranalyse untersucht (Abbildung 30). Diese Untersuchung offenbarte ebenfalls einen Trend bei der Substitution. Da bei der Carboxymethylierung von Polysacchariden prinzipiell ein Natriumacetat-Baustein eingefügt wird, also zwei

Kohlenstoffatome, zwei Sauerstoffatome, zwei Wasserstoffatome und eine schlechte definierbare Anzahl Natriumatomen, verringerte sich der Kohlenstoffgehalt mit Anzahl der repetitiven Reaktionen an den jeweiligen Substraten.

Die Verminderung des Kohlenstoffanteils verlief gegen einen Wert von ca. 36 % (Abbildung 30). Dabei wurde bei den ersten drei Carboxymethylierungen des entsprechenden Polysaccharids die größte Differenz im Vergleich mit dem unmodifizierten Polysaccharid festgestellt. Bei höheren angewendeten Carboxymethylierungsreaktionen wurde für alle modifizierten Substrate der Trend eines Plateaus notiert. Der Grund für diesen Trend liegt in der oben beschriebenen relativen Reaktivität der Hydroxygruppen und der nicht bevorzugten zweifachen Substitution einer einzelnen glykosidischen Subeinheit.

4.1.3 HYDRAZIDBILDUNG AN CARBOXYMETHYLIERTEM DEXTRAN UND PULLULAN

Um aus den dargestellten carboxymethylierten Dextran- (**33**) und Pullulan-Derivaten (**34**) die gewünschten Hydrazid-Komponenten zu generieren, wurde zunächst nach einem Protokoll von KIRSCHNING *et al.*^[67] vorgegangen. Bei diesem wurde zur Modifizierung von Hyaluronsäure zum Hydrazid ein Lösungsmittelgemisch aus DMSO und Wasser benötigt.



Schema 6: Darstellung von Hydrazid-modifiziertem Dextran CM (**35**) und Pullulan CM (**36**) mit $R=CH_2CO_2Na$, $CH_2CON_2H_3$ oder H. Reaktionsbedingungen: a) EDC, HOBT, DIPEA, Hydrazin-Hydrat (1 M in THF), H_2O , RT, 4 d.

Untersuchungen dieser Reaktion konnten zeigen, dass im Fall von Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) Wasser als Lösungsmittel benötigt ist, da die carboxymethylierten Polysaccharide (**33**, **34**) mit steigendem Carboxymethyl-Substitutionsgrad eine geringere Löslichkeit in DMSO bzw. DMSO-haltigen Lösungsmittelgemischen aufwiesen (Schema 6).

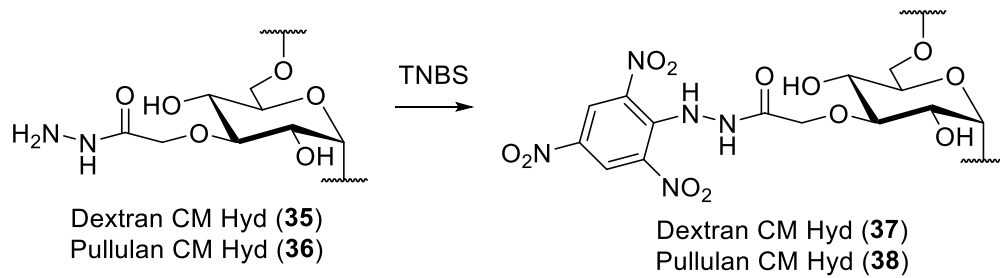


Abbildung 31: Allgemeine Abbildung der Umsetzung von Hydrazid-modifizierten Polysacchariden mit TNBS unter Bildung des Chromophors **37** bzw. **38**.

Von den carboxymethylierten und Hydrazid-modifizierten Polysacchariden wurden ^1H NMR-Spektren angefertigt, welche jedoch wegen des Austauschs von Deuterium mit den Protonen der Hydrazid-Funktion nicht von den Spektren der carboxymethylierten Substraten **33** und **34** zu unterscheiden waren. Um eine Aussage über den Substitutionsgrad zu treffen, wurden die dargestellten Polysaccharide Dextran CM Hyd (**35**) und Pullulan CM Hyd (**36**) in einem Assay^[132,133] zur Quantifizierung von primären Aminen mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) umgesetzt (Abbildung 31).

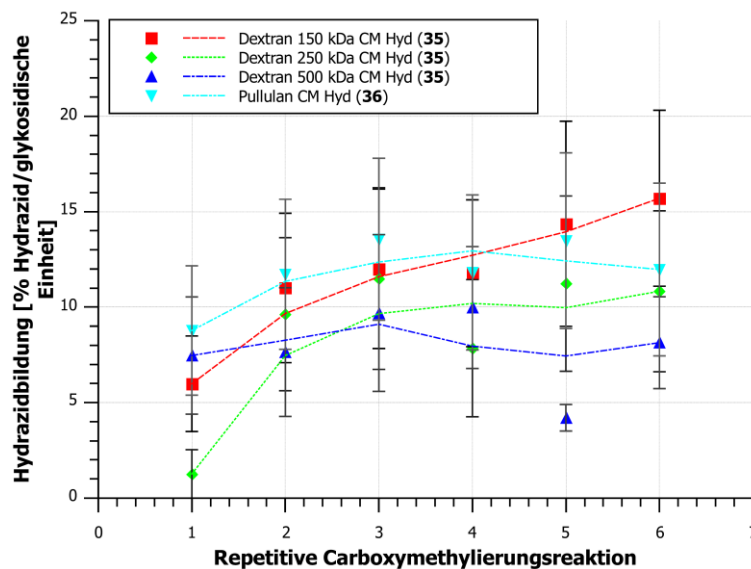


Abbildung 32: Auswertung der Ergebnisse des TNBS-Assays der einzelnen Dextran CM Hyd (**35**) und Pullulan CM Hyd (**36**) Komponenten. Aufgetragen sind die Prozente der Hydrazid-modifizierten Carboxylgruppen für die carboxymethylierten Polysaccharide.

Bei der Reaktion diente das Sulfit-Ion (SO_3^{2-}) als Abgangsgruppe und es wurde das Trinitrobenzol-Derivat **37** bzw. **38** gebildet, welches ein Absorptionsmaximum bei 325 nm aufwies. Hierüber wurde eine Standard-Kalibriergrade auf Basis von Glycin erstellt und so die Hydrazid-Funktionalisierungen der jeweiligen Polysaccharide quantifiziert (Abbildung 32).

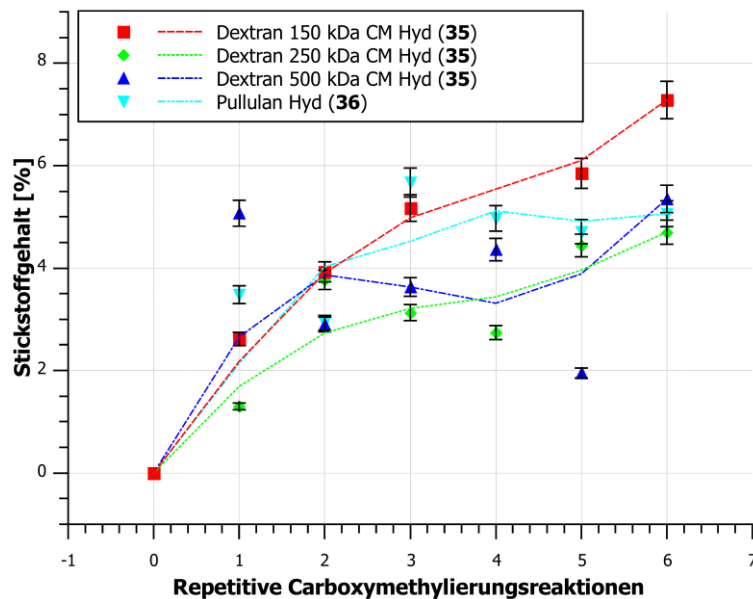


Abbildung 33: Zusammenfassung der elementaranalytischen Auswertung der Hydrazidbildung von Dextran CM (33) und Pullulan CM (34).

Es zeigte sich, dass der DS von Hydrazid-Funktionalitäten mit steigendem DS von Carboxymethylierungen ansteigt. Um dieses Ergebnis zu unterstützen, wurden die Proben nachträglich mittels Verbrennungsanalyse untersucht. Hierbei wurden abermals die gereinigten und gefriergetrockneten Polysaccharide vermessen und der Stickstoffanteil der Proben betrachtet (Abbildung 33).

Die CHN-Analysen der Hydrazid-modifizierten Polysaccharide (35, 36) lieferten einen ähnlichen Trend. Der Stickstoffanteil und der DS von Hydrazid-Funktionalitäten steigt mit erhöhtem Carboxymethylierungsgrad. Der Vergleich der photometrischen Untersuchungen mittels TNBS mit der elementaranalytischen Untersuchung offenbart, dass der relative Anstieg bei den carboxymethylierten Polysacchariden mit ein, oder zwei wiederholt durchgeführten Carboxymethylierungsreaktionen höher war als der Anstieg nach den folgenden Wiederholungen. Nach vier wiederholten Carboxymethylierungsreaktionen stellte sich ein Plateau des Funktionalisierungsgrades ein. Da diese Tendenz sowohl in der photometrischen, als auch in der CHN-Untersuchung zu erkennen war, wurde der große Fehler der Daten aus dem TNBS-Assay akzeptiert.

Das grundlegende Problem der TNBS-Methode für die Quantifizierung von Hydraziden ist die Verwendung des TNBS-Reagenzes selbst.^[134] Dabei handelt es sich um ein hydrolyseempfindliches Reagenz, welches ursprünglich für die Untersuchung von primären Aminen wie der Aminosäure Lysin in DMSO entwickelt wurde. Das Lösungsmittel DMSO ist in

der Lage, die aromatische Sulfonsäure zu stabilisieren und somit eine Hydrolyse zu verhindern. In wässrigen Lösungen entsteht jedoch die Picrylsäure, die ihr Absorptionsmaximum bei ca. 340 nm hat und somit die Ergebnisse des Chromophores aus Amin, bzw. Hydrazid und TNBS überdeckt und verfälscht.^[135] Außerdem wurde das gebildete Chromophor am Polysaccharid nicht wie in der Literatur für die Reaktion von primären Aminen beschrieben bei 335 nm, sondern bei 325 nm nachgewiesen. Dieses deutet darauf hin, dass sich der gewählte interne Standard, die Aminosäure Glycin, nicht für die TNBS-Methode zur Quantifizierung von Hydraziden geeignet ist (Abbildung 34).

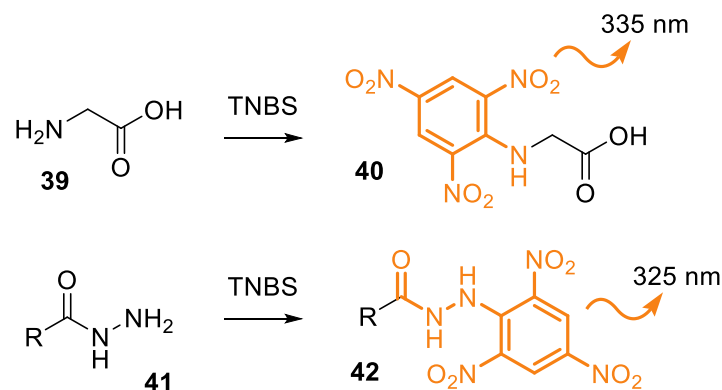


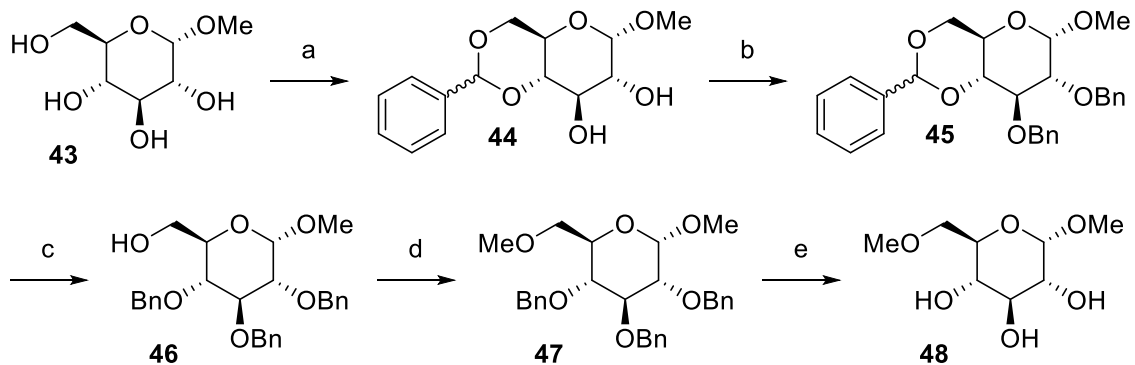
Abbildung 34: Gegenüberstellung der gebildeten Chromophore von Aminen und Hydraziden mittels TNBS.

Dennoch lieferte diese Methode eine gute Einschätzung des Hydrazid-Modifizierungsgrades an Polysacchariden. Das zeigt der Vergleich mit den Untersuchungen der Elementaranalyse. Um jedoch ein präziseres Analyseverfahren zu entwickeln und einen geeigneteren Standard zu generieren, wurde im Folgenden versucht einen Monomerausschnitt eines carboxymethylierten und Hydrazid-modifizierten Polysaccharids zu synthetisieren.

4.1.4 MONOMER-UNTERSUCHUNGEN EINES POLYSACCHARIDAUSSCHNITTS

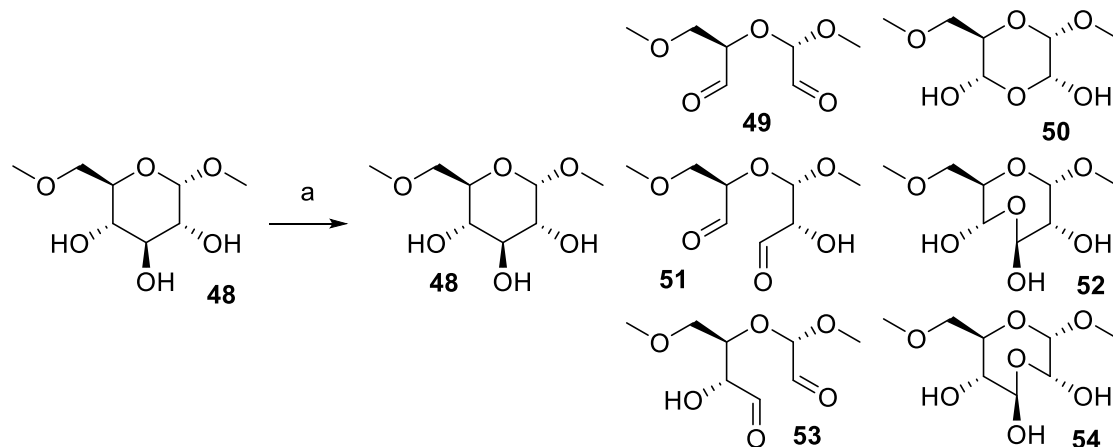
Die gezeigten Ungenauigkeiten insbesondere zur Bestimmung des Hydrazid-Funktionalisierungsgrades in Polysacchariden gaben Anlass ein Modell zu entwickeln, welches repräsentativ für die Modifizierungen der glykosidischen Einheiten an Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) steht. Dieses Modell sollte einen α -1,6-glykosidisch verknüpften Ausschnitt (**48**) aus dem Rückgrat der jeweiligen Polymere widerspiegeln. Anhand dieses Modells

sollten sowohl die Bildung der Hydrazide, als auch die Oxidation der Polysaccharide untersucht werden.



Schema 7: Darstellung des α -1,6-geschütztem Modells **48** eines Polysaccharids. Reaktionsbedingungen: a) Benzaldehyddimethylacetal, Camphersulfonsäure, MeCN, 95 °C, 4 h, 60 %; b) Benzylbromid, NaH, DMF, RT, 17 h, 78 %; c) LiAlH₄, AlCl₃, CH₂Cl₂/Et₂O (1:1), 50 °C, 3 h, 90 %; d) MeI, NaH, DMF, RT, 4 h, 97 %; e) Pd/C, H₂ (1 bar), MeOH, RT, 12 h, 60 %.

Kommerziell erhältliches Methyl α -D-glykopyranosid (**43**) diente als Startmaterial für die Synthese. Eine zweistufige Sequenz lieferte zunächst eine acetalische Schutzgruppe zwischen C-4 und C-6.^[136] Die verbliebenen Alkohole wurden mit Benzylgruppen^[137] versehen (Schema 7). Das resultierende Pyranosid (**45**) wurde anschließend selektiv an diesem Acetal geöffnet, so dass die 6-Position des Glykosids **46** freigesetzt wurde. Methylierung des Alkohols in C-6-Position und Hydrierung der Benzylgruppen lieferten das Zielmolekül **48**.^[137]



Schema 8: Oxidation des Monomerbausteins **48**. Reaktionsbedingungen: a) NaIO₄, H₂O, RT, 12 h.

Das 1,6-dimethylierte Glukosederivat **48** diente in den nachfolgenden Studien als Modell für eine α -1,6-glykosidische Einheit des Polymers. Zunächst wurde die Periodat-Oxidation an diesem Grundgerüst untersucht. Dafür wurde das Substrat **48** unter den gleichen Bedingungen oxidiert, die zuvor bei den Polysacchariden Dextran und Pullulan Verwendung fand. Diese Reaktion wurde zunächst massenspektrometrisch untersucht, wobei analoge Resultate wie bei den polymeren Substraten gefunden wurden. Demnach wurden bei einem

Einsatz von 1.1 Äq NaIO_4 eine Vielzahl von Oxidationsprodukten nachgewiesen. Das vicinale Triol wurde sowohl einfach (**51**, **53**), als auch mehrfach (**49**) oxidiert und es konnten sowohl die Aldehyd-Hydrate (**50**, **52**, **54**), als auch der unmodifizierte Grundbaustein (**48**) nachgewiesen werden. (Schema 8). Um ausreichende Mengen für die Durchführung von NMR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der oxidierten Monomerbausteinen (**49-54**) zu erhalten, wurde das Reaktionsprodukt über eine präparative HPLC (RP-C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 99:1→70:30 über 90 min) gereinigt.

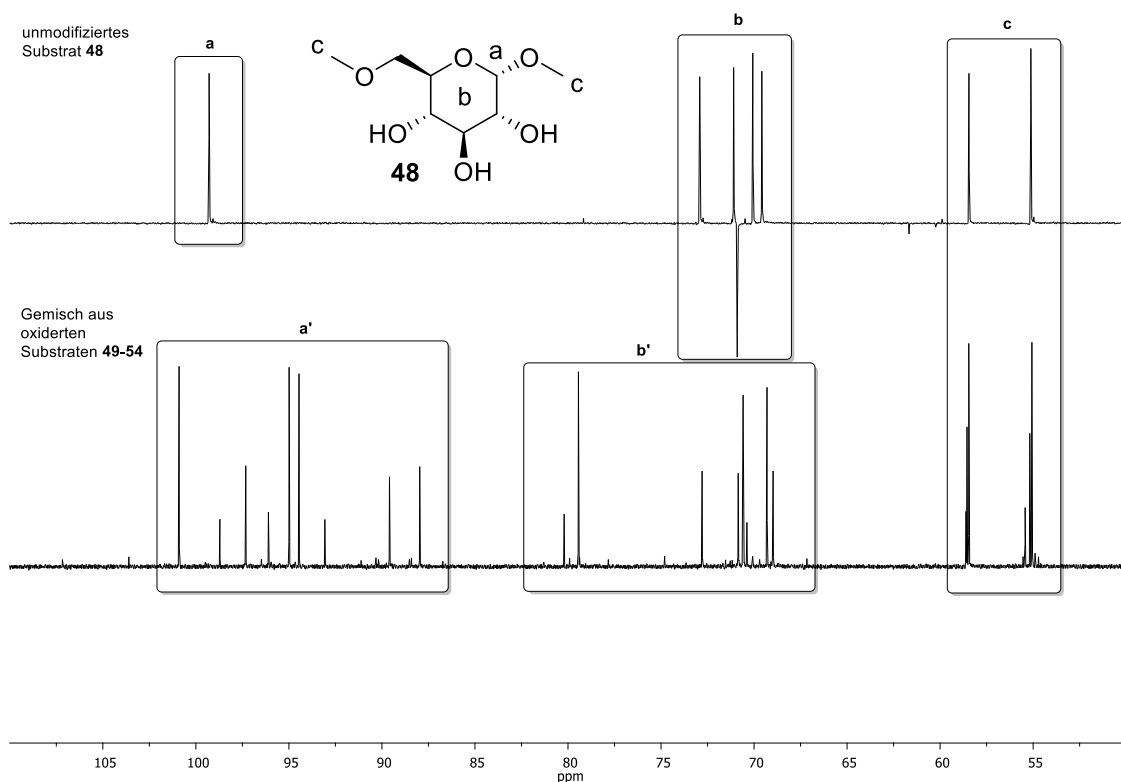


Abbildung 35: Vergleich der ^{13}C NMR-Spektren von **48** und seinen oxidierten Derivaten.

Die oxidierten Substrate wiesen eine ähnliche Retentionszeit auf und konnten nur als Gemisch isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht werden (Abbildung 35). Um die breite Palette der Oxidationsprodukte besser zu beschreiben, wurde das DEPT- ^{13}C NMR Spektrum des nicht modifizierten Monosaccharids **48** mit dem ^{13}C NMR-Spektrum des isolierten Gemisches verglichen. Die Analyse der Methylgruppen (Abbildung 35, c) offenbarte, dass drei unterschiedliche, oxidierte Monosaccharide in der Mischung vorlagen.

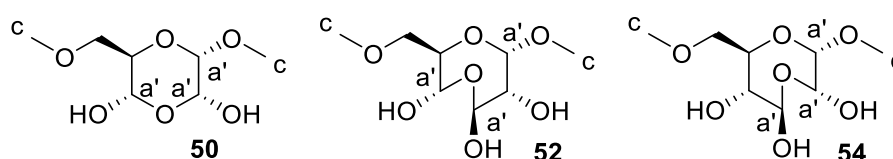


Abbildung 36: Monosaccharide, gebildet durch Oxidation des α -1,6-glykosidischen Modellsaccharids.

Die drei ^{13}C -Signale im Bereich um 58 ppm und die drei ^{13}C -Signale im Bereich um 55 ppm sind diagnostisch, da diese mit den sechs Methylgruppen der erwarteten Produkte korrelieren (Abbildung 36). Des Weiteren konnten im Bereich von 87 ppm bis 102 ppm neun ^{13}C -Signale den Acetalen bzw. Halbacetalen (Abbildung 36, a') zugeordnet werden. Zusätzlich wurden acht Signale im Bereich von 68 ppm bis 81 ppm detektiert, die den verbliebenen Kohlenstoffatomen der oxidierten Derivate **50**, **52** und **54** zugewiesen werden konnten. Wie erwartet, konnten im ^{13}C NMR-Spektrum (D_2O) keine Signale gefunden werden, die auf Aldehyde hinweisen, da diese vollständig zu den korrespondierenden Hydraten umgewandelt waren.

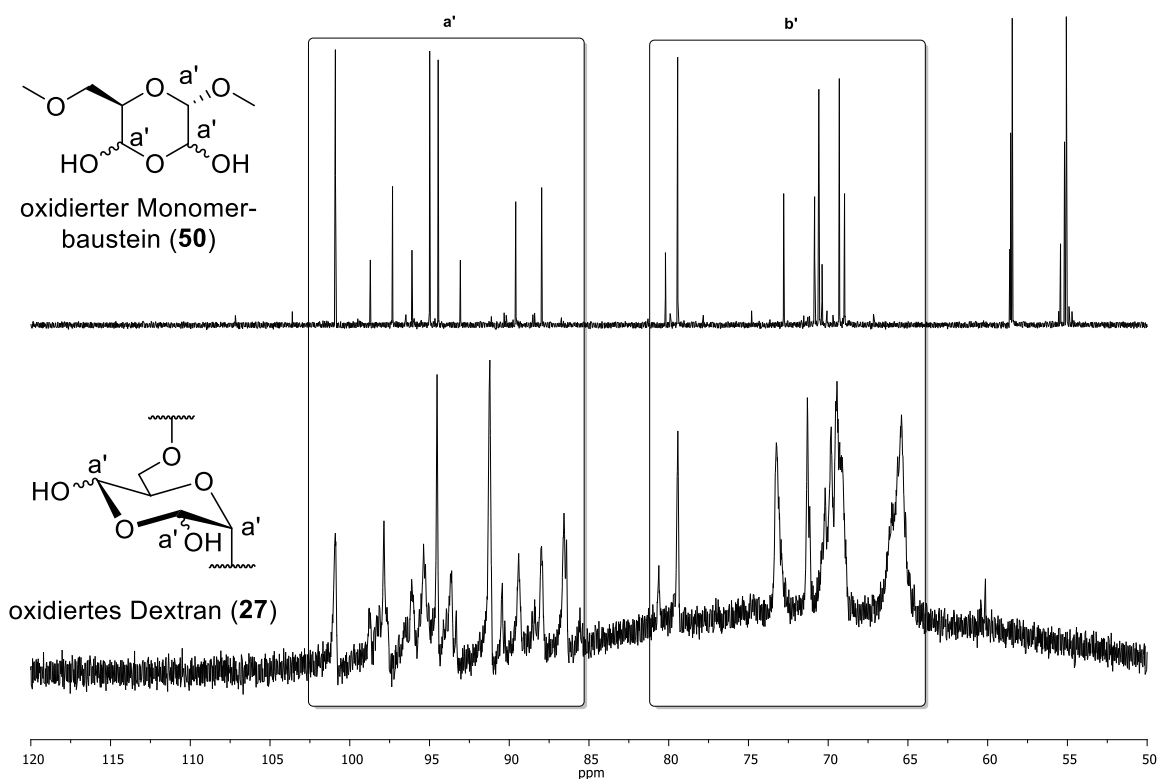
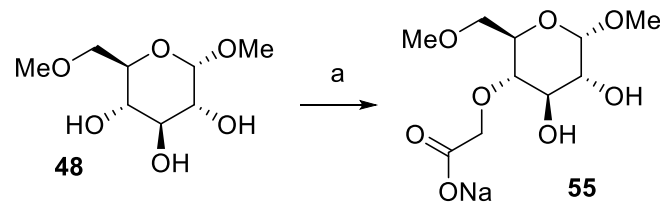


Abbildung 37: Vergleich der Oxidation des Monomerbausteins **48** mit dem oxidierten Dextran 100 kDa (**27**).

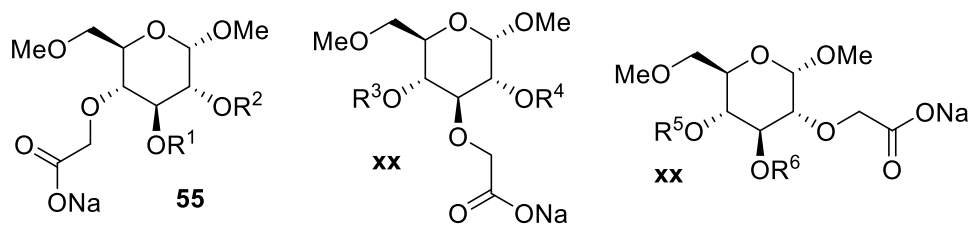
Um zu zeigen, dass sich das Monosaccharid-Modell (**48**) für die Untersuchungen an modifizierten Dextranen eignet, wurde das ^{13}C NMR-Spektrum eines der oxidierten Dextrane (**Kapitel 4.1.1**) mit der oxidierten Vergleichssubstanz (**50**, **52**, **54**) verglichen (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass sich bei der Oxidation von Dextran ein ähnliches Bild wie bei der Oxidation des synthetischen Monosaccharid-Modells ergab. Wie in Abbildung 37 gezeigt, lieferte die Oxidation Produkte des Dextrans, die eine Vielzahl von Kohlenatomen mit chemischen Verschiebungen von 85 ppm bis 102 ppm besitzen, dem Bereich der Acetal- bzw. Halbacetal-Kohlenstoffatome. Auch die chemischen Verschiebungen der weiteren

Kohlenstoffatome bei 65 ppm bis 82 ppm glichen denen des oxidierten Monosaccharids (**50**, **52**, **54**). Das Monosaccharid-Modell erlaubte zwar nicht, die Oxidationsprodukte im Polymer zu quantifizieren, es zeigte sich aber, dass selbst bei Einsatz größerer Mengen von NaIO_4 das anomere Kohlenstoff intakt bleibt und damit die Kohlenhydratkette nicht gespalten wird.



Schema 9: Carboxymethylierung von **48** zum Vergleich der Carboxymethylierung von Dextran (**27**) und Pullulan (**28**). Reaktionsbedingungen: a) 2-Chloressigsäure, NaOH (8 M), H_2O , 62 °C, 1.5 h, 15 %.

Im Folgenden wurden die Bedingungen zu Einführung eines Carboxylats in **48** untersucht. Hierfür wurden zunächst die Bedingungen der Carboxymethylierung von Polysacchariden auf das Monosaccharid **48** übertragen (Schema 9). Die Carboxymethylierung verläuft beim Modell überwiegend an der C-4-Position (**55**). Es war jedoch nicht möglich das Produktgemisch der unterschiedlichen Positionsisomere (2- und 3-Position) voneinander zu trennen. Die Analyse der hochaufgelösten Massenspektren zeigte zusätzlich, dass die Mehrfachsubstitution eines glykosidischen Bausteins prinzipiell möglich ist. Als Ergebnis der Carboxymethylierungsreaktion können somit die Strukturen in Abbildung 38 festgehalten werden.



55 für $\text{R}^1=\text{H}$ und $\text{R}^2=\text{H}$; **56** für $\text{R}^3=\text{H}$ und $\text{R}^4=\text{H}$; **57** für $\text{R}^5=\text{H}$ und $\text{R}^6=\text{H}$

58 für $\text{R}^1=\text{H}$ und $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$; **59** für $\text{R}^3=\text{H}$ und $\text{R}^4=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$; **60** für $\text{R}^5=\text{H}$ und $\text{R}^6=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$

61 für $\text{R}^1=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$ und $\text{R}^2=\text{H}$; **62** für $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$ und $\text{R}^4=\text{H}$; **63** für $\text{R}^5=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$ und $\text{R}^6=\text{H}$

Abbildung 38: Darstellung des Produktgemisches einer Carboxymethylierungsreaktion an **48**.

Auch die ^{13}C NMR-Spektren der carboxymethylierten Monosaccharid-Bausteine wurden mit denen des Dextrans verglichen (Abbildung 39). Diese zeigen ein ähnliches Signalmuster wie die Carboxymethylierungsprodukte des Dextrans. Bemerkenswert ist, dass die ^{13}C -Signale des Essigsäurerestes **b** und **b'** als unklare und breite Signale erschienen.

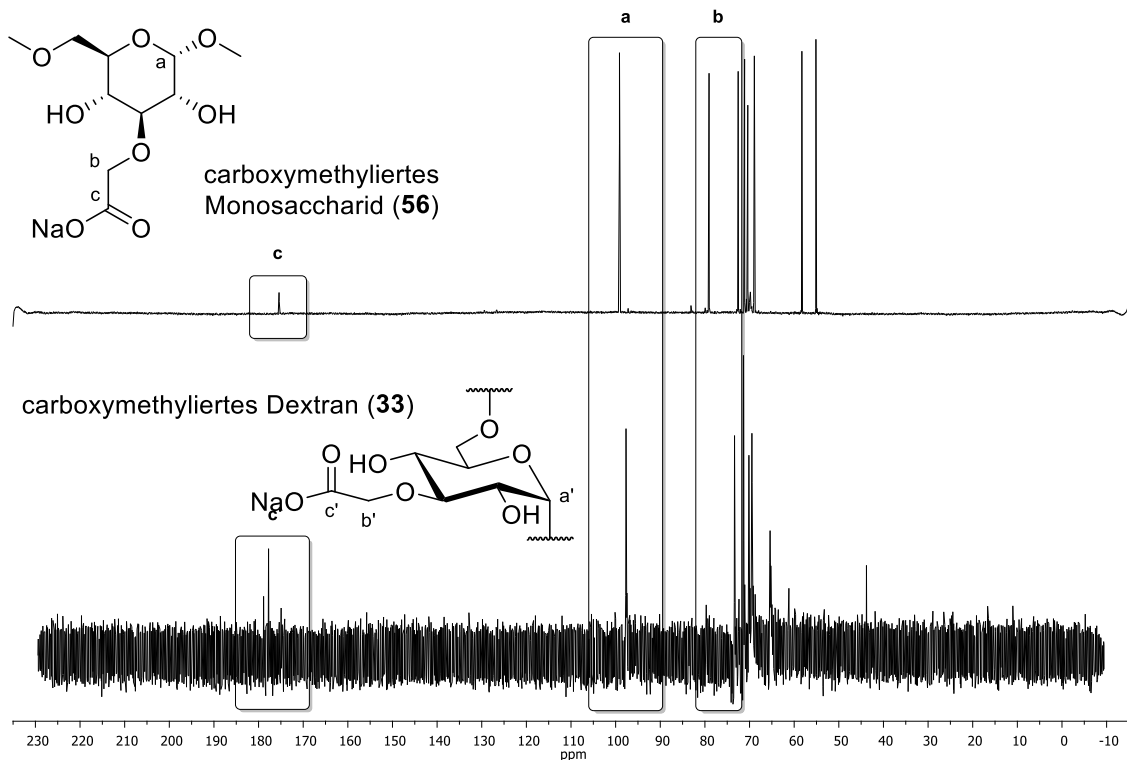
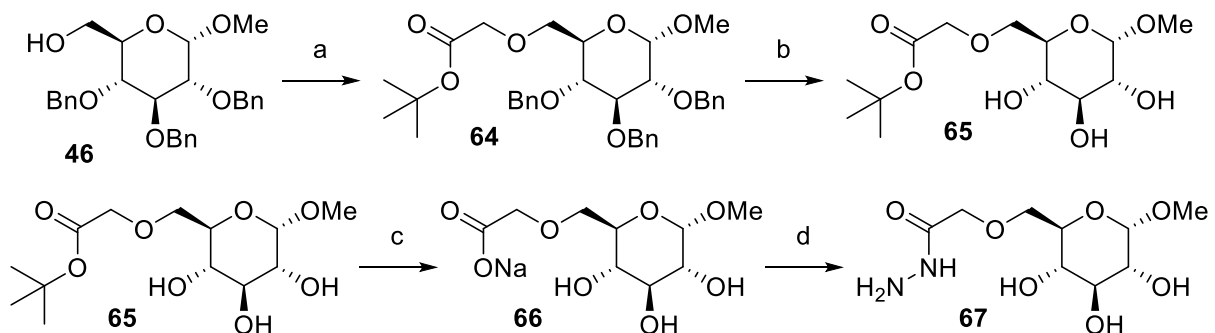


Abbildung 39: Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren des carboxymethylierten Monosaccharids (**56**) mit dem des carboxymethylierten Dextrans (**33**). Hervorgehoben sind die ¹³C-Signale des anomeren Protons (**a**, **a'**) und der eingebrachten Carboxymethylfunktion (**b**, **b'**, **c**, **c'**).

Diese Signalverbreiterung verweist auf eine Vielzahl unterschiedlicher Substitutionsmuster am Rückgrat des Polysaccharids. Allerdings lässt das ¹³C-Spektrum auch hier keine Quantifizierung des Substitutionsgrades zu.



Schema 10: Darstellung des Hydrazid-Standards **67** ausgehend von **46**. Reaktionsbedingungen: a) NaH, BrCH₂CO₂tBu, DMF, RT, 3 h, 85 %; b) H₂/Pd/C MeOH, RT, 12 h, 94 %; c) TFA, Et₃SiH, CH₂Cl₂, RT, 12 h, 96 %; d) EDC, HOBt, DIPEA, N₂H₄ (1 M in THF), RT, 4 d, nur in Spuren erhalten.

Die vorliegenden Untersuchungen zur Carboxymethylierung von **48** liefern einen guten Einblick in die Reaktionswege. Die Umsetzungen zu den carboxymethylierten Monosacchariden sind jedoch zu unselektiv für die Darstellung einer Standardsubstanz für den TNBS-Assay. Aus diesem Grund wurde die Strategie abgeändert und ausgehend von dem Alkohol **46** die direkte Einbringung des Carboxylbausteins in 6-Position des glykosidischen

Grundgerüsts unter Bildung von **64** durchgeführt. Ein selektiver Reaktionsweg^[138] zu **67** (Schema 10) konnte ausgehend von dem Monosaccharid **66** in drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 77 % präpariert werden. Die guten Ausbeuten qualifizierten diesen Syntheseweg als idealen Zugang zu dem Vergleichssaccharid **67** für den TNBS-Assay. Aus technischen Gründen konnte **67** jedoch nicht Isoliert werden.

4.2 DARSTELLUNG VON HYDROGELEN

Um aus den dargestellten Materialien ein Hydrogel zu bilden, wurden die Hydrazid-Komponenten und die Aldehyd-Komponenten in wässriger Lösung miteinander vermengt. Die modifizierten Polysaccharide konnten so in einer Kondensationsreaktion zu den korrespondierenden Hydrazonen reagieren und somit miteinander vernetzt werden. Diese Methode wurde, wie in Kapitel 2.32 erläutert, bereits von KIRSCHNING *et al.*^[67] an Hyaluronsäure und Alginat erfolgreich realisiert.

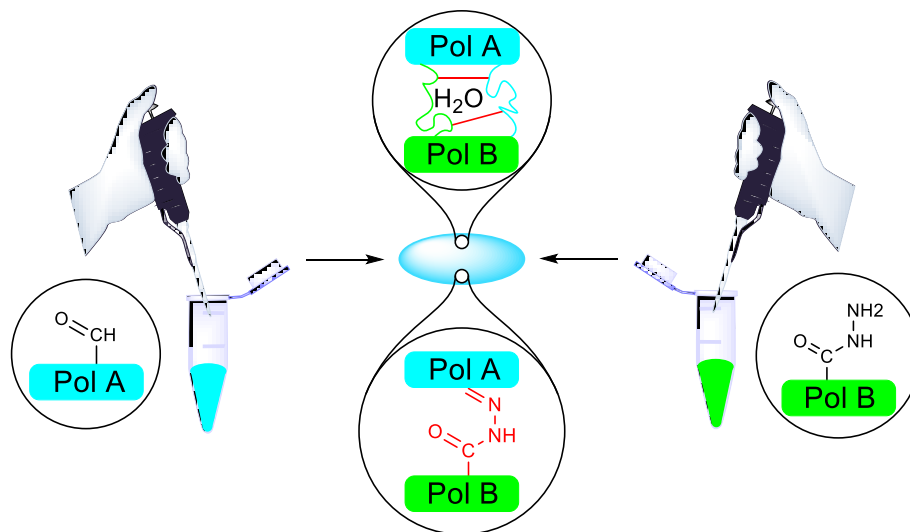


Abbildung 40: Allgemeine, präparative Methode zur Darstellung von Hydrogelen basierend auf Hydrazid- und Aldehyd-modifizierten Polysacchariden (Pol A und Pol B).

Diese Art der Vernetzung von Polysacchariden wurde auch im Rahmen dieser Arbeit für die Darstellung von Hydrogelen basierend auf Dextran und Pullulan angewendet. Hierbei wurden gleiche Volumina einer wässrigen Lösung der Aldehyd- und Hydrazid-Komponente (20 mg/mL) miteinander gemischt (Abbildung 40). Die Fähigkeit der funktionalisierten Polysaccharide durch Quervernetzung ein Hydrogel auszubilden wurde nach der erfolgreichen Darstellung durch Änderung der Viskosität beim Mischvorgang untersucht.

Hierfür wurden wässrige Lösungen der Materialien mit dem korrespondierenden Hyaluronsäure-Derivat (Aldehyde mit dem Hyaluronsäure Hydrazid und Hydrazide mit dem Hyaluronsäure Aldehyd) vermischt und danach die Änderung der Viskosität untersucht. Um von diesen Gelierungsexperimenten qualitative Daten und somit Rückschlüsse auf die Qualität der Vernetzung und des gebildeten Hydrogels zu erhalten, wurde eine Methode für die präparierten Dextran- und Pullulan-Derivate entwickelt nach der es möglich war den Grad der Quervernetzung und die Wasseraufnahmefähigkeit zu bestimmen.

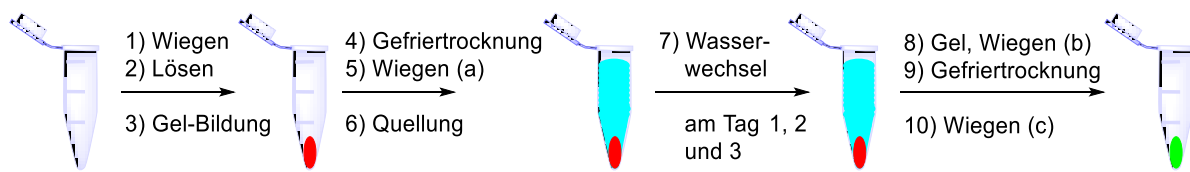


Abbildung 41: Darstellung des entwickelten Prozessablaufs zur Charakterisierung der dargestellten Hydrogele.

Diese Methodik konnte zusätzlich eine Aussage über den Zusammenhang zwischen der Eigenschaft des Gels, dem Grad der Modifizierung und des durchschnittlichen Molekulargewichts liefern. Die entwickelte Methode besteht aus zehn Schritten. Zunächst wurden die Gele in einem Eppendorf-Gefäß mit jeweils 100 μL der Aldehyd- und Hydrazid-Komponente (20 mg/mL) gebildet (Abbildung 41, 1-3).

Für diese Gelierexperimente wurden 2.0 mg des jeweiligen Polysaccharids untersucht, sodass jedes der Gele einen Gehalt von 4.0 mg Polysaccharid besaß. Um einen sich ergebenden Wägefehler herauszurechnen, wurden diese Gele gefriergetrocknet und gewogen (Abbildung 41, 4-5, Wiegen (a)). Dann wurde das gefriergetrocknete Gel in ca. 1.5 mL deion. H_2O aufgenommen und über drei Tage durch stetigen Wasserwechsel gewaschen (Abbildung 41, 6-7). Dieser Waschprozess sollte die nicht vernetzten Komponenten der Polysaccharide entfernen und so die Bestimmung des tatsächlichen Vernetzungsgrades ermöglichen. Diese gequollenen Hydrogele wurden daraufhin auf einem Filterpapier kurzzeitig getrocknet, um das überschüssige Wasser (Kapitel 2.3) zu entfernen. Dann wurden sie gewogen (Abbildung 40, Wiegen (b)) und erneut gefriergetrocknet (Abbildung 41, 8-9). Durch ein erneutes Wiegen (Abbildung 40, Wiegen (c)) der gefriergetrockneten Gele (Abbildung 41, 10) konnte der eigentliche Gehalt an Polysaccharid in den gequollenen Hydrogelen ermittelt und somit der eigentliche Vernetzungsgrad bestimmt werden. Die Wasseraufnahme und der Vernetzungsgrad (Formel 1, Formel 2) der dargestellten Hydrogele wurde wie folgt berechnet:

Formel 1:
$$\text{Vernetzungsgrad} = \frac{\text{Wiegen (a)}}{\text{Wiegen (c)}}$$

Formel 2:
$$\text{Wasseraufnahme} = \text{Wiegen (b)} - \text{Wiegen (c)}$$

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst und über einen Farb-Code, der jeweils an der rechten Bildkante erläutert ist, veranschaulicht. Im Allgemeinen wird deutlich, dass der Messfehler bei niedrigem Vernetzungsgrad größer ist, als vergleichbare Proben mit hohem Vernetzungsgrad. Grund hierfür ist die hohe Wasseraufnahme solcher niedrig-vernetzten Gele und damit ein Verlust des Netzwerkes beim Trocknungsvorgang. Dennoch ließen diese Versuchsreihen Rückschlüsse auf die Möglichkeit der gezielten Änderung der physikalischen Eigenschaften eines Hydrogels zu.



Abbildung 42: Vernetzungsgrad und Fähigkeit zur Wasseraufnahme der Hydrogele bestehend aus oxidierten Dextran-Derivaten (27) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa und verschiedenen Hydrazid-Komponenten (35, 36).

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, hat ein hoher Vernetzungsgrad einen Einfluss auf die Porengröße des Netzwerkes und somit auf die Wasseraufnahmefähigkeit. Dieses Phänomen zeigte sich sehr anschaulich bei der ersten Versuchsreihe, in der die Dextran 100 kDa Ox-Derivate (27) untersucht wurden (Abbildung 42). Hier verhielt sich die Wasseraufnahme umgekehrt proportional zum Vernetzungsgrad. Innerhalb einer Hydrazid-Reihe, z.B. Dextran 100 kDa CM 1 Hyd (35), sinkt prinzipiell der Vernetzungsgrad mit steigendem Oxidationsgrad der Dextran 100 kDa Ox-Derivate (27). Diese Beobachtung wurde in unterschiedlichem Ausmaß bei allen Versuchsreihen gemacht und deutet auf die in Kapitel 2.3 beschriebenen unterschiedlichen Bindungsarten des Wassers in einem Hydrogel hin. Dabei wird deutlich, dass die Limitierung der Vernetzung durch die Hydrazid-

Komponente bedingt wird und die überschüssigen, nicht vernetzten Aldehyd-Funktionen dazu dienen, Wasser kovalent unter Bildung der Hydrate und durch Hydrathüllen zu binden. Des Weiteren stellt das Dextran 250 kDa CM 1 Hyd (35) einen Grenzfall zwischen weichen Hydrogelen die zu einer hohen Wasseraufnahme (von ca. 0.30 g bis ca. 1.40 g pro 4.0 mg Polysaccharid) befähigt sind dar und solchen, die nur über niedrige Wasseraufnahmefähigkeiten (von ca. 0.08 g bis ca. 0.20 g pro 4.0 mg Polysaccharid) verfügen.



Abbildung 43: Vernetzungsgrad und Fähigkeit zur Wasseraufnahme der Hydrogele bestehend aus oxidierten Dextran-Derivaten (27) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 150 kDa und verschiedenen Hydrazid-Komponenten (35, 36).

Beim Vergleich der Abbildung 42 und Abbildung 43 wird ersichtlich, dass die modifizierten Dextrane (27) mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa bzw. 150 kDa in den Parametern Vernetzungsgrad und Wasseraufnahmefähigkeit starke Ähnlichkeiten aufweisen. Bei der Verwendung von Dextran 250 kDa als Aldehyd-Komponente (27) hingegen (Abbildung 44) wurde eine maximale Wasseraufnahme von ca. 0.5 g pro 4.0 mg Polysaccharid gemessen.



Abbildung 44: Vernetzungsgrad und Fähigkeit zur Wasseraufnahme der Hydrogele bestehend aus oxidierten Dextran-Derivaten (27) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 250 kDa und verschiedenen Hydrazid-Komponenten (35, 36).

Da die Vernetzungsgrade vergleichbar zu denen mit Dextran 100 kDa und Dextran 150 kDa (27) waren, bedeutet dies, dass die Porengröße und somit die Wasseraufnahmefähigkeit der gequollenen Hydrogele nicht über ein höheres durchschnittliches Molekulargewicht vergrößert werden konnte. Trotzdem besitzt das Dextran 250 kDa Ox (27) ähnliche Eigenschaften wie die anderen oxidierten Dextran-Derivate.



Abbildung 45: Vernetzungsgrad und Fähigkeit zur Wasseraufnahme der Hydrogele bestehend aus oxidierten Dextran-Derivaten (27) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 500 kDa und verschiedenen Hydrazid-Komponenten (35, 36).

Im Fall von Dextran 250 kDa CM 2 Hyd (35) wurde ebenfalls ein Grenzfall in Bezug auf den Vernetzungsgrad und die Wasseraufnahmefähigkeit festgestellt. Die These, dass das durchschnittliche Molekulargewicht der Aldehyd-Komponente in diesen Versuchsreihen einen Einfluss auf die Wasseraufnahme hat, wurde durch das Dextran 500 kDa Ox (27)

zusätzlich bestärkt. Hier konnte die größte Wasseraufnahme um 0.3 g pro 4.0 mg Polysaccharid bei ähnlich hohem Vernetzungsgrad (Abbildung 45) verzeichnet werden.

Auch hier wurde eine markante Änderung der Wasseraufnahme und des Vernetzungsgrads bei der Hydrazid-Komponente Dextran 250 kDa CM 1 Hyd (35) festgestellt. Jedoch war der Unterschied der beiden Bereiche nicht mehr so ausgeprägt wie es beispielsweise bei dem oxidierten Dextran (27) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa (Abbildung 42) beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den Dextranen (27) zeigte oxidiertes Pullulan (28) einen anderen Zusammenhang zwischen Funktionalisierungsgrad und Wasseraufnahme (Abbildung 46). Die Fähigkeit zur Wasseraufnahme sinkt hier mit steigendem Oxidationsgrad des Pullulans (28). Ferner wurde beim Gelierprozess beobachtet, dass Pullulan Derivate beim Vermengen mit der Hydrazid-Komponente (35, 36) weitaus schneller ihre Viskosität ändern als die gleichartig funktionalisierten Dextran-Aldehyd-Komponenten (27).



Abbildung 46: Vernetzungsgrad und Fähigkeit zur Wasseraufnahme der Hydrogele bestehend aus oxidierten Pullulan-Derivaten (28) und verschiedenen Hydrazid-Komponenten (35, 36).

Diese Beobachtung erklärt zusätzlich den schwankenden Vernetzungsgrad in einer Versuchsreihe und die damit verbundene geringe Fähigkeit zur Wasseraufnahme. Bei genauer Betrachtung der Hydrogele aus Pullulan Ox 0.2-1.1 (28) und den jeweiligen Hydraziden CM 1-4 Hyd (35, 36) gleichem durchschnittlichen Molekulargewichts zeigt sich, dass der Vernetzungsgrad vom Substitutionsgrad der Hydrazid-Komponente abhängt. So wird bei einem Hydrogel, erzeugt aus Pullulan Ox 0.2 (28) und Dextran 250 kDa CM 1 Hyd (35) einen Vernetzungsgrad von 1.0 beobachtet. Ein anderes Hydrogel bestehend aus Pullulan Ox 1.1 (28) und Dextran 250 kDa CM 4 Hyd (35) hingegen weist nur einen

Vernetzungsgrad von ca. 0.85 auf. Dies zeigt, dass eine zu schnelle Kondensationsreaktion der beiden Komponenten und die damit verbundene rasche Gelbildung den Ausschluss von funktionellen Gruppen nach sich zieht. Dies resultiert schließlich in einer Änderung der Eigenschaften dieser Gele. Dadurch wurde zwar immer noch ein hochvernetztes, stabiles Gel gebildet, jedoch konnten nicht alle modifizierten Polysaccharidstränge der Probe zur Gelbildung beitragen.

Durch diese Versuche konnten die Wasseraufnahmefähigkeit und der Vernetzungsgrad in Abhängigkeit des Modifikationsgrades und des durchschnittlichen Molekulargewichts der einzelnen Komponenten untersucht werden. Sie manifestieren sich in der Festigkeit der Hydrogele. Rheologische Messungen sollten im Folgenden quantifizierbare Aussagen zu diesen Eigenschaften ergeben.

4.2.1 RHEOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AUSGEWÄHLTER HYDROGELE

Zur rheologischen Untersuchung werden Scherkräfte auf einen Festkörper, bzw. eine Probe, ausgeübt und dadurch die visko-elastischen Eigenschaften bestimmt.^[139] Bei der Messung von gelartige Polymeren liefert diese Methode Aussagen darüber ob es sich um Festkörper, oder Flüssigkeiten handelt. Für die rheologischen Untersuchungen wurden ausgewählte Hydrazid- und Aldehyd-Komponenten herangezogen.

Tabelle 3: Aufschlüsselung des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') nach Flüssigkeiten und Feststoffen

	Flüssigkeiten	Sol-Gel-Übergänge	Feststoffe	
Materialverhalten	ideal-viskos	visko-elastisch	Ideal-elastisch	
Speicher- und Verlustmodul	$G'' \gg G'$ und $G'' > G'$	$G'' = G'$	$G'' < G'$	$G'' \ll G'$

Durch diese Untersuchung kann über die aufgenommene mechanische Energie der Aggregatzustand bestimmt werden. Hierbei gelten die physikalischen Zusammenhänge nach dem Hookeschen Gesetz gemäß Tabelle 3 von Speichermodul (G') und Verlustmodul (G''). Das Speichermodul (G') stellt den sogenannten Realteil dar und gibt an wieviel der mechanischen Energie der einwirkenden Scherkräfte vom Material gespeichert werden. Das Verlustmodul hingegen beschreibt die gestreute bzw. freigegebene Energie und ist der sogenannte Imaginärteil des Elastizitätsmoduls.

In diesem Sinne gelten Hydrogele als visko-elastische Feststoffe^[140], was auch für den Gelbildungsprozess der vorliegenden Proben beschrieben werden konnte (Abbildung 47). In dem gezeigten Beispiel einer Hydrogel-Bildung wird dieser Übergang von Flüssigkeit zu einem visko-elastischem Verhalten ebenfalls deutlich.

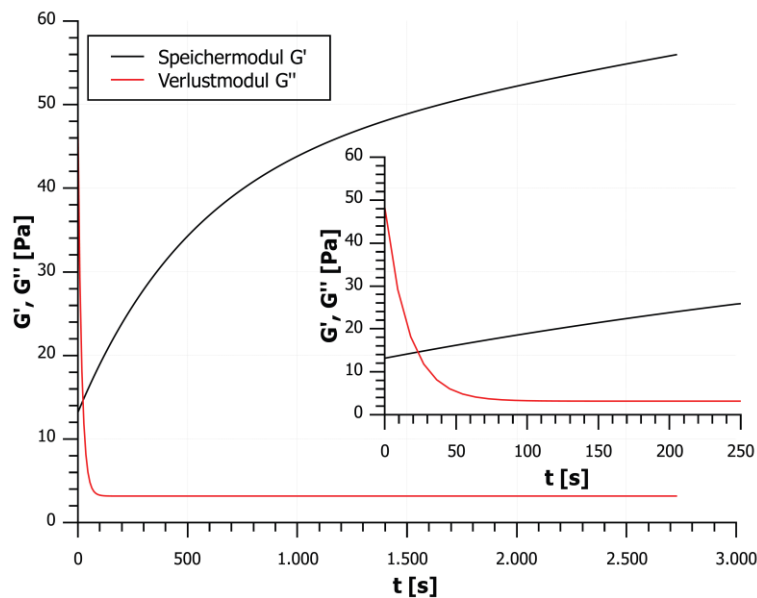


Abbildung 47: Abbildung der rheologischen Untersuchung einer Gelbildung aus Dextran 250 kDa CM 4 Hyd (35) und Dextran 150 kDa Ox 0.5 (27) und das Verhalten des zugehörigen Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'').

Zu Beginn der Messung lagen beide Komponenten als Flüssigkeiten vor. Daher weist das Verlustmodul (G'') einen höheren Wert als das Speichermodul (G') auf. Nach wenigen Sekunden kann ein Schnittpunkt der beiden Graphen verzeichnet werden. Dieser Schnittpunkt repräsentiert den Sol-Gel-Übergang, bei dem das Speichermodul gleich dem Verlustmodul ist (Tabelle 3, $G'' = G'$). Nachfolgend steigt das Speichermodul an und nähert sich einem Grenzwert, dem tatsächlichen Speichermodul des jeweiligen Materials an.

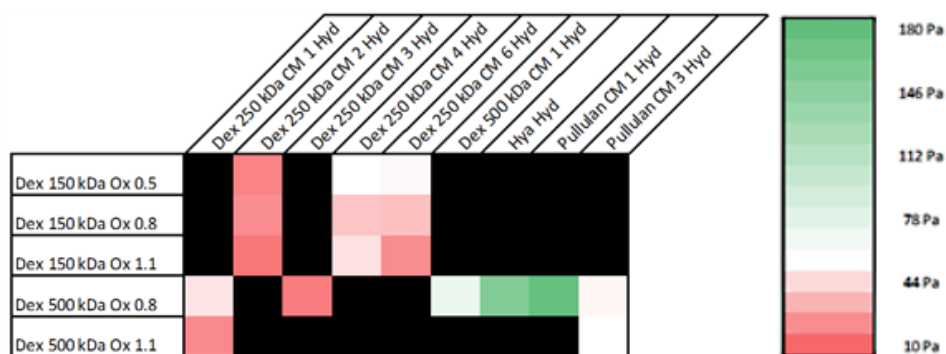


Abbildung 48: Übersicht der Speichermodule (G') bei einer stichprobenartigen, rheologischen Untersuchung der präparierten Hydrogele.

Durch eine stichprobenartige Auswahl verschiedener Komponenten sollte ein Zusammenhang zwischen der Größe des Speichermoduls der Hydrogele und dem Vernetzungsgrad bzw. der Wasseraufnahmefähigkeit untersucht werden. Hier zeigte sich zunächst, dass die gebildeten Hydrogele auf der Basis von Dextran ein geringes Speichermodul aufwiesen. Zum Vergleich konnte in einer Arbeit von KIRSCHNING *et al.*^[67] für ein Hydrogel, welches ausschließlich auf Hyaluronsäure-Komponenten basierte, ein Speichermodul von ca. 200 Pa nachgewiesen werden. Die hier untersuchten Hydrogele hatten im Durchschnitt ein Speichermodul von ca. 60 Pa (Abbildung 48). Einzig ein Blend-Material aus Pullulan CM 1 Hyd (36) und Dextran 500 kDa Ox 0.8 (27) zeigt mit einem Speichermodul von ca. 180 Pa ein ähnliches visko-elastisches Verhalten wie die reinen Hyaluronsäure Proben.

Die aus den rheologischen Messungen gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend mit dem Vernetzungsgrad und der Wasseraufnahme der ausgewählten Blend-Materialien verglichen (Abbildung 49). Demnach hätten die hoch-vernetzten Hydrogele auch ein größeres Speichermodul als die niedrig-vernetzten Hydrogele aufweisen müssen, was allerdings nur beim Pullulan CM 1 Hyd (36) zutraf.

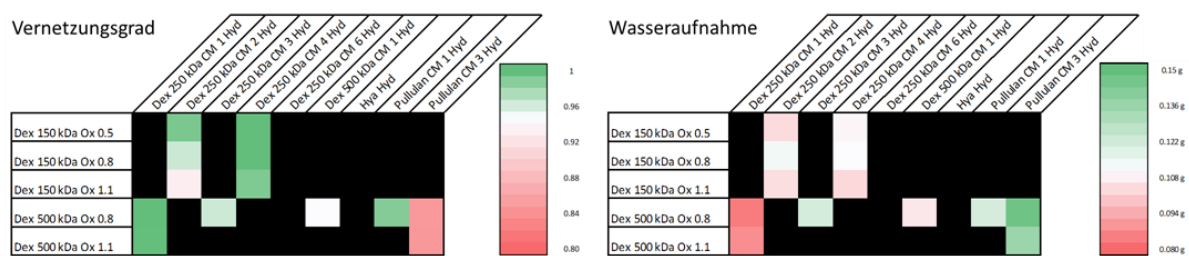


Abbildung 49: Vergleich von Vernetzungsgrad und Wasseraufnahmefähigkeit der Hydrogele, welche rheologisch untersucht wurden.

Offensichtlich kann aufgrund der unterschiedlichen Herangehensweisen beim Gelierungsprozess kein direkter Vergleich gezogen werden. Die Arbeiten von DEGHANI *et al.*^[141] zeigten, dass die Stärke des angelegten Vakuums bei der Gefriertrocknung von Hydrogelen einen Einfluss auf die Porengröße hat. Deshalb wurde eine repräsentative Gelierung und Quellung ohne zwischengeschaltete Gefriertrocknung durchgeführt. Hierfür wurde ein Hydrogel aus den Komponenten Dextran 100 kDa CM 1 Hyd (36) und Dextran 100 kDa Ox 0.2 (27) gewählt, für das in den vorhergegangenen Untersuchungen eine Wasseraufnahme von ca. 1.0 g bestimmt wurde. Die Quellung des so behandelten Materials ohne zwischenzeitige Gefriertrocknung zeigte jedoch nur eine Wasseraufnahme von

ca. 0.3 g. Das deutet auf die Zerstörung des dreidimensionalen Netzwerkes während des Gefriertrocknungsprozesses und der damit verbundenen Vergrößerung der Poren hin. Dies wiederum erklärte die größere Wasseraufnahmefähigkeit bei gefriergetrockneten Gel-Proben.

4.2.2 ANWENDUNG DER HYDROGELE ZUR EINBETTUNG VON MYOKARDIALEN STAMMZELLEN

Nachdem eine Vielzahl von verschiedenen Hydrogelen über die Hydrazon-bildende pseudo-„Click“-Reaktion hergestellt und charakterisiert werden konnte, wurden einige Proben hinsichtlich der Anwendung im *tissue engineering* untersucht. Diese modifizierten Polysaccharide sollten als ECM zur Gewebekonstruktion dienen. Um die Kompatibilität der Materialien mit den Zellen zu untersuchen wurde zunächst die Toxizität verschiedener Blend-Materialien und Einzelkomponenten bestimmt (Abbildung 50).

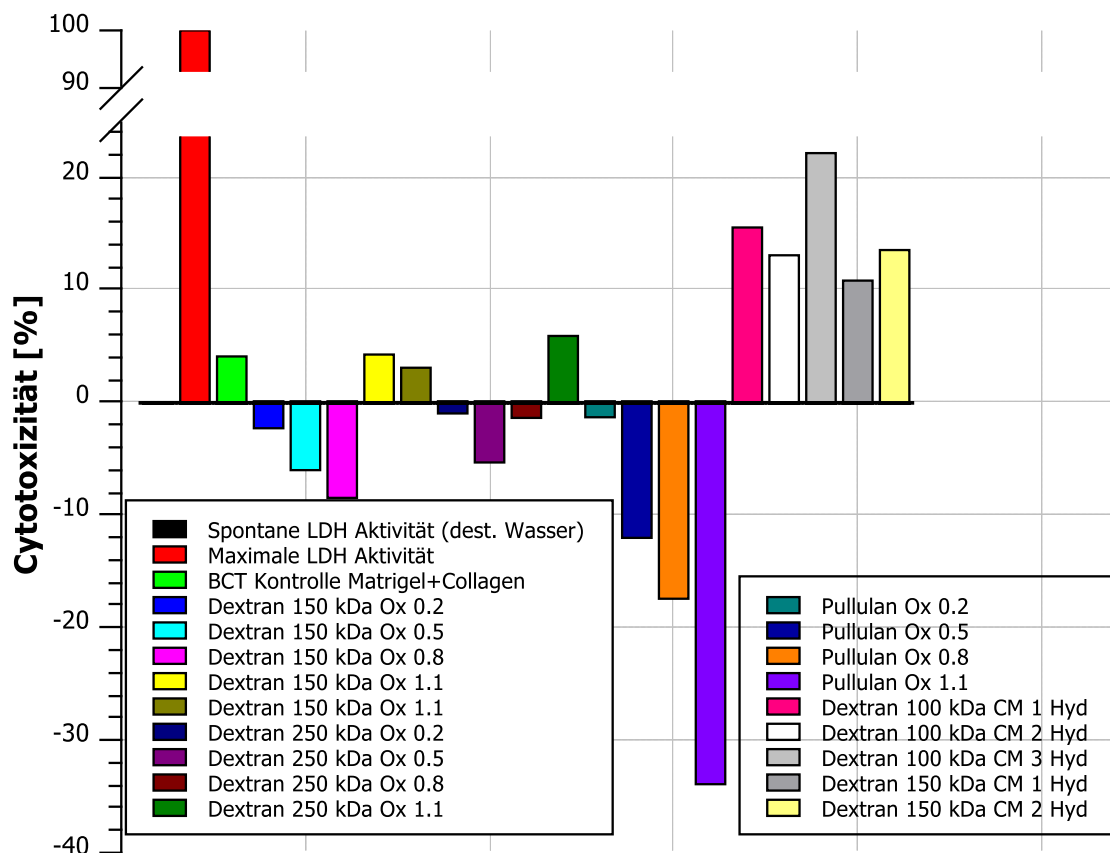


Abbildung 50: Ergebnisse der Untersuchung der Cytotoxizität der einzelnen modifizierten Polysaccharide. Die Cytotoxizität gibt einen Prozentsatz der verstorbenen Zellen nach sechsständiger Inkubationszeit an.

Die Untersuchungen wurden von JULIO-CESAR RIOS-CAMACHO (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt und sind im Experimentellen Teil beschrieben (Kapitel 7.2). Zunächst wurden die einzelnen Hydrazid- und Aldehyd-Komponenten untersucht. Keines der untersuchten Polysaccharide wies eine erhöhte Cytotoxizität auf (Abbildung 50). Lediglich bei den carboxymethylierten Polysacchariden konnte nach sechs Stunden eine Cytotoxizität von ca. 20 % festgestellt werden. Das bedeutet, dass nach sechs Stunden eine Verringerung der Zellzahl von ca. 20 % beobachtet werden konnte. Dieser Wert liegt jedoch im Toleranzbereich der Messung und wurde als vernachlässigbar bewertet. Es zeigte sich, dass die vorgenommenen Modifizierungen der Polysaccharide keinen Einfluss auf die Zellkompatibilität haben. Diese Untersuchungen liefern neben den ^1H NMR-Messungen Aussagen über die Reinheit der dargestellten Materialien. Der Reinigungsprozess der Polymere über Dialyse und Sterilfiltration ist also so effizient, dass zellschädigende Substanzen von den Polysaccharidproben entfernt werden konnten.

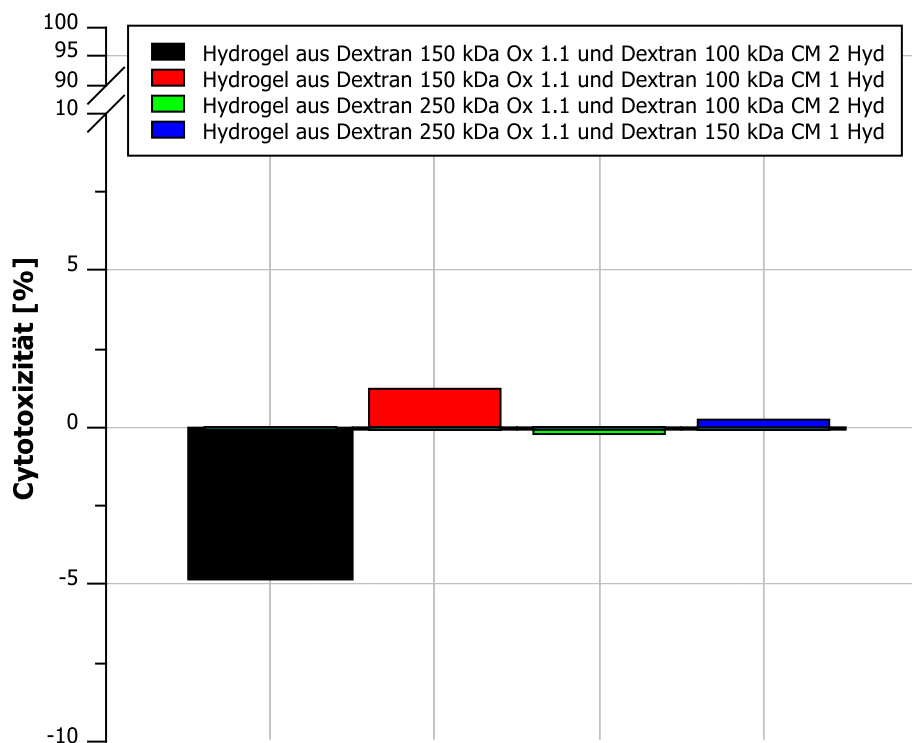


Abbildung 51: Untersuchung der Zelltoxizität von verschiedenen Hydrogelen basierend auf modifizierten Dextran-Derivaten. Die Ordinate wurde zwischen dem Bereich von 10 % und 90 % abgetrennt, um die niedrigen Cytotoxizitätswerte in geeigneter Aussagekraft darzustellen. Die Cytotoxizität gibt einen Prozentsatz der verstorbenen Zellen nach sechsständiger Inkubationszeit an.

Im Folgenden wurde die Zellkompatibilität der Hydrogele bestimmt. Es wurden Mischungen von Materialien gewählt, die bei einem geeigneten Vernetzungsgrad während des

Gelierungsexperimenten (Kapitel 4.2) eine hohe Wasseraufnahme zeigten (Abbildung 51). Solchen Materialien sollten eine stabile ECM liefern und zusätzlich über Poren verfügen, die groß genug für einen Transport der notwendigen Nähr- und Botenstoffe sind. Diese Faktoren sollten gewährleisten, dass die myokardialen Stammzellen nicht derart in das Polysaccharid-Netzwerk eingebettet sind, dass keine Kommunikation zu den Nachbarzellen mehr stattfinden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten, funktionalisierten Polymere für Fibroblasten nicht zelltoxisch sind (Abbildung 51). Somit sind sie für die Ausbildung von Herzgewebe mittels myokardialer Stammzellen prinzipiell geeignet. Anschließend wurde gemäß eines Protokolls nach DAHLMANN *et al.*^[142] die Nutzbarkeit dieser Hydrogele als ECM geprüft. Aufgrund der Zielsetzung, also der Abwesenheit von Collagen wurde zunächst die makroskopische Beschaffenheit der Hydrogele mit und ohne den Einsatz von Collagen untersucht. Hierfür wurden mikroskopische Aufnahmen von den Oberflächen der Hydrogele angefertigt. Dabei wurde die Grenzfläche eines Hydrogels ohne Collagen, eines Hydrogels mit 40 vol% einer Collagen-Lösung und eines Hydrogels mit 20 vol% Collagen-Lösung untersucht (Abbildung 52).

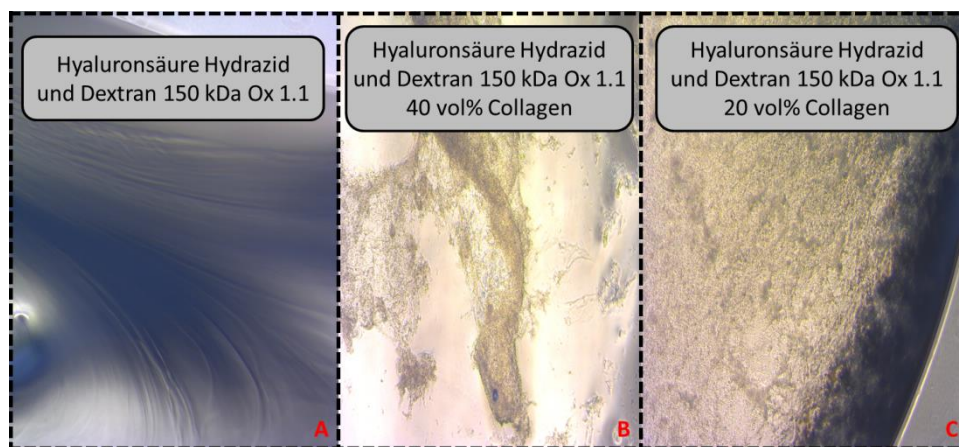


Abbildung 52: Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen von verschiedenen Hydrogelen mit unterschiedlichen Anteilen an Collagen und deren strukturellen Änderungen.

Ohne die Zugabe von Collagen (Abbildung 52, **A**) weist das gebildete Hydrogel eine glatte und homogene Oberfläche auf. Bedingt durch die Durchmischung beim Gelierprozess waren zwar wellenförmige Erhebungen auf der Oberfläche zu erkennen, jedoch war das Material durchgehend homogen. Bei der Verwendung von 40 vol% (Abbildung 52, **B**) wie von DAHLMANN *et al.* beschrieben, wurde das Collagen offensichtlich vom Polysaccharid-Netzwerk eingeschlossen und es bildeten sich Agglomerate von Collagen, die das Hydrogel zunächst inhomogen erscheinen ließen. Wurden jedoch nur 20 %, also die Hälfte des vorgeschlagenen Anteils an Collagen verwendet, so wurde eine deutlich bessere Durchmischung und somit ein

homogenes Hydrogel erzeugt (Abbildung 52, C). Es wurde jedoch auch eine geringere Quervernetzung der Polysaccharid-Komponenten, also ein niedrigviskoses Hydrogel festgestellt.

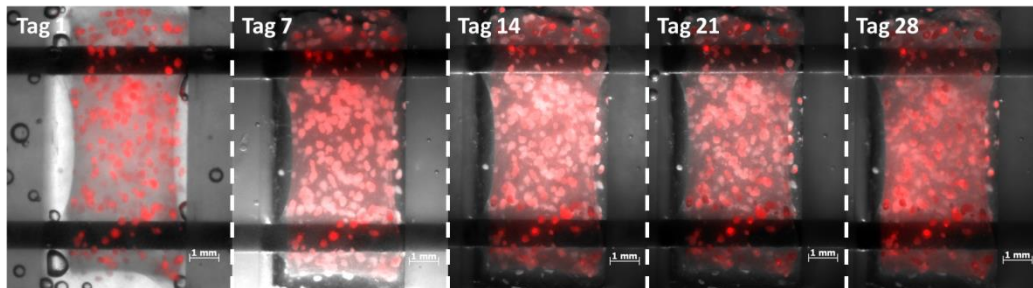


Abbildung 53: Ausschnitt einer Versuchsreihe zur Gewebsbildung mit Kardiomyozyten und einer ECM bestehend aus Hyaluronsäure Hydrazid (6) und Dextran 150 kDa Ox 1.1 (27) unter physiologischen Bedingungen.

Dies deutet darauf hin, dass Collagen selbst mit den modifizierten Polysacchariden reagiert und somit eine effektive Gelierung verhindert. Im Rahmen der Kooperation mit dem AK GRUH wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, bei denen myokardiale Stammzellen mit der Hydrazid-Komponente inkubiert wurden und anschließend die Gelierung mit der Aldehydkomponente und die Bildung eines Herzgewebes durch die eingesetzten Zellen angestrebt wurde. Diese führten jedoch nicht zu der Bildung eines künstlichen Herzgewebes und waren somit nicht erfolgreich. Das Hydrogel mit den besten Eigenschaften in dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 53 gezeigt.

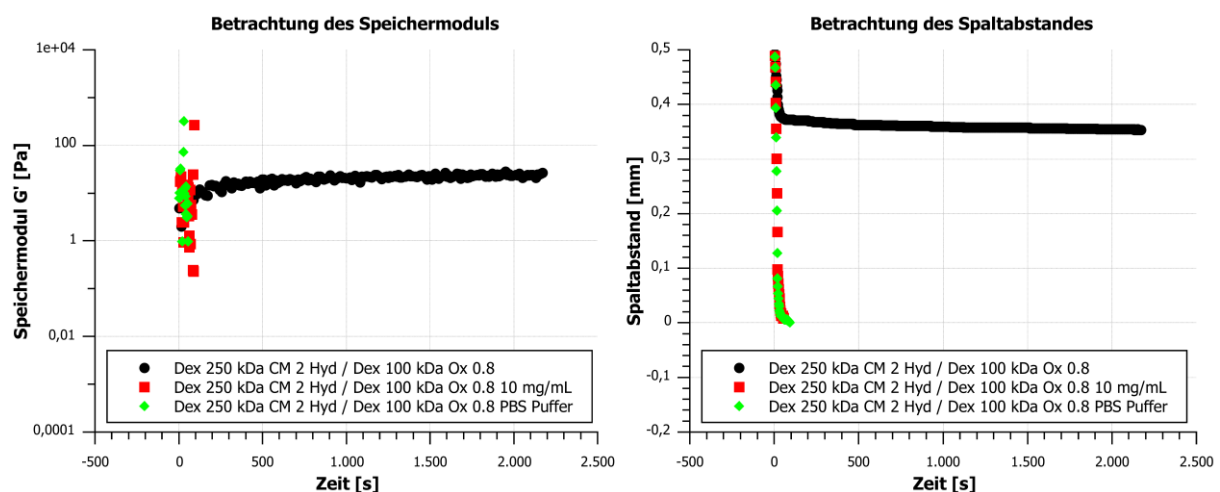


Abbildung 54: Vergleich der Gelbildung von Dex 250 kDa CM 2 Hyd (35, 20 mg/mL) und Dex 100 kDa Ox 0.8 (27, 20 mg/mL) in deion. H₂O (schwarz), PBS Puffer (grün) und Dex 250 kDa CM 2 Hyd (35, 10 mg/mL) und Dex 100 kDa Ox 0.8 (27, 10 mg/mL) in deion. H₂O (rot). Es sind die Speichermodule der jeweiligen Mischung (links) mit dem gemessenen Spaltabstand (rechts) gegenübergestellt.

Die Form des Gels wurde zunächst durch eine Silikonform (graue Ränder) vorgegeben. Diese Form wurde vollständig mit dem Gel ausgefüllt. In diesem Gel waren die myokardialen Stammzellen bereits eingebettet. Bei erfolgreicher Adsorption der Stammzellen an die ECM

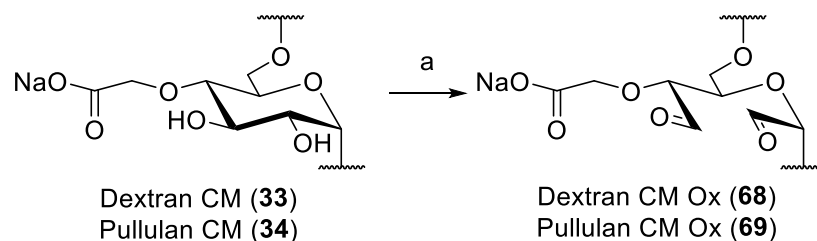
sollte sich das Gel stark zusammenziehen und die Zellen nach Ausrichtung synchronisierte Kontraktionen zeigen. Es wurde jedoch nur eine leichte Orientierung und Zusammenlagerung der Zellen in der ECM festgestellt. Dieses ließ sich an den freien hellgrauen Bereichen feststellen (Abbildung 53). Allerdings konnte keine Kommunikation zwischen den Zellen und eine damit verbundenen Synchronisation der Kontraktionen beobachtet werden. Das Ausbleiben dieser gleichgeschalteten Bewegung zeigt, dass die verwendete Matrix für die Bildung von funktionsfähigem Herzmuskelgewebe nicht geeignet ist. Nach den erfolglosen Versuchen der Gewebekonstruktion zeigen die rheologischen Untersuchungen der Gelbildung in dem verwendeten Puffersystem (PBS Puffer), dass die Hydrazonbildung und damit die Vernetzung durch den Puffer verhindert wird (Abbildung 54). Bei erfolgreicher Ausbildung eines Hydrogels stellt sich durch die konstante Krafteinwirkung ein Spaltabstand ein. Dieser Spaltabstand ist dann repräsentativ für den Festkörpercharakter der Gels, der durch die konstante Krafteinwirkung einen Widerstand zeigt. Bei Verminderung der Konzentration (10 mg/mL), oder das Lösen der Polysaccharidkomponenten in PBS Puffer wurde keine Gelbildung beobachtet. Dies äußert sich in dem abnehmenden Spaltabstand bis auf 0 mm und die damit verbundene vollständige Verdrängung der Polysaccharidlösungen aus dem Messbereich. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration der Einzelkomponenten von 20 mg/mL für die erfolgreiche Bildung eines Hydrogels notwendig ist. Außerdem deutet alles darauf hin, dass der PBS Puffer mit den funktionellen Gruppen der Polysaccharide wechselwirkt und damit die Quervernetzung unterbindet.

4.3 WEITERFÜHRENDE MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN

Zusätzlich zur Oxidation, Carboxymylierung und Hydrazid-Bildung wurden weitere Derivatisierungsmethoden für die Polysaccharide Dextran und Pullulan untersucht. Sie sollten durch chemische Flexibilität zu einer erweiterten Materialienbibliothek führen. Zum anderen sollten die Derivatisierungen die Biokompatibilität erhöhen.

4.3.1 OXIDATION VON CARBOXYMETHYLIERTEM DEXTRAN UND PULLULAN

Zur Erweiterung des Materialspektrums wurden einige carboxymethylierte Polysaccharide nachträglich oxidiert (Schema 11). Unter Berücksichtigung des unvollständigen Umsatzes bei der Hydrazidbildung von carboxymethyliertem Dextran (**33**) und Pullulan (**34**), sollte diese Modifizierung zeigen, ob das eingebrachte Carboxylat eine weitere Koordinationsstelle liefert und damit einen Einfluss auf die Wasseraufnahme, den Vernetzungsgrad und somit auf die Quellung der Hydrogele hat.



Schema 11: Oxidation von carboxymethyliertem Dextran (**33**) und carboxymethyliertem Pullulan (**34**). Reaktionsbedingungen: a) NaIO_4 , H_2O , RT, 12 h.

Für diese Modifizierungen wurden Dextran- und Pullulanderivate mit einem möglichst geringen Carboxymylierungsgrad verwendet. Dieser sollte nicht über $\text{DS} = 0.5$ sein, um einen direkten Vergleich mit der Hyaluronsäure ziehen zu können. Ein weiterer Grund für die Auswahl der niedrigsubstituierten CM-Polysaccharide war der Einfluss der Carboxylate auf den pH-Wert der wässrigen Lösungen. Daher wurden die niedrig-funktionalisierten Polysaccharide Dextran 150 kDa CM 1, Dextran 250 kDa CM 1, Dextran 500 kDa CM 1 (**33**) und Pullulan CM 1 (**34**) eingesetzt.

Um ausreichend Aldehydfunktionen für eine erfolgreiche Quervernetzung zu generieren wurden zur Oxidation der CM-Polysaccharide 1.1 Äq. des Oxidationsmittels (NaIO_4) verwendet. Zunächst wurden die neuen Materialien bezüglich ihrer Fähigkeit zur Gelbildung untersucht (zu Methode der Gelbildung siehe Kapitel 4.2).

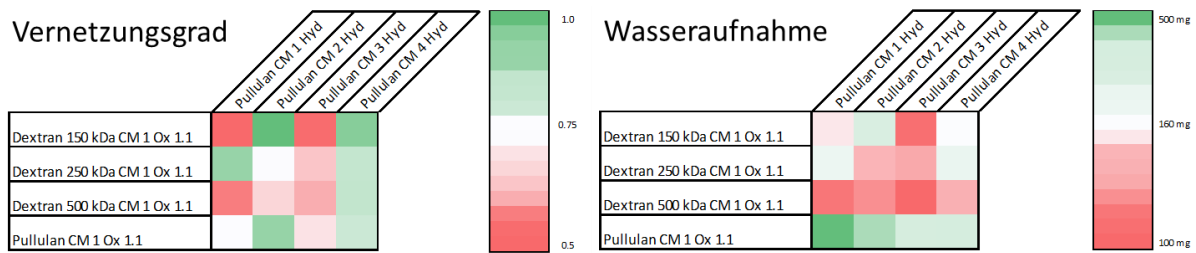


Abbildung 55: Gegenüberstellung von Vernetzungsgrad und Wasseraufnahme von Hydrogelen, die eine carboxymethylierte und oxidierte Komponente enthalten.

Hierfür wurden vier Stufen der carboxymethylierten Pullulan-Hydrazid-Derivate verwendet, da diese sich als potenteste Gelbildner herausgestellt haben (Abbildung 55). Diese Untersuchungen zeigen, dass die carboxymethylierten Polysaccharide oxidierbar sind und erfolgreich mit Hydrazid-modifiziertem Pullulan Hydrogele bilden können, jedoch zu keiner merklichen Optimierung der Eigenschaften der Hydrogele führen. Im Fall des Pullulan CM 1 Ox 1.1 (69) konnte ein Zusammenhang zwischen dem DS der Carboxymethylierung und Hydrazid-Bildung und der Wasseraufnahme verzeichnet werden. Hydrogele mit dem niedrigsten Vernetzungsgrad zeigen auch in dieser Versuchsreihe die größte Wasseraufnahmefähigkeit. Allerdings ist diese Beobachtung nicht bei allen oxidierten und carboxymethylierten Polysacchariden anzutreffen.

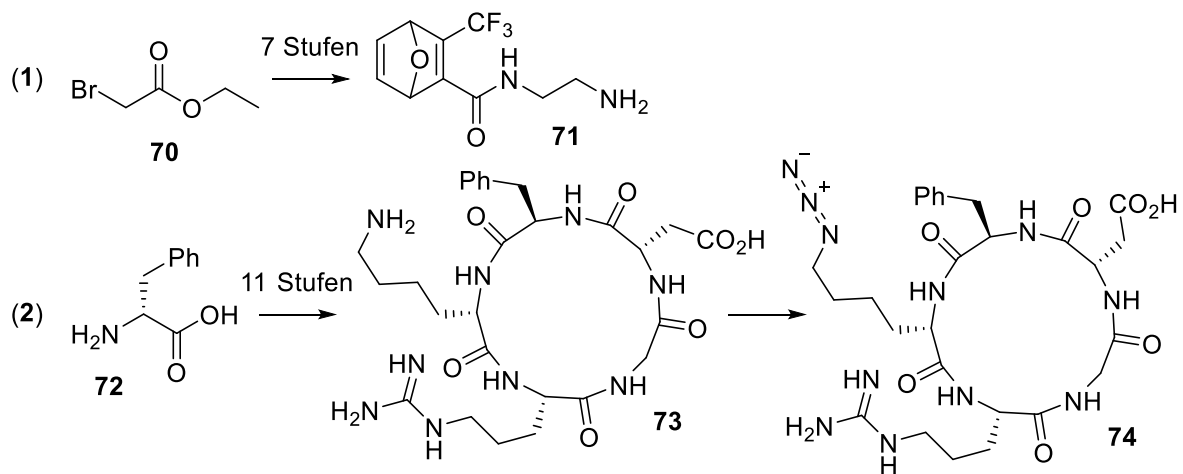


Abbildung 56: Hydrogel gebildet aus Pullulan CM 2 Hyd und Pullulan CM 1 Ox 1.1.

Bei allen Komponenten findet sich eine starke Trübung im Kern des Hydrogels, was auf inhomogenen Vernetzungsgrad im Gel hinweist (Abbildung 56). Im inneren Bereich der Gele scheint ein sehr hoher Grad an Vernetzung vorzuliegen, so dass eine Trübung durch Bildung von Aggregaten und teilweise sogar ein Ausfallen des Netzwerkes aus der Lösung beobachtet wurde. Die hohe Reaktivität dieser modifizierten Polysaccharide bezüglich der Hydrazon-Bildung kann hierfür verantwortlich gemacht werden. Diese Beobachtung schließt die so modifizierten Polysaccharide für eine biomedizinische Anwendung jedoch aus.

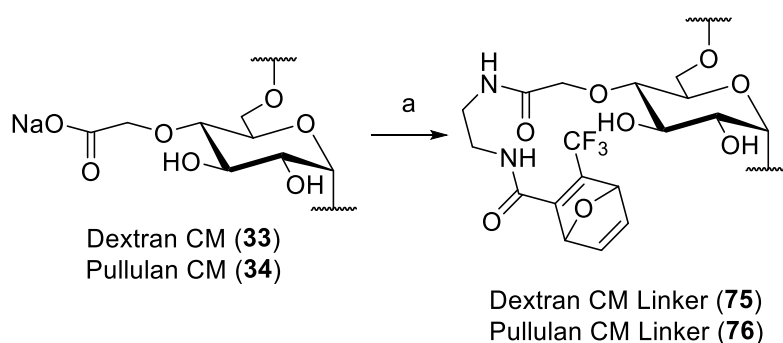
4.3.2 MODIFIZIERUNG VON DEXTRAN UND PULLULAN ZUR ERHÖHUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Biokompatibilität von Polysacchariden ist die Funktionalisierung mit dem zyklischen Pentapeptid RGDfK (**73**).^[143] Dieses Peptid enthält eine Sequenz der Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G), Asparaginsäure (D), D-Phenylalanin (f) und Lysin (K). Mittels dieses RGD-Motivs können verschiedene Integrine der Zellen gebunden werden, was zu einer besseren Adaption der Zellen an das jeweilige Material führt (siehe Kapitel 2).



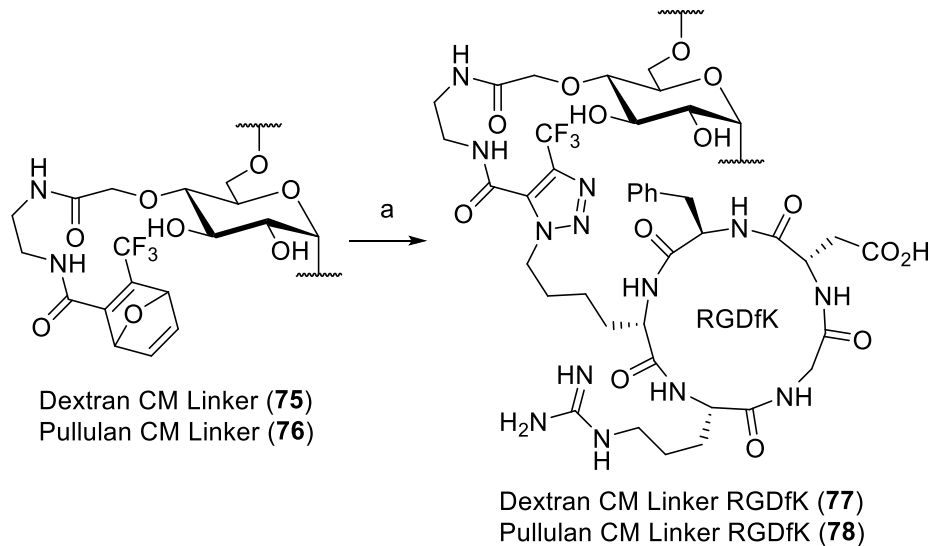
Schema 12: Darstellung der verwendeten Substanzen RGDfK (**73**), RGDfK-Azid (**74**) und des Linkers **71** nach RUTJES *et al.* zur Erhöhung der Biokompatibilität der Hydrogele.

Eine Möglichkeit dieses cyclische Peptid (**74**) an ein Polysaccharid zu binden ist die Verwendung eines Verbindungselement, also eines Linker-Moleküls wie **71**. Dieser Linker-Baustein (**71**) wurde basierend auf den Arbeiten von RUTJES *et al.* dargestellt.^[144–146] Das Produkt konnte durch Vergleich der analytischen Daten aus Literatur bestimmt werden, weswegen diese durchgeführte Synthese keiner näheren Betrachtung im Experimentellen Teil findet. Das Pentapeptid RGDfK (**73**) und das korrespondierende Azid **74**^[143] wurden durch IM Chemie Bastian Dieter für dieses Projekt bereitgestellt.



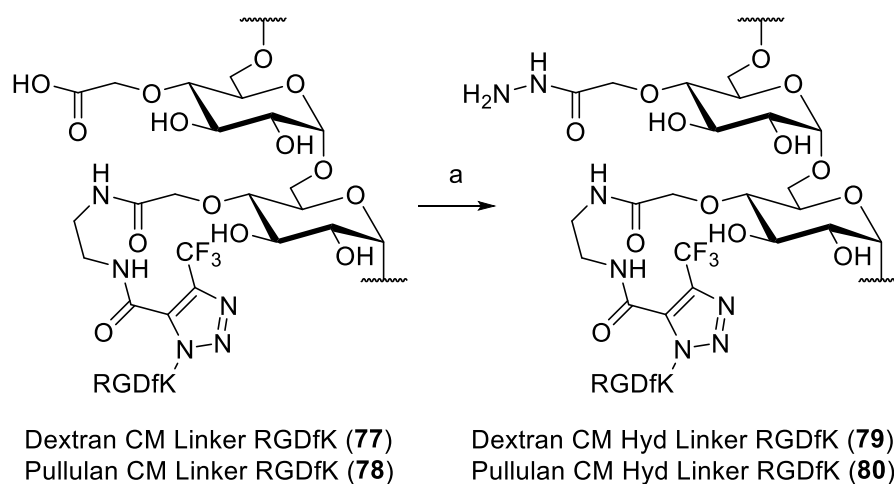
Schema 13: Modifizierung von carboxymethyliertem Dextran (**33**) und carboxymethyliertem Pullulan (**34**) mit dem Linker **71**. Reaktionsbedingungen: a) **71**, EDC, HOBT, DIPEA, H₂O, RT, 12 h.

Der Linker **71** wurde zunächst gemäß einer Methode von KIRSCHNING *et al.*^[147] an die Polysaccharide Dextran und Pullulan gebracht. Hierbei wurden die carboxymethylierten Polymere über eine Peptidkupplungsreaktion mit dem Linker **71** versehen. Mit diesem Substrat (**71**) lies sich eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion mit dem zuvor dargestellten RGDfK-Azid (Schema 12, **74**) an einem Polysaccharid realisieren (Schema 14).



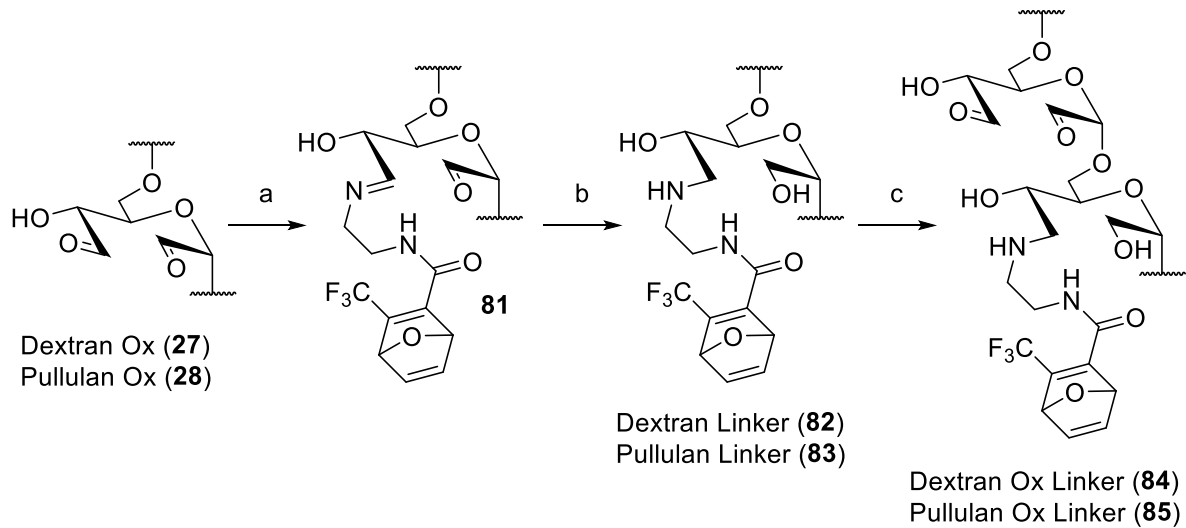
Schema 14: Kupfer-freie „Click“-Reaktion an modifizierten Polysacchariden (**75**, **76**). Reaktionsbedingungen: a) RGDfK-Azid (**74**), H₂O, 40 °C, 4 d.

Hierbei mussten die Bedingungen nach KRAUSE *et al.*^[144] optimiert werden (Schema 14). Die verwendeten Polysaccharide wurden nur mit substöchiometrischen Mengen des Linkers **71** und des Pentapeptids **74** umgesetzt. Der Substitutionsgrad wurde über ¹H NMR-Spektren abgeschätzt. Zusätzlich wurde der Umsatz über ¹⁹F NMR-spektroskopische Untersuchungen bestimmt.



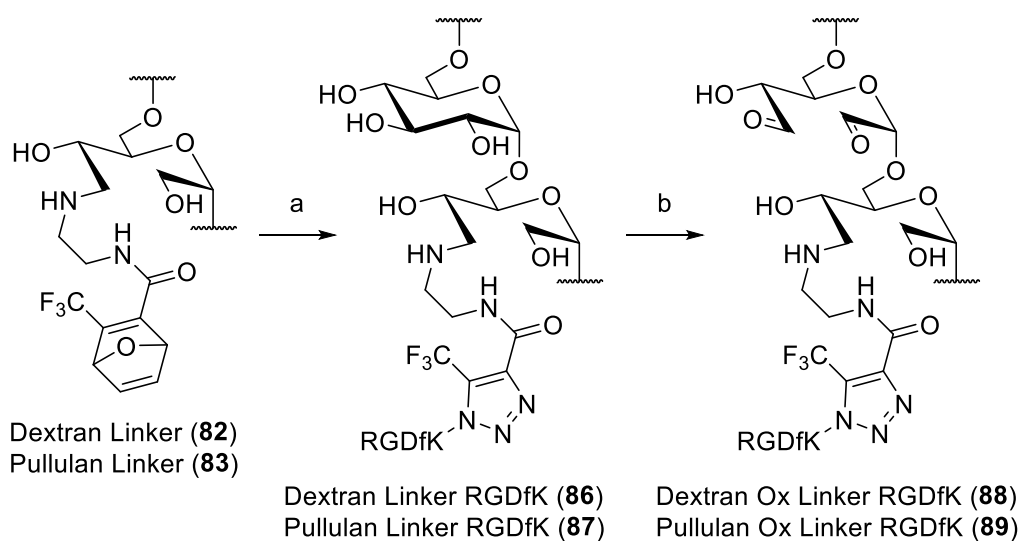
Schema 15: Hydrazid-Bildung an carboxymethylierten und Linker-RGDfK-modifizierten Polysacchariden. Reaktionsbedingungen: a) EDC, HOBT, DIPEA, H₄N₂ (1.0 M in THF), H₂O, RT, 4 d.

Da diese Reaktion bereits zuvor von KIRSCHNING *et al.*^[144] beschrieben wurden, wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Linker-RGDfK-modifizierten Polysaccharide auch unter den Bedingungen der Hydrazid-Modifizierung stabil vorliegen (Schema 15). Damit ist der Zugang zu RGDfK-modifizierten und vernetzbaren Polysacchariden zum Aufbau von Hydrogelen verwirklicht.



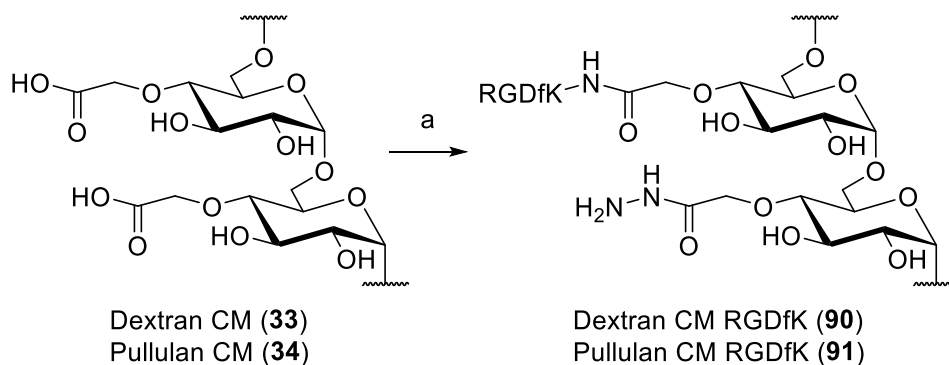
Schema 16: Darstellung des linker-modifizierten Dextran (**84**) bzw. Pullulan (**85**). Reaktionsbedingungen: a) **71**, H₂O, RT, 12 h; b) NaBH₃CN, H₂O, RT, 12 h; c) NaIO₄, H₂O, RT, 12 h.

Das Konzept der Kupfer-freien „Click“-Reaktion wurde ebenfalls auf Aldehyd-modifizierte Polysaccharide übertragen. Um dies zu realisieren wurde eine Variante aus der Dissertation von Dr. LENA MÖLLER verwendet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Linker **71** in einer Kondensationsreaktion auch mit Aldehyd-funktionalisierten Polysacchariden reagiert.



Schema 17: Modifizierung von **82** und **83** mit dem Pentapeptid RGDfK (**74**) und nachträgliche Oxidation zu **88** bzw. **89**.

Es zeigte sich jedoch, dass diese Verknüpfung über die intermediäre Schiffsche Base (**81**) reversibel ist, und diese während der Dialyse wieder gespalten wurde. Aus diesem Grund wurde die Imin-Struktur mittels NaBH_3CN zum Amin reduziert und auf diesem Weg stabilisiert (Schema 16). Die Polysaccharide, welche mit dem Linker **71** modifiziert wurden, konnten im Folgenden ebenfalls durch eine Kupfer-freie „Click“-Reaktion mit dem RGDfK modifiziert und nachträglich oxidiert werden (Schema 17). Dadurch war es möglich auch die Aldehyd-Komponente für eine Vernetzung mit dem korrespondierenden Hydrazid vorzubereiten. Somit konnte eine Methode zu Erhöhung der Biokompatibilität von Polysacchariden erfolgreich an oxidierten Dextran und Pullulan-Derivaten entwickelt werden. Mit den so generierten oxidierten bzw. Hydrazid-modifizierten Polysacchariden (Schema 15, Schema 16, Schema 17) wurden die Gelierversuche mit den korrespondierenden Komponenten Pullulan CM 1 Hyd (**36**) bzw. Pullulan Ox 1.1 (**28**) durchgeführt. Es zeigte sich, dass der geringe RGDfK-Funktionalisierungsgrad keinen Einfluss auf die Eigenschaft der Komponenten, ein Hydrogel zu bilden, hatte.



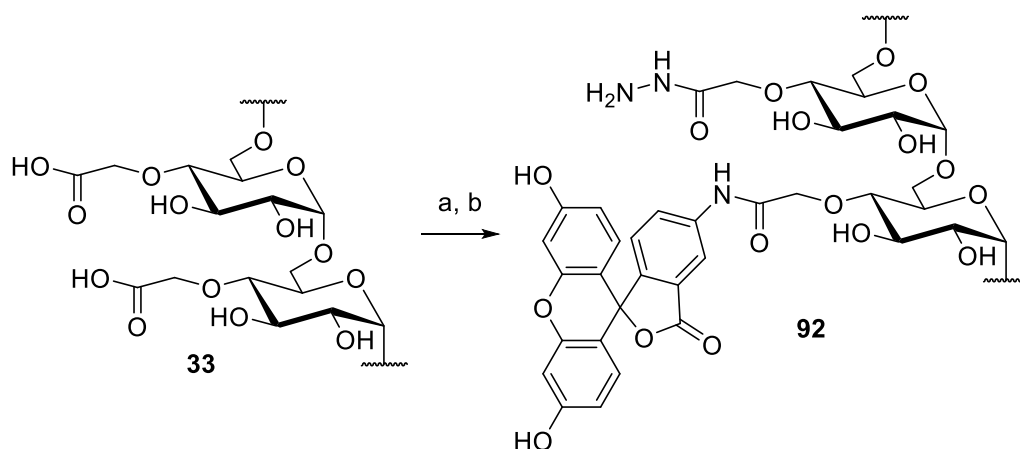
Schema 18: Darstellung von RGDfK-modifizierten und carboxymethylierten Hydrazid-Komponenten aus Dextran (**90**) und Pullulan (**91**). Reaktionsbedingungen: a) EDC, HOBT, DIPEA, RGDfK (**73**), H_2O , RT, 2 d, dann EDC, HOBT, DIPEA, H_4N_2 (1.0 M in THF), H_2O , RT, 4 d.

Ein Nachteil der Anbringung von **74** an ein polymeres Rückgrat ist der hohe synthetische Aufwand zur Darstellung des Linkers **71** und dessen Anbringung an das glykosidische Rückgrat. Zusätzlich konnten Verunreinigungen durch die reduktive Aminierung mittels NaBH_3CN nicht vollständig durch Dialyse, oder Fällung entfernt werden. Aus diesem Grund wurde die Strategie geändert. Durch die direkte Reaktion des RGDfK (**73**) mit den modifizierten Polysacchariden sollte die Synthese des Linkers **71** und der Diazo-Transfer zum RGDfK-Azid (**74**) vermieden werden. Diese Strategie ermöglichte eine kaskadenartige Reaktionsführung (Schema 18) bei der zunächst minimale Mengen des RGDfK (**73**) über eine Peptidbindungsknüpfung an das Rückgrat der carboxymethylierten Komponente angebracht

und direkt im Anschluss die Hydrazid-Bildung durchgeführt werden konnte. Der Umsatz der Reaktion wurde nach der Reinigung durch Dialyse im ^1H NMR-Spektrum bestätigt. So konnte ein weiterer Zugang zu einer Bibliothek aus vielseitig anwendbaren und hoch flexiblen Polysacchariden zu Darstellung von Hydrogelen erzeugt werden. Um die Vielseitigkeit der Bibliothek zu erweitern, wurden im Folgenden weitere Polysaccharide modifiziert (siehe Kapitel 4.3.3 und Kapitel 4.4).

4.3.3 STUDIEN ZUM ABBAU VON MODIFIZIERTEN DEXTRAN-HYDROGELEN

Dextran (**21**) und Pullulan (**22**) zeigten sich in den vorhergehenden Studien als vielseitig modifizierbar und als ausgezeichnete Kandidaten für die Bildung von Hydrogelen aus Rein-, oder Blend-Materialien. Um die in Kapitel 2 angesprochene Biodegradierbarkeit zu untersuchen, wurde eine Methode zur Visualisierung des Abbaus von Dextran entwickelt. Diese sollte zeigen, ob sich die hier entwickelten Dextran-basierten Materialien auch für die Anwendung als *drug-delivery-Systeme* (deutsch Wirkstoff-Transport-Systeme) eignen.



Schema 19: Darstellung von Fluoreszein modifizierten Dextran CM Hyd-Derivaten (**92**). Reaktionsbedingungen: a) EDC, HOBt, DIPEA, Fluoreszinamin, H_2O , RT, 12 h; b) EDC, HOBt, DIPEA, H_4N_2 (1 M in THF), H_2O , RT, 4 d.

Diese Methodik basiert auf den früheren Arbeiten von KUMBAR *et al.*^[148] in denen gezeigt werden konnte, dass Polysaccharide sich grundsätzlich als *drug-delivery-vehicles* eignen. Polysaccharide wie Hyaluronsäure und Chitosan können mit Wirkstoffen modifiziert und diese über einen enzymatischen Abbau freigesetzt werden. Dieses Konzept wurde auf die Dextran-basierten Hydrogele übertragen. Hierfür wurden zunächst die carboxymethylierten Dextran-Derivate (Dextran CM 1-6, **33**) über eine Peptidbindungssequenz mit dem Aminofunktionalisierten Fluoreszein-Derivat modifiziert (Schema 19).

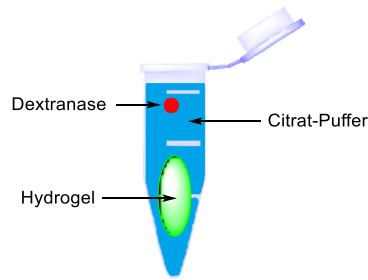


Abbildung 57: Konzeptionelle Durchführung des Hydrogel-Degradierungs-Experiments.

Die so zugänglichen Polysaccharide wurden anschließend unter den standardisierten Hydrogel-Bildungs-Bedingungen (Kapitel 4.2) mit dem Dextran Ox 0.8 (27) gemischt. So konnten Fluoreszein-modifizierte Hydrogele gebildet werden. Anschließend wurde unter Einsatz einer Dextranase der Abbau^[149] des modifizierten Hydrogels Fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (Abbildung 57). Dafür wurden jeweils 100 μL der Aldehyd-Komponente mit 100 μL der Fluoreszein-modifizierten Hydrazid-Komponente in einem 1.5 mL Eppendorf-Gefäß gemischt und das gebildete Hydrogel zunächst mit 1.0 mL Citratpuffer (pH = 5.6)^[150] und nachfolgend mit einer wässrigen Lösung der Dextranase überschichtet. Diese Lösungen wurden bei 37 °C inkubiert und der Überstand zu definierten Zeiten fluoreszenzspektrometrisch vermessen (Abbildung 58).

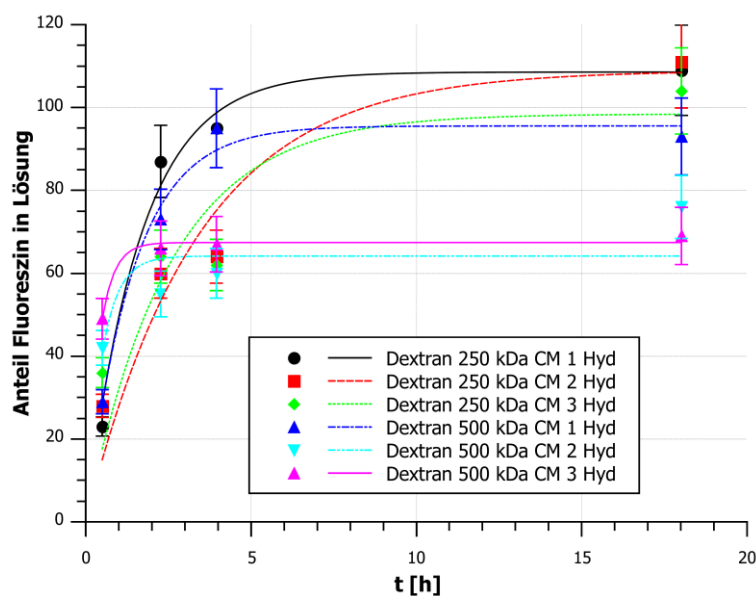


Abbildung 58: Ergebnisse der Dextranase-Zersetzungsuntersuchungen von Hydrogelen bestehend aus Fluoreszein-modifizierten und carboxymethylierten Dextranderivaten (92) und Dextran Ox 0.8 (27).

Als Maximum der messbaren Fluoreszenz wurden die jeweiligen Fluoreszein-modifizierten Polysaccharide als Lösung vermessen. Anhand dieser Werte konnten die durch den enzymatischen Abbau des Hydrogels freigesetzten Fluoreszein-Addukte quantifiziert werden

(Abbildung 58). Es zeigte sich, dass nur die Gele mit den Komponenten Dextran 250 kDa CM 1 Hyd (92), Dextran 250 kDa CM 2 Hyd (92), Dextran 250 kDa CM 3 Hyd (92) und Dextran 500 kDa CM 1 Hyd (92) nach wenigen Stunden vollständig abgebaut werden konnten. Bemerkenswert war, dass bereits das Dextran 500 kDa CM 2 Hyd (92) nicht mehr vollständig degradiert werden konnte.

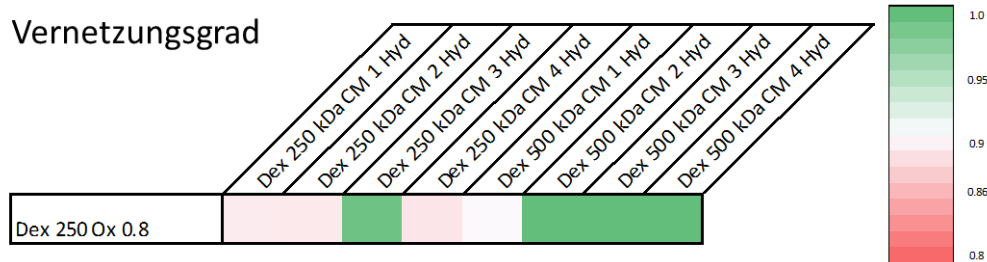


Abbildung 59: Quellversuche der verwendeten Dextranderivate zur Unterstützung der Erklärung der Dextranase-Aktivität.

Die Erklärung für dieses Phänomen kann in den vorangegangenen Quellversuchen gefunden werden (Abbildung 59). Es wurde deutlich, dass Dextrane mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 250 kDa einen geringeren Vernetzungsgrad als Dextrane mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 500 kDa besitzen. Dies bedeutete, dass die Dextranase bei höher vernetzten Hydrogelen mit einem geringeren Anteil unveränderter glykosidischer Einheiten nicht mehr in der Lage war, die einzelnen Einheiten zu detektieren und damit das Hydrogel vollständig zu degradieren.

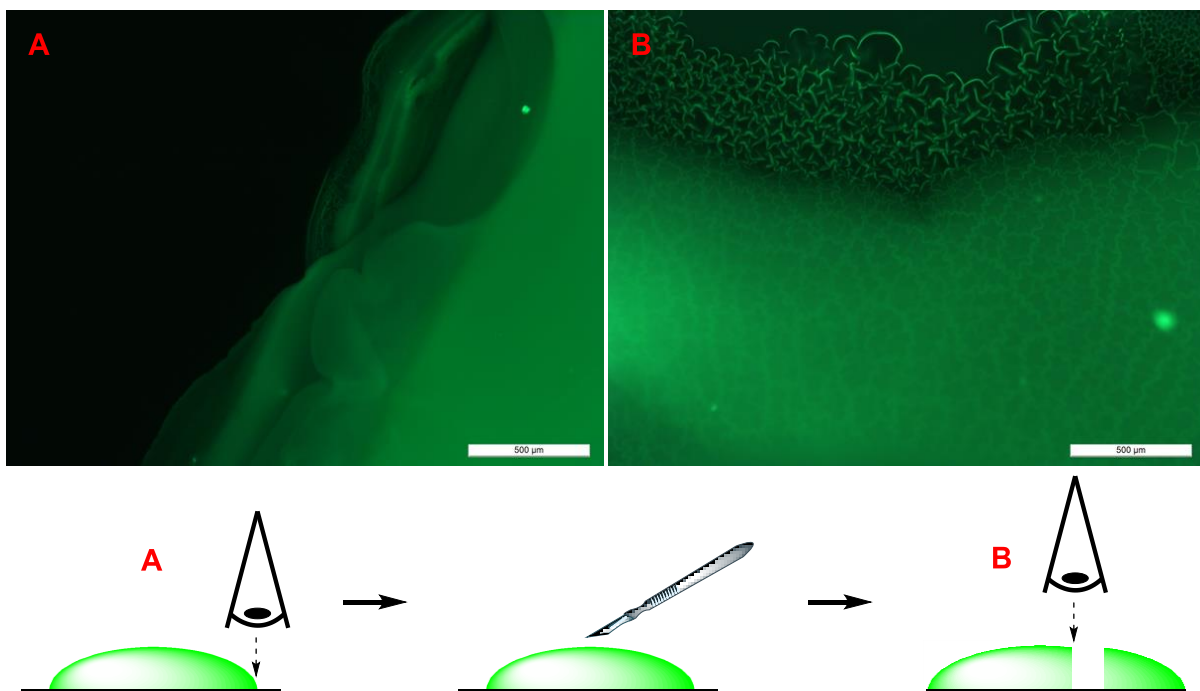


Abbildung 60: Untersuchung eines fluoreszin-modifizierten Hydrogels. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Schnittkante.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von BOURNE *et al.*^[151] beschrieben, die die Bildung von iso-Maltose durch den Abbau verschiedener Dextrane mit unterschiedlichen Anteilen an α -1,6- und α -1,4-glykosidischen Bindungen untersuchten. Zusammenfassend zeigt diese Versuchsreihe, dass die dargestellten Hydrogele einem der wichtigsten Kriterien des *tissue engineering*, der Biodegradierbarkeit, gerecht werden können. Die Fluoreszein-modifizierten Hydrogele wurden auch unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 60). Dafür wurden zunächst Bilder der äußeren Grenze (Abbildung 60, A) der Hydrogele aufgenommen. Um ein Bild von der Schnittkante zu erhalten wurde das Hydrogel mit einem Skalpell durchtrennt und die Schnittstücke auseinander geschoben. Dabei wurde eine fluoreszierende Musterung festgestellt (Abbildung 60, B). Anstelle einer geraden Schnittkante, wurden kleine Risse an der Schnittkante und auf der verbliebenen, dünnen Gelschicht auf dem Boden des Objektträgers vermerkt.

Die Bildung dieser Risse kann durch den hohen vernetzungsgrad und der damit verbundenen Festigkeit des Hydrogels erklärt werden. Das gebildete Hydrogel konnte dadurch durchtrennt werden ohne seine Form zu verlieren, beim Durchtrennen und Verschieben verhielt es sich jedoch wie ein Festkörper und zeigte durch die mechanischen Einwirkungen Brüche. Dies weist auf eine hohe Festigkeit der Gelstruktur hin und liefert damit eine weitere Erklärung für die negativen Resultate bei der Bildung eines Herzgewebes unter Verwendung von modifizierten Dextranen als ECM.

4.4 MODIFIZIERUNG ANDERER POLYSACCHARIDE ZUM AUFBAU VON HYDROGELEN

Die entwickelten flexiblen Modifizierungsmethoden für Dextran und Pullulan sollten nun auf weitere Polysaccharide übertragen werden. Dabei wurde keine Präferenz für α -, oder β -glykosidische Verknüpfung gelegt, da diese Komponenten nur in Mischungen eingesetzt werden sollten.

4.4.1 STUDIEN ZUR ANWENDUNG DER METHODIK AN GLYKOGEN

Glykogen (**93**) ist ein Polysaccharid, welches auch als Leberstärke, oder Tierstärke bezeichnet wird. Es besitzt einen kugelförmigen Aufbau (Abbildung 61) aus α -1,4- und α -1,6-glykosidisch

verbundenen D-Glukoseeinheiten in deren Zentrum sich das Glykogenin, ein Kernprotein, befindet.^[152] Glykogen (**93**) spielt im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle als Glukose-Lieferant. Somit erweist sich Glykogen (**93**) durch seine hohe Biokompatibilität als geeigneter Kandidat für das entwickelte Modifizierungskonzept und die biomedizinische Anwendung. Glykogen selbst wurde bereits von KADOKAWA *et al.*^[153] zum Aufbau einer ECM verwendet. Durch die Vernetzung verschiedener Glykogen-Polysaccharide über Glukosamin- und Glukose-Phosphate als Linker zwischen den Kugelförmigen Grundstrukturen konnten Hydrogele zur medizinischen Anwendung dargestellt werden.

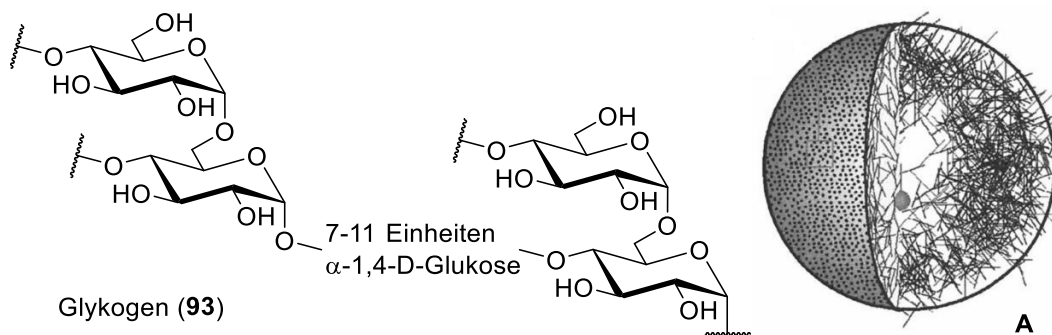
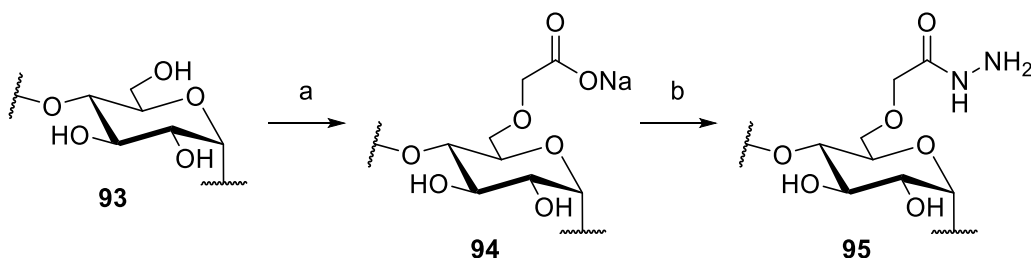


Abbildung 61: Struktur des Glykogens (**93**) bestehend aus α-1,4- und α-1,6-D-glykosidisch verbundenen Einheiten. Außerdem ist die kugelförmige Anordnung der Glukose-Ketten um das Kernprotein (**A**) abgebildet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das modifizierte Dextran diese verbindende Rolle übernehmen. Zunächst wurde Glykogen (**93**) mittels Chloressigsäure zu Glykogen CM (**94**) modifiziert. Um einen Vergleich mit den dargestellten Dextran und Pullulan Derivaten zu führen, wurden hier ebenfalls repetitiv vier Carboxymylierungsreaktionen durchgeführt. Jedes diese Glykogen CM 1-4 (**94**) wurde anschließend über die Standard-Hydrazid-Bildungsbedingungen zum Glykogen CM 1-4 Hyd (**95**) derivatisiert (Schema 20).



Schema 20: Darstellung von carboxymyliertem und Hydrazid-modifiziertem Glykogen (**95**). Die Polymere Struktur wurde auf einen α-1,4-glykosidischen Ausschnitt reduziert. Reaktionsbedingungen: a) Chloressigsäure, NaOH (8 M), H₂O, 62 °C, 1.5 h; b) EDC, HOBt, DIPEA, H₄N₂ (1 M in THF), H₂O, RT, 4 d.

Die Auswertung der elementaranalytischen Untersuchungen (Abbildung 62) zeigte, dass die Modifizierung vergleichbar mit denen von Dextran und Pullulan und somit erfolgreich gewesen ist. Wie zu erwarten war, zeigten die höheren Carboxymylierungsstufen einen

Abfall des Kohlenstoffgehalts. Dies begründet sich auch hier durch die Einbringung des Carboxylats und des so erhöhten Sauerstoff- und Natriumgehalts. Am Stickstoffgehalt der einzelnen Hydrazide ist ebenfalls zu erkennen, dass mit jeder weiteren Carboxymethylierung mehr Gruppen für die Hydrazid-Bildung zur Verfügung standen. Hier war ein Anstieg zu beobachten, der sich jedoch auch einem Plateau bei ca. 7 % annäherte.

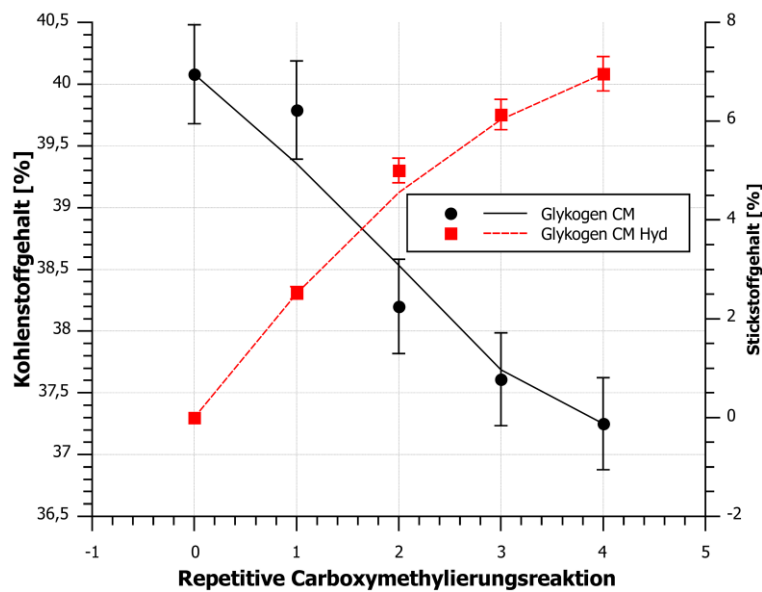
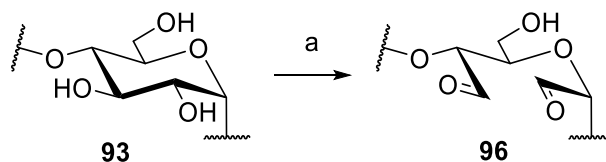


Abbildung 62: Elementaranalytische Auswertung der carboxymethylierten und Hydrazid-modifizierten Glykogen-Derivate.

Zusätzlich zu der Hydrazid-Modifizierung wurde Glykogen einer NaIO_4 -Oxidation unterzogen, um Blendmaterialien sowohl mit anderen Hydrazid-, als auch Aldehyd-Komponenten zu generieren (Schema 21). An dieser Stelle sollte zunächst nur ein Glykogen Ox 0.8 dargestellt werden, um die Anwendbarkeit von Glykogen zur Hydrogelbildung zu zeigen. Bei der Vermischung verschiedener Dextran Ox-Derivate (**27**) mit Glykogen CM 1-4 Hyd (**95**) die Bildung wurde jedoch die Bildung eines wasserunlöslichen Feststoffes wahrgenommen.



Schema 21: Oxidation von Glykogen (**93**) zu Glykogen Ox 0.8 (**96**). Reaktionsbedingungen: a) NaIO_4 , H_2O , RT, 17 h.

Dieselben Beobachtungen wurden ebenfalls bei der Verwendung von Glykogen Ox 0.8 (**96**) mit verschiedenen Dextran CM Hyd-Derivaten (**35**) gemacht. Dies zeigt, dass die erzeugte Aldehyd- (**96**) und Hydrazid-Komponenten (**95**) in der Lage sind mit anderen korrespondierenden Gruppen zu reagieren. Die gebildeten Strukturen werden jedoch so

groß und unpolar, dass sie aus der wässrigen Lösung ausfallen. Daraus wurde geschlossen, dass sich Glykogen für die entwickelte Modifizierungs-Strategie eignete, die modifizierten Derivate jedoch nicht für die Bildung von Hydrogelen.

4.4.2 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON LENTINAN

Beim Lentinan (**97**) handelt es sich um ein Polysaccharid mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 500 kDa, das aus dem Fruchtkörper des Shiitake-Pilzes isoliert wird.^[154]

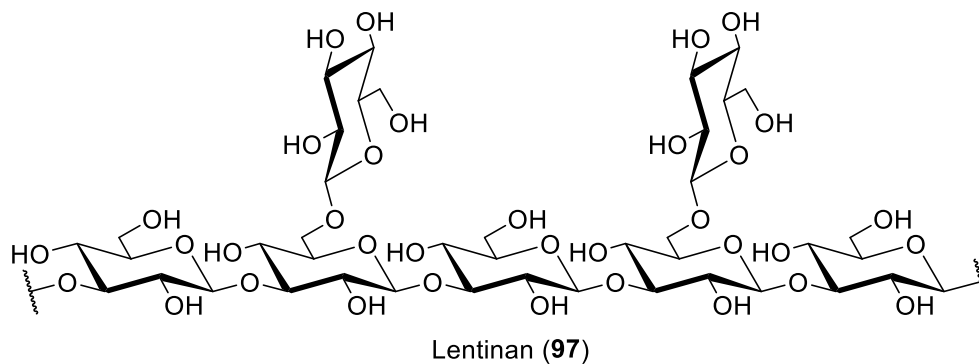
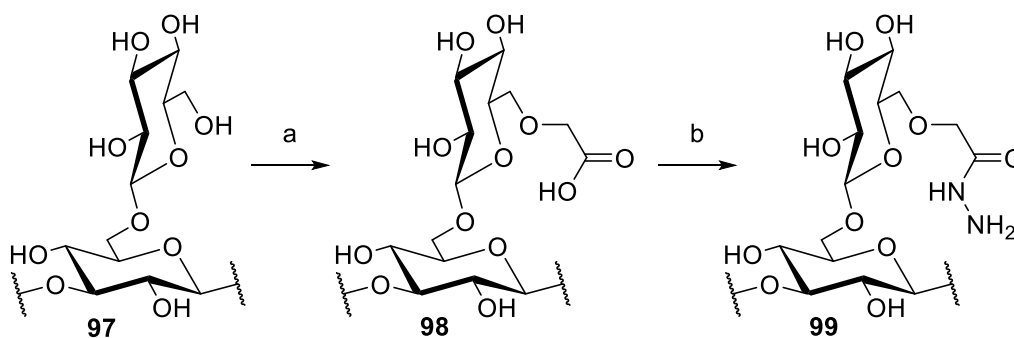


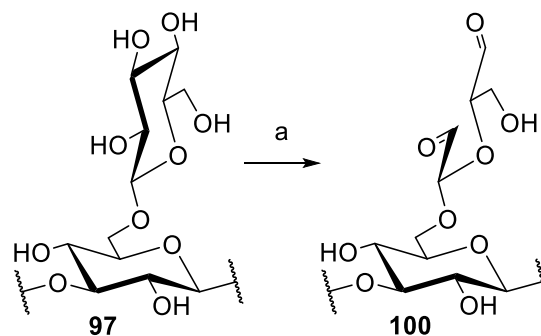
Abbildung 63: Struktur des Lentinan (**97**). Gezeigt ist ein Ausschnitt der sich wiederholenden Einheit aus fünf β -1,3-D-Glukosebausteinen und der charakteristischen β -1,6-verknüpften D-Glukose an jedem zweiten Glukosemonomer.

Es besteht aus β -1,3-Glukose-Einheiten von denen jede zweite zusätzlich über eine β -1,6-glykosidische Bindung mit einer β -Glukose-Seitenketten verbunden ist (Abbildung 63). Lentinan wurde wegen seiner bekannten Biokompatibilität zur Modifizierung ausgewählt. Durch die Immunsystem-unterstützenden Eigenschaften des Lentinans (**97**) wird dieses derzeit in der kombinierten Chemo-Immuntherapie^[155,156] verwendet.



Schema 22: Darstellung von carboxymethyliertem und Hydrazid-modifiziertem Lentinan (**99**). Als repräsentative Struktur ist ein Ausschnitt des Rückgrats mit einer β -Glukose-Seitenkette abgebildet. Reaktionsbedingungen: a) Chloressigsäure, NaOH (8 M), H_2O , 62 °C, 1.5 h; b) EDC, HOBt, DIPEA, H_4N_2 (1 M in THF), H_2O , RT, 4 d.

Zunächst wurde nur das Lentinan CM 1 Hyd (**99**) und das korrespondierende Lentinan Ox 0.8 (**100**) präpariert, um eine Aussage über die Gelierfähigkeit dieses Polysaccharids zu erhalten. Wie in den vorhergehenden Untersuchungen, wurden die standardisierten Bedingungen auf das Lentinan (**97**) angewendet (Schema 22). Elementaranalytische und ^1H NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Derivatisierungen zum Lentinan CM 1 (**98**) und Lentinan CM 1 Hyd (**99**) erfolgreich verlaufen waren. Durch Übertragen der etablierten Oxidationsbedingungen mit Periodat wurden auch Aldehydkomponenten von Lentinan (**100**) erzeugt (Schema 23).



Schema 23: Oxidation von Lentinan (**97**). Reaktionsbedingungen: a) NaIO_4 , H_2O , RT, 17 h.

Auch in diesem Fall wurde zunächst nur ein Lentinan Ox 0.8 (**100**) generiert, um eine prinzipielle Übertragung der entwickelten Methodik auch auf dieses Polysaccharid zu zeigen. Diese Umsetzungen wurden ebenfalls ^1H NMR-Spektroskopisch belegt. Nachdem sowohl die Aldehyd-, als auch die Hydrazid-Komponente des Lentinans erfolgreich dargestellt werden konnten, wurde die Gelierfähigkeit dieser Materialien unter den etablierten Bedingungen untersucht (Abbildung 64). Als Donor der jeweiligen korrespondierenden Aldehyd- bzw. Hydrazid-Komponente wurde Pullulan gewählt. Die Gelierungsversuche konnten zeigen, dass die erzeugten funktionalisierten Lentinane (**99**, **100**) in der Lage sind, mit funktionalisierten Pullulanen (**28**, **36**) Hydrogele auszubilden. Es ist jedoch anzumerken, dass es gravierende Unterschiede zwischen der Hydrazid- (**99**) und der Aldehyd-Komponente (**100**) gab.

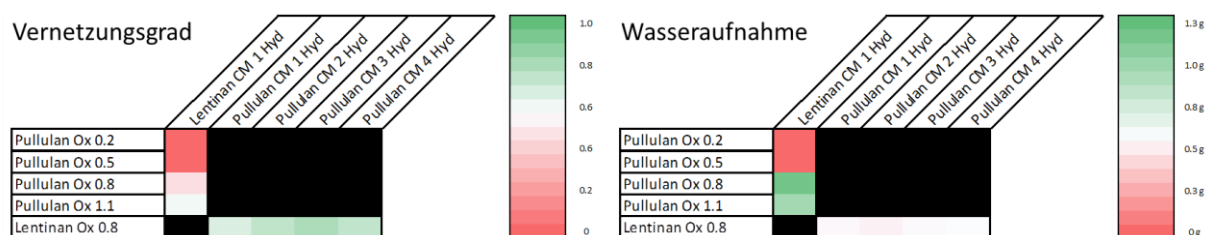


Abbildung 64: Experimente zur Gelierung von modifizierten Lentinanen (**99**, **100**) mit unterschiedlichen Pullulan-Derivaten (**28**, **36**).

Hydrogele, basierend auf Lentinan CM 1 Hyd (99) weisen einen sehr geringen Vernetzungsgrad auf, was auf den Grad der Funktionalisierung zurückzuführen ist. Wie auch in den Gelierversuchen aus Kapitel 4.2 korreliert ein geringer Vernetzungsgrad mit einer hohen Wasseraufnahmefähigkeit und einem sehr niedrig-viskosen Hydrogel.

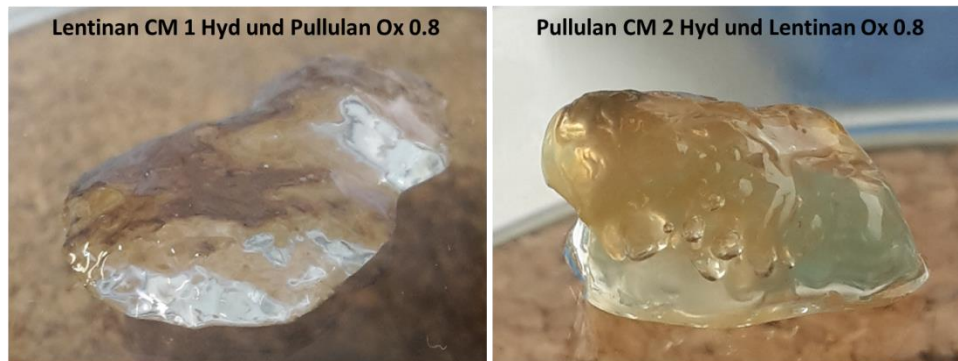


Abbildung 65: Vergleich der Nutzung von Lentinan als Hydrazid-Komponente (99) und Lentinan als Aldehyd-Komponente (100) zur Bildung von Hydrogelen.

Hydrogele, basierend auf dem Lentinan Ox 0.8 (100) hingegen, bildeten deutlich stabilere Matrizen bei einer Wasseraufnahme von ca. 0.6 g pro 4.0 mg Polysaccharid aus. Fotografische Abbilder von den Hydrogelen (Abbildung 65) können das zusätzlich belegen.

4.4.3 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON LICHENIN

Das Polysaccharid Lichenin (101) wird auch Moosstärke genannt, da es in großen Teilen im Isländischen Moos *cetraria islandica* vorkommt und aus diesem isoliert wird.^[157]

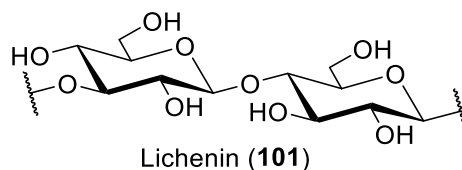
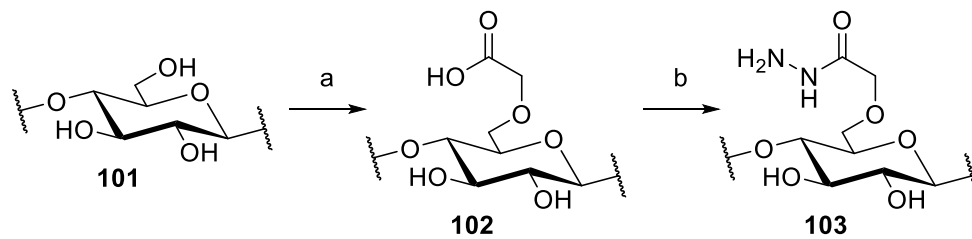


Abbildung 66: Struktur des Lichenin.

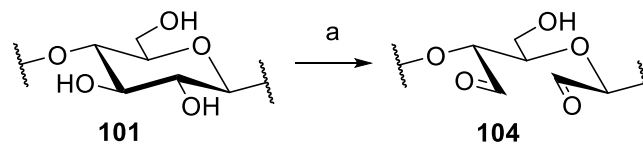
Die Struktur wurde durch PERLIN *et al.*^[158] aufgeklärt und enthält abwechselnd β -1,3- und β -1,4-glykosidisch verbundene D-Glukoseeinheiten (Abbildung 66). Lichenin (101) wurde aus zwei Gründen für dieses Projekt gewählt. Zum einen ist es nachgewiesen biokompatibel, da es bereits als Hausmittel bei der Behandlung von Reizhusten und Appetitlosigkeit genutzt wird.^[159] Zum anderen besitzt Lichenin (101) eine freie Hydroxygruppe an der C-6-Position. Sie eröffnet die Möglichkeit einer gezielten Derivatisierung und einer guten Erreichbarkeit

der substituierten Gruppen. So wurde, wie auch am Beispiel des Lichenin (**97**), Hydrazid- (**103**, Schema 24) und Aldehyd-Modifizierungen (**104**, Schema 25) vorgenommen.



Schema 24: Darstellung von carboxymethyliertem (**102**) und Hydrazid-modifiziertem Lichenin (**103**). Als repräsentative Struktur ist ein β -1,4-verknüpfter Ausschnitt des Rückgrats gezeigt. Reaktionsbedingungen: a) Chloressigsäure, NaOH (8 M), H_2O , 62 °C, 1.5 h; b) EDC, HOBT, DIPEA, H_4N_2 (1 M in THF), H_2O , RT, 4 d.

Nachdem durch ^1H NMR- und elementaranalytische Untersuchungen die Bildung des carboxymethylierten (**102**) und Hydrazid-modifizierten Lichenin (**103**) nachgewiesen werden konnte, wurde auch von diesem Polysaccharid eine Aldehyd-Komponente erzeugt, die wiederum ^1H -NMR-Spektroskopisch belegt wurde.



Schema 25: Oxidation von Lichenin (**101**). Als repräsentative Struktur ist ein β -1,4-verknüpfter Ausschnitt des Rückgrats gezeigt. Reaktionsbedingungen: a) NaIO_4 , H_2O , RT, 17 h.

Auch bei dieser Oxidation konnten die charakteristischen Signale der Oxidation (Kapitel 4.1.1) von Polysacchariden im ^1H NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Dadurch qualifizierte sich auch Lichenin (**101**) für die nachfolgenden Gelierexperimente, wobei verschiedene oxidierte (**28**) und Hydrazid-modifizierte Pullulan-Derivate (**36**) als Reaktionspartner genutzt wurden (Abbildung 67).

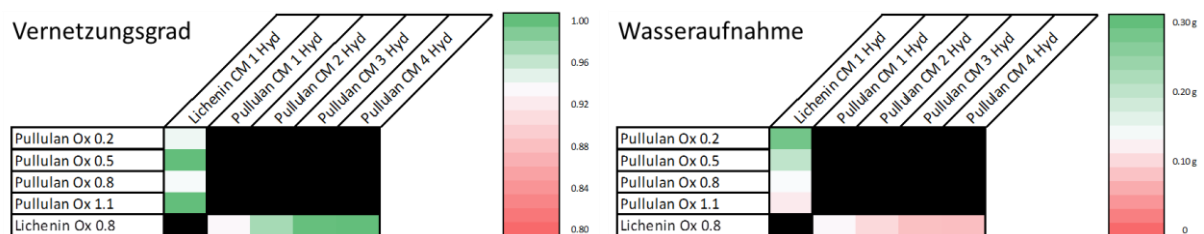


Abbildung 67: Experimente zur Gelierung von funktionalisiertem Lichenin (**103**, **104**) mit unterschiedlichen Pullulan Derivaten (**28**, **36**).

Bei den erzeugten Hydrogelen bestehend aus Lichenin CM 1 Hyd (**103**) und verschiedenen Pullulan Ox-Derivaten (**28**) fand sich ein hoher Vernetzungsgrad (95 %). Bei niedrigem Oxidationsgrad (Pullulan Ox 0.2) des Pullulans (**28**) wurde eine größere Wasseraufnahme

(0.30 g), als bei höheren Oxidationsgraden wie Pullulan Ox 1.1 (**28**) festgestellt. Ein Grund für diese Beobachtung können die generellen Quelleigenschaften des Lichenin (**101**) sein.^[160] Demnach würden die Quelleigenschaft mit zunehmender Derivatisierung und damit Abweichung von der natürlichen Struktur des Polysaccharids abnehmen.

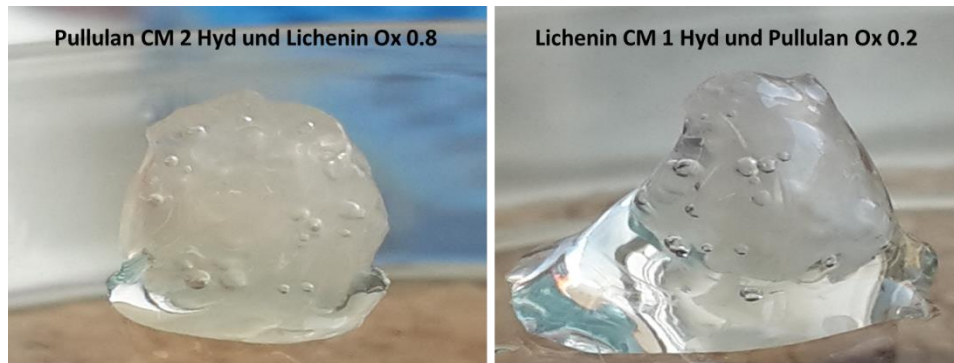


Abbildung 68: Vergleich der Nutzung von Lichenin als Hydrazid-Komponente (**103**) und Lichenin als Aldehyd-Komponente (**104**) zur Bildung von Hydrogelen.

Bei Betrachtung des Einflusses des Vernetzungsgrades auf die Wasseraufnahme von Lichenin Ox-Derivaten (**104**) zeigte sich, dass auch die freien Aldehyde einen Einfluss auf die Wasseraufnahme haben. Je höher der Substitutionsgrad der Hydrazid-Komponente (**36**), desto höher war auch der Vernetzungsgrad. Damit einhergehend sank die Wasseraufnahme. Diese Beobachtung bestätigte die Diskussion in Kapitel 4.2 über die Arten des gebundenen und freien Wassers in einem Hydrogel.

4.4.4 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON FUCOIDAN

Das marine, sulfathaltige Polysaccharid Fucoidan (**105**), entnommen aus dem braunen Seegrass, besteht je nach mikrobiellen Produzenten aus verschiedenen α -L-1,3- und α -L-1,4-verknüpften Fucopyranose-Einheiten^[161] (Abbildung 69). Das Kriterium für die Auswahl des Fucoidans (**105**) war die freie Hydroxyfunktion und die vorliegenden Sulfatgruppen am Rückgrat des Polysaccharids. Zusätzlich zu diesen strukturellen Eigenschaften, wurden für Fucoidan verschiedene medizinische Wirkungen beschrieben.

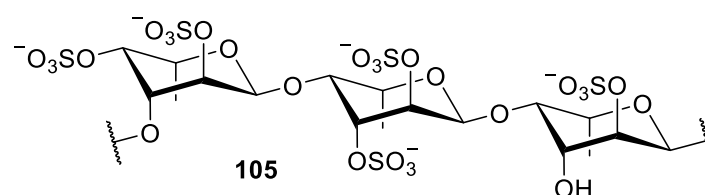
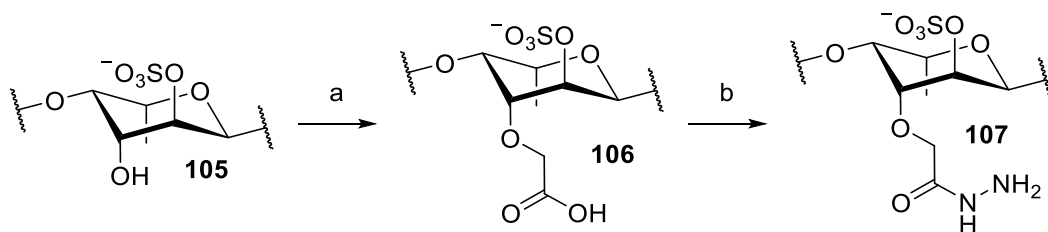


Abbildung 69: Struktur des Fucoidan (**105**) isoliert aus *fucus vesiculosus*.

So wurde publiziert, dass Fucoidan (**105**) in der Lage ist eine Verengung der Arterien nach erfolgreicher Stent-Therapie^[162] zu verhindern, die Apoptose von HS-Sultan Zellen^[163] zu induzieren und in den Zellzyklus von Tumorzellen^[164] einzugreifen. Das verwendete Fucoidan (**105**) wurde von SILVA *et al.*^[165] bezogen, die an photoinduzierten Vernetzungsmethoden für modifizierte Fucoidan-Derivate arbeiten. In diesem Kooperationsprojekt sollte die hier entwickelte Strategie zur Bildung von Hydrogelen (Kapitel 4.1) auf Fucoidan (**105**) übertragen werden.



Schema 26: Darstellung von carboxymethyliertem (**106**) und Hydrazid-modifiziertem Fucoidan (**107**). Als repräsentative Struktur ist ein α -L-1,4-verknüpfter Ausschnitt des Rückgrats gezeigt. Reaktionsbedingungen: a) Chloressigsäure, NaOH (8 M), H₂O, 62 °C, 1.5 h; b) EDC, HOBt, DIPEA, H₄N₂ (1 M in THF), H₂O, RT, 4 d.

Da auf Grund der Struktur des Fucoidans (**105**) eine Oxidation nicht möglich ist, wurde die Darstellung einer carboxymethylierten Hydrazid-Komponente (**107**, Schema 26) unter Erhalt der Sulfat-Gruppen verfolgt.^[166] Es zeigte sich, dass die Sulfat-Gruppen auch nach drei repetitiven Carboxymethylierungsreaktionen noch via elementaranalytischer Untersuchung nachzuweisen waren. Auch die Hydrazid-Bildung veränderte den Schwefelgehalt in den untersuchten Proben nicht. Deshalb wurde auch das modifizierte Fucoidan (**107**) für Gelierexperimente verwendet (Abbildung 70).

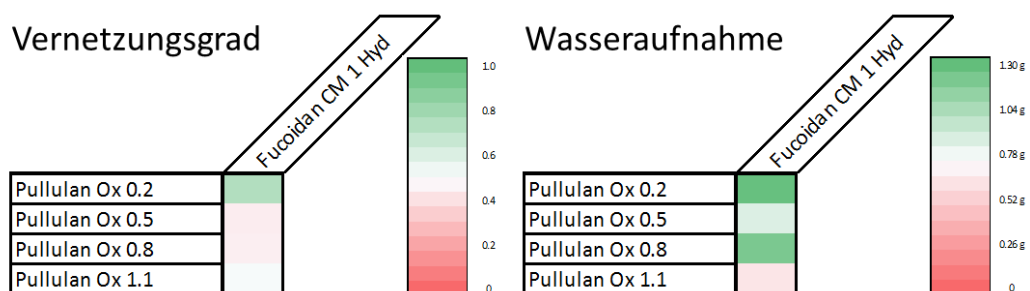


Abbildung 70: Gelierexperimente des carboxymethylierten und nachfolgenden Hydrazid-modifizierten Fucoidan (**107**) mit unterschiedlichen oxidierten Pullulan Derivaten (**28**).

Es wurde das Fucoidan-Derivat Fucoidan CM 1 Hyd (**107**) mit Pullulan-Derivaten (**28**) unterschiedlichen Oxidationsgrades untersucht. Fucoidan CM Hyd (**107**) selbst bildet zwar ein Gel, dieses erwies sich jedoch als sehr weich bzw. sehr niedrig vernetzt (Abbildung 71).

Wie zuvor schon bei allen anderen Polysacchariden führte der niedrige Vernetzungsgrad zu einem hohen Wassergehalt von bis zu 1.3 g pro 4.0 mg Polysaccharid.



Abbildung 71: Hydrogel bestehend aus den Komponenten Fucoidan CM 1 Hyd und Pullulan Ox 0.8.

4.4.5 STUDIEN ZUR MODIFIZIERUNG VON CHITOSAN

Das Polysaccharid Chitosan (**109**) wird aus dem Chitin (**108**) der Garnelenschalen gewonnen. Dies geschieht durch Deacetylierung von Chitin in heißer Natronlauge.^[167] Dabei entscheidet der Grad der Deacetylierung über die Löslichkeit unter wässrigen, neutralen Bedingungen.^[168]

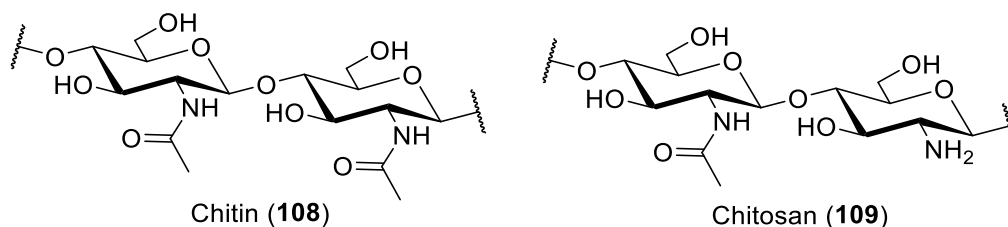
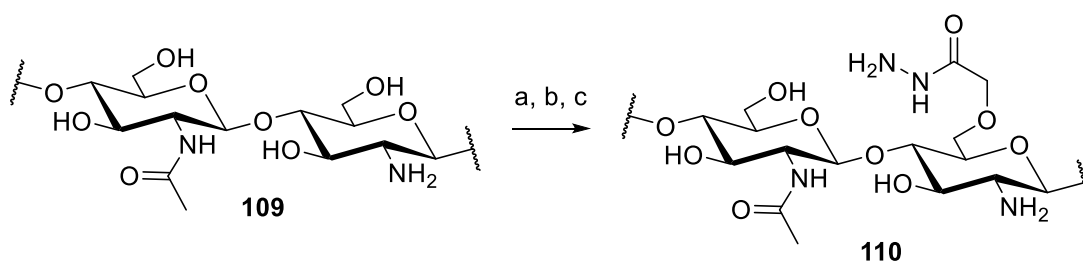


Abbildung 72: Struktur des Chitins (**108**) und des Chitosans (**109**). Abgebildet sind die sich wiederholenden D-Glukosamine.

Chitosan (**109**) ist durch seine vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten^[169] in Kosmetik, Lebensmittelindustrie und Papierherstellung ein geeigneter Kandidat für die Bildung von Hydrogelen zur biomedizinischen Anwendung.



Schema 27: Darstellung von Chitosan CM 2 Hyd (**110**). Reaktionsbedingungen: a) NaOH, Chloressigsäure, H₂O/*i*-PrOH, RT, 4 h; b) NaOH, Chloressigsäure, H₂O/*i*-PrOH, RT, 4 h; c) EDC, HOBT, DIPEA, H₄N₂ (1 M in THF), H₂O, RT, 4 d.

Es ist bekannt, dass Chitosan (**109**) besonders biokompatibel^[170] und biodegradierbar ist.^[171] Da das kommerziell erhältliche Chitosan (**109**) wasserunlöslich ist, musste das Protokoll für die wässrige Carboxymethylierung von Polysacchariden geändert werden. So zeigten PARK *et al.*^[172], dass die Reaktion von Chloressigsäure in Isopropanol vorwiegend zur O-Carboxymethylierung von Chitosan führt.^[173] Wegen des niedrigen Substitutionsgrades der Carboxymethylierung am Chitosan wurde die Reaktion ebenfalls repetitiv geführt. Es zeigte sich, dass nach der ersten Wiederholung der Carboxymethylierungsreaktion das Chitosan CM 2 als wasserlösliches Polysaccharid vorlag (Schema 27).

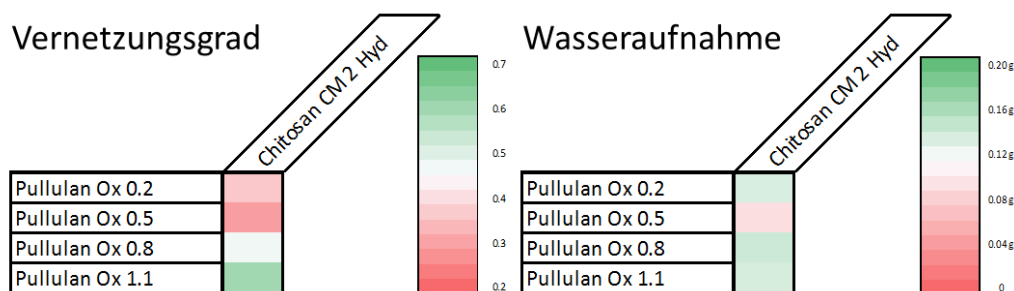


Abbildung 73: Ergebnisse der Gelierexperimente von Chitosan CM 2 Hyd (**110**) mit Pullulan-Derivaten (**28**) verschiedenen Oxidationsgrades.

Anschließend wurde das Chitosan CM 2 Hyd (**110**) über die zuvor entwickelten Bedingungen zur Hydrazidbildung präpariert. Die Hydrazid-Komponente **110** wurde anschließend ebenfalls in Gelierexperimenten mit Pullulan-Derivaten (**28**) verschiedenen Oxidationsgrades untersucht (Abbildung 73). Es zeigte sich, dass sich im Fall des Chitosan CM 2 Hyd (**110**) der Vernetzungsgrad proportional zum Substitutionsgrad der Aldehyd-Komponente ist. Dies deutete darauf hin, dass ein hoher Funktionalisierungsgrad des Chitosans (**110**) vorlag und mit steigender Verfügbarkeit der Aldehyd-Funktionalitäten auch eine höhere Vernetzung stattfindet. Die Wasseraufnahme hingegen blieb bei allen erzeugten Hydrogelen in einem niedrigen Bereich von 0.08 g bis 0.20 g pro 4.00 mg Polysaccharid.



Abbildung 74: Hydrogel aus Chitosan CM 2 Hyd und Pullulan Ox 0.8.

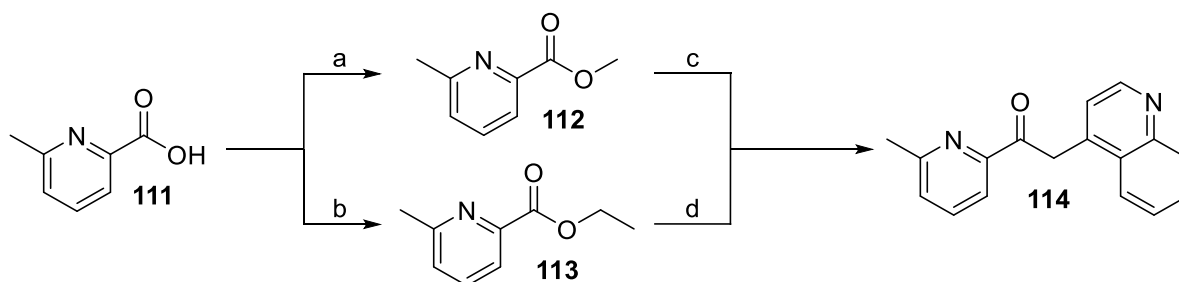
Damit erwiesen sich die Chitosan-basierten Hydrogele als feste Gele (Abbildung 74) mit geringer Wasseraufnahmefähigkeit. Diese zeichneten sich jedoch durch eine nahezu plastisch wirkende Oberfläche und einen geringen Wasserverlust beim Wiegen aus.

Somit konnte die Entwickelte Strategie zur Hydrazidbildung bzw. Aldehydfunktionalisierung an fünf weiteren Polysacchariden (Kapitel 4.4) erfolgreich angewendet werden. Die Gelierexperimente zeigen bei allen Polysacchariden, in Bezug auf den Zusammenhang von Vernetzungsgrad mit der Wasseraufnahmefähigkeit, ein einheitliches Bild.

5 STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASEINHIBITOREN

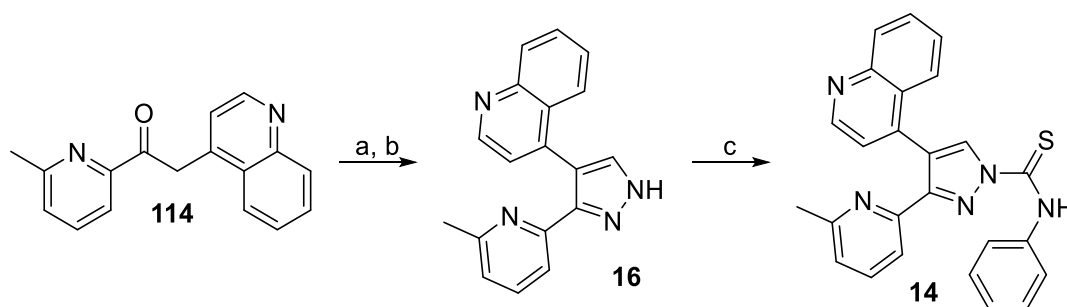
5.1 STUDIEN ZUR DARSTELLUNG DES TGF- β -INHIBITORS A 83-01

Die Synthese der Verbindung A 83-01 (**14**) verlief über eine fünfstufige, lineare Sequenz ausgehend von 6-Methyl-picolinsäure (**111**). Im ersten Schritt wurde die Säure **111** verestert, um diese für eine nukleophile Substitution am Carbonylkohlenstoffatom vorzubereiten.



Schema 28: Alternative Synthesewege zu **114**. Reaktionsbedingungen: a) H_2SO_4 , MeOH, 80 °C, 48 h, 99 %; b) H_2SO_4 , EtOH, 60 °C, 48 h, 87 %; c) KHMDS (0.5 M in Toluol), Lepidin, THF, -78 °C \rightarrow RT, 12 h, 45 %; d) KHMDS (0.5 M in Toluol), Lepidin, THF, -78 °C \rightarrow RT, 12 h, 50 %.

Es wurden sowohl der Methyl-^[174] (**112**) als auch der Ethylester^[175] (**113**) dargestellt, um die Abgangsgruppenaktivität in der nachfolgenden Substitutionsreaktion^[176] (c bzw. d, Schema 28) zu untersuchen und zu vergleichen. Die Reaktion zum Methylester **112** verlief nahezu quantitativ. Zusätzlich zeigte sich, dass es keine markanten Unterschiede in Bezug auf Umsatz und Reaktivität bei der nukleophilen Substitution zu **114** gab.



Schema 29: Synthese der Inhibitoren A 77-01 (**16**) und A 83-01 (**14**). Reaktionsbedingungen: a) DMFDMA, AcOH, DMF, RT, 1 h; b) Hydrazin-hydrat, 50 °C, 2 h, 70 % über zwei Stufen; c) Phenylisothiocyanat, NaH, THF, RT, 12 h, 11 %.

Aus diesem Grund wurde für nachfolgende Wiederholungen der Reaktion stets der Methylester **112** verwendet. Um das Pyrazol-Grundgerüst von **16** aufzubauen, wurde unter der Verwendung von DMFDMA ein C1-Baustein eingeführt, um anschließend in einer Kondensationsreaktion mit Hydrazin den Ringschluss^[177] zu erreichen (Schema 29). Die ersten Umsetzungen von **114** zu **16** lieferten nach säulenchromatographischer Reinigung das Produkt mit geringen Ausbeuten. Es zeigte sich jedoch, dass diese durch Kristallisation des

Pyrazols **16** aus Acetonitril, als alternative Reinigungsmethode, erheblich verbessert werden konnte. Im anschließenden, letzten Schritt der linearen Synthese zu A 83-01 (**14**) ergaben sich zunächst Schwierigkeiten bei der Isolierung des Zielmoleküls **14**. Dünnschichtchromatographische Analysen offenbarten die Instabilität von **14** gegenüber dem verwendeten Kieselgel. Der Zusatz von 10 % Triethylamin zum Eluenten verhinderte die Zersetzung auf der Kieselgeloberfläche, jedoch konnte nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum (40 °C, 200 mbar) nur noch ein Gemisch aus A 83-01 (**14**) und A 77-01 (**16**) sowie Phenylisothiocyanat nachgewiesen werden. Es gelang aber schließlich, **14** bei 8 °C aus EtOAc in geringer Ausbeute zu isolieren (Schema 29).

5.1.1 STABILITÄTSTESTS DES INHIBITORS A 83-01

Die Stabilität des Thioharnstoffs **14** wurde zunächst ^1H NMR-spektroskopisch in CDCl_3 (Abbildung 75) und d_6 -DMSO (Abbildung 76) studiert.

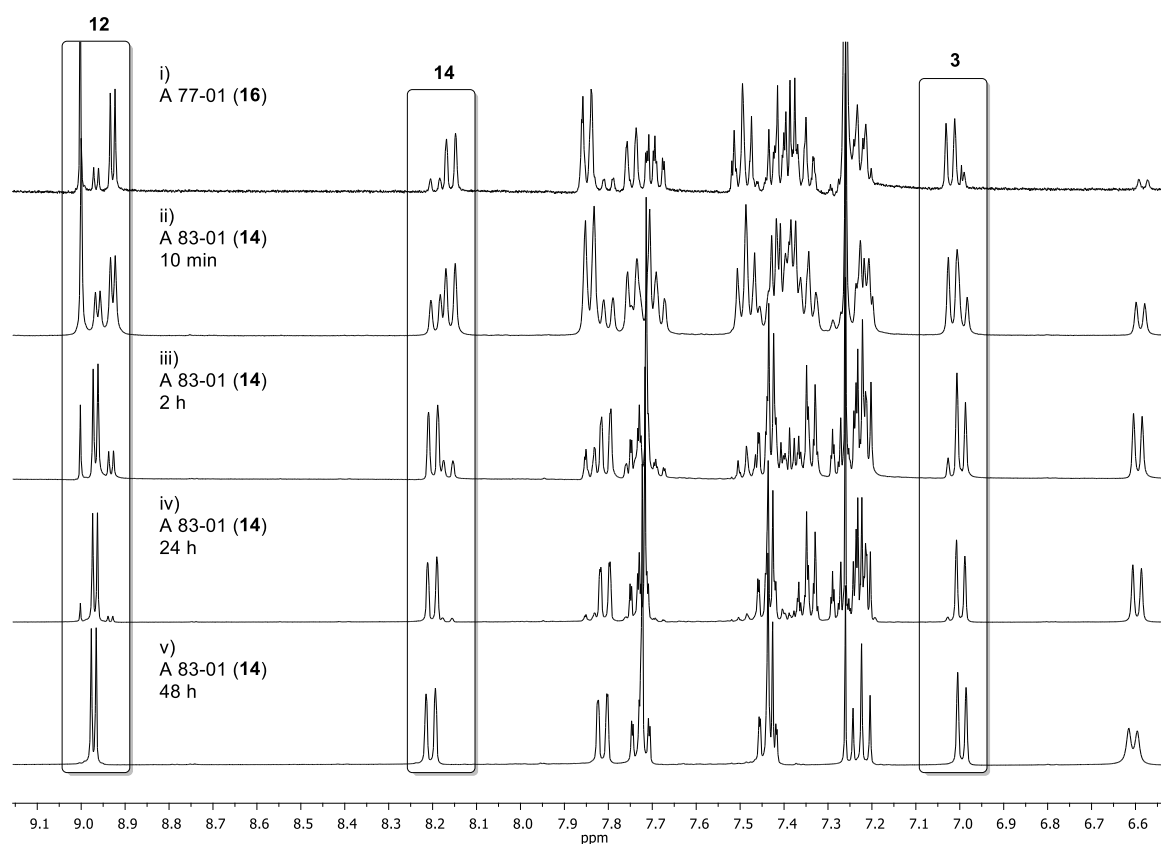
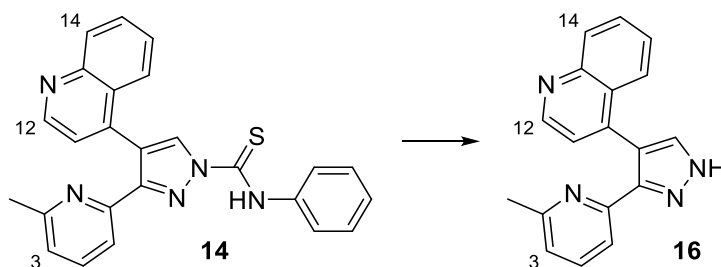


Abbildung 75: ^1H NMR Untersuchungen zur Stabilität von **14** in CDCl_3 . Dabei geben die Nummern 5 (Piperidinproton), 12 (Chinolinproton) und 14 (Chinolinproton) die charakteristischen Protonensignale aus Schema 30 wieder.

Das deuterierte Chloroform wurde vorher über basischem Al_2O_3 filtriert, um Spuren von DCl zu entfernen.



Schema 30: Zerfall des A 83-01 (**14**) in Lösung zu A 77-01 (**16**).

Aus den vorliegenden ^1H NMR-Spektren (Abbildung 75, Abbildung 76) wurde deutlich, dass sich **14** bereits nach 24 h sowohl in CDCl_3 , als auch in d_6 -DMSO zu einem Großteil unter Bildung von **16** zersetzte (Schema 30). Zur besseren Illustration der NMR-Ergebnisse (Abbildung 75 und Abbildung 76) sind die Signale der Protonen *H*-12, *H*-14 und *H*-3 von **14** hervorgehoben und mit den korrespondierenden Signalen (Schema 30) des Pyrazols **16** verglichen.

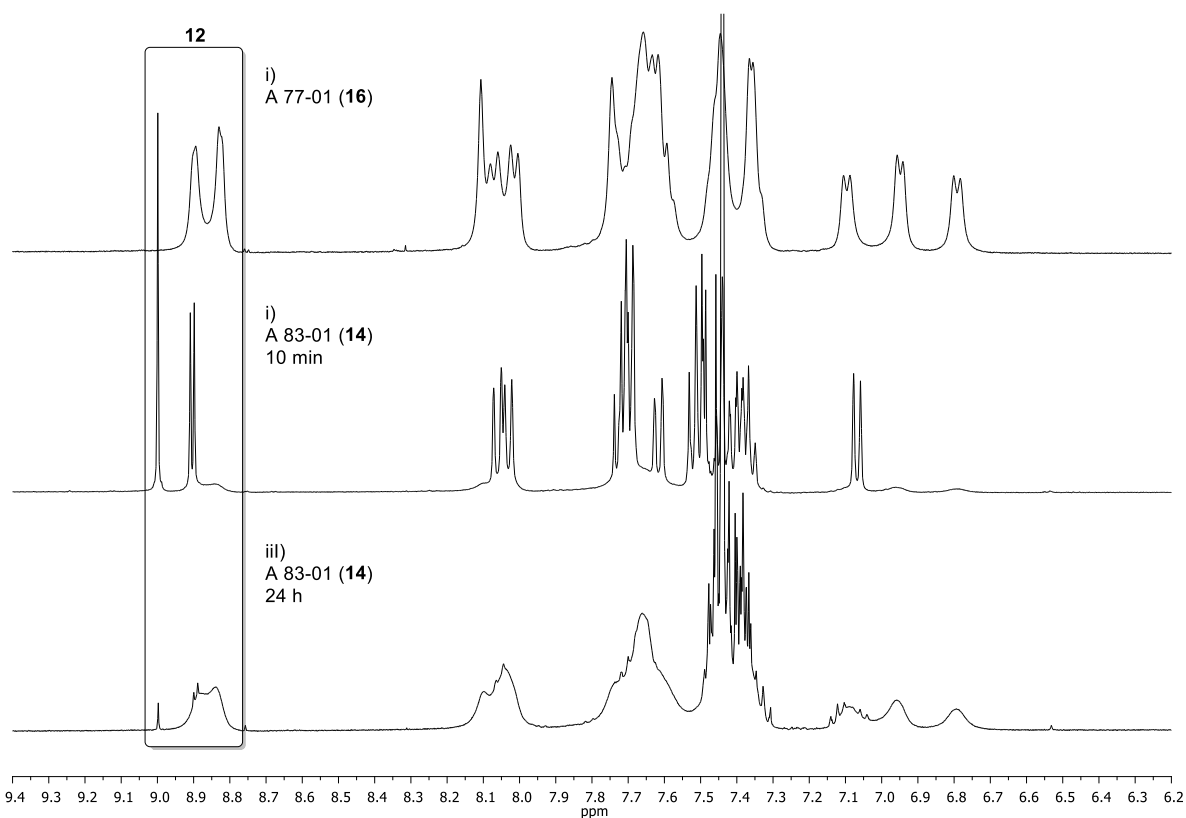
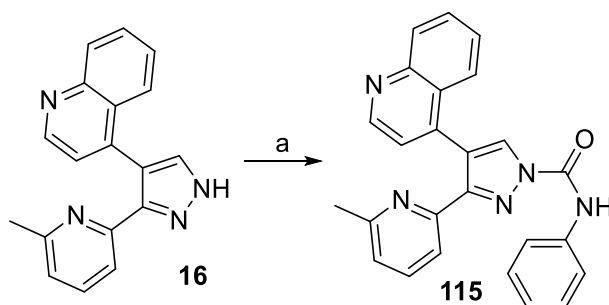


Abbildung 76: ^1H NMR Untersuchungen zur Stabilität von **14** in d_6 -DMSO. Dabei gibt die hervorgehobene Nummer 12 (Chinolinproton) das charakteristische Protonensignal aus Schema 30 wieder.

Anhand dieser Spektren konnte der Zerfall von **14** und die Bildung von **16** belegt werden. Im speziellen wurde auf die Protonen in Position 12 und deren charakteristischer Verschiebung geachtet.



Schema 31: Darstellung des Harnstoffderivates **115**. Reaktionsbedingungen: a) Phenylisocyanat, NaH, THF, RT, 12 h, 80 %.

Da sowohl Sauerstoff, DCl und Licht in den NMR-Untersuchungen ausgeschlossen wurde, konnte es sich bei dem Zerfall nur um eine Rückreaktion durch einen 1,3-*H*-Shift, oder durch einen katalytischen, nukleophilen Angriff des DMSO am Thiocarbonylkohlenstoff^[178] handeln.

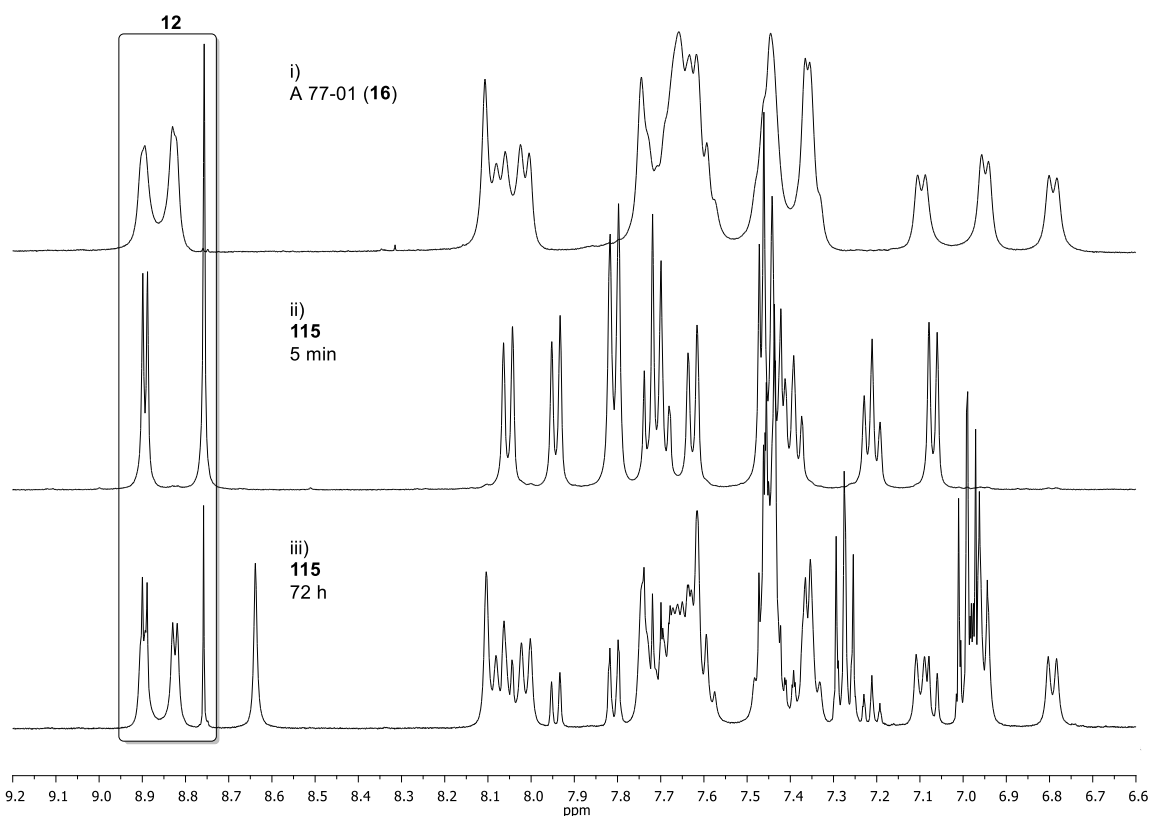
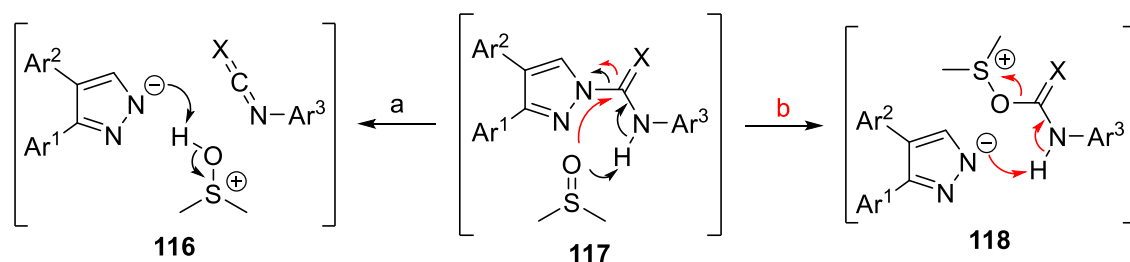


Abbildung 77: Stabilitätstest von **115** in d_6 -DMSO. Dabei gibt die hervorgehobene Nummer 12 (Chinolinproton) das charakteristischen Protonensignal aus Schema 30 wieder.

Um eine mechanistische Betrachtung des Zerfalls der Thioharnstoffstruktur führen zu können, wurde zunächst das Harnstoffderivat **115** (Schema 31) präpariert, bei dem von einer höheren Stabilität ausgegangen wurde. Der Harnstoff **115** konnte säulenchromatographisch gereinigt werden und ist in $CDCl_3$ stabil. In d_6 -DMSO zersetzte sich **115** jedoch innerhalb von 72 h zu ca. 60 % des Pyrazols **16** (Abbildung 77).



Schema 32: Mögliche Mechanismen des Zerfalls der Harnstoffstrukturen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine Stabilisierung der Zielstruktur durch die Verwendung einer Harnstoff- (**115**) anstelle einer Thioharnstoffeinheit (**14**) möglich ist. Dies gilt jedoch nur in Bezug auf CDCl_3 . Damit wird die anfängliche These eines nukleophilen Angriffs bzw. einer katalytischen Deprotonierung durch DMSO, wie von KINGSBURY *et al.*^[178] (Schema 32) beschrieben, bestärkt.

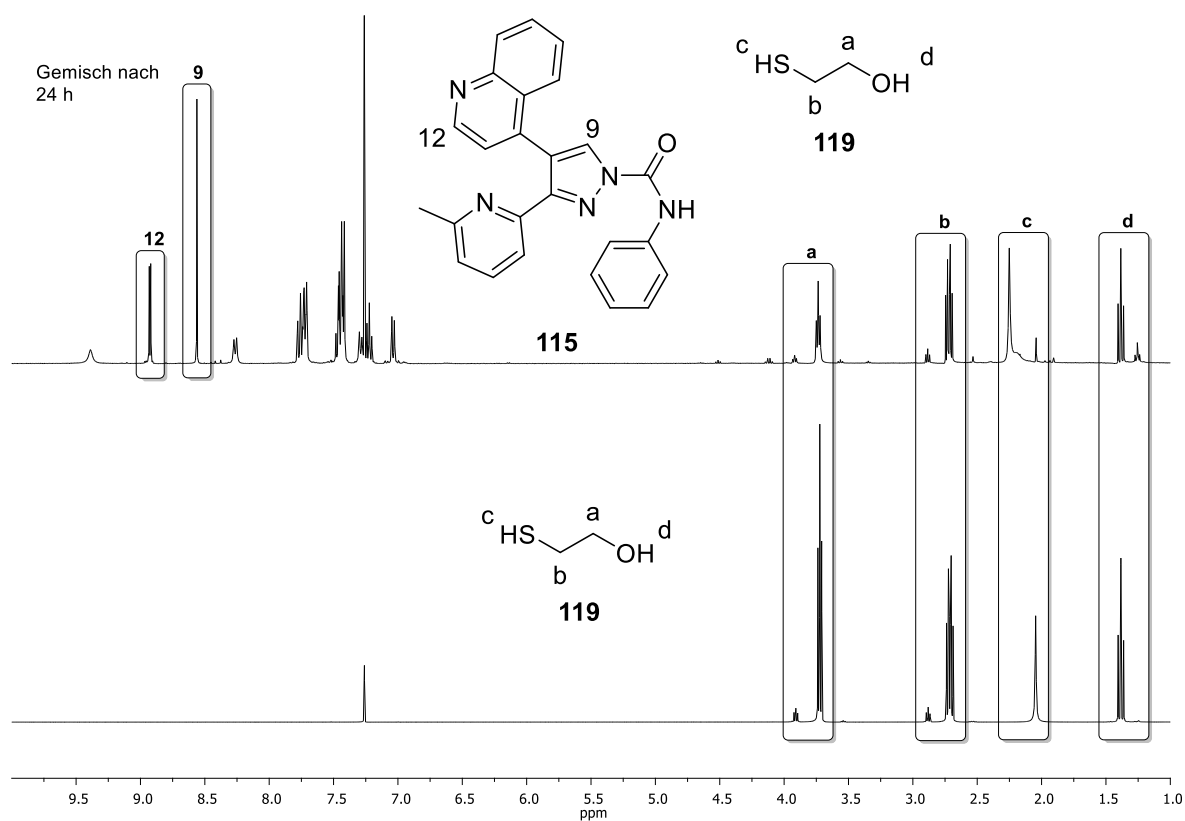


Abbildung 78: NMR-Experiment über die Stabilität von **115** in Anwesenheit von Mercaptoethanol (**119**).

Um diese These zu bestätigen, wurde zunächst ein Modell-System für den möglichen Reaktionsweg **b** (Schema 32) entwickelt, um zu prüfen, ob der nukleophile Angriff am Carbonylkohlenstoffatom der Harnstoffgruppe der Grund für die Instabilität des Thioharnstoffs **14** und seines Harnstoff-Derivates **115** in DMSO ist. Dafür wurde eine Lösung des Harnstoffes **115** für mehrere Tage in CDCl_3 gelagert um zu zeigen, dass die

Harnstoffstruktur ohne äußere Einwirkungen unter diesen Bedingungen stabil vorliegt. Anschließend wurde diese Lösung mit einer äquimolaren Menge einer Lösung von Mercaptoethanol (**119**) in CDCl_3 versetzt (Abbildung 78). Durch die nukleophilen Eigenschaften des Mercaptoethanols (**119**) sollte gezeigt werden, ob es möglich ist, die Struktur des Harnstoffderivates (**115**) durch ein Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Nukleophil wie **119** zu destabilisieren. Die Lösung wurde nach 10 h und nach 24 h NMR-spektroskopisch untersucht. Selbst nach 24 h konnte keine Zersetzung des Harnstoffderivates festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass ein nukleophiler Angriff durch Sauerstoff- bzw. Schwefel-Nukleophile an der Harnstoffstruktur (**115**) nicht stattfindet und somit auch die Theorie des nukleophilen Angriffs von DMSO über den Reaktionsweg **b** (Schema 32) nicht zutreffend ist. Um die Hypothese einer katalytischen Deprotonierungs-Protonierungs-Reaktion zu untersuchen wurde ein NMR-Experiment durchgeführt, bei dem die Stabilität des Harnstoff-Derivates in Anwesenheit der nukleophilen Base Piperidin untersucht wurde.

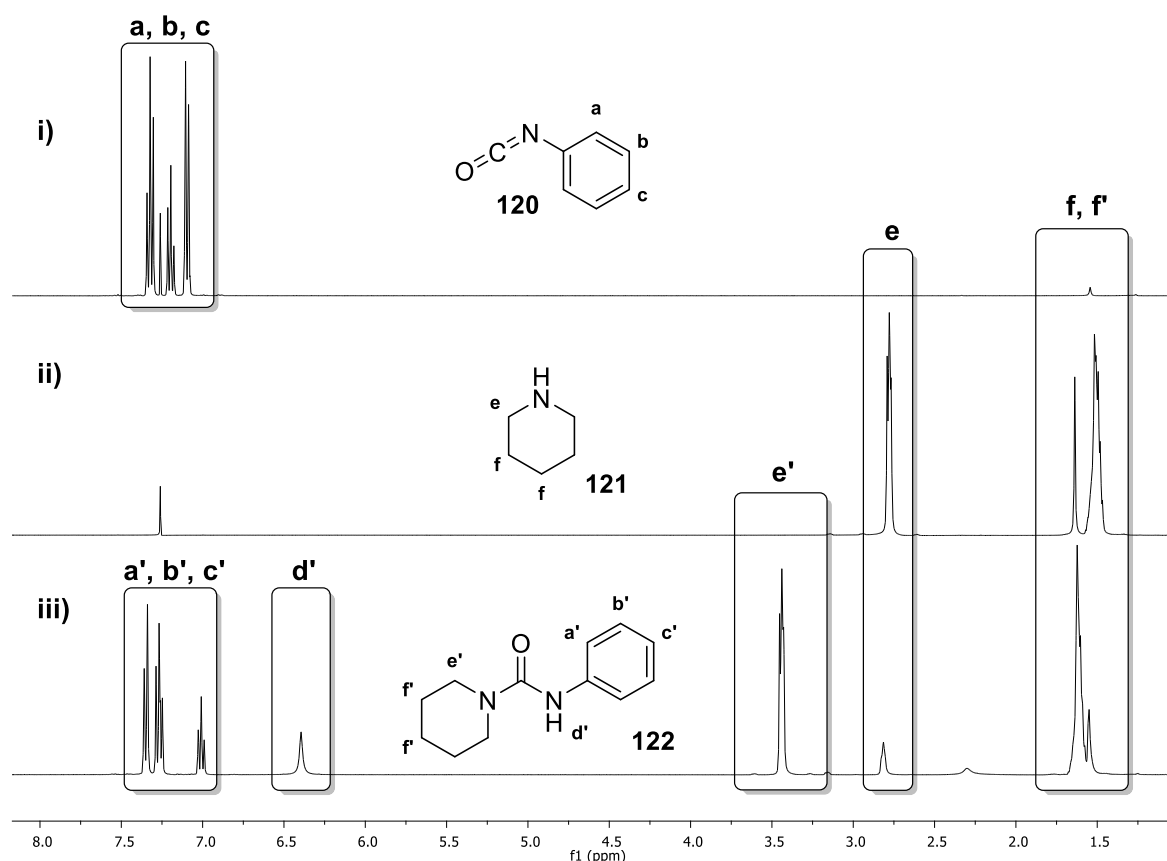
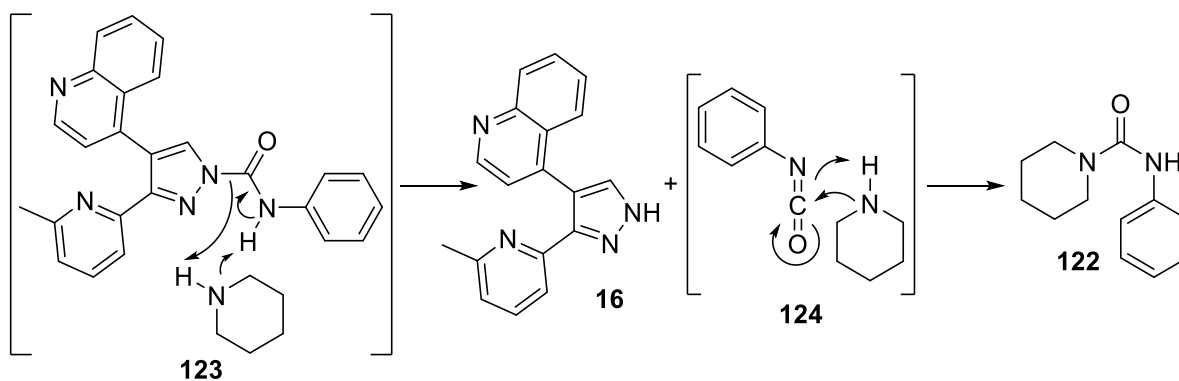


Abbildung 79: Reaktion von Phenylisocyanat (**120**) mit Piperidin (**121**) in CDCl_3 bei RT.

Es sollte der Nachweis der Deprotonierung und Protonierung durch einen äquimolaren Einsatz von Piperidin (**121**) und der Bildung des gemischten Harnstoffderivates **122** angeführt werden.



Schema 33: Mechanismus der Destabilisierung der Thioharnstoff- bzw. Harnstoffderivate von A 83-01 (16) durch basenkatalysierten 1,3-*H*-Shift.

Um das Abfangprodukt der Zerfallsreaktion (122) als Referenz nutzen zu können, wurde dieses zunächst im Rahmen eines NMR-Experiments dargestellt (Abbildung 79). Hierfür wurden Lösungen der Ausgangsprodukte angefertigt und diese anschließend sowohl einzeln, als auch als äquimolares Gemisch vermessen.

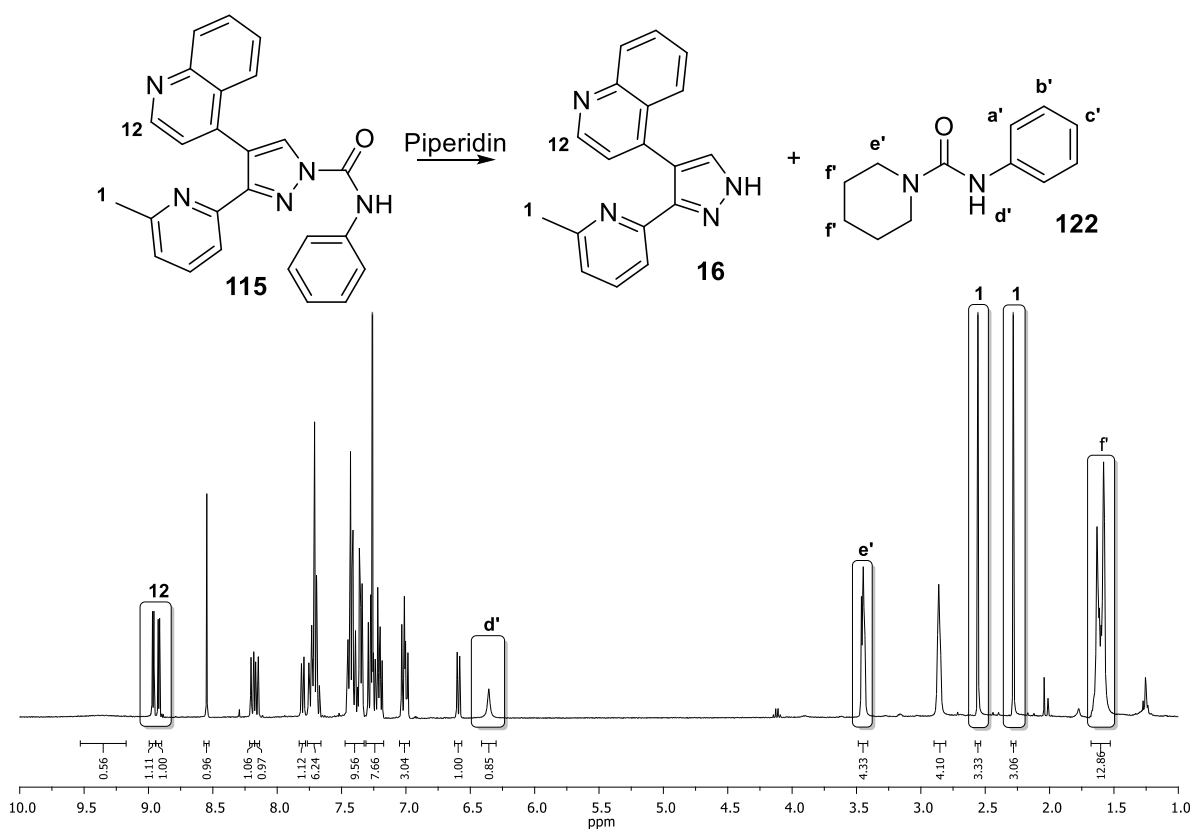


Abbildung 80: Untersuchung des Derivates 115, 41 h nach Zugabe von Piperidin (121).

Aus dem Vergleich der NMR-Spektren wird deutlich, dass bereits 1 h nach Mischung der Phenylisocyanat- (120) und Piperidin-Lösung (121) das Phenylisocyanat (120) vollständig zum Harnstoff-Addukt (122) umgesetzt war. Verläuft also der Zerfall von 115 über eine

Deprotonierung, so sollte das Piperidin-Addukt (Schema 33) im NMR-Spektrum nachweisbar sein.

Anschließend wurde einer Lösung des Harnstoffderivates **115** (21 $\mu\text{mol/mL}$) in CDCl_3 nach drei Tagen mit einer Lösung von Piperidin (**121**, 147 $\mu\text{mol/mL}$) in CDCl_3 in äquimolaren Mengen versetzt und das Gemisch nach 41 h NMR-spektroskopisch vermessen (Abbildung 80). Anhand dieses Spektrums wird deutlich, dass das Harnstoffderivat **115** in CDCl_3 durch Zugabe einer Base, die sowohl in der Lage ist durch eine katalytische Deprotonierungs- und Protonierungs-Reaktion den Harnstoff zum freien Pyrazol (**16**) zu zersetzen, als auch das gebildete Phenylisocyanat (**120**) abzufangen, destabilisiert werden kann. Damit konnte ein nukleophiler Angriff vom DMSO ausgeschlossen und gezeigt werden, dass die Zugabe einer Base notwendig war, um die Harnstoffstruktur (**115**) zu destabilisieren. Zusätzlich wurden beide Verbindungen (**14**, **115**) in einem Zerfallsexperiment verglichen, welches massenspektrometrisch analysiert wurde. Hierfür wurde eine Lösung des jeweiligen Substrates (**14** und **115**, 0.69 μM) in DMSO angefertigt und diese unmittelbar einer LC-MS-Untersuchung unterzogen (Abbildung 81). Um das Verhältnis von Substrat zu seinem Zerfallsprodukt aufzustellen, wurden die jeweiligen UV-Signale integriert und so das Verhältnis ermittelt.

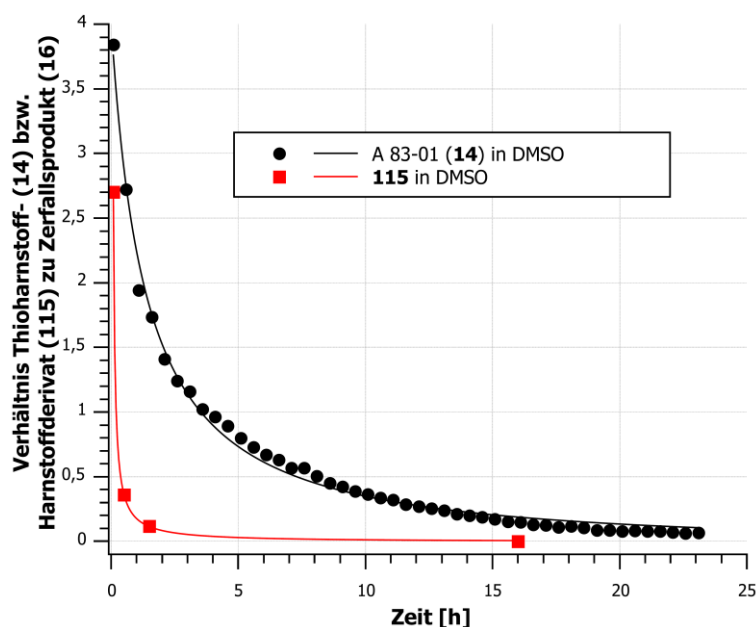


Abbildung 81: Vergleich der Stabilität von A 83-01 (**14**) mit dem Harnstoffanalogon **115** in DMSO.

Hierbei zeigte sich, dass der Harnstoff **115** unter den gegebenen Bedingungen schneller zum freien Pyrazol **16** zerfällt, als der korrespondierende Thioharnstoff (**14**). Eine Erklärung können die Berechnungen nach KAUR *et al.*^[179] liefern. Demnach besitzt die CN-Bindung im

Thioharnstoffgrundgerüst von **14** einen größeren Doppelbindungscharakter und damit eine bessere Delokalisierung als der korrespondierende Harnstoff **115**. Dies würde die Azidität des Protons herabsetzen und somit den pK_S -Wert des Harnstoffs im Vergleich zum Thioharnstoff erhöhen. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Untersuchungen von SCHREINER *et al.*^[180] nach denen der pK_S -Wert von verschiedenen Thioharnstoffen niedriger ist als bei den korrespondierenden Harnstoffen.

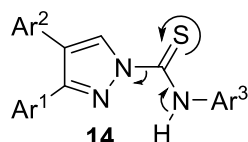


Abbildung 82: Postulierter Mechanismus des spontanen Zerfalls des Inhibitors A 83-01 (**14**).

Die untersuchten Verbindungen waren jedoch nicht mit einer Pyrazol substituiert, sondern besaßen zwei Harnstoff-Protonen und sind somit nur schwer mit dem Thioharnstoff **14** und seinem Harnstoff-Derivat **115** zu vergleichen. Darüber hinaus erklärt sich dadurch auch die Stabilität des Harnstoff-Derivates **115** in $CDCl_3$. Hier liegt keine bzw. nur kaum Resonanz im Grundgerüst vor, was eine spontane Rückreaktion zum freien Pyrazol **16** verhindert. Hingegen wird diese spontane Deprotonierung beim Thioharnstoff **14** durch die Delokalisierung der Elektronen begünstigt (Abbildung 82).

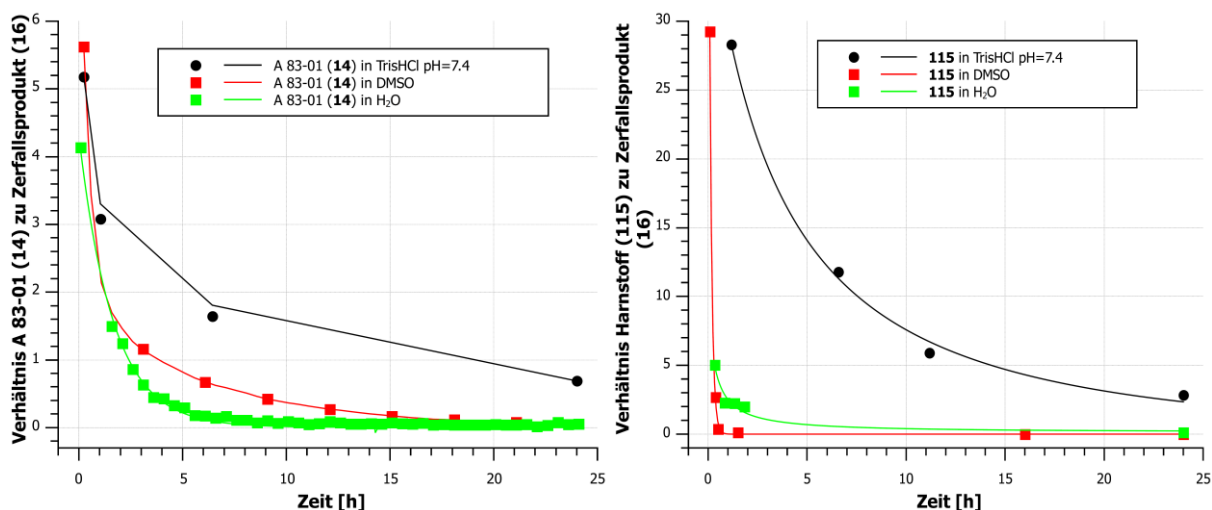


Abbildung 83: Vergleich der Stabilität des A 83-01 (**14**) und des Harnstoff-Derivates **115** in TrisHCl-Puffer (siehe Kapitel 7.1).

Diese Experimente zeigten, dass bei einem Thioharnstoff-Gerüst diese Deprotonierungs-Protonierungs-Reaktion wegen des elektronischen Einflusses des Schwefels spontan und ohne Aktivierung durch eine Base verlaufen konnte. Das Harnstoff-Derivat **115** war in Abwesenheit von basischen Reagenzien hingegen stabil. Im Hinblick auf die folgenden

Kinaseexperimente wurde der Thioharnstoff **14** und der Harnstoff **115** in einem gängigen Puffersystem (TrisHCl) untersucht. Dieses Puffersystem wird in dem „ADP-Glo™ Kinase Assay“ verwendet, um die Aktivität verschiedener Kinase nach Einsatz eines potentiellen Inhibitors zu prüfen. Der darin verwendete TrisHCl Puffer (40 mM TrisHCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA) wurde nach der Beschreibung der Firma Promega hergestellt und die beiden Substrate **14** und **115** erneut einer LC-MS-Untersuchung unterzogen (Abbildung 83).

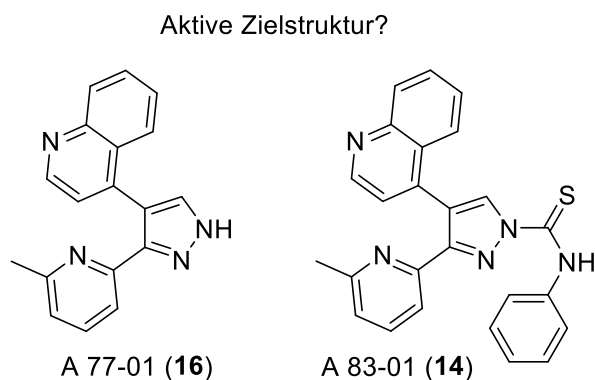


Abbildung 84: Gegenüberstellung der beiden aktiven Strukturen.

Diese Versuchsreihe (Abbildung 83) konnten zeigen, dass der Thioharnstoff **14** in dem verwendeten Puffersystem nicht stabil ist. Beide Substrate (**14** und **115**) zeigten jedoch in dem Puffersystem eine erhöhte Stabilität gegenüber der reinen DMSO-Lösung und der Lösung in einer Mischung aus Wasser und DMSO (95:5). Offensichtlich bewirkt das Puffersystem durch Ph-Wert-Regulierung eine Erhöhung der Stabilität von **14** bzw. **115**.

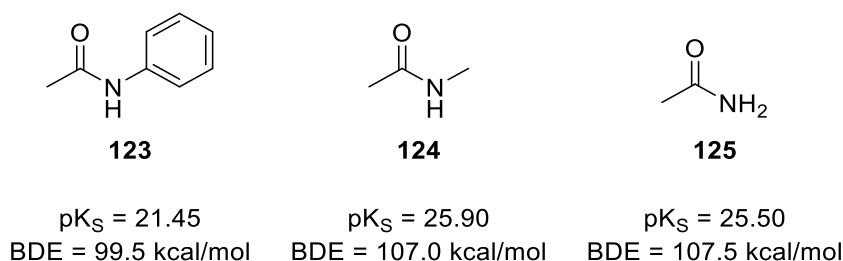
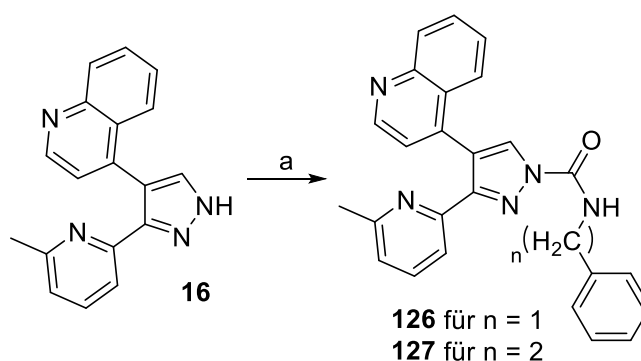


Abbildung 85: Vergleich der pK_S -Werte und berechneten Bindungs-Dissoziations-Energien (BDE) nach BORDWELL et al.^[181,182] verschiedener Amid-Strukturen. Die Werte beziehen sich in allen Fällen auf die N-H-Bindung.

Diese Untersuchung lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass eine Deprotonierungs-Protonierungs-Reaktion für den Zerfall des Thioharnstoffs **14** und des Harnstoffs **115** verantwortlich ist. Diese Ergebnisse gaben jedoch Zweifel an der Identität des aktiven Inhibitors. Zwar ist der Inhibitor A 83-01 (**14**) kommerziell erhältlich, doch die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine schnelle Zersetzung zu der Verbindung A 77-01 (**16**) stattfindet. Somit könnte **14** einen Vorläufer des aktiven Inhibitors darstellen. Wie bereits in Kapitel 2.6

gezeigt, gleichen sich die Substrate **14** und **16** in ihren Aktivitäten und auch das literaturbekannte Kinaseprofil der beiden Inhibitoren weist hohe Ähnlichkeiten auf.



Schema 34: Darstellung der Harnstoff-Derivate **126** und **127**. Reaktionsbedingungen: für $n = 1$ a) Benzylisocyanat, NaH, THF, RT, 12 h, 73 %; für $n = 2$ a) 2-Phenylethylisocyanat, NaH, THF, RT, 12 h, 59 %.

Daher wurde vermutet, dass es sich bei der aktiven Zielstruktur nicht um den Thioharnstoff **14**, sondern bestenfalls um eine Mischung aus den Inhibitoren **14** und **16** handelte (Abbildung 84). Um diese These zu festigen wurde versucht, eine Derivatisierung durchzuführen die zu einer erhöhten Stabilität führt. Zunächst sollte die eigentliche Zielstruktur nur geringfügig geändert werden.

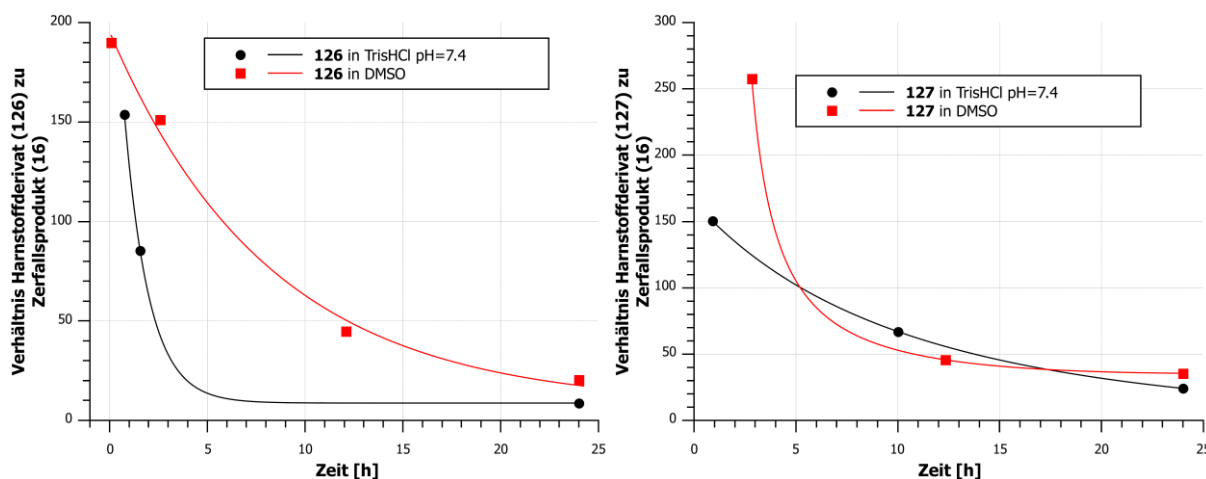
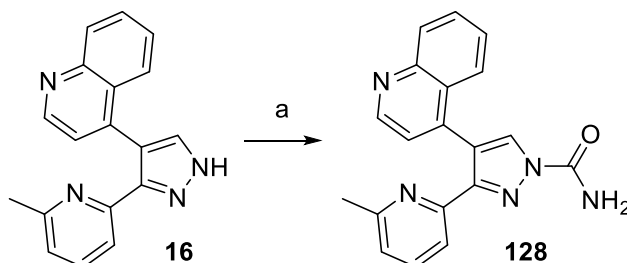


Abbildung 86: Untersuchung der Stabilität der Harnstoffderivate **126** und **127**.

Dafür wurde der stabilere Harnstoff **115** herangezogen und Derivate (**126**, **127**) von diesem dargestellt die für eine Verminderung der Azidität des NH-Protons sorgen konnten. Vor diesem Hintergrund konnten die Arbeiten von BORDWELL *et al.*^[181,182] die Zusammenhänge zwischen Substitutionsmuster und Azidität von Amid-Strukturen (Abbildung 85) aufzeigen. Diese Arbeiten zeigten, dass der aromatische Ring am Stickstoffatom durch Resonanzstabilisierung des Amids für eine Erhöhung der Azidität des Amid-Protons führt. Im Gegensatz dazu sind die errechneten pK_S - und BDE-Werte für **124** und **125** aufgrund der

fehlenden Stabilisierung über eine Resonanzstruktur nahezu identisch. So wurden zunächst zwei Derivate dargestellt die eine aliphatische Gruppe zwischen dem aromatischen System und der Harnstoffstruktur enthielten (Schema 34).



Schema 35: Darstellung des Harnstoffderivates **128**. Reaktionsbedingungen: a) Trichlormethylchlorformiat, Ammoniak-Lsg., CHCl_3 , RT, 6 h, 41 %.

Die beiden Harnstoffderivate **126** und **127** zeigten zunächst eine hinreichende Stabilität in CDCl_3 , weswegen diese ebenfalls im Rahmen eines LCMS-Experiments in DMSO untersucht wurden (Abbildung 86). Die Einbringung eines aliphatischen Verbindungselements führte zu einer erhöhten Stabilität der Harnstoffderivate **126** und **127** in einer Lösung von DMSO.

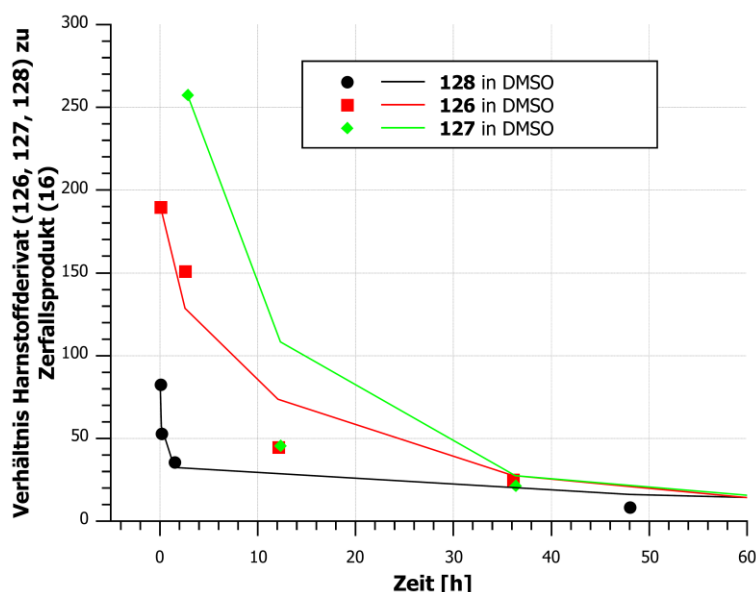
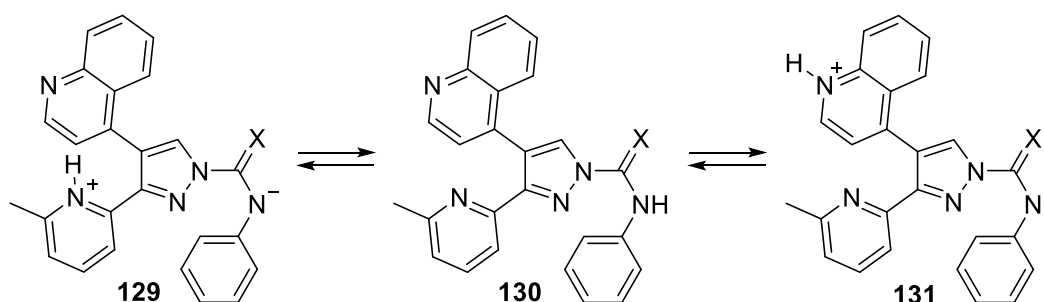


Abbildung 87: Vergleich der Stabilität von **126**, **127** und **128** in reiner DMSO-Lösung. Die Untersuchung wurde mit einer LCMS durchgeführt und ein Verhältnis der integrierten UV-Signale der Harnstoffderivate (**126**, **127**, **128**) mit dem jeweiligen Zerfallsprodukt (**16**) erstellt.

Beide Derivate wiesen noch nach 24 h ein Verhältnis von ca. 25:1 (korrespondierendes Harnstoffderivat:Zerfallsprodukt **16**) auf. Eine weitere Derivatisierung zu **128** (Schema 35) sollte zeigen, ob die Ergebnisse der Arbeiten von BORDWELL *et al.*^[181,182] (Abbildung 85) bezüglich der pK_S -Werte verschiedener Amide auch auf die Pyrazolderivate anwendbar

waren. Die Stabilität dieses Harnstoffderivats wurde ebenfalls über ein LCMS-Experiment studiert (Abbildung 87).



Schema 36: Darstellung der tautomeren Zwischenstufen (**129**, **130**, **131**), die durch Ionen-stabilisierendes Lösungsmittel begünstigt werden können. Die Bezeichnung **X** bezieht sich entweder auf ein Sauerstoff-, oder ein Schwefelatom.

Der potentielle Inhibitor **128** wies eine ähnliche Stabilität auf wie die Substrate die ein aliphatisches Verbindungselement zwischen Harnstoffeinheit und aromatischem Ring besitzen. Diese LCMS-Untersuchungen zeigten somit, dass die Zusammenhänge zwischen den Substitutionsmustern von Amiden (Abbildung 85) und ihren pK_S-Werten mit den dargestellten Harnstoffderivaten (**126**, **127**, **128**) vergleichbar sind. Dies zeugt davon, dass die Stabilität der Thioharnstoff- bzw. Harnstoffderivate von der Azidität des NH-Protons abhängig ist. Zusätzlich zu dem basischen Charakter von DMSO tragen die dargestellten Harnstoffderivate ebenfalls ein basisches Zentrum. In einem Lösungsmittel wie DMSO könnte dieser Effekt ebenfalls ein Faktor für die verminderte Stabilität der Substanzen sein. DMSO selbst ist in der Lage, sowohl Kationen als auch Anionen zu stabilisieren und damit Protonentransfer-Reaktionen zu begünstigen.^[183] Dies würde die erhöhte Stabilität in CDCl₃ erklären, da dieses keine Ionen-stabilisierende Effekte besitzt und somit die Protonentransfer-Reaktion nicht begünstigen kann.

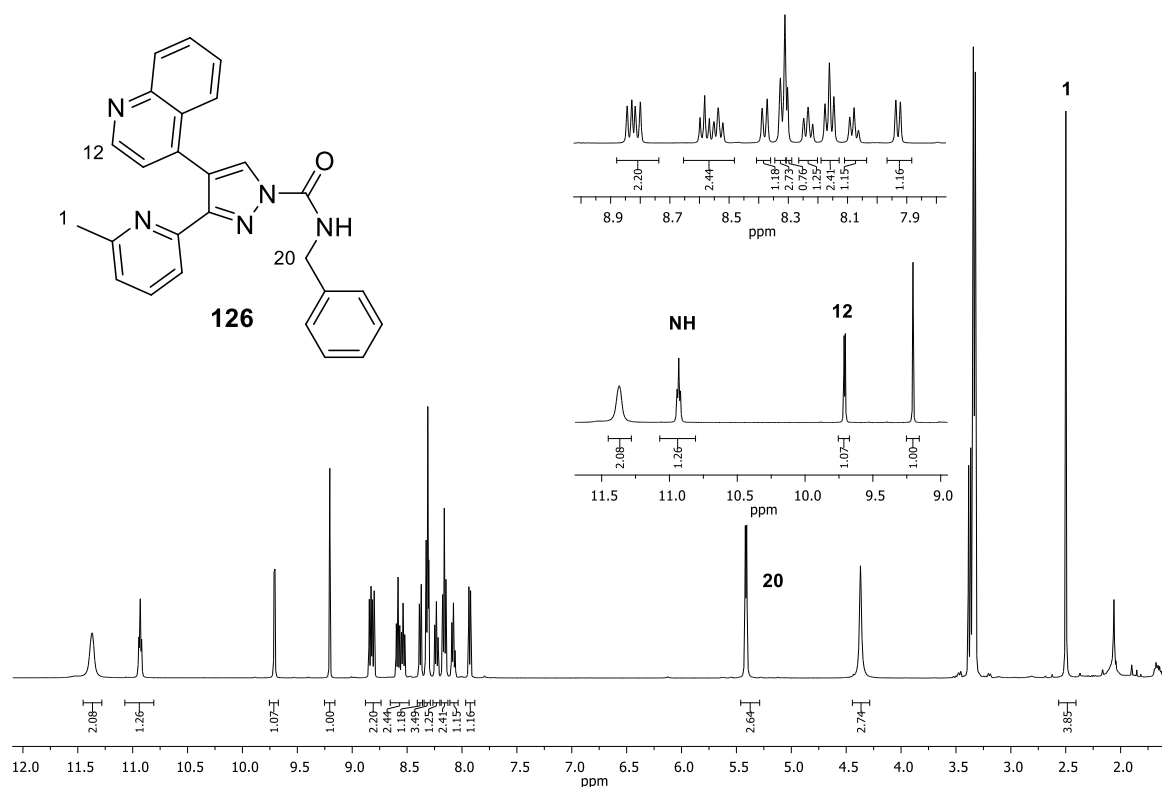


Abbildung 88: Abbildung des ¹H NMR-Spektrums von **126** in d₁₈-HMPA. Die korrespondierenden Signale wurden durch die Nomenklatur des Experimentellen Teils dieser in der Abbildung hervorgehoben.

Ein Lösungsmittel das in der Lage ist Ladungen zu stabilisieren, könnte über die in Schema 36 gezeigten Tautomere zu einem Zerfall der jeweiligen Substanz führen. Um diese Vermutung zu beweisen, wurde ein NMR-Experiment in deuteriertem HMPA durchgeführt. Hierfür wurde eines der stabileren Derivate (**126**) untersucht.

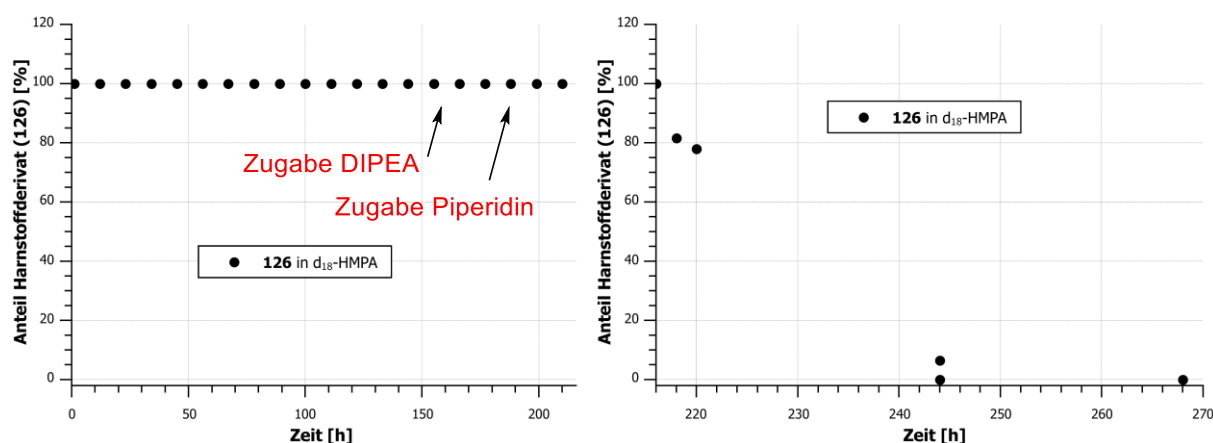


Abbildung 89: Gehalt der NMR-Lösung an **126** unter verschiedenen Bedingungen. Links ist die Untersuchung der d₁₈-HMPA-Lösung von **126** bei RT gezeigt. Dabei sind die Zugaben von DIPEA nach 168 h und die Zugabe von Piperidin nach 192 h hervorgehoben. Rechts ist die Untersuchung des Gemischs aus **126**, DIPEA und Piperidin in d₁₈-HMPA bei 60 °C gezeigt.

Es sollte gezeigt werden, ob der basische Charakter eines Lösungsmittels oder seine Fähigkeit Ionen zu stabilisieren für den Zerfall verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass HMPA nur schwach basisch ist und Kationen stabilisiert. Dadurch kann HMPA die besagte Protonentransfer-Reaktionen prinzipiell begünstigen.^[183] Aus Sicherheitsgründen wurde ein NMR-Röhrchen mit der Verbindung **126** und d_{18} -HMPA befüllt, abgeschmolzen und anschließend die NMR-Messungen vorgenommen. In dieser Lösung lag der potentielle Inhibitor **126** über einen Zeitraum von 3 h unverändert vor. Das Amidproton erfuhr dabei eine deutliche Verschiebung und es wurde eine deutliche Kopplung zu den Protonen der benzylichschen Position beobachtet (Abbildung 88).

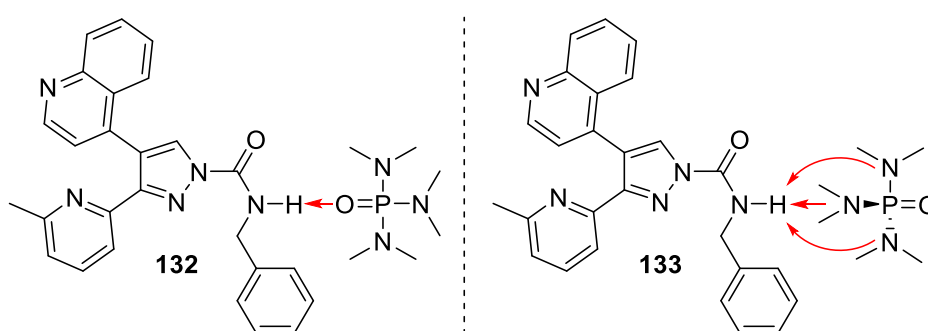
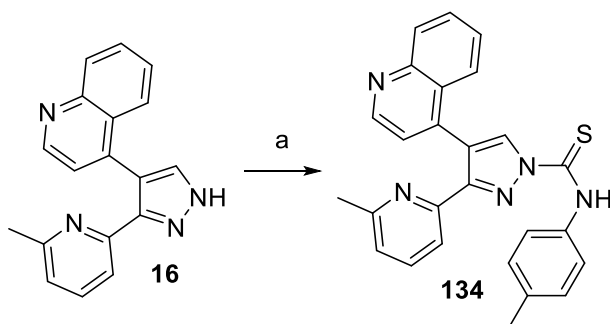


Abbildung 90: Vorschlag der Koordination des HMPA (**132**, **133**) am Harnstoffproton von **126** zu Erklärung der Stabilität von **126** in d_{18} -HMPA.

Durch dieses Experiment kann ausgeschlossen werden, dass der Zerfall von **126** über ein Gleichgewicht wie in Schema 36 gezeigt verlief. Vielmehr kann so belegt werden, dass die Anwesenheit einer Base notwendig ist, um die Zersetzung Harnstoffstruktur am Pyrazol einzuleiten. Die Lösung von **126** in HMPA wurde insgesamt über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht ohne eine Veränderung festzustellen. Aus diesem Grund wurde der Lösung zunächst DIPEA zugesetzt (Abbildung 89). Auch hier zeigte sich über einen Zeitraum von 48 h keine Zerfallsreaktion. Somit ist die nicht nukleophile Base DIPEA in der vorliegenden Verdünnung nicht geeignet um das Harnstoffproton von **126** zu abstrahieren. Wie in den vorigen Stabilitätsuntersuchungen wurde der NMR-Lösung zusätzlich ein Überschuss an Piperidin zugegeben. Die Zugabe dieser nukleophilen Base führte an **126** in $CDCl_3$ zu einer raschen Zersetzung. Im Fall der HMPA-Lösung von **126** wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Nachdem **126** auch in Anwesenheit von Piperidin und DIPEA keinen Zerfall zeigte (Abbildung 89), wurde begonnen die vorgefertigte NMR-Lösung zu erwärmen um somit die Deprotonierungsreaktion zu beschleunigen bzw. einzuleiten (Abbildung 89). Anhand dieser Daten (Abbildung 89) und der chemischen Verschiebung des

Harnstoffprotons (Abbildung 88) wird von einer Koordination des HMPA am Harnstoff nach Abbildung 90 ausgegangen.



Schema 37: Synthese des Thioharnstoffderivats **134**. Reaktionsbedingungen: a) *p*-Toluolisothiocyanat, NaH, THF, RT, 12 h, 20 %.

Diese Koordination kann allem Anschein nach erst bei höheren Temperaturen (60 °C) abgeschwächt werden, um das Proton für die Deprotonierung der beigefügten Basen freizugeben. Da das Harnstoffderivat **126** in einer d_{18} -HMPA-Lösung stabil ist, wurde ein Thioharnstoffderivat (**134**) synthetisiert, der dem Inhibitor A 83-01 (**14**) sehr ähnlich ist (Schema 37).

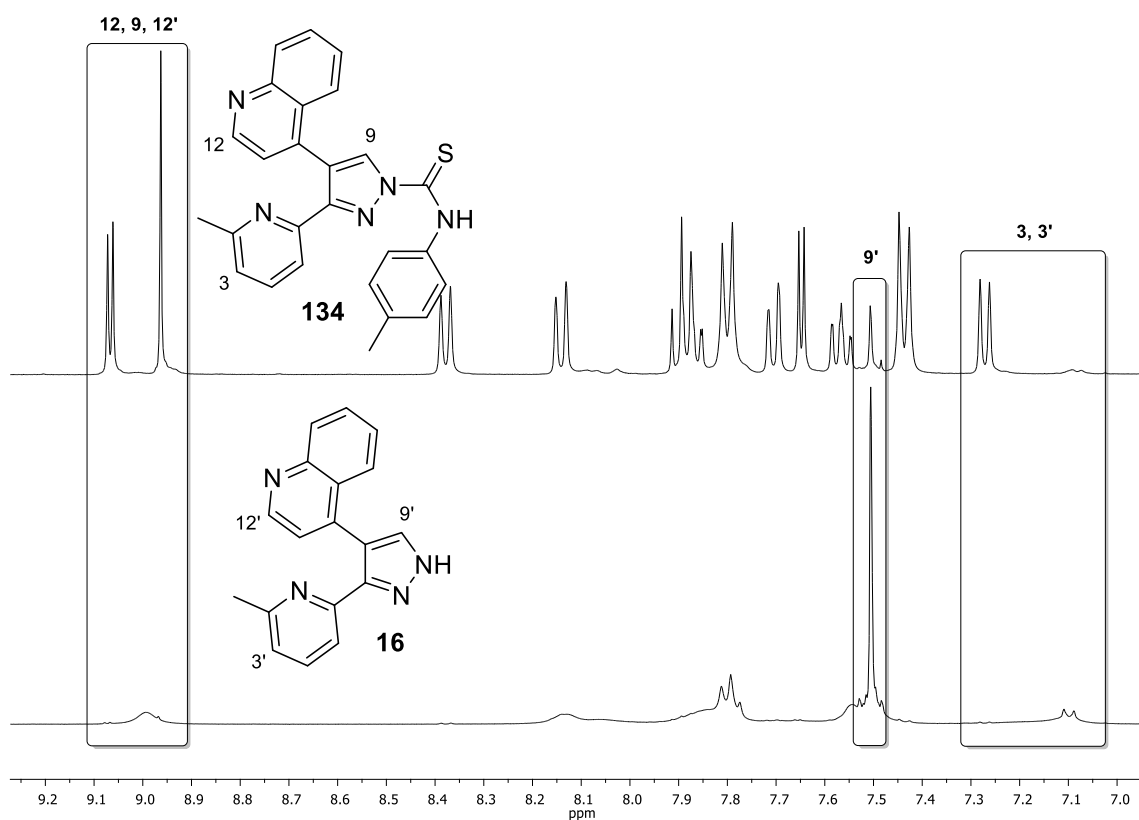


Abbildung 91: ^1H NMR-Untersuchung des Zerfalls von **134** zu **16** in d_{18} -HMPA. Es wird die Messung direkt nach der Lösung von **134** (oben) und nach 24 h bei RT. Hervorgehoben sind die Protonen 12 (oben, duplett), 9 (oben, singulett) und 3 (oben duplett) des Thioharnstoffderivats **134**, sowie die Protonen 12' (unten, breites singulett), 9' (unten, singulett) und 3' (unten duplett) des Zerfallsprodukts **16**.

Dieser sollte ebenfalls in einer d_{18} -HMPA-Lösung untersucht werden. Bei der Reinigung von **134** ergaben sich dieselben Probleme wie bei A 83-01 (**14**). Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Methylgruppe in *para*-Position keinen Einfluss auf die Stabilität des Thioharnstoffderivats **134** hat. Die ^1H NMR-Untersuchung zeigte den Zerfall von **134** binnen 24 h in d_{18} -HMPA (Abbildung 91) bzw. in CDCl_3 (Abbildung 92).

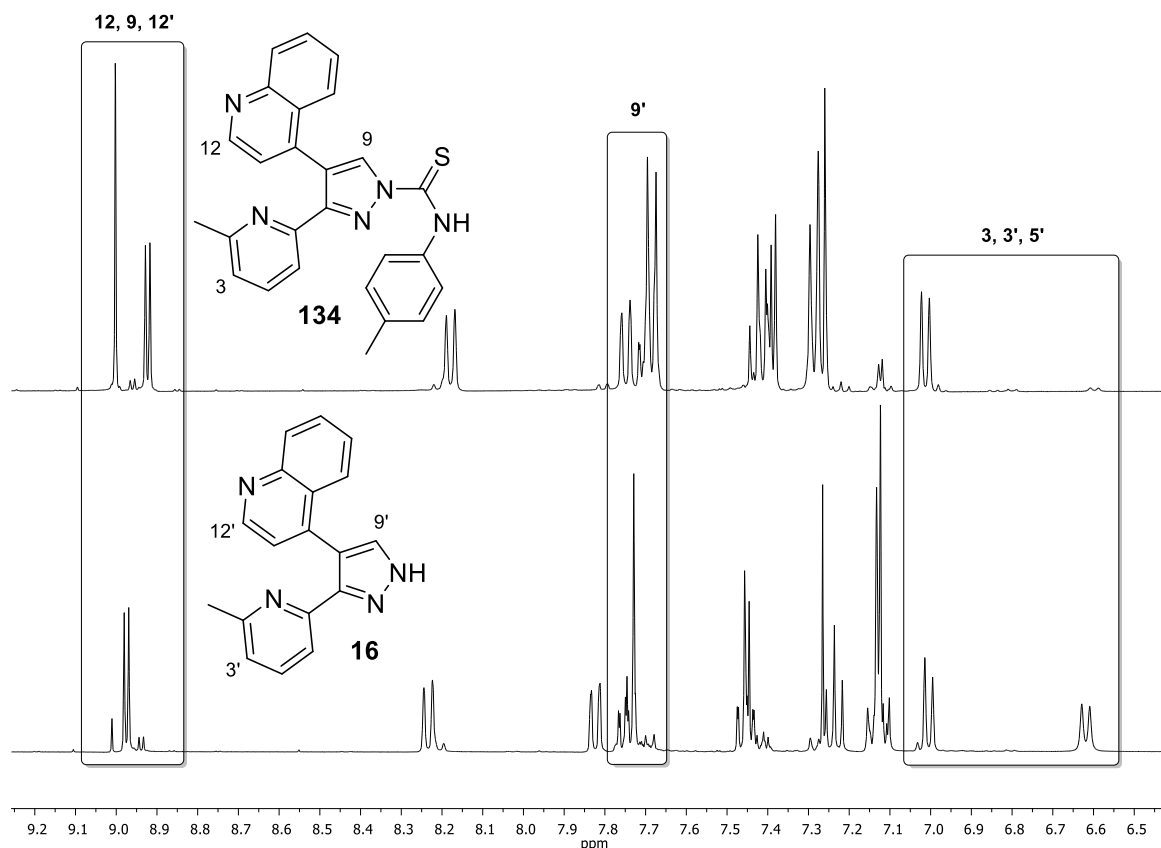
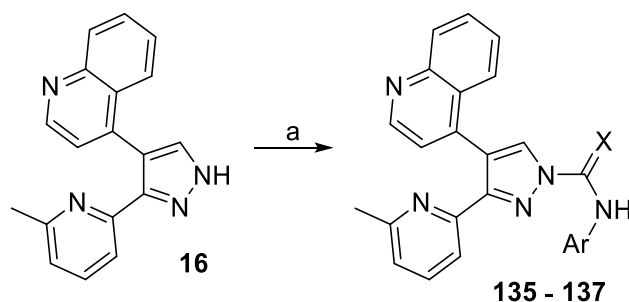


Abbildung 92: ^1H NMR-Untersuchung des Zerfalls von **134** zu **16** in CDCl_3 . Es wird die Messung direkt nach der Lösung von **134** (oben) und nach 24 h bei RT. Hervorgehoben sind die Protonen 12 (oben, duplett), 9 (oben, singulett) und 3 (oben duplett) des Thioharnstoffderivats **134**, sowie die Protonen 12' (unten, breites singulett), 9' (unten, singulett) und 3' (unten duplett) des Zerfallsprodukts **16**.

Diese Untersuchungen zeigen, dass das Harnstoffderivat **126** durch das Puffersystem TrisHCl lediglich stabilisiert und durch d_{18} -HMPA der Zerfall vollständig aufgehalten werden kann. Im Gegensatz dazu sind die untersuchten Thioharnstoffderivate (**14**, **134**) unter allen untersuchten Bedingungen nicht stabil. Da jedoch HMPA als *vehicle* für Targetmoleküle zur Inhibierung von Kinasen aufgrund der hohen Mutagenität^[184,185] nicht geeignet ist, kann an dieser Stelle keine Alternative zur Untersuchung der Inhibitoraktivität von A 83-01 (**14**) geliefert werden. Im weiteren Verlauf sollte gezeigt werden, ob durch die Variation des aromatischen Substituenten am Thioharnstoff- bzw. am Harnstoffgerüst zu einer Stabilisierung führt.

5.1.2 DARSTELLUNG UND UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER DERIVATE VON A 83-01

Um den Einfluss des aromatischen Substituenten am Thioharnstoff-Gerüst auf die Stabilität der Inhibitoren zu untersuchen, sollten die Bedingungen für die Darstellung von A 83-01 (**14**, Kapitel 5.1) auf weitere Isothiocyanate übertragen werden (Schema 38).



Schema 38: Aufbau von Derivaten des A 83-01 (**14**). Reaktionsbedingungen: a) ArNCS bzw. ArNCO, NaH, THF, RT, 12 h, 3-80 %.

Beginnend mit den Thioharnstoff-Derivaten (**135**, **136**, **137**) konnte gezeigt werden, dass diese unabhängig von elektronenschiebenden bzw. elektronenziehenden Substituenten (Abbildung 93) nicht hinreichend stabil in CDCl_3 vorlagen.

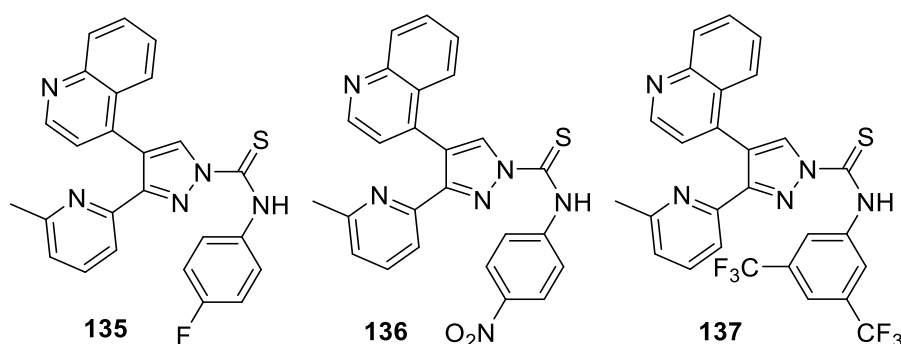


Abbildung 93: Dargestellte Thioharnstoffderivate über die etablierten Bedingungen aus Schema 38.

Im Hinblick auf die Zerfallsgeschwindigkeit in CDCl_3 (Abbildung 94) ist nur ein leichter Unterschied festzustellen. Jedoch war es nicht möglich, die Thioharnstoffstruktur durch einen schwach elektronenschiebenden wie *p*-Methyl (**134**, siehe Kapitel 5.1.1) bzw. einen elektronenziehenden Substituenten wie *p*-Fluor (**135**), *p*-Nitro (**136**), oder *m*-bis- CF_3 (**137**) am aromatischen System zu stabilisieren. Im Gegensatz zu dem *p*-Toluolderivat **134** wurde bei den Derivaten, welche einen elektronenarmen Aromaten tragen, bereits nach 10 min in Lösung (CDCl_3) ein Zerfall zu ca. 70 % festgestellt.

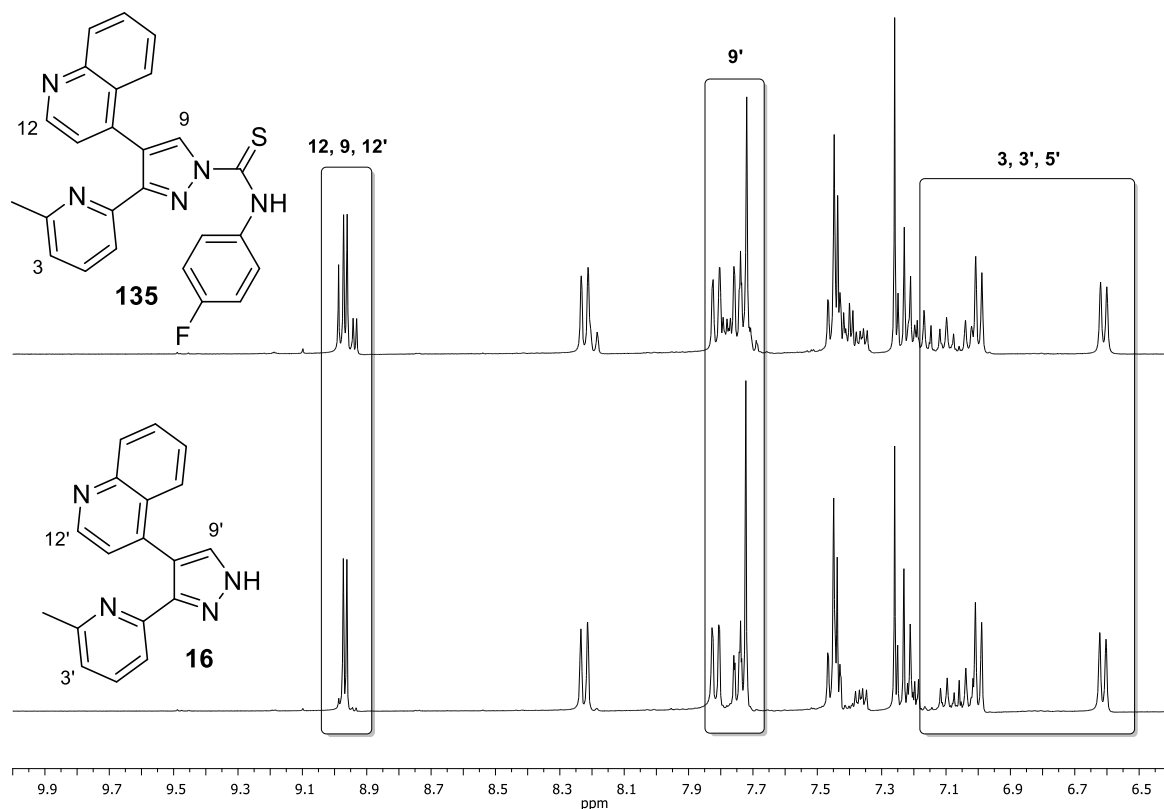


Abbildung 94: Auswertung der ¹H NMR-Untersuchung des *p*-Fluorphenylthioharnstoffderivats (**135**). Hervorgehoben sind die Protonen 12 (oben, duplett), 9 (oben, singulett) und 3 (oben duplett) des Thioharnstoffderivats **135**, sowie die Protonen 12' (unten, breites singulett), 9' (unten, singulett) und 3' (unten duplett) des Zerfallsprodukts **16**.

Diese Untersuchungen festigen die Annahme, dass die erhöhte Polarisierung des Thioharnstoffgerüsts durch die Thiocarbonyleinheit und eine damit verbundene spontane 1,3-*H*-Verschiebung für die Labilität der Verbindungen **14**, **134**, **135**, **136** und **137** verantwortlich ist. Gleichzeitig erhöht ein elektronenarmes aromatisches System am Thioharnstoffgerüst die Azidität. Dies wirkte sich ebenfalls negativ auf die Stabilität aus (Abbildung 94). Die Synthese der korrespondierenden Harnstoffderivate (Abbildung 95) und Untersuchung dieser zeigte, dass erhöhte Stabilität dieser Derivate in CDCl₃.

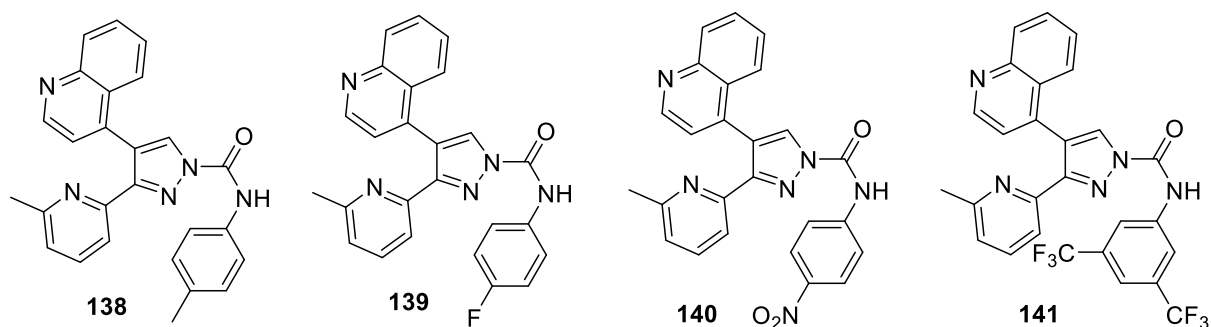


Abbildung 95: Synthetisierte Harnstoffderivate zur Untersuchung des Einflusses des Thioharnstoffgrundgerüsts auf die Stabilität der Verbindungen.

Da der postulierte Mechanismus für den Zerfall der Thioharnstoff- und Harnstoffderivate (Kapitel 5.1.1) den Einsatz einer Base benötigt, wurde eine Auswahl der Derivate (**138** als elektronenreicher und **140** als elektronenarmer aromatischer Substituent) in DMSO mittels LCMS untersucht.

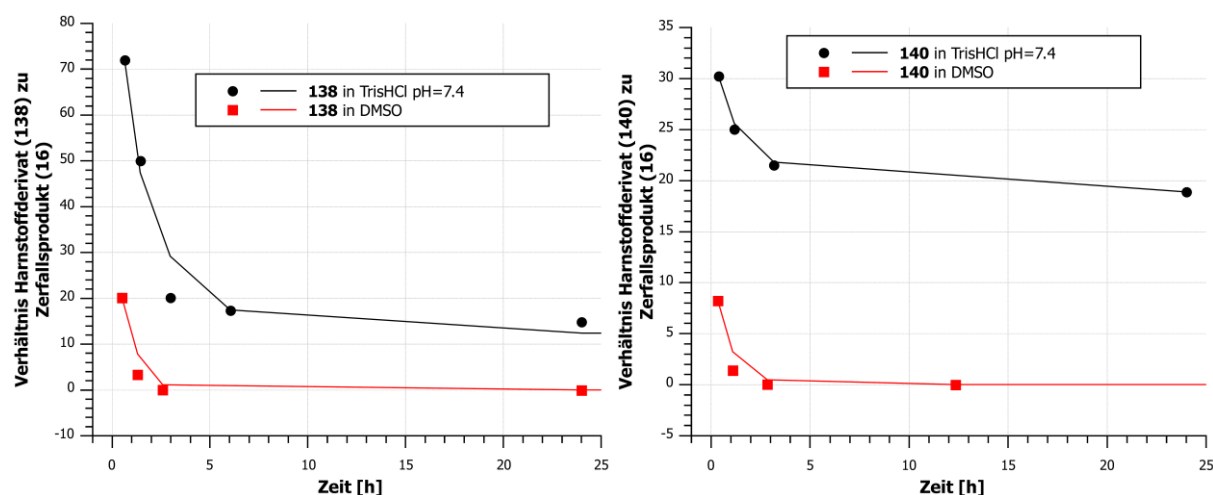


Abbildung 96: Vergleich der Stabilität des *p*-Toluolderivats (**138**) mit dem *p*-Nitrophenylderivat (**140**) im LCMS-Experiment.

Hierzu wurden Proben über einen Zeitraum von bis zu zehn Tagen in dem jeweiligen Lösungsmittel gelagert und der Gehalt über LCMS bestimmt (Abbildung 96).

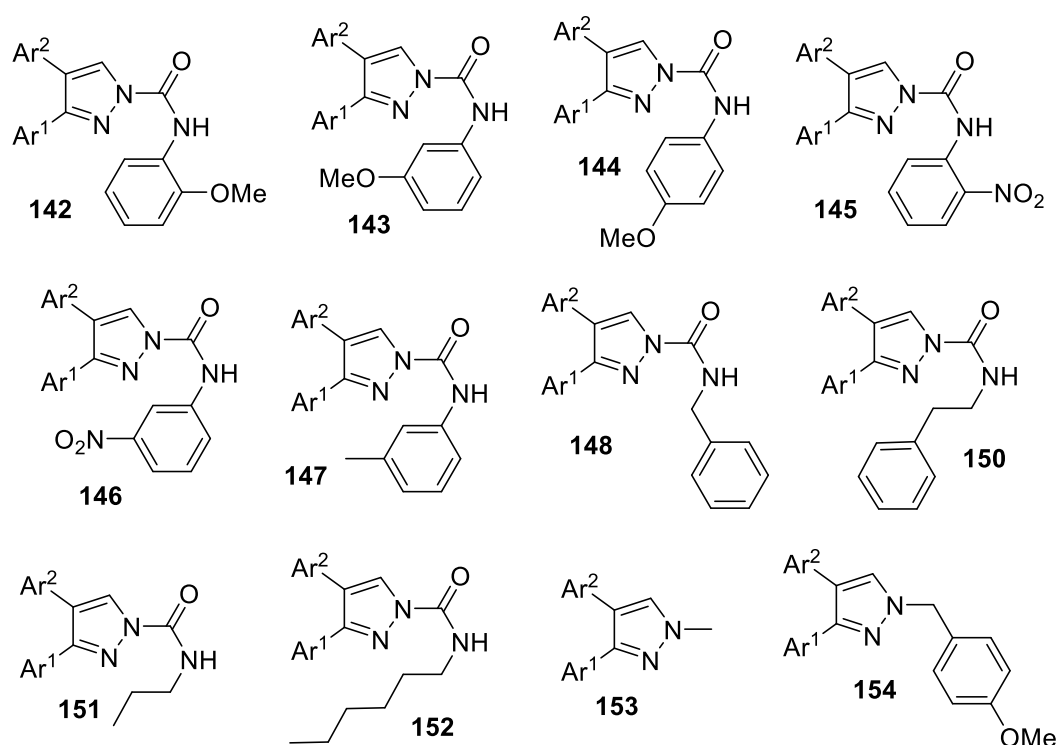


Abbildung 97: Darstellung verschiedener Harnstoffderivate zur Untersuchung der Stabilität und der Aktivität in Bezug auf die Inhibierung von Ser/Tyr-Kinasen. Die Bezeichnung Ar¹ bezieht sich auf den 2-Methyl-6-pyridyl-Substituenten und die Bezeichnung Ar² bezieht sich auf den 4-Chinolin-Substituenten.

Analog zu den vorigen LCMS-Untersuchungen wurde jeweils eine Lösung der Inhibitoren **138** und **140** (0.05 mg/mL in DMSO) hergestellt und der zeitabhängige Gehalt der Lösungen bestimmt. Die Quantifizierung wurde ebenfalls über die Integration der UV-Signale durchgeführt.

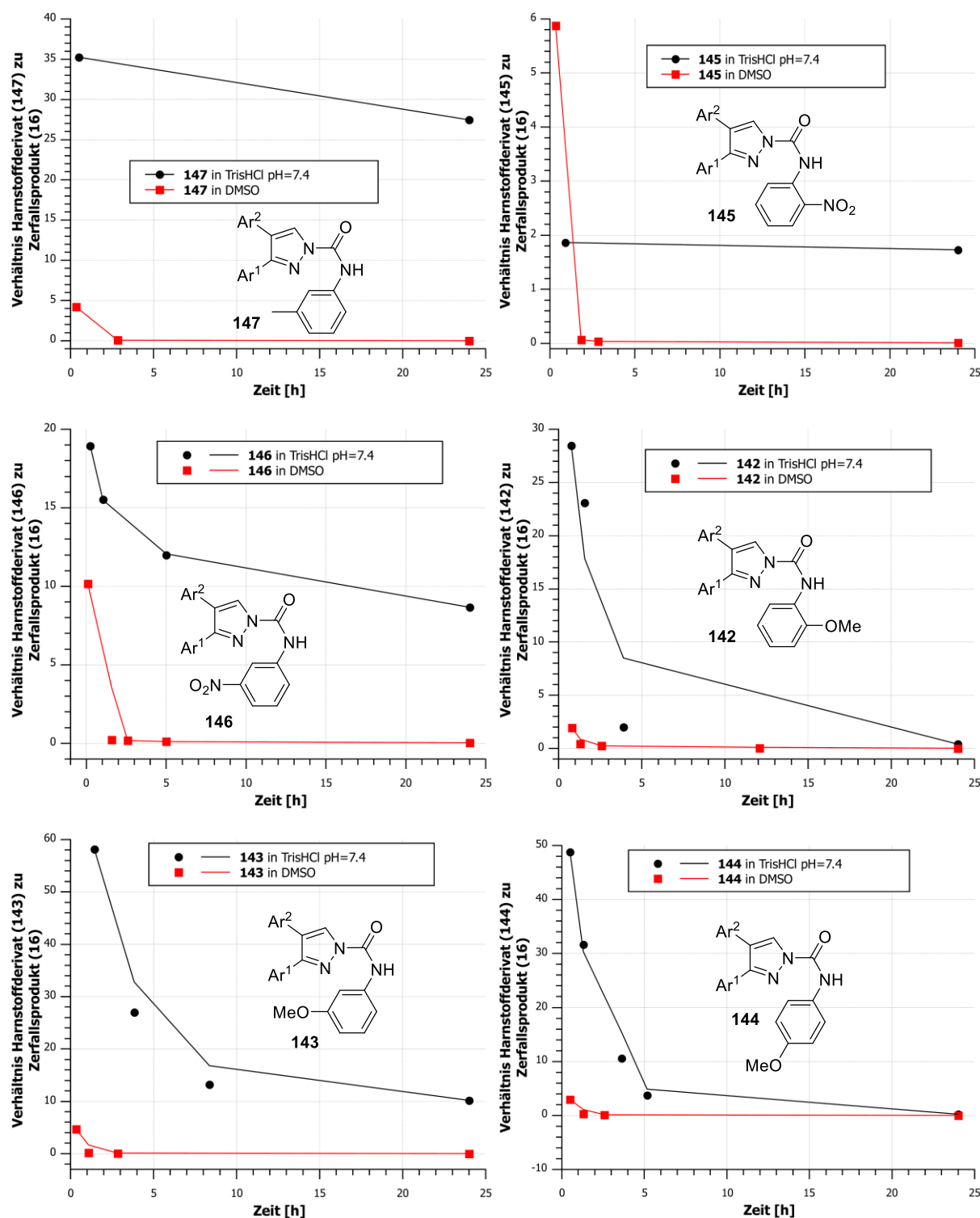


Abbildung 98: Gegenüberstellung der LCMS-Experimente für die Untersuchungen zur Stabilität von verschiedenen Derivaten des Inhibitors A 83-01 (**14**) in DMSO. Die Bezeichnung Ar¹ bezieht sich auf den 2-Methyl-6-pyridyl-Substituenten und die Bezeichnung Ar² bezieht sich auf den 4-Chinolin-Substituenten.

Generell konnten auch hier die Stabilitäten durch das Verwenden eines TrisHCl-Puffersystems erheblich verbessert werden. Jedoch sind diese Derivate in DMSO sehr labil. Um weitere Harnstoffderivate darzustellen, diese auf ihre Stabilität zu untersuchen und anschließend in einem Kinase-Assay ihre Inhibitor-Aktivität zu prüfen, wurden die Bedingungen zur Darstellung von A 83-01 (**14**) auf weitere aromatische Isocyanate angewendet (Abbildung 97). Zunächst wurden die potentiellen Kandidaten für den Einsatz in einem Kinase-Assays auf ihre Stabilität untersucht. Da der Umfang eines solchen Assays auf maximal 12 Substrate begrenzt ist, fand eine Auswahl (**142** - **147**) zur Untersuchung der Stabilität in DMSO statt. Auch hier wurden Lösungen der Derivate (0.05 mg/mL in DMSO und TrisHCl-Puffer) per LCMS untersucht (Abbildung 98).

Anhand dieser Zerfallsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aryl-substituierten Harnstoffe in DMSO-Lösung schon nach zwei bis drei Stunden nahezu vollkommen zerfallen sind. Ausnahmen bildeten dabei die Derivate mit einem aliphatischen Verbindungselement zwischen der Harnstoff-Einheit und dem aromatischem Substituenten. Je länger dieses ist, desto stabiler ist das entsprechende Harnstoffderivat. Außerdem konnten die Stabilitäten der Verbindungen **143**, **146** und **147** durch die Verwendung des TrisHCl-Puffersystems erheblich verbessert werden. Diese Zerfallsreaktion konnte bei **145** durch die Verwendung des TrisHCl-Puffersystems sogar vollständig gestoppt werden.

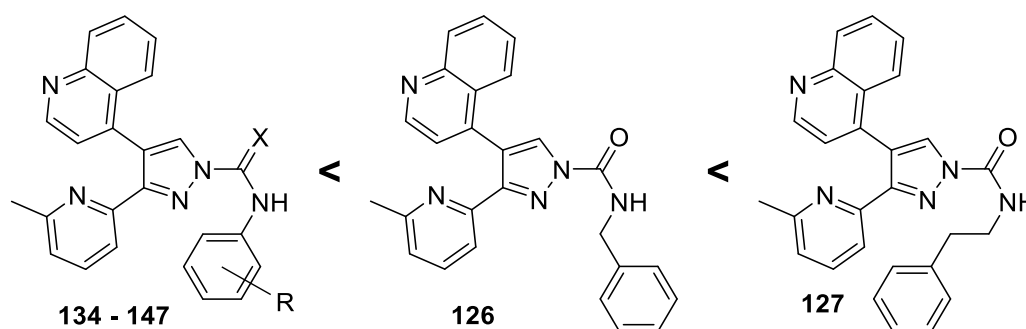


Abbildung 99: Zusammenfassung der Untersuchungen der Stabilität des A 83-01 (**14**) und seiner Derivate (**126**, **127**, **134** - **147**).

Zusammenfassend zeigten diese Studien, dass die Thioharnstoff- und Harnstoff-Substituenten am Pyrazolring sehr labil sind (Abbildung 99). Diese Instabilität konnte jedoch durch verschiedene Faktoren wie ein modifiziertes Substitutionsmuster und verwendete Lösungsmittel beeinflusst werden. Die Verbindungen **126** und **127** erwiesen sich dabei als die stabilsten der dargestellten Derivate von A 83-01 (**14**). Allerdings geht diese Stabilität mit enormen strukturellen Veränderungen einher. Diese kann sich negativ im Hinblick auf die

inhibitorische Aktivität auswirken. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der eigentliche Wirkstoff A 83-01 (**14**) bereits in CDCl_3 spontan in das A 77-01 (**16**) zerfällt. Dieser Zerfall erfolgt durch die spontane 1,3-*H*-Verschiebung. Diese wird jedoch durch elektronenreiche, aromatische Substituenten verlangsamt und durch den Austausch des Schwefelatoms durch ein Sauerstoffatom komplett unterbunden. Alle dargestellten Derivate zeigten Instabilität in DMSO, welche durch den basischen Charakter des DMSO und die Azidität des Protons am Harnstoffgerüst hervorgerufen wird. Durch ein aliphatisches Verbindungselement zwischen der Harnstoffgruppe und dem Phenyl-Substituenten (**126**, **127**) konnte dieser Zerfall soweit verlangsamt werden, dass selbst nach 12 h der Harnstoff nur in marginalen Mengen zersetzt zu wurde. Die Harnstoffstruktur kann demnach durch die Verminderung der Azidität stabilisiert werden.

In diesem Zusammenhang sollte anschließend gezeigt werden, ob die neuen Derivate eine mit dem A 83-01 (**14**) bzw. A 77-01 (**16**) vergleichbare Aktivität zeigen und gegebenenfalls einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) unterliegen.

5.2 UNTERSUCHUNG DER INHIBITORAKTIVITÄT DER DARGESTELLTEN DERIVATE

5.2.1 STUDIEN ZUR AKTIVITÄT DER INHIBITOREN AN ISOLIERTEN KINASEN

Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, handelt es sich bei dem Inhibitor A 83-01 (**14**) um einen Inhibitor, der die Signalübertragung der Typ I Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren der Zytokine aus der TGF- β -Familie unterbindet und somit in die Zellvermehrung, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose eingreifen und regulieren kann.^[112,115] Ein anerkanntes Verfahren, welches die direkte Wirkung eines Inhibitors auf eine Kinase zeigt, ist ein standardisierter, kommerziell erhältlicher ADP-Glo™ Kinase-Assay.^[186] Dieser Assay basiert auf der Phosphorylierung der Substrate durch die dazugehörige Kinase (Abbildung 100). Bei dieser Reaktion wird Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) umgewandelt. Dieses wurde dann mittels ADP-Glo™ Biolumineszenz-Kit quantifiziert.^[187] Dies geschieht zunächst über die Zugabe eines ADP-Glo™-Reagenzes (Reagenz **A**), welches die Kinase-Reaktion unterbricht und das verbliebene ATP verbraucht. Anschließend wurde durch die Zugabe eines weiteren Reagenzes, ADP-Glo™ *kinase detection*

reagent (Reagenz **B**), das generierte ADP zu ATP umgesetzt und dieses gleichzeitig stabilisiert.

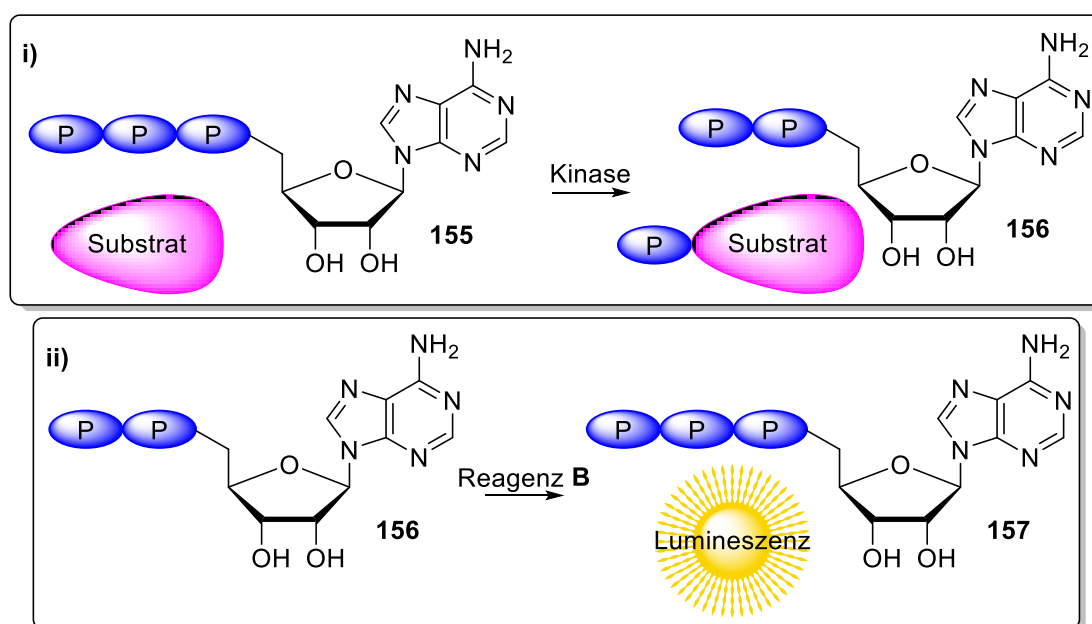


Abbildung 100: Prinzipielle Funktionsweise des ADP-Glo™ Kinase Assays.

Das gebildete ATP wird letztlich in einer Luziferase/Luziferin-Reaktion^[188] (Reagenz **B**) durch das Auslesen der Lumineszenzintensität quantifiziert. Unter Zuhilfenahme dieses Assays konnten einige der in Kapitel 5.1 dargestellten Derivate (Abbildung 101) im Vergleich mit dem literaturbekannten TGF β -Inhibitor A 83-01 (**14**) auf ihre Inhibitoraktivität untersucht werden.

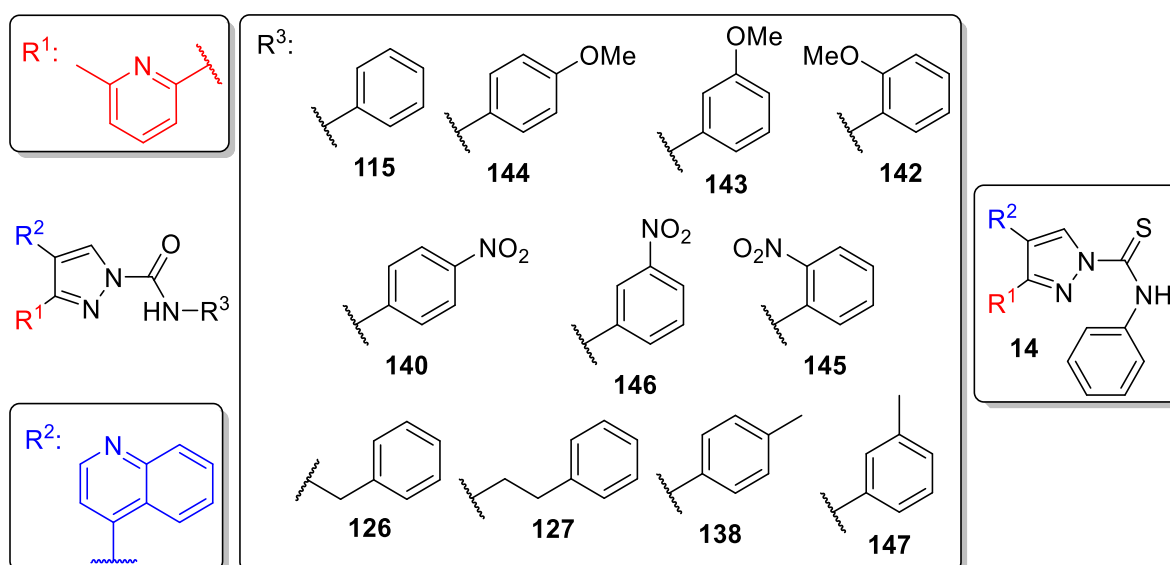


Abbildung 101: Auswahl der Derivate des A 83-01 (**14**) für das Kinase-Assay.

Für diese Versuchsreihe wurden Derivate ausgewählt, die im Hinblick auf die geplante SAR-Studie (*engl. structure-activity-relation*) verschiedene Substituenten (R^3) aufweisen. Diese sollten dann in verschiedenen Assay-Studien mit dem Inhibitor A 83-01 (**14**) verglichen werden (Abbildung 101). Da der Inhibitor A 83-01 (**14**) selbst ein literaturbekannter Inhibitor für Kinasen aus der TKL-Familie ist, wurde ein Assay-Kit gewählt, welches die Kinasen ALK2^[189] (Kinase **1**), ALK4^[190] (Kinase **2**), IRAK4^[191] (Kinase **3**), MLK2^[192] (Kinase **4**), RIPK2^[193] (Kinase **5**), TAK-TAB1^[194] (Kinase **6**), TGF- β -R2^[195] (Kinase **7**) und ZAK^[196] (Kinase **8**) enthielt. Diese Kinasen sind im TGF- β -Signalweg für die Transduktion über den Smad-abhängigen bzw. den Smad-unabhängigen Signalweg zuständig (Kapitel 2.5).

Aufgrund der gezeigten Instabilität der potentiellen Inhibitoren wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Anfertigen der Stammlösungen und der Durchführung des Assays maximal ein Zeitraum von einer Stunde liegt, um zu gewährleisten, dass die instabilen Derivate nicht vollständig zum A 77-01 (**16**) degradiert werden. Da ein solcher Zerfall jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden bei der Interpretation der Ergebnisse die gewonnenen Werte als Gemisch von dem jeweiligen Substrat und **16** betrachtet. Damit gaben die gemessenen Inhibitoraktivitäten zwar einen Hinweis auf eine SAR, jedoch stellten diese lediglich einen Richtwert und keine exakten Daten dar. Bei dem verwendeten Inhibitor A 83-01 (**14**) handelte es sich um eine Stammlösung der kommerziell erhältlichen Substanz **14**. Diese wurde gewählt, um die Bedingungen der üblichen Anwendung dieses Inhibitors nachzuempfinden. Die Konzentration aller Derivate wurde auf 45 nM festgesetzt, da dies der literaturbekannte Wert des A 83-01 für die ALK4 ist. Zunächst wurden die Aktivitäten des A 83-01 (**14**) und des Harnstoffanalogon **115** verglichen (Abbildung 102).

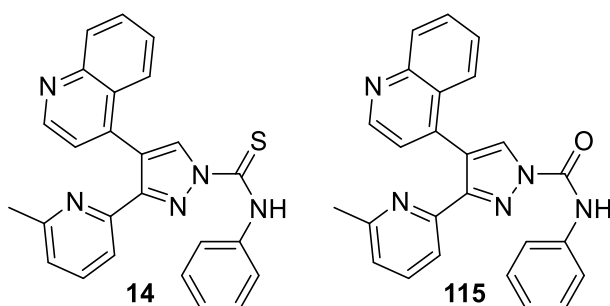


Abbildung 102: Vergleich des Inhibitors A 83-01 (**14**) mit dem Harnstoffderivat **115**.

Beide Substanzen (**14**, **115**) weisen eine sehr ähnliche Grundstruktur auf, unterscheiden sich jedoch in der Harnstoff- bzw. Thioharnstoffeinheit. Bei dem Einsatz dieser Substanzen im

Kinase Assay zeigte sich, dass beide in Bezug auf die Kinasen ALK2, ALK4, IRAK4, MLK2 und TAK1-TAB2 ein ähnliches Wirkprofil besitzen (Abbildung 103).

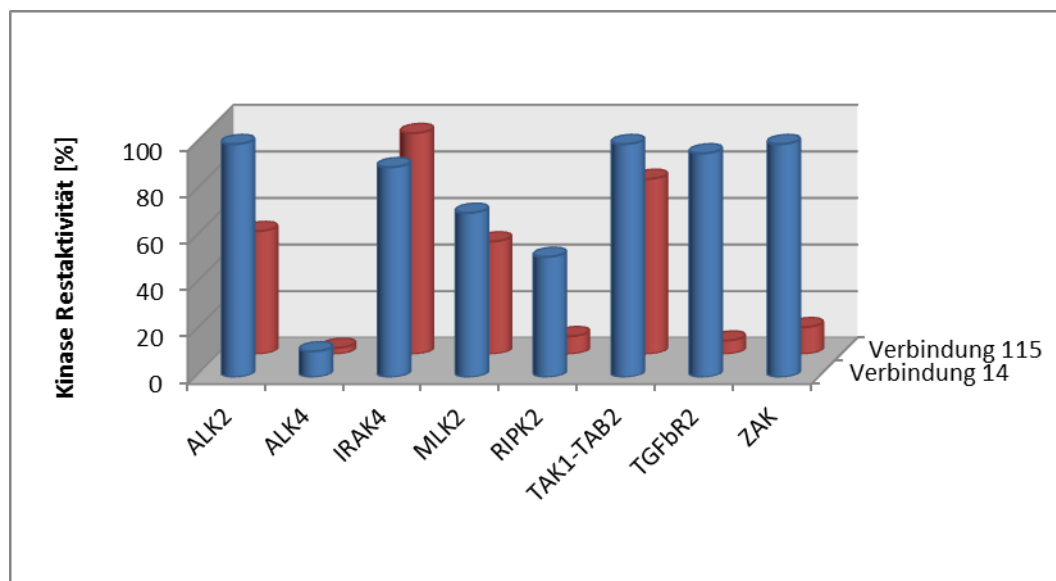


Abbildung 103: Vergleich der Kinase-Restaktivitäten nach Reaktion mit den Verbindungen 14 und 115.

Die grundlegendsten Unterschiede wurden bei den Kinasen RIPK2, TGF- β -R2 und ZAK festgestellt. Hierbei zeigte der kommerzielle Inhibitor A 83-01 (14) keine oder nur schwache Inhibitoraktivität, während das Harnstoffanalogon 115 zur vollständigen Inaktivierung der Kinasen führte.

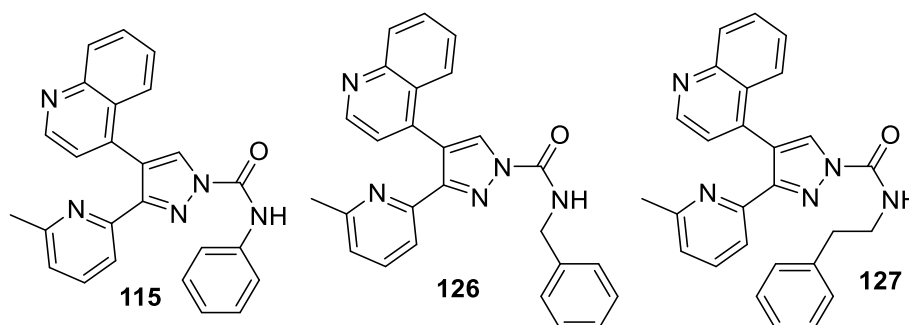


Abbildung 104: Struktureller Vergleich der potentiellen Inhibitoren 115, 126 und 127.

Dieses Harnstoffderivat (115) eignet sich ebenfalls für eine SAR-Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge des Verbindungselements zwischen der Harnstoffgruppe und dem aromatischen Substituenten auf die Inhibitoraktivität. Da bei den Derivaten 126 und 127 eine erhöhte Stabilität unter den Assay-Bedingungen festgestellt wurde (Kapitel 5.1), kann hier von einer guten Verlässlichkeit der erhaltenen Daten ausgegangen werden. Der Vergleich der drei Derivate zeigt, dass diese prinzipiell ein ähnliches Kinase-Profil besitzen.

Sie zeigen einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf die Kinasen ALK4, IRAK4, MLK2, RIPK2 und TAK1-TAB1 (Abbildung 105).

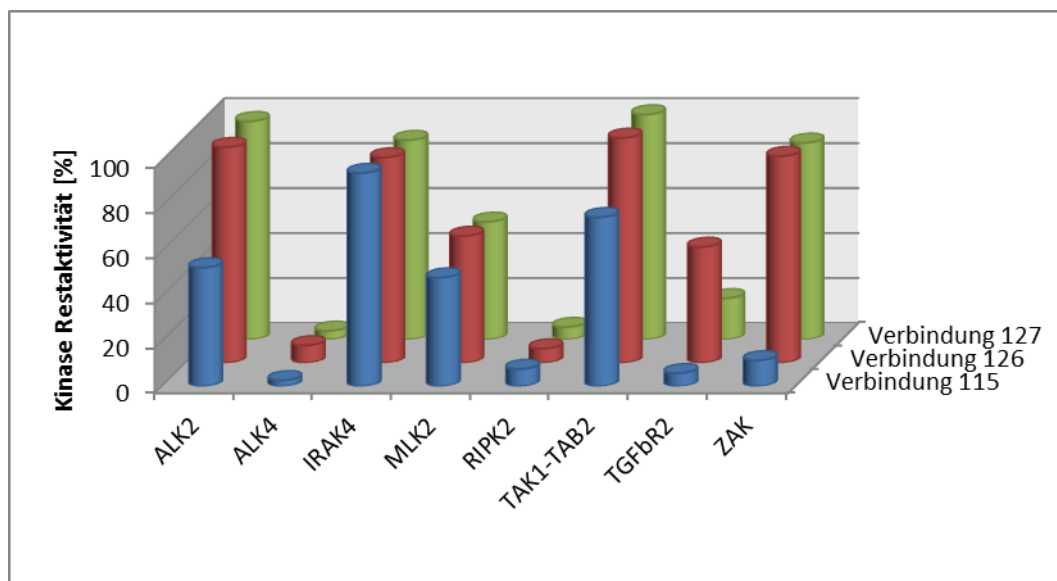


Abbildung 105: Vergleich der Kinase-Restaktivitäten nach Reaktion mit den Verbindungen **115**, **126** und **127**.

Bezüglich der Kinasen ALK2, TGF- β -R2 und ZAK wurde jeweils eine AktivitätseinbuÙe gefunden, die auf die Einföhrung des aliphatischen Bausteins (CH₂ bzw. C₂H₄) zurückzuföhren ist. Da jedoch die Kinasen ALK4, RIPK2 und TGF- β -R2 nahezu vollständig inhibiert wurden, bedeutet die Verminderung der Aktivität auf nur einige Kinasen die erwünschte Erhöhung der Selektivität zwischen verschiedenen Kinasen.

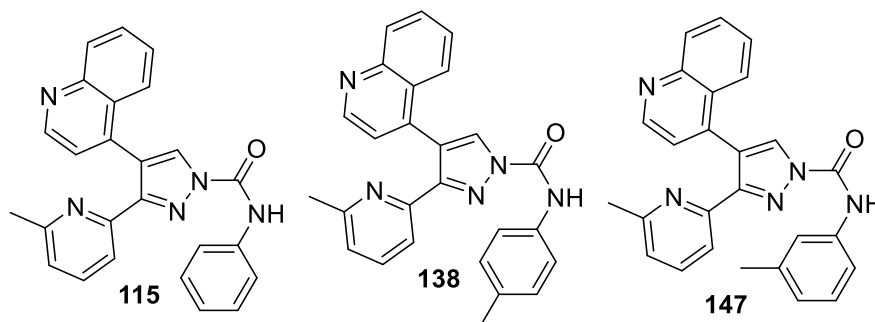


Abbildung 106: Vergleich der Strukturen der Harnstoffderivate **115**, **138** und **147**.

Neben der Länge des aliphatischen Verbindungselements kann auch eine höhere Lipophilie der aromatischen Struktur an der Harnstoffgruppe für eine veränderte Lage des Inhibitors in der jeweiligen Proteintasche sorgen. Für diesen Kinase-Assay wurden zwei weitere Substanzen untersucht, die zum einen in *para*- (**138**) und zum anderen in *meta*-Position (**147**) des Aromaten Methylsubstituiert sind (Abbildung 106).

Das Kinase-Profil dieser Methyl-substituierten Derivate **138** und **147** ähnelt stark dem des Harnstoffderivats **115** (Abbildung 107). Auch diese beiden Inhibitoren sind nur wenig selektiv und üben nur auf die Kinase IRAK4 keinen Effekt aus. Dies deutet darauf hin, dass die Methylgruppe einen zu geringen sterischen Einfluss besitzt und somit keine Wirkung auf die Wechselwirkung des Inhibitors mit den Proteinen hat.

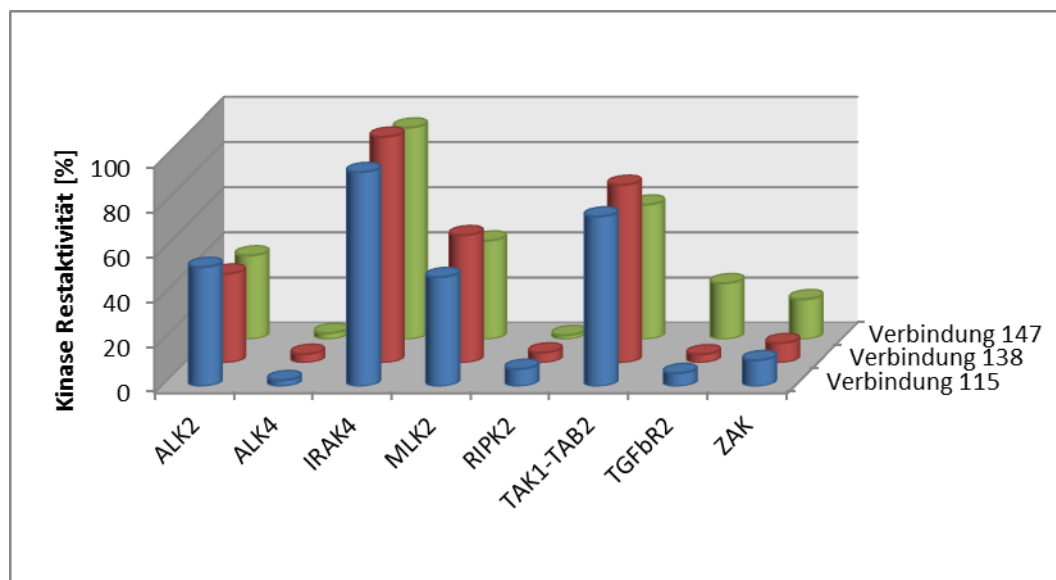


Abbildung 107: Vergleich der Kinase-Restaktivitäten nach Reaktion mit den Verbindungen **115**, **138** und **147**.

Um einen größeren sterischen Anspruch des aromatischen Restes R^3 zu erzielen wurden Derivate hergestellt, die jeweils in den *orto*- (**142**), *meta*- (**143**) und *para*-Positionen (**144**) durch die größere Methoxygruppe versehen waren (Abbildung 108). Zusätzlich zu dem sterischen Anspruch übt die Methoxygruppe auch einen elektronenschiebenden Effekt auf das aromatische System aus. Außerdem bewirkt das Sauerstoffatom zusätzliche Koordinationsmöglichkeiten mit den Aminosäuren der Kinasen.

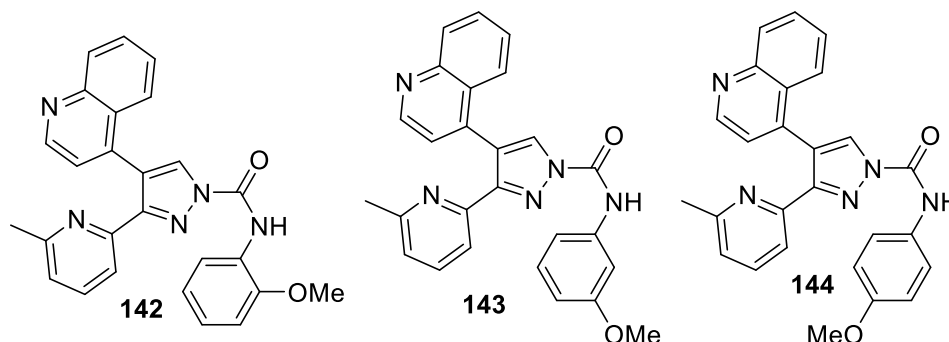


Abbildung 108: Struktureller Vergleich der Derivate **142**, **143** und **144**.

Der Kinase-Assay offenbarte, dass diese strukturellen Veränderungen keinen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften auf die ausgewählten Kinasen haben (Abbildung 109). Die drei

Derivate zeigen ein sehr ähnliches Wirkprofil gegenüber den untersuchten Kinasen verglichen mit dem Harnstoffderivat **115** (Abbildung 103).

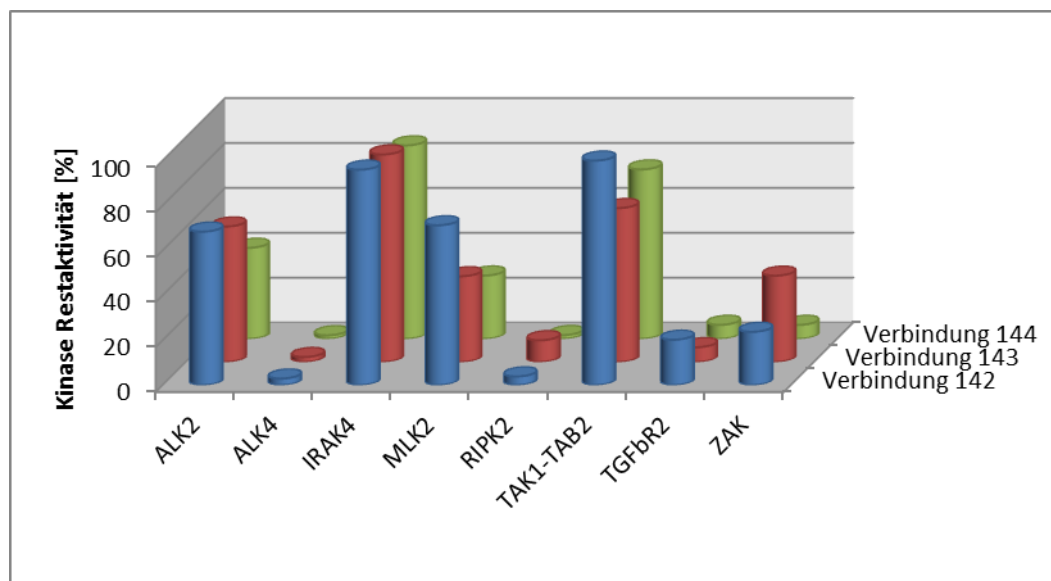


Abbildung 109: Vergleich der Kinase-Restaktivitäten nach Reaktion mit den Verbindungen **142**, **143** und **144**.

Um zu zeigen, ob ein elektronenziehender und stark polarer Substituent die Selektivität der Inhibitoren erhöhen kann, wurden auch die Derivate **140**, **145** und **146** auf ihre Aktivität untersucht (Abbildung 110).

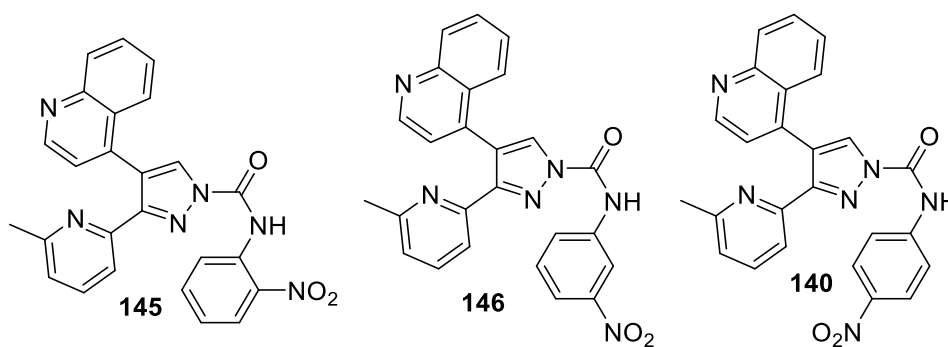


Abbildung 110: Struktureller Vergleich der Derivate **140**, **145** und **146**.

Auch diese strukturellen und elektronischen Veränderungen führten zu keiner signifikanten Änderung der inhibitorischen Aktivität (Abbildung 111). Auch diese Derivate weisen ein ähnliches Wirkprofil wie das Harnstoffderivat **115** auf.

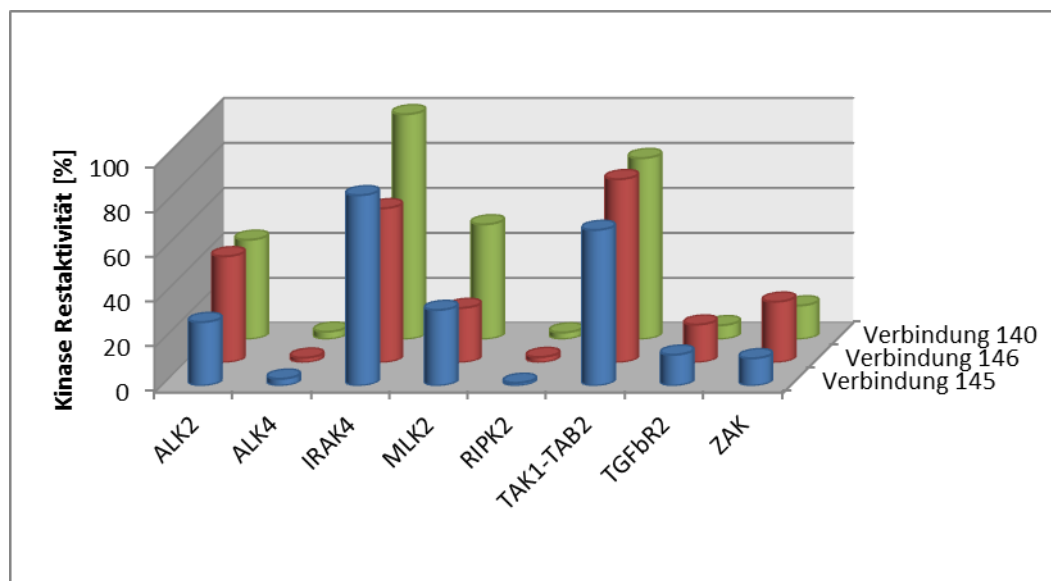


Abbildung 111: Vergleich der Kinase-Restaktivitäten nach Reaktion mit den Verbindungen **140**, **145** und **146**.

Bisher konnten damit keine Derivate des A 83-01 (**14**) gefunden werden, die eine verbesserte Aktivität, oder Selektivitäten gegenüber den acht ausgewählten Kinasen zeigen. Alle Derivate zeigen jedoch in Bezug auf die Kinase ALK2 eine höhere Aktivität als die Vergleichsverbindung A 83-01 (**14**).

5.2.2 EINSATZ AUSGEWÄHLTER DERIVATE ZUM DIFFERENZIERUNGSSTOPP VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN

Durch die Untersuchungen zur Stabilität von A 83-01 (**14**) und der dargestellten Derivate (Kapitel 5.1) konnte die Rolle des Inhibitors A 83-01 (**14**) als aktive Zielstruktur angezweifelt werden. Bei der Verwendung von Kinasen in einer in vivo Situation ist nicht nur die Inaktivierung einzelner isolierter Kinasen ausschlaggebend. Auf zellulärer Ebene können andere Signalwege eine entscheidende Rolle spielen (Kapitel 2.5). Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit HENNING KEMPF eine Auswahl an potentiellen Inhibitoren an einer pluripotenten menschlichen embryonalen Stammzell-Line getestet.^[197] Diese Zell-Line trägt ein GFP (*engl. green fluorescent protein*) in dem endogenen MIXL1 Transkriptionsfaktor. Dieses Gen stellt einen anerkannten Marker für die Bildung des Primitivstreifens dar. Dieser Primitivstreifen ist eine Zusammenlagerung von Zellen, die sich im embryonalen Stadium auf der Keimscheibe von Reptilien, Vögeln und Säugetieren bildet. Die Bildung dieses Primitivstreifens ist eine Voraussetzung für die Bildung von vielen Geweben im menschlichen Körper und stark vom TGF-β-Signalweg abhängig.^[198] Die Unterdrückung der MIXL1-

Induktion diente somit als quantitativer Marker für die Bestimmung der Effektivität eines Inhibitors auf den TGF- β -Signalweg.

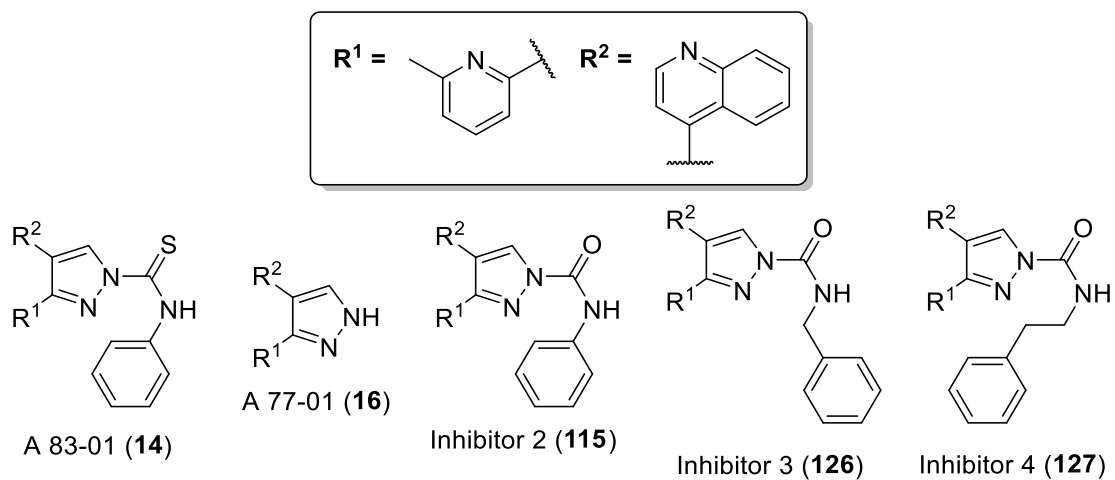


Abbildung 112: Auswahl der synthetisierten Derivate zur Inhibition der MIXL1-Expression.

Um den Zusammenhang zwischen der Stabilität der dargestellten Substanzen und der Aktivität in diesen *in vitro*-Experimenten herzustellen, wurden zusätzlich zu dem A 83-01 (14) und dem A 77-01 (16) das Harnstoffanalogon 115 und die in DMSO stabilsten Vertreter 126 und 127 ausgewählt (Abbildung 112).

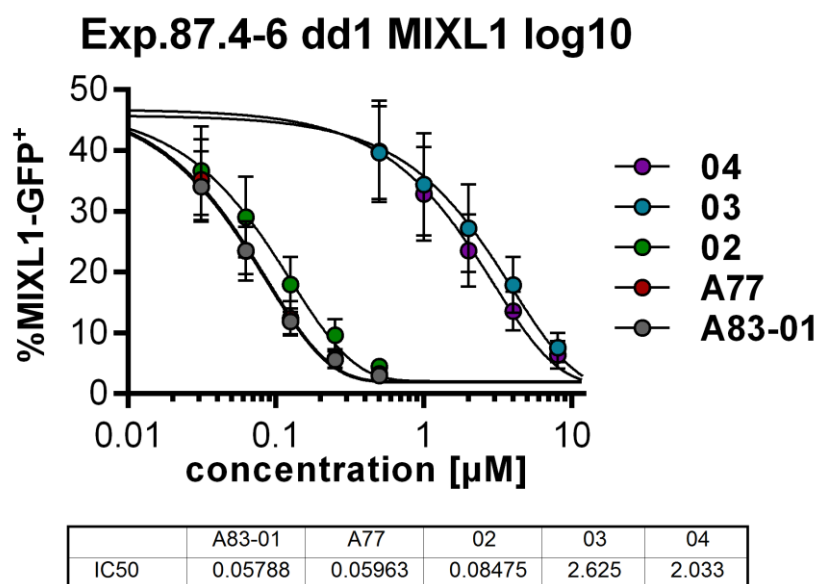


Abbildung 113: Ergebnisse zur Unterdrückung der Expression des MIXL1 Transkriptionsfaktors.

Diese Untersuchungen zeigten, dass A 83-01 (14), A 77-01 (16) und der Inhibitor 2 (115) sehr ähnliche Aktivitätsprofile besitzen (Abbildung 113). Die IC₅₀ Werte wurden für A 83-01 (14) mit 58 nM und A 77-01 (16) mit 60 nM bestimmt. Unter Berücksichtigung der chemischen

Labilität der Verbindungen **14** und **115** lässt dieses Experiment vermuten, dass die eigentliche aktive Spezies die Verbindung A 77-01 (**16**) ist.

Die Derivate **126** und **127** hingegen erwiesen sich in Kapitel 5.1 als stabilere Derivate. Für diese Substanzen wurden IC_{50} Werte bestimmt, die bis zu 31x höher sind als die für das kommerzielle A 83-01 (**14**). Dieses ist ein weiterer Hinweis, dass das freie Pyrazol und somit A 77-01 (**16**) die Inhibition des TGF- β -Signalwegs verursacht. Bei den beiden Verbindungen **14** und **115** musste davon ausgegangen werden, dass ein weitaus geringerer Anteil des Zerfallsproduktes **16** in Lösung vorlag.

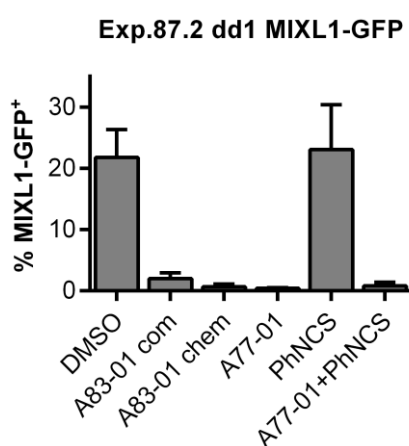


Abbildung 114: Kontrollexperiment zur Aktivitätsbestimmung der mutmaßlich aktiven Substanz **16** und den davon abgeleiteten Zerfallsprodukten in DMSO.

Ferner konnte keine Wirkung von Phenylisothiocyanat auf den Signalweg und die MIXL1-Inhibition festgestellt werden. Somit ist auszuschließen, dass beide Zerfallsprodukte von A 83-01 (**14**) Einfluss auf die Differenzierung ausüben.

5.2.3 BERECHNUNGEN ZU BINDUNGSSITUATION AN DEN KINASEN ALK2 UND ALK4

In Zusammenarbeit mit DIMITRI MALCEV aus dem Arbeitskreis von MATTHIAS PRELLER wurde versucht, die Aktivität ausgewählter Inhibitoren durch Berechnungen erklärbarer zu machen. Sie sollten zeigen, ob unterschiedliche Selektivitäten durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Kinasen errechnet werden können. Prinzipiell ist die Berechnung solcher Zustände schwierig und nur mit einem idealen Modell des jeweiligen Proteins mit der Realität zu vergleichen. Dabei ist es entscheidend, dass für die Bestimmung der

korrekten Bindungsmotive und Energien die richtige Konformation des Proteins herangezogen wird.

Generell können Kinaseinhibitoren in zwei Klassen unterteilt werden. Die Typ-I-Inhibitoren binden direkt an die Aktiv-Konformation der ATP-Bindungsstelle der Kinase. Diese Inhibitoren werden auch kompetitive Inhibitoren genannt, da sie in Konkurrenz mit dem vorliegenden ATP um die Bindungsstelle des Proteins stehen. Die Typ-II-Inhibitoren nutzen ebenfalls die ATP-Bindungsstelle, jedoch in einer inaktiven Konformation des Proteins. Hierbei wird der sogenannte „*activation loop*“ durch Phosphorylierung derart gefaltet, dass neben der kompetitiven auch eine allosterische Interaktion, sowie eine Interaktion an einer nicht-ATP-Bindungsstelle möglich ist.

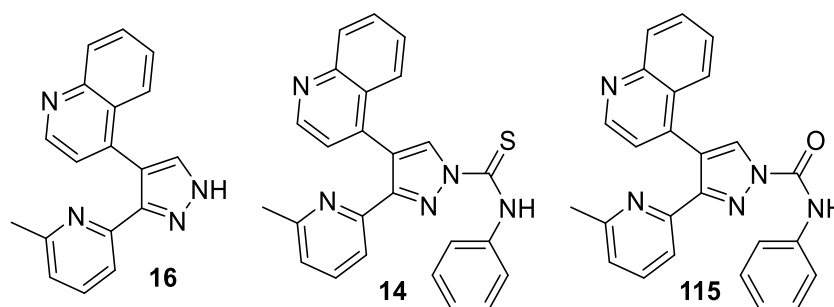


Abbildung 115: Pyrazolderivate, die für die Berechnungen der Wechselwirkung mit den Kinasen ALK2 und ALK4 herangezogen wurden.

Für die Berechnungen wurden drei potentielle Inhibitoren untersucht (Abbildung 115). Die Berechnungen von A 77-01 (**16**) und A 83-01 (**14**) sollten klären, warum die Wirkprofile dieser Verbindungen eine starke Ähnlichkeit haben. Zusätzlich wurde der Inhibitor **115** studiert, da er sich als stabiler erwies als A 83-01 (**14**) und dennoch eine Inhibitoraktivität auf die Kinasen ALK2 und ALK4 aufweist. Bei den Berechnungen wurden die günstigsten Konformationen in den Proteintaschen für den aktiven wie für den inaktiven Zustand herangezogen. Um die Qualität der Wechselwirkung zu bewerten, wurden die Gibbs-Energien der erhaltenen Protein-Inhibitor-Komplexe berechnet. Diese Berechnungen offenbarten, dass **14** und **115** sehr ähnliche Wechselwirkungen mit ALK2 sowohl in der aktiven (Abbildung 116) als auch in der inaktiven Konformation (Abbildung 117) ausbilden. Diese sind jedoch nicht stark genug, um die gegebene Inhibitoraktivität zu erklären.

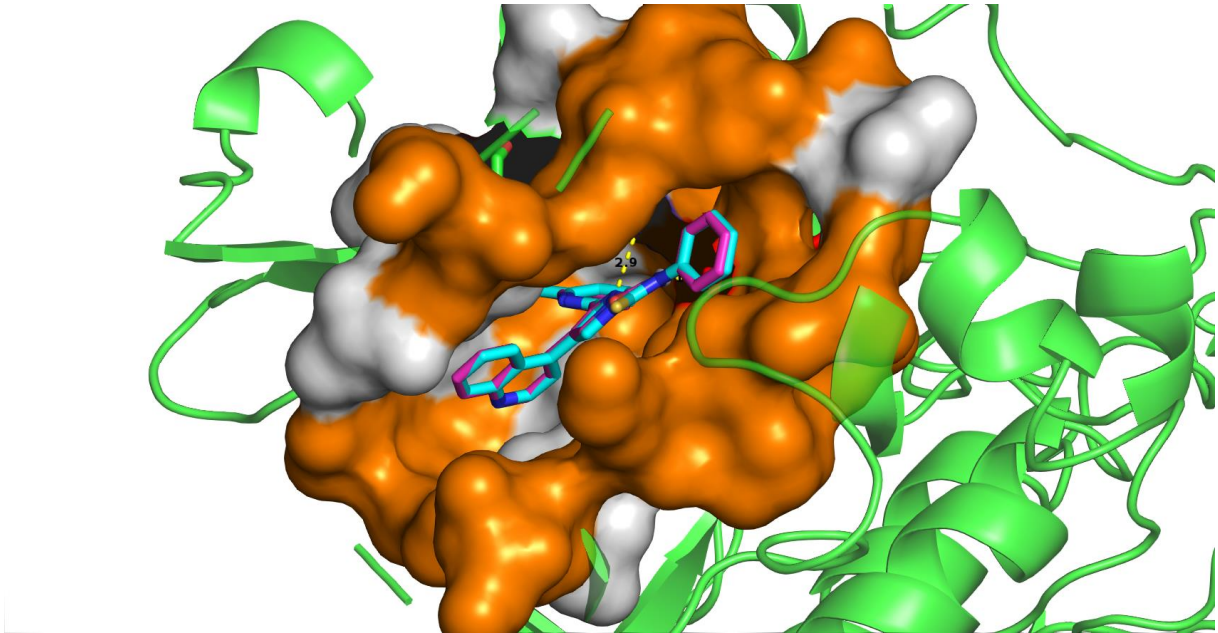


Abbildung 116: Vergleich der Lage des Harnstoffderivats **115** (Violett) mit der Lage des Inhibitors A 83-01 (**14**, Cyan) in der kompetitiven Konformation der ALK2 Kinase in der Aktiv-Konformation. Beide Strukturen liegen übereinander und zeigen somit keinen Unterschied in Bezug auf Wechselwirkungen in dieser Konformation der Kinase.

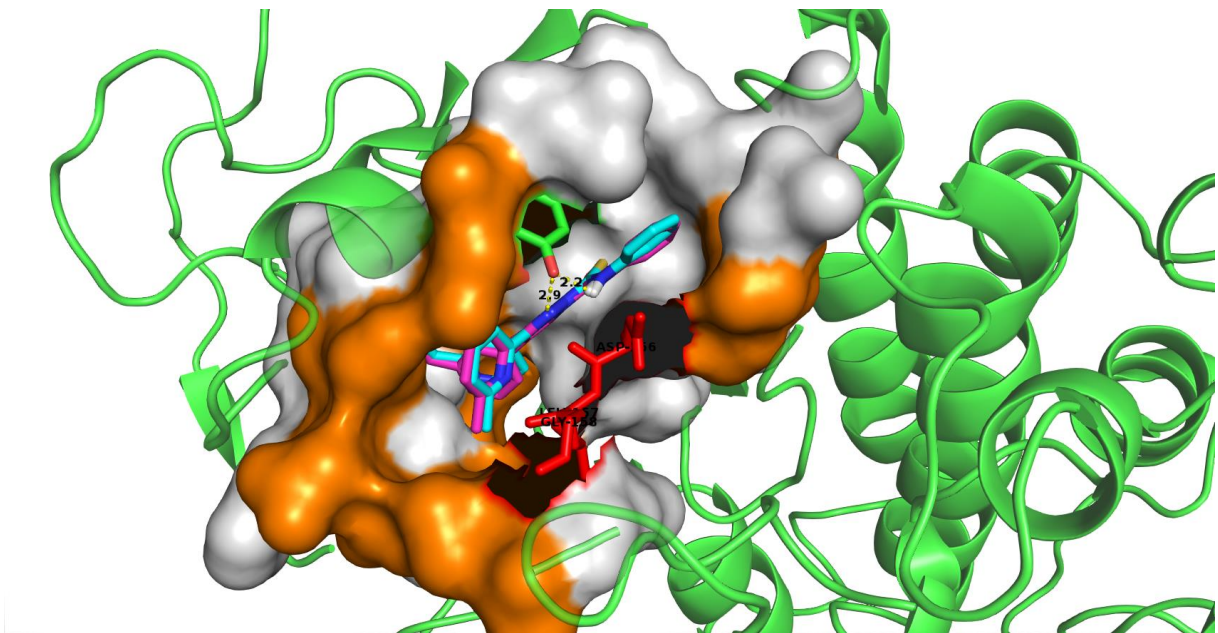


Abbildung 117: Vergleich der Lage des Harnstoffderivats **115** (Violett) mit der Lage des Inhibitors A 83-01 (**14**, Cyan) in der allosterischen Tasche der ALK2 Kinase in der Inaktiv-Konformation. Beide Strukturen liegen übereinander und zeigen somit keinen Unterschied in Bezug auf die Wechselwirkung in dieser Konformation der Kinase.

Für beide Substrate konnten Gibbs-Energien des Protein-Liganden-Komplexes von ca. -6.4 kcal/mol errechnet werden. Dies deutete auf eine eher schwache Wechselwirkung der Substrate hin. Die Berechnungen von A 77-01 (**16**) ergaben, dass dieser sich sowohl in der aktiven (Abbildung 118), wie auch in der inaktiven Konformation (Abbildung 119) der ALK2 eher kompetitiv zu ATP verhält. Hier konnten die Wechselwirkungen zwischen **16** und den Aminosäuren His286 und His284 belegt werden.

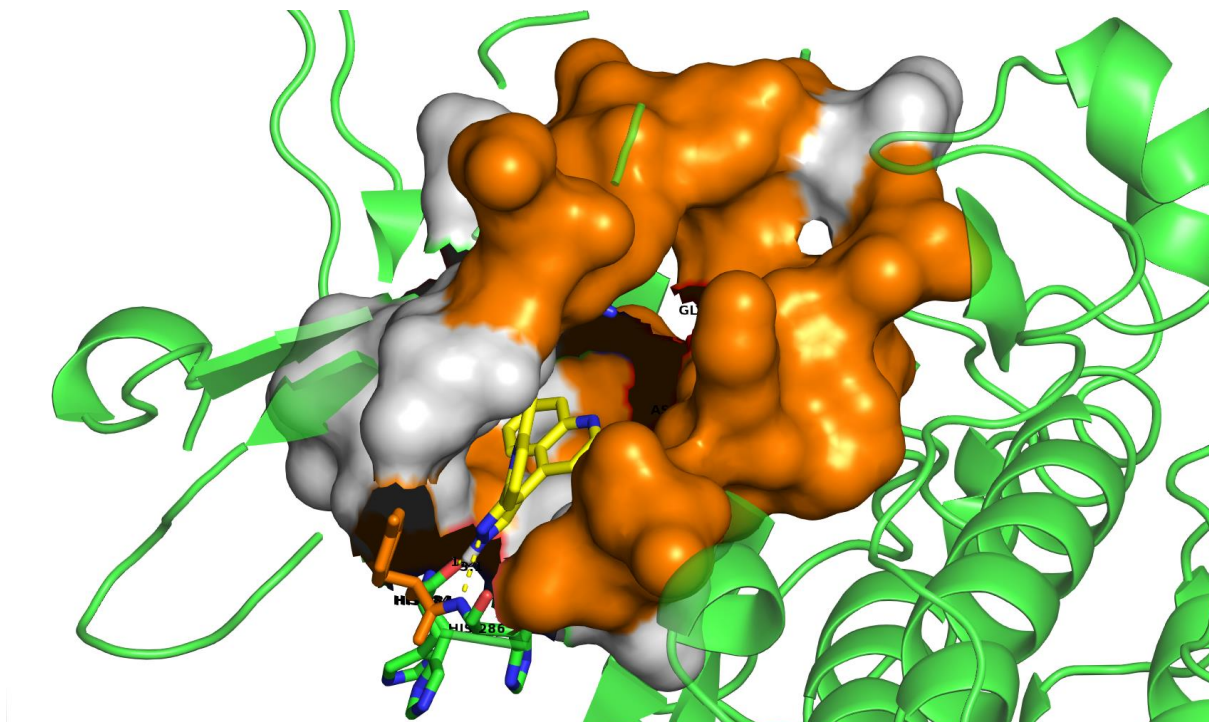


Abbildung 118: Lage von **16** (gelb) in der aktiven Konformation von ALK2. Die deutlichen Ausbildungen von Wasserstoffbrücken zu His284 und His284 sind gezeigt.

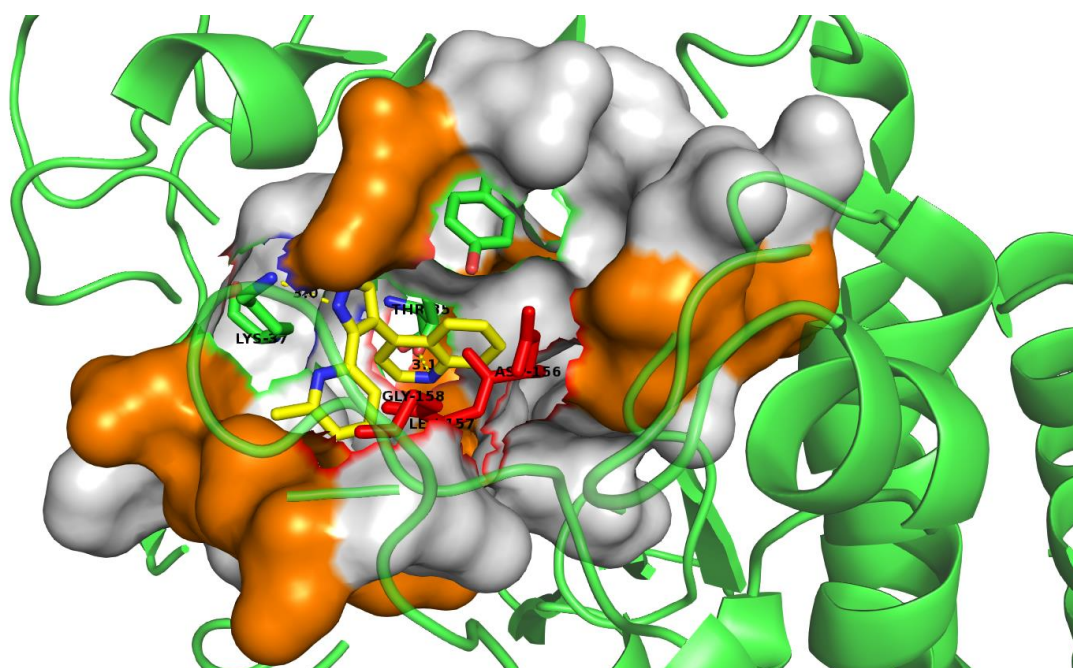


Abbildung 119: Lage des freien Pyrazolderivats **16** in der allosterischen Bindungsseite der inaktiven Konformation von ALK2. Wesentliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr85 und des Protons im Pyrazol-Ring und die Wechselwirkung zwischen Lys37 und einem der Stickstoffatome des Pyrazolderivats **16** sind gezeigt.

Obwohl bei A 77-01 (**16**) Wechselwirkungen berechnet wurden die denen von ATP sehr ähnlich sind, sind diese als äußerst gering (ca. -4.9 kcal/mol) zu bewerten. Somit können sie die Aktivität dieses Derivats nicht erklären. Gleiche Berechnungen wurden für die Kinase ALK4 durchgeführt. Aufgrund der Ähnlichkeit mit den Wechselwirkungen der Kinase ALK2 sind diese hier nicht weiter diskutiert.

Tabelle 4: Auflistung der errechneten Gibbs-Energien der Docking-Experimente an ALK2 und ALK4.

Protein	<i>dG</i> A 83-01 (14) [kcal/mol]		<i>dG</i> Harnstoffderivat 115 [kcal/mol]		<i>dG</i> A 77-01 (16) [kcal/mol]	
	Aktiv-Form	Inaktiv-Form	Aktiv-Form	Inaktiv-Form	Aktiv-Form	Inaktiv-Form
ALK2	-6.27	-6.58	-6.35	-6.51	-4.83	-4.96
ALK4	-6.54	-6.03	-6.61	-6.61	-4.28	-4.77

Die Modellberechnungen legen nahe, dass ein anderer Ort als Rezeptorstelle wirkt, oder eine andere Konformation des Proteins und damit eine andere Wechselwirkung mit den dargestellten Inhibitoren für die gefundene Aktivität verantwortlich ist. In Tabelle 4 sind die bestimmten Gibbs-Energien zusammengefasst.

5.2.4 UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON **140** AUF HUMANES TUMORLYSAT

Bei dem Protein Hsp90 handelt es sich um ein Hitzeschock-Protein, das ATP als Substrat benötigt. Dieses molekulare Chaperon ist im menschlichen Körper für die Aktivierung und Alterung mehrerer hundert Proteine verantwortlich.^[199] Die Inhibition von Hsp90 wird als vielversprechendes „target“ in der Bekämpfung von Lungenkrebs angesehen.^[200]

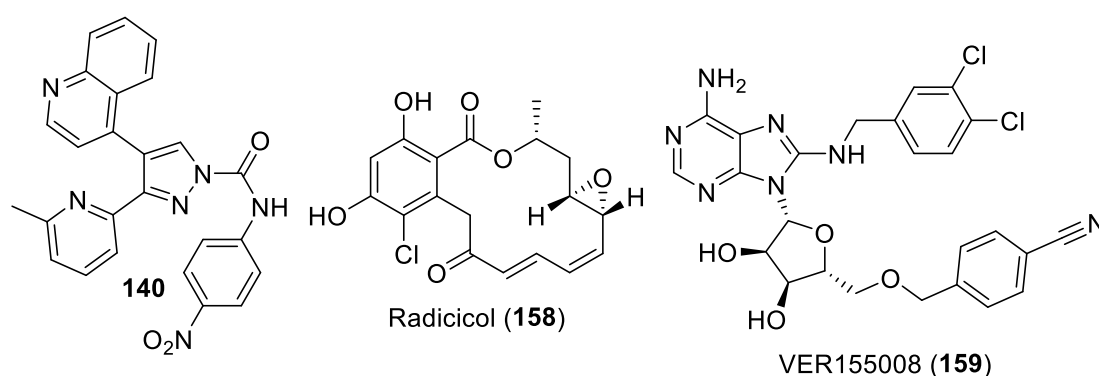


Abbildung 120: Genutzte Verbindungen **140**, Radicol (**158**) und WER155008 (**159**) zur Unterdrückung des ATP-Signals im humanen Tumorslysat.

Eine Besonderheit von Hsp90 ist die Fähigkeit zur allosterischen Regulation. Unter dieser versteht man die Umwandlung von ATP zu ADP (ATPase) von Untereinheiten dieses Proteins die von der eigentlichen ATP-Bindungstasche weit entfernt sind. Diese Eigenschaft ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von ZEILINGER *et al.* sollten einige ausgewählte Substanzen lysiertem humanem Tumorgewebe ausgesetzt werden. Diese Arbeiten wurden von M. Sc. CHRISTIN ALBRECHT^[201] durchgeführt und

wurden bereits in ihrer Masterarbeit veröffentlicht. In ihrer Arbeit wurde Fluoreszenzmarkiertes ATP verwendet und die Verdrängung aus den jeweiligen Proteinen untersucht. Ein Referenzwert wurde von Inhibitoren erhalten, die eine bekannte spezifische Aktivität gegen Hsp90 (**158**, Abbildung 120)^[202] und Hsp70 (**159**, Abbildung 120)^[203] besitzen. Bei der Verwendung von **140** in einem Gemisch verschiedener Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass **140** das Fluoreszenzsignal aus dem Tumorzelllysats erheblich verminderte (Abbildung 121).

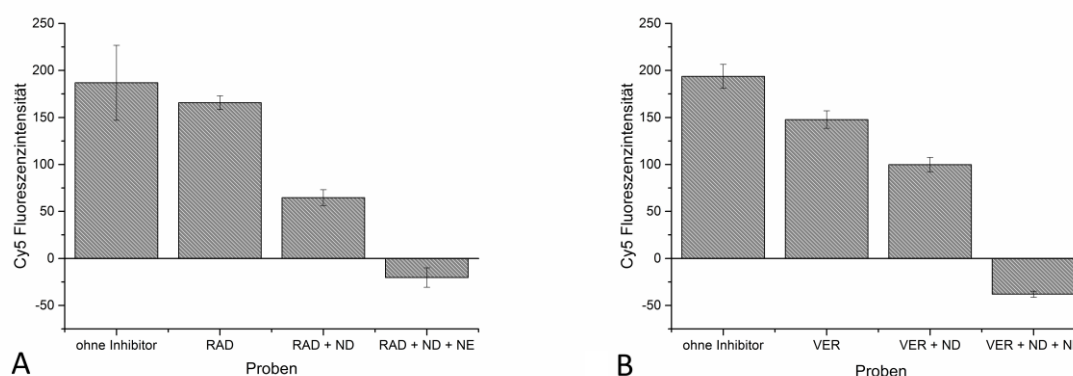


Abbildung 121: Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Verdrängung des ATP-Signals verschiedener Tumorlysate durch Kombination verschiedener Inhibitoren. Die Inhibitoren wurden wie folgt abgekürzt: RAD (**158**), VER (**159**) und ND (**140**). Außerdem wurde ein Naturstoffextrakt (NE) aus *Hypoxylon rickii* unbekannter Zusammensetzung verwendet.

Es konnte allerdings nicht genau geklärt werden, warum das Derivat **140** einen Einfluss auf die ATP-Verdrängung zeigte. Offensichtlich ist die Verbindung **140** in der Lage, das fluoreszenzmarkierte ATP auch aus dem Tumorlysats zu verdrängen. Eine Untersuchung der Stabilität des Derivats **140** zeigte zudem, eine erhebliche Verbesserung der Stabilität in dem verwendeten Puffersystem. Darum kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der aktiven Spezies in diesem Experiment tatsächlich um die Struktur **140** handelt.

5.3 STUDIEN ZUM DIVERGENTEN AUFBAU EINER WIRKSTOFF-BIBLIOTHEK

5.3.1 STUDIEN ZU KREUZKUPPLUNGS-REAKTIONEN AN 3,4-DIBROM PYRAZOLDERIVATEN

Um die Flexibilität für den Aufbau einer Wirkstoffbibliothek aus Derivaten von A 83-01 (**14**) zu erhöhen, sollte ein Vorläufer dargestellt werden, der den Einbau der aromatischen Substituenten am Pyrazol über sequenzielle Kreuzkupplungsreaktionen, z. B. SUZUKI-Kreuzkupplungs-Reaktionen^[204] ermöglichen sollte (Abbildung 122).

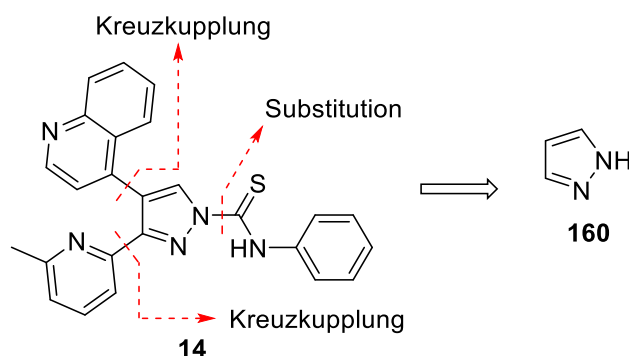
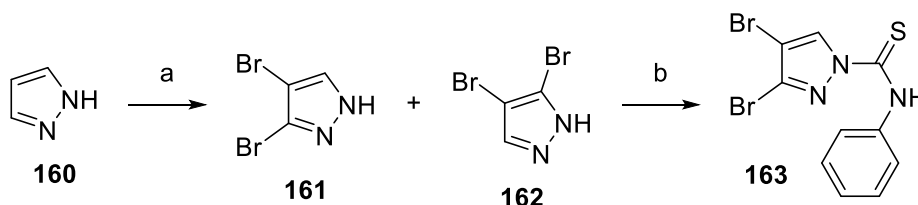


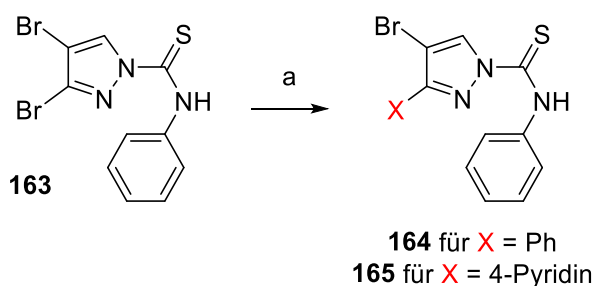
Abbildung 122: Retrosynthetischer Ansatz zum Aufbau einer Wirkstoffbibliothek mit dem Strukturmotiv des A 83-01 (**14**).

Hierbei wurde zunächst die Methodik von LANGER *et al.* zur selektiven Kreuzkupplung von 3,4,5-Tribrompyrazol^[205] verwendet. Über eine Bromierung wurde 3,4-Dibrompyrazol (**161**) aufgebaut. Dieses sollte anschließend über eine Substitutionsreaktion zu dem Thioharnstoffderivat **163** umgesetzt werden (Schema 39).



Schema 39: Darstellung des SUZUKI-Kreuzkupplungs-Vorläufers **163**. Reaktionsbedingungen: a) Br₂, NaOH, RT, 6 h, 90 %; b) Phenylisothiocyanat, NaH, THF, RT, 3 h, 22 %.

Als Startpunkt dieser Syntheseroute diente Pyrazol (**160**). Nach der Bromierung^[206] konnten zwar die mono- und tri-substituierten Nebenprodukte voneinander getrennt werden, jedoch lag ein Tautomerengemisch von 3,4-Dibrompyrazol (**161**) und 4,5-Dibrompyrazol (**162**) vor. Dieses wurde anschließend in einer Substitutionsreaktion^[207] mit NaH und Phenylisothiocyanat zu **163** umgesetzt. Hier zeigte sich erneut die bereits in Kapitel 5.1 beschriebene Labilität der Thioharnstoffgruppe.



Schema 40: Studien zu Kreuzkupplungsreaktionen mit **163**. Reaktionsbedingungen: a) Pd-Katalysator, XB(OH)₂, Base, Lösungsmittel, Temperatur, Zeit (siehe Tabelle 5).

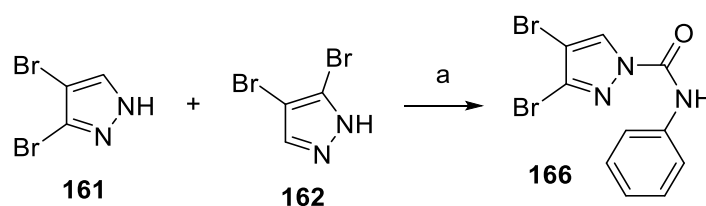
Es war nicht möglich **163** über säulenchromatographische Reinigung zu isolieren. Aus diesem Grund wurde eine Kristallisation aus MeCN durchgeführt. Im Vergleich zum A 83-01 (**14**)

zeigte **163** jedoch eine erhöhte Stabilität in CDCl_3 und wurde daher in nachfolgenden Studien über SUZUKI-Kreuzkupplung als Substrat genutzt (Schema 40). Die ersten Studien zu Kreuzkupplungsreaktionen mit **163** lieferten nur Spuren des gewünschten Produkts und zwar unabhängig von den in Tabelle 5 angeführten Reaktionsbedingungen. Grund hierfür ist zum einen die beschriebene Labilität von **163** und die Fähigkeit des Schwefelatoms, am Palladium zu koordinieren und somit die Harnstoffstruktur zu zersetzen.

Tabelle 5: Studien zu Kreuzkupplungsreaktionen mit **163**. Die angeführten Reaktionen wurden im analytischen Maßstab durchgeführt und per LCMS untersucht. Die farbliche

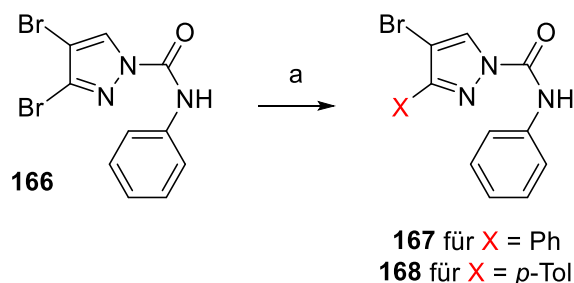
Lfd. Nr.	Kat. / Base / XB(OH)_2	LM	T / Zeit	Anmerkungen
1	$\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ / K_2CO_3 / Ph	Dioxan/ H_2O (4:1)	60 °C / 4 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
2	$\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ / K_2CO_3 / Ph	Dioxan/ H_2O (4:1)	60 °C / 4 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
3	$\text{Pd(dppf)}_2\text{Cl}_2$ / K_2CO_3 / Ph	Dioxan/ H_2O (4:1)	60 °C / 4 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
4	Pd(OAc)_2 / TBAT / Ph	Dioxan/ H_2O (4:1)	60 °C / 4 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
5	Pd(OAc)_2 / K_3PO_4 / 4-Pyridin	<i>i</i> PrOH/ H_2O (1:1)	80 °C / 3 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
6	PdCl_2 / TBAF / 4-Pyridin	H_2O	95 °C / 3 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
7	PdCl_2 / K_2CO_3 / 4-Pyridin	DMF/ H_2O (1:1)	RT / 1 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM
8	PdCl_2 / K_2CO_3 / 4-Pyridin	DMF/ H_2O (1:1)	RT / 14 h	Keine Produktbildung Zersetzung des SM

Außerdem wurde auch das 4-Brompyrazol nachgewiesen, was auf eine erfolgreiche Insertion des Palladiums in die C-Br-Bindung hinweist. Es ist jedoch unklar, ob diese Reaktion vor oder nach der Zersetzung der Thioharnstoffgruppe stattfand. Im Folgenden wurden Derivate dargestellt und genutzt, bei denen die 1H-Position des Pyrazolrings mit stabileren Substituenten modifiziert ist. Zunächst wurde die Thioharnstofffunktion durch die korrespondierende Harnstoffgruppe ersetzt (Schema 41).



Schema 41: Darstellung des Harnstoffderivats **166**. Reaktionsbedingungen: a) Phenylisocyanat, 80 °C, 15 min, 43 %.

Hierfür wurde eine lösungsmittelfreie Variante nach DEHN *et al.*^[208] gewählt. Nach Kristallisation aus Ethanol konnten die beiden Regioisomere voneinander getrennt und nachfolgend einer SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktion unterzogen werden (Schema 42).



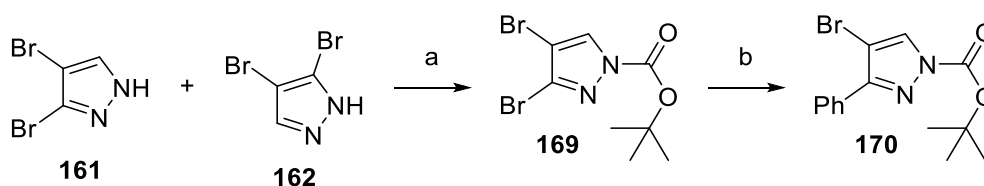
Schema 42: Studien zu Kreuzkupplungsreaktion mit **166**. Reaktionsbedingungen: a) Pd-Katalysator, XB(OH)_2 , Base, Lösungsmittel, Temperatur, Zeit (siehe Tabelle 6).

Auch hier wurde die in Kapitel 5.1 beschriebene Labilität gefunden. Unter den gewählten Kreuzkupplungsbedingungen (Tabelle 6) konnten sowohl das di-substituierte Produkt, als auch 3,4-Dibrompyrazol und 4-Brompyrazol nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Studien zu Kreuzkupplungsreaktionen mit **166**. Die angeführten Reaktionen wurden im analytischen Maßstab durchgeführt und per LCMS untersucht.

Lfd. Nr.	Kat. / Base / XB(OH)_2	LM	T / Zeit	Anmerkungen
1	Pd(OAc) ₂ / K ₃ PO ₄ / Ph	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O (1:1)	80 °C → RT / 2 h → 14 h	komplexes Produktgemisch
2	Pd(OAc) ₂ / K ₃ PO ₄ / <i>p</i> -Tol	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O (1:1)	80 °C → RT / 2 h → 14 h	komplexes Produktgemisch, di-Substituiertes Produkt
3	Pd(OAc) ₂ / K ₃ PO ₄ / <i>p</i> -Tol	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O (1:1)	80 °C / 3 h	komplexes Produktgemisch, di-substituiertes Produkt

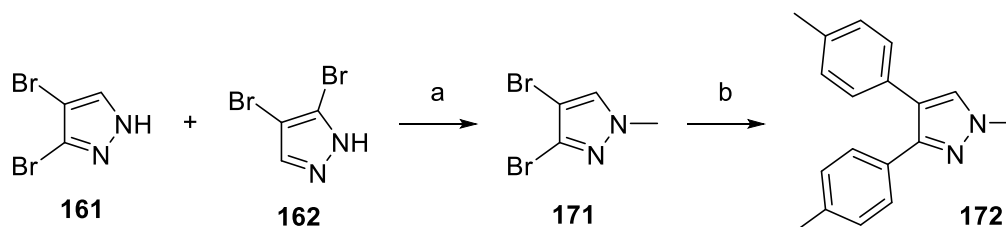
Die vorliegenden Untersuchungen lieferten keinen Hinweis auf die Selektivität der Kreuzkupplungsreaktionen. Um festzustellen, ob die 3-Position im Pyrazol selektiv in einer Kreuzkupplung umgesetzt werden kann, wurde nach einem Substituenten gesucht, der unter den Bedingungen einer SUZUKI-Reaktion unverändert am Pyrazol verbleibt. Zunächst wurde eine Schutzgruppe für Amine^[209] gewählt, die sich leicht wieder entfernen lässt (Schema 43).



Schema 43: Einführung einer Boc-Gruppe und Kreuzkupplungsreaktionen mit **169**. Reaktionsbedingungen: a) Boc₂O, DMAP, MeCN, RT, 3.5 h 16 %; b) Pd(PPh₃)₄, PhB(OH)₂, K₃PO₄, 100 °C, 3 h, Spuren.

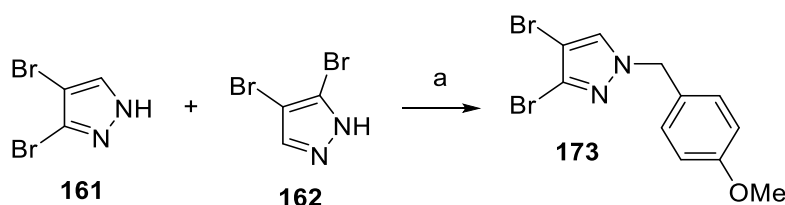
In dieser Sequenz konnte das einfach substituierte Pyrazol **170** ebenfalls nur in Spuren nachgewiesen werden. Auch die Verwendung des Boc-funktionalisierten Pyrazols (**170**) führte überwiegend zu dem 4-Brompyrazol, sowie zu den mono- und di-substituierten, freien Pyrazolen.

Keine der gewählten Veränderungen an der 1*H*-Position zeichneten sich als ausreichend stabil aus, um die Selektivität der Kreuzkupplungen mit 3,4-Dibrompyrazolderivaten untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurde eine weitere Schutzgruppenstrategie gewählt, bei der zunächst eine *N*-Methyl-Gruppe^[210] eingeführt wurde. Diese hätte zwar nach erfolgreicher Reaktion nicht wieder entfernt werden können, jedoch wurde eine hinreichende Stabilität erwartet, um grundsätzliche Studien zur Selektivität der SUZUKI-Reaktion mit **171** durchzuführen (Schema 44).



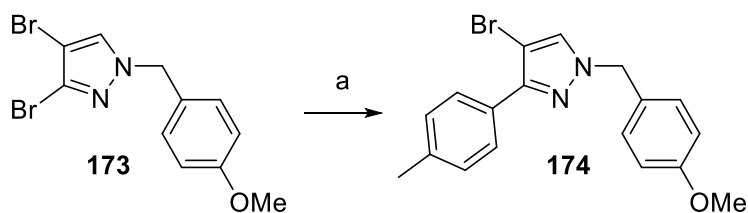
Schema 44: Aufbau des *N*-Methyl-Pyrazols **171** und Untersuchung zur selektiven Kreuzkupplung. Reaktionsbedingungen: a) MeI, KOH, H₂O, RT, 12 h, 32 %; b) *p*-ToIB(OH)₂, K₂CO₃, Pd(OAc)₂, SPhos, Dioxan/H₂O (4:1), 100 °C, 15 h, 80 %.

Diese Kreuzkupplung mit **171** und 1.0 Äq. der Boronsäure lieferte das zweifach substituierte Produkt (**172**) das Hauptprodukt. Das einfach substituierte Produkt konnte ebenfalls per GC-MS nachgewiesen. Deshalb wurde versucht die Methylgruppe^[211] in **172** zu entfernen, was allerdings nicht gelang. Aus diesem Grund wurde eine Schutzgruppe für **161** gesucht, die eine ähnliche Stabilität wie die Methylgruppe verspricht, jedoch leichter entfernbar ist. Die *para*-Methoxybenzylgruppe erwies sich als geeignet, da sie mild einzubringen^[212] und zu entfernen^[207] ist (Schema 45).



Schema 45: Darstellung des PMB-Pyrazols **173** zur Untersuchung der Selektivität von Kreuzkupplungsreaktionen mit 3,4-Dibrompyrazolderivaten. Reaktionsbedingungen: a) NaH, PMB-Cl, DMF, RT, 18 h, 25 %.

Angelehnt an den Arbeiten von LANGER *et al.* wurden die Bedingungen der Kreuzkupplung^[213] mittels Pd(PPh₃)₄ auf das PMB-geschützte 3,4-Dibrompyrazol (**173**) übertragen (Schema 46).



Schema 46: SUZUKI-Kreuzkupplung mit **173**. Reaktionsbedingungen: a) *p*-TolB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, K₃PO₄, Dioxan, 100 °C, 15 h, 15 %.

Es konnte gezeigt werden, dass zwar eine selektive Kupplung an Position drei des Pyrazols möglich war. Jedoch ist diese Position so reaktiv, dass der Großteil des Startmaterials lediglich in 3-Position debromiert (**177**) wurde (Abbildung 123). Die Isolierung der einzelnen Nebenprodukte zeigte außerdem, dass auch die Homokupplung der beiden Boronsäuren (**175**), die zweifache Substitution (**178**) und die Bildung des *para*-Kresols (**176**) stattgefunden hat.

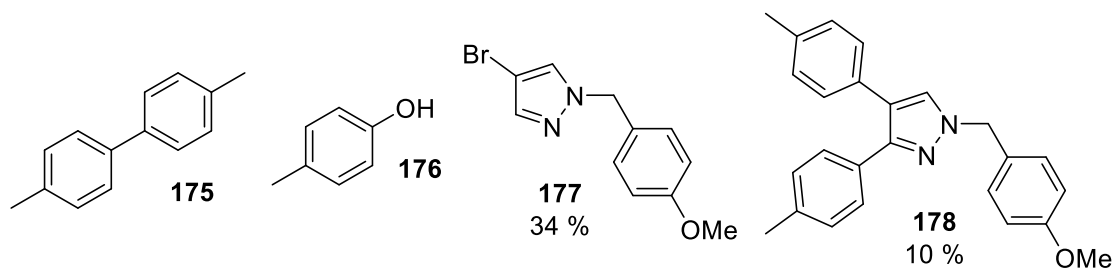


Abbildung 123: Isolierte Nebenprodukte der Kreuzkupplung von **173** mit *p*-TolB(OH)₂.

Dieses exemplarische Kreuzkupplungsexperiment wurde genutzt, um im Folgenden den Einfluss von verschiedene Katalysatoren, Basen, Temperaturen und Reaktionszeiten^[205, 210,213–217] auf Umsatz und Selektivität zu untersuchen (Tabelle 7). Hierbei wurden die Retentionszeiten der einzelnen Produkte bzw. Nebenprodukte unter LCMS-Bedingungen als Referenz genutzt, um eine Aussage über die Umsetzung der folgenden Reaktionen treffen zu können.

Tabelle 7: Bedingungen für die Kreuzkupplungsreaktionen aus Schema 46. Die Auswertung erfolgte mittels LCMS.

Lfd. Nr.	Katalysator	Zusatz	Lösungsmittel	Base	Temperatur	Zeit
1	Pd(PPh ₃) ₄		Dioxan/H ₂ O (4:1)	K ₃ PO ₄	RT→90 °C	26 h
2	Pd(OAc) ₂	SPhos	EtOH/H ₂ O (1:1)	K ₃ PO ₄	60 °C	21 h
3	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂		Dioxan/H ₂ O (4:1)	K ₃ PO ₄	60 °C	21 h
4	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂		Dioxan/H ₂ O (4:1)	K ₂ CO ₃	60 °C	16 h
5	Pd(PPh ₃) ₄		Toluol	K ₂ CO ₃	90 °C	23 h
6	Pd(PPh ₃) ₄	langsame Zugabe der Boronsäure	Toluol	K ₂ CO ₃	90 °C	19 h

7	Pd(PPh ₃) ₄	KBr	Dioxan	K ₃ PO ₄	100 °C	28 h
8	PdCl ₂	O ₂ unterstützte Pd-Katalyse	EtOH/H ₂ O (1:1)	K ₃ PO ₄	RT→80 °C	17 h
9	Pd(OAc) ₂	O ₂ unterstützte Pd-Katalyse	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O (1:1)	K ₂ CO ₃	80 °C	22 h
10	Pd(DPPF)Cl ₂		H ₂ O	K ₃ PO ₄	80→100 °C	22 h
11	Pd(DPPF)Cl ₂	DPPF	Dioxan	K ₂ CO ₃	100 °C	22 h
12	PEPPSI™-IPr		Dioxan/H ₂ O (4:1)	K ₃ PO ₄	RT→100 °C	27 h

Es zeigte sich, dass bei allen gewählten Reaktionsbedingungen kein vollständiger Umsatz zu beobachten war. Die Ursache hierfür könnten die Nebenreaktionen, die Homokupplung der Boronsäuren und die Bildung des *para*-Kresols sein. Außerdem wurde in jeder Reaktion die Bildung des debromierten (**177**) und des doppelt substituierten Produktes (**178**) beobachtet. Dies war der Anlass, die Synthesestrategie zu ändern und eine Gruppe in 3-Position des Pyrazols zu wählen, welche ausschließlich über die Aktivierung durch einen Katalysator, oder eines speziellen Reagenzes reagieren konnte.

5.3.2 STUDIEN ZUM AUFBAU DES PYRAZOL-GRUNDGERÜSTS UNTER VERWENDUNG EINER [1,3]-DIPOLAREN CYCLOADDITION

Um das Pyrazol-Grundgerüst selektiv in der 3- und 4-Position mit einer funktionellen Gruppe zu versehen, die in einer Kreuzkupplung umgesetzt werden kann, wurde im Folgenden die Herangehensweise von ECKERT-MAKSIC *et al.*^[218] verwendet. Dazu wurde der Aufbau eines Pyrazol Grundgerüsts beschrieben, bei dem, abhängig vom eingesetzten Alkin, ein 3,4-Substitutionsmuster über eine [1,3]-dipolare Cycloaddition unter Verwendung von TMS-Diazomethan als 1,3-Dipol erreicht wird (Abbildung 124).

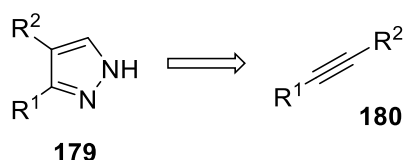
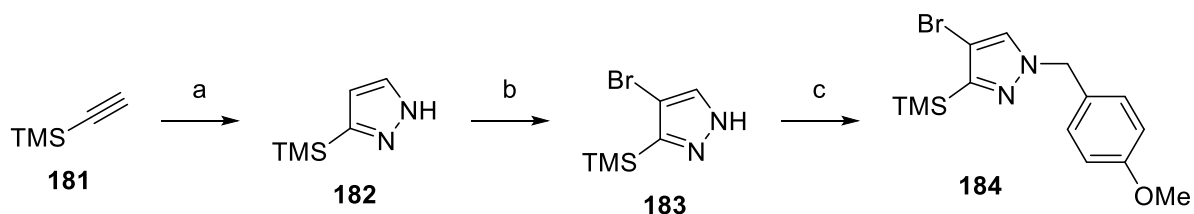


Abbildung 124: Retrosynthese zum Aufbau des Pyrazol Grundgerüsts (**179**) über eine [1,3]-dipolare Cycloaddition.

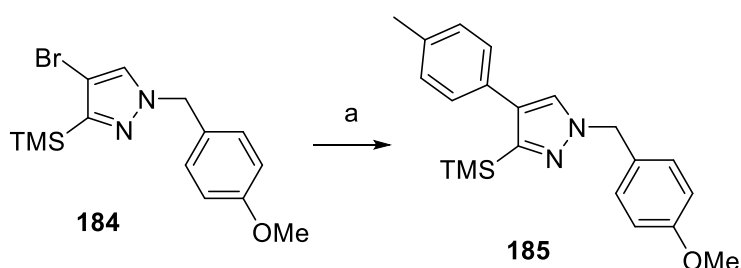
Durch diese Methode war es möglich, das Pyrazol **182** aufzubauen und im weiteren Verlauf ein Bromid durch selektive Bromierung in 4-Position (**183**, Schema 47) einzuführen.^[219] Um

den negativen Einfluss des freien Pyrazols auf die Kreuzkupplung zu unterbinden wurde dieses zuvor, wie auch im vorhergehenden Kapitel beschrieben, mit einer PMB-Gruppe (**184**) maskiert.^[212]



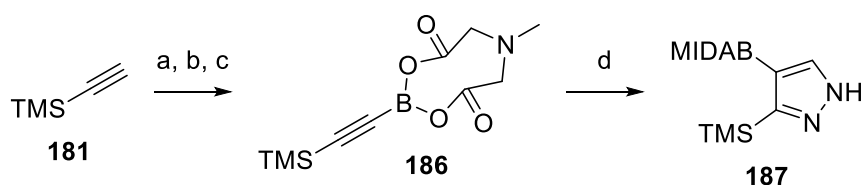
Schema 47: Darstellung des 3-TMS-4-Brom-Derivats **184** als Kreuzkupplungsvorläufer. Reaktionsbedingungen: a) TMS-Diazomethan (2 M), Et₂O, μ W (250 W, 120 °C), 30 min, 71 %; b) NBS, CCl₄, RT, 3 h, 98 %; c) PMB-Cl, NaH, DMF, RT, 18 h, 11 %.

Die geringen Ausbeuten erklären sich zum einen durch den geringen Umsatz der Bromierung (Schema 47, c), aber zum anderen auch durch die problematische Trennung von para-Methoxybenzylchlorid vom Produkt **184**. Bei dieser Reaktion offenbarte sich wiederum die Labilität des Bromsubstituenten im Pyrazolring. Das gewünschte Produkt (**185**) konnte nur in Spuren erhalten werden. Darüber hinaus wurde auch der Verlust der TMS-Gruppe und die Debromierung beobachtet (Schema 48).



Schema 48: SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktion mit **184**. Reaktionsbedingungen: a) *p*-Toluolboronsäure, Pd(PPh₃)₄, K₃PO₄, Dioxan, 70 °C, 30 h, Spuren von **185**.

Es ist literaturbekannt, dass die Boronsäure einen Einfluss auf die Nebenreaktion der Protodebromierung haben kann.^[220] Aus diesem Grund wurde die Strategie so geändert, dass die Boronsäure als maskiertes MIDA-Boronat direkt in 4-Position eingebracht werden sollte. Hierfür wurden erneut die Bedingungen der [1,3]-dipolaren Cycloaddition nach ECKERT-MAKSIC *et al.* genutzt und das MIDA-TMS-Alkin^[221,222] (**186**) generiert (Schema 49).



Schema 49: Darstellung des Suzuki-Kreuzkupplungsvorläufers **187**. Reaktionsbedingungen: a) EtMgBr, THF, 0 °C→RT, 1.5 h; b) B(OMe)₃, THF, -78 °C→RT, 3 h; c) *N*-Methylimino-di-essigsäure, DMSO, 130 °C, 1 h, 72 % über drei Stufen; d) TMS-Diazomethan, Xylol, 160 °C, Spuren von **187**.

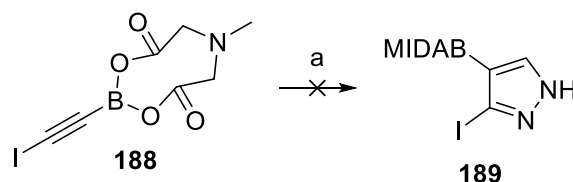
Nach erfolgreichem Aufbau von **182** konnten die Bedingungen dieser Cycloaddition^[218] aus Schema 47 nicht auf **186** übertragen werden. Nach einer umfangreichen Optimierung der Reaktionsbedingungen unter Verwendung von TMS-Diazomethan bzw. von frisch destilliertem Diazomethan (Tabelle 8) konnte beim Einsatz von TMS-Diazomethan und Xylol bei 160 °C das Produkt nur in Spuren über hochaufgelöste Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Untersuchungen der [1,3]-dipolaren Cycloaddition mit **186** unter Verwendung von TMS-Diazomethan (1-9) und frisch destilliertem Diazomethan (10-11) und Untersuchung des Einflusses der Mikrowellenstrahlung (1-4) bzw. konventionellen Heizens (5-11) auf den Reaktionsumsatz.

Lfd. Nr.	Reagenz	Lösungsmittel	Bedingungen	Beobachtungen
1	TMS-Diazomethan	Hexan	μw, 150 W, 120 °C, 50 min	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
2	TMS-Diazomethan	DMSO	μw, 150 W, 120 °C, 55 min	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
3	TMS-Diazomethan	1,4-Dioxan	μw, 150 W, 130 °C, 24 min	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
4	TMS-Diazomethan	Aceton	μw, 300 W, 120 °C, 29 min	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
5	TMS-Diazomethan	DMSO	120 °C, 24 h	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
6	TMS-Diazomethan	1,4-Dioxan	120 °C, 24 h	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
7	TMS-Diazomethan	DMSO	140 °C, 24 h	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
8	TMS-Diazomethan	1,4-Dioxan	120 °C, K ₂ CO ₃ , 24 h	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
9	TMS-Diazomethan	Xylol	160 °C, 24 h	GC: < 10 % HR-MS: Produktbildung
10	Diazomethan	Xylol	12 h, 50 °C	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz
11	Diazomethan	Diethylether	12 h, 50 °C	DC: kein Umsatz GC: kein Umsatz

Ein Grund für die geringe Reaktionsfähigkeit des Alkins **186** in der Reaktion mit TMS-Diazomethan könnte auf die elektronische Situation am Alkin zurückzuführen sein. Hierbei handelt es sich beim verwendeten TMS-Alkin **186** um ein sehr elektronenreiches Alkin,

welches die Reaktion mit dem elektronenreichen Dipol erschwert. Um die Elektronendichte am Alkin zu verringern, wurde das iodierter Alkin **188** das von DAVID CANDITO synthetisiert wurde, ebenfalls in einer [1,3]-dipolaren Cycloaddition eingesetzt (Schema 50).

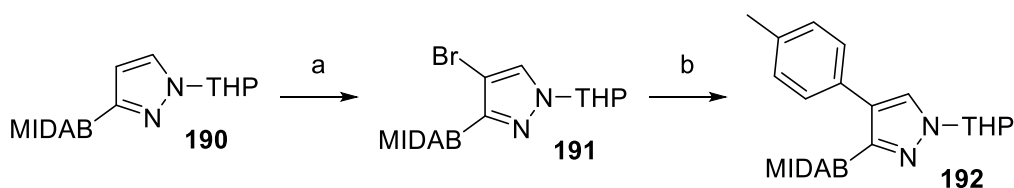


Schema 50: Untersuchung der [1,3]-dipolaren Cycloaddition mit **188**. Reaktionsbedingungen: a) TMS-Diazomethan (2 M), Et₂O, μ W (250 W, 120 °C), 30 min, kein Umsatz.

Es zeigte sich jedoch, dass es bei dieser Reaktion zu keiner Produktbildung kommt. Auch das Startmaterial konnte nicht reisoliert werden, was auf die Zersetzung des Alkins **188** hindeutet.

5.3.3 WEITERE ANSÄTZE ZUM AUFBAU EINER DIVERGENTEN DARSTELLUNG EINER WIRKSTOFFBIBLIOTHEK

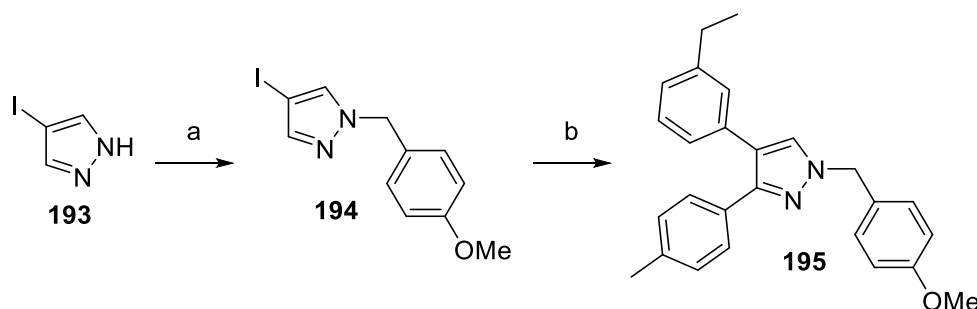
Ein weiterer Ansatz führte, beginnend mit dem kommerziell erhältlichen Pyrazol **190**, über eine Bromierung (**191**) zum Kupplungsprodukt **192**, das jedoch nur in Spuren nachgewiesen werden konnte (Schema 51).



Schema 51: Darstellung des Pyrazolderivats **191** und anschließende Kreuzkupplung zu **192**. Reaktionsbedingungen. a) NBS, Acetonitril, RT, 12 h, 92 %; b) Pd(OAc)₂, CyJohnPhos, K₃PO₄, THF, 65 °C, 12 h, Spuren von **192**.

Nach umfangreichen Optimierungen konnte die Bromierung bei einer Ansatzgröße von 20 mg unter vollständigem Umsatz und eine Ausbeute von 92 % erhalten werden.^[223] Bei einer doppelten Ansatzgröße konnte bei vollständigem Umsatz von **190** nur noch eine Ausbeute von 15 % des bromierten Pyrazols **191** gewonnen werden. Diese Reaktion zeigte sich damit als ungeeignet, große Mengen des Startmaterials für den Aufbau einer Wirkstoffbibliothek zu generieren. Die nachfolgende Kreuzkupplungsreaktion^[224] von **191** zu **192** lieferte eine Vielzahl von Zerfallsprodukten, weshalb dieser Ansatz zum Aufbau einer Wirkstoffbibliothek nicht weiter verfolgt wurde.

Ein weiterer Versuch ein geeignetes Startmaterial für den Aufbau einer Wirkstoffbibliothek zu entwickeln führte über die CATELLANI-Reaktion.^[225] Hierbei sollte, ausgehend von dem Iodpyrazol **193**, zwei verschiedene Substituenten in 3- und 4-Position des Pyrazols durch eine Reaktionssequenz eingeführt werden (Schema 52).



Schema 52: Darstellung des Substrates **194** und anschließende CATELLANI-Reaktion zu **195**. Reaktionsbedingungen: a) PMB-Br, Cs_2CO_3 , DMF, RT, 1 h, 75 %, b) *para*-Toluolboronsäure, 3-Ethylphenylboronsäure, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Norbornen, K_2CO_3 , DMF, RT, 24 h, Spuren von **195**.

Das Produkt der Catellani-Reaktion konnte jedoch nur in Spuren nachgewiesen werden, da das Iodpyrazol zum einen sehr schnell mit der Boronsäure abreagierte. Zum anderen konnte ein hoher Umsatz zu dem deiodierten Produkt nachgewiesen werden. Somit stellt sich dieser Ansatz ebenfalls als ungeeignet heraus.

5.3.4 AUFBAU EINES FLUOR-BROM-PYRAZOL-GERÜSTS

Wie in vorhergehenden Kapiteln gezeigt, eignet sich die SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktion für die Funktionalisierung bromierter Pyrazolderivate. Allerdings erwiesen sich sowohl Brom als auch die Trimethylsilylgruppe in der 3-Position als zu labil. Aus diesem Grund wurde eine funktionelle Gruppe gewählt, die eine hinreichend große Stabilität und geringere Reaktivität besitzt, um nach einer SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktion unverändert vorzuliegen. Die Arbeiten von ICHIKAWA *et al.*^[226,227] zeigten, dass das Boc-geschützte 3-Fluorpyrazol (**196**) aus 2-Brom-3,3,3-trifluorprop-1-en (**198**) dargestellt werden kann (Abbildung 125).

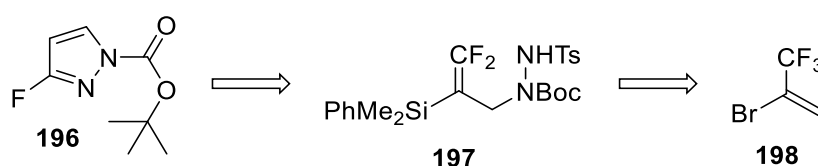
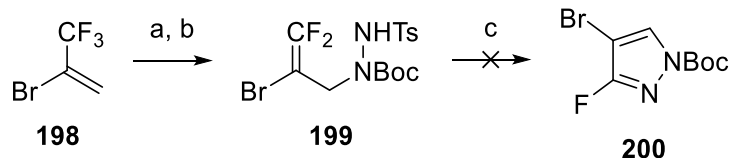


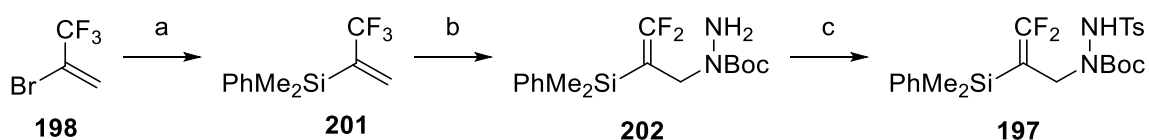
Abbildung 125: Retrosynthese zur Darstellung von **196** nach ICHIKAWA *et al.*

Basierend auf diesem Ansatz sollte zunächst die Zielstruktur **200** auf direktem Weg ausgehend von **198** generiert werden (Schema 53). Hierbei wurde ein abgeänderter Reaktionsweg verfolgt. Es zeigte sich jedoch, dass der Ringschluss zum Pyrazol **200** auf diesem Weg nicht möglich ist. Der Grund für den Misserfolg kann über die notwendige Anwesenheit einer Silylgruppe im postulierten Mechanismus^[226] erklärt werden.



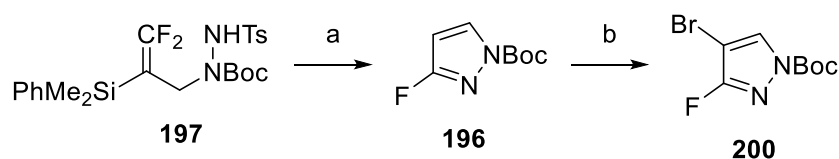
Schema 53: Darstellung von **199** und Untersuchung des Ringschlusses zu **200**. Reaktionsbedingungen: a) *tert*-Butylhydrazincarboxylat, NaH, THF, RT, 24 h; b) Tosylchlorid, Pyridin, RT, 12 h, 61 % über 2 Stufen; c) NaH, DMF, 24 h, RT, kein Umsatz.

Um das Pyrazolgrundgerüst aufzubauen und über eine nachfolgende Bromierung **200** zu generieren, wurde die Synthese von ICHIKAWA *et al.*^[226,227] nachvollzogen und optimiert. Hierbei wurde zunächst ausgehend von **198** Vinylmagnesiumbromid erzeugt und durch Abfangen mit Chlor(dimethyl)phenylsilan der Silylenolether **201** gebildet (Schema 54). Anschließend wurde **201** mit *tert*-Butylhydrazincarboxylat zu **202** und weiter zum *N*-Tosylat **197** umgesetzt.



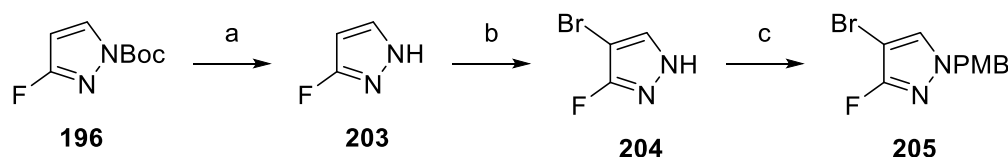
Schema 54: Darstellung des Vorläufers (**197**) der Ringschlussreaktion zum Pyrazol **196**. Reaktionsbedingungen: a) Mg, Chlor(dimethyl)phenylsilan, THF, -15 °C→RT, 8 h, 94 %; b) *tert*-Butylhydrazincarboxylat, NaH, THF, 0 °C, 3 h, 67 %; c) Tosylchlorid, Pyridin, RT, 3 h, 80 %.

Die Reaktionen zu **197** ließen sich reproduzierbar im Maßstab von 15 g führen. Die anschließende Ringschlussreaktion wurde durch NaH initiiert, konnte allerdings nur in einem Maßstab von 400 mg durchgeführt werden. Nach erfolgreichem Ringschluss zu **196** wurde am Boc-geschützten Pyrazol (**196**) die Bromierung^[219] zu **200** untersucht. Es zeigte sich, dass sich das bromierte Produkt (**200**) nur in Spuren bildete.



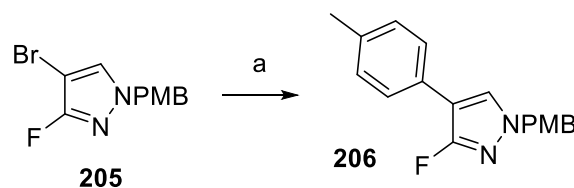
Schema 55: Ringschluss zu **196** und nachfolgende Bromierung zu **200**. Reaktionsbedingungen: a) NaH, DMF, RT, 12 h, 94 %; b) NBS, CCl₄, RT, 24 h, Spuren.

Aus diesem Grund wurde die Route um die in Schema 56 gezeigte Reaktionssequenz erweitert. Zunächst konnte die Boc-Gruppe unter sehr milden Bedingungen^[228] (Schema 56) mittels K_3PO_4 entfernt und das freie Pyrazol **203** so unter Einsatz von NBS selektiv und quantitativ bromiert^[219] werden. Um das Pyrazolgrundgerüst **204** für eine Kreuzkupplungsreaktion vorzubereiten, wurde wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, die PMB-Gruppe als geeignete Schutzgruppe zur Untersuchung der SUZUKI-Kreuzkupplung an Pyrazol-Derivaten eingeführt.^[212]



Schema 56: Darstellung des SUZUKI-Kreuzkupplungsvorläufers **205**. Reaktionsbedingungen: a) K_3PO_4 , MeOH, 40 °C, 24 h, 60 %; b) NBS, CCl_4 , RT, 8 h, 99 %; c) PMB-Cl, CS_2CO_3 , DMF, RT, 16 h, 73 %.

Nach erfolgreicher Darstellung von **205** mit einer Gesamtausbeute von 21 % über sieben Stufen wurde dieses Pyrazolderivat genutzt, um die selektive Kreuzkupplung in 4-Position zu untersuchen. Es wurden die Bedingungen von LANGER *et al.*^[205] übernommen, trotz der in Kapitel 5.3.1 beschriebenen mangelnden Regio- und Chemoselektivitäten. Allerdings zeigte diese Methode das geringste Ausmaß an Protodebromierung. Zunächst wurde die *para*-Toluolboronsäure verwendet, um einen Vergleich mit den vorhergehenden Studien zu SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktionen zu ziehen (Schema 57). Hier zeigten sich zunächst nur 49 % Umsatz nach 12 h Reaktionszeit und eine Ausbeute von 31 %. Unter diesen Bedingungen konnte nur ein Umsatz von 11 % zum debromierten Nebenprodukt verzeichnet werden.



Schema 57: Kreuzkupplungsreaktion mit **205**. Reaktionsbedingungen: a) *p*-Toluolboronsäure, K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1), 90 °C, 24 h, 31 %.

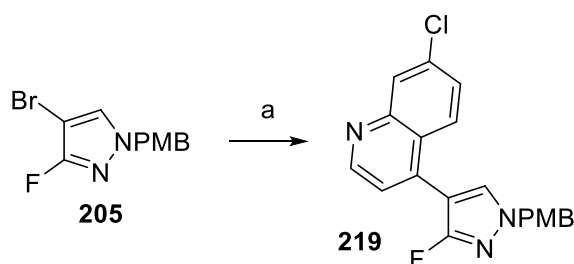
Um den Umsatz der Kreuzkupplungsreaktion zu erhöhen, wurde die Reaktionstemperatur von 90 °C auf 105 °C erhöht. Der Einsatz verschiedener Boronsäuren (Tabelle 9) sollte zeigen, ob es einen Zusammenhang zwischen elektronenreichen bzw. elektronenarmen aromatischen Boronsäurederivaten und den korrespondierenden Ausbeuten gibt.

Tabelle 9: Tabelle zur Untersuchung der Kreuzkupplungsreaktionen mit **205**.

Reaction scheme showing the cross-coupling of compound **205** (2-bromo-5-fluoro-1-(4-methylphenyl)-1H-imidazole) with an aryl boronic acid ArB(OH)_2 under conditions to yield products **207-212**.

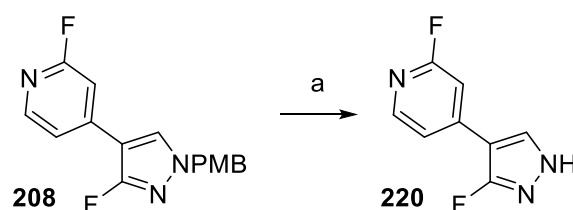
Lfd. Nr.	ArB(OH)_2	Reagenzien	Rkt-Bedingungen	Ausbeute
1	213	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	26 %
2	214	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	99 %
3	215	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	41 %
4	216	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	23 %
5	217	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	Produkt nur in Spuren erhalten
6	218	K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Dioxan/ H_2O (4:1)	105 °C, 12 h	Produkt nur in Spuren erhalten

Hierbei zeigte sich, dass Boronsäuren mit stark elektronenziehenden Substituenten in der *meta*-Position schneller mit **205** umgesetzt werden und somit zu verbesserten Ausbeuten führen als für vergleichbare elektronenreiche aromatische Boronsäuren (Tabelle 9, Eintrag 1 und 2). Lediglich die Naphthalen- und Chinolinderivate (Tabelle 9, Eintrag 5 und 6) reagierten unter diesen Bedingungen sehr langsam und führten zu einem hohen Anteil des protodebromierten Produkts. Die Boronsäuren **217** und **218** konnten vollständig umgesetzt werden, jedoch wurde nach der Reinigung per präparativer HPLC (MeOH/ H_2O 20:80→100 % über 90 min) das jeweilige Produkt nur in Spuren nachgewiesen.



Schema 58: Kreuzkupplungsreaktion unter Anwendung der Bedingungen nach Biswas *et al.*^[229] mit **205**.
Reaktionsbedingungen: a) 7-Chlor-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)chinolin, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , MeCN/ H_2O (1:1), 90 °C, 12 h, 56 %.

Um zu klären, ob es an den Reaktionsbedingungen oder an der Reinigungsmethode lag, wurden die Bedingungen an eine literaturbekannte Methode zur Kreuzkupplung von Chinolin-Derivaten angepasst (Schema 58). Nachdem gezeigt werden konnte, dass **205** ein geeignetes Substrat für die Anwendung der SUZUKI-Kreuzkupplung in 4-Position ist, musste diese Syntheseroute zu Derivaten von A 83-01 (**14**) noch um die Entschützung und den Aufbau des Harnstoffes erweitert werden. Die *para*-Methoxybenzylgruppe wurde gemäß einer Variante von SUTTON *et al.*^[230], die innerhalb von 12 h vollständig verläuft, entfernt (Schema 59).



Schema 59: Darstellung des freien Pyrazols **220** durch Entschützung mittels CAN. Reaktionsbedingungen: a) CAN, MeCN/H₂O (2.5:1), RT, 12 h, nur in Spuren erhalten.

Allerdings nach säulenchromatographischer Reinigung nur noch Spuren des Produktes nachzuweisen. Wie bereits im Kapitel 5.1 gezeigt, könnte auch hierfür eine irreversible Wechselwirkung des freien Pyrazols (**220**) mit der Kieselgeloberfläche verantwortlich gemacht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

6.1 DARSTELLUNG NEUER HYDROGELE ZUR ANWENDUNG IM TISSUE ENGINEERING

6.1.1 ZUSAMMENFASSUNG

In den Studien zu Darstellung neuer Hydrogele zur Anwendung im *tissue engineering* sollte eine Hydrazon-Vernetzungsstrategie an Polysacchariden etabliert werden, die keine Carboxylfunktion enthalten. Diese musste zunächst in die jeweiligen Polysaccharide eingebracht werden.

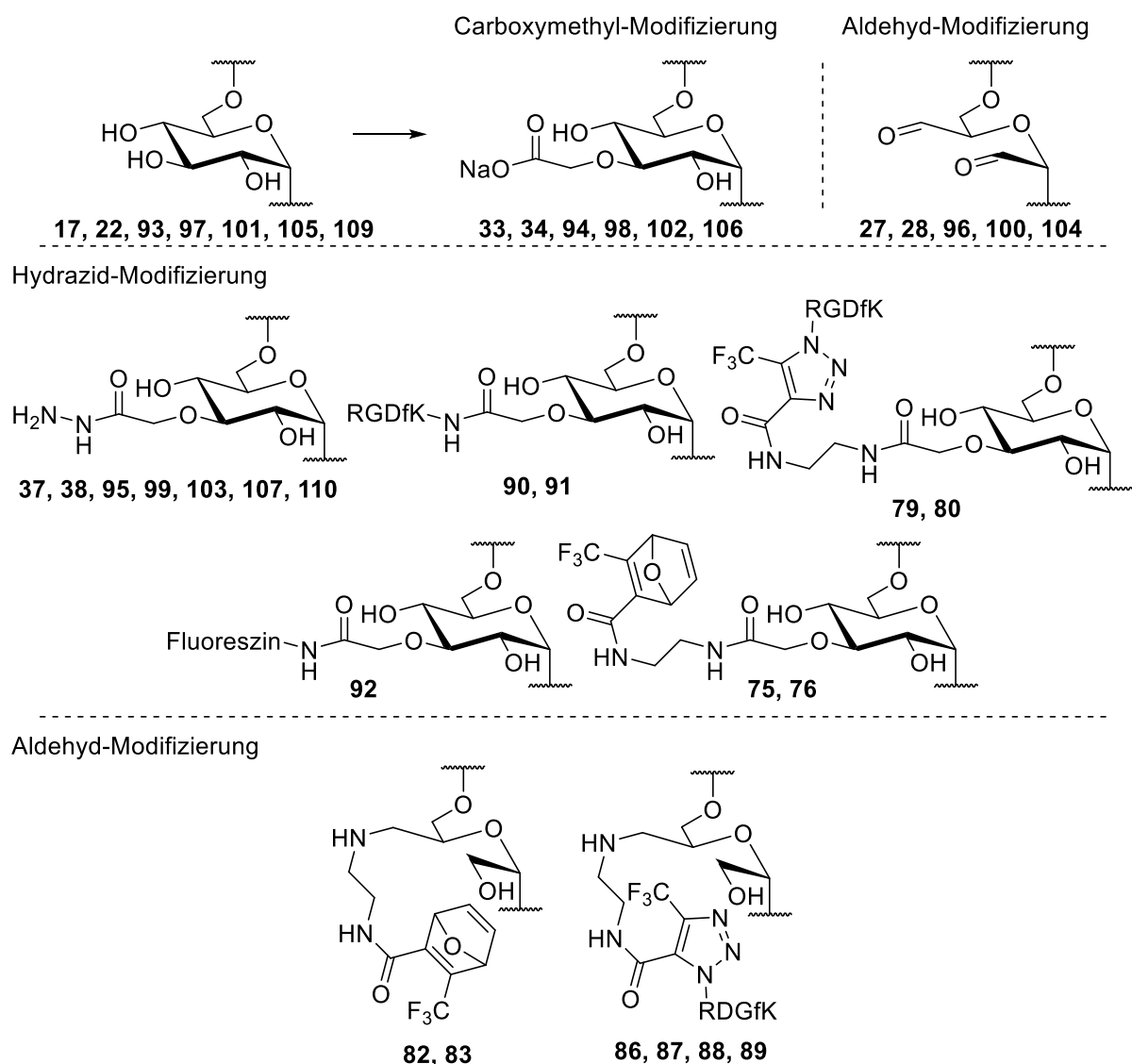
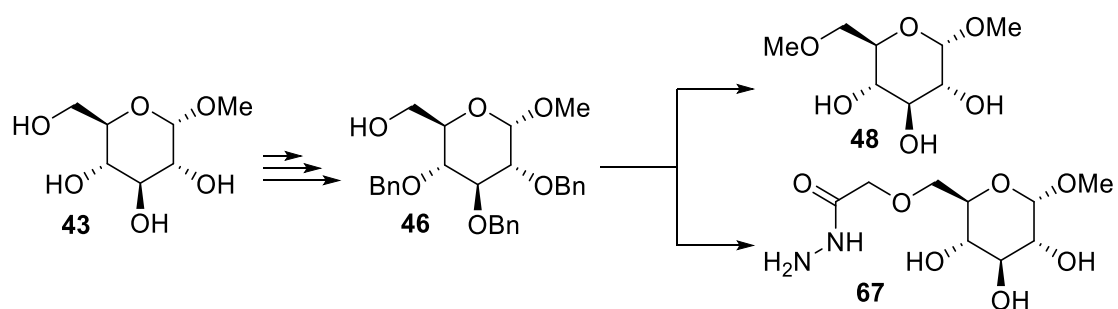


Abbildung 127: Übersicht der durchgeführten bzw. möglichen Modifizierungen an Polysacchariden wie Dextran (17), Pullulan (22), Glykogen (93), Lentinan (97), Lichenin (101), Fucoidan (105) und Chitosan (109).

Durch die Nutzung der Hydrazon-Bildung eines Aldehyd-modifizierten Polysaccharids mit einem Hydrazid-modifizierten Polysaccharid konnte ein Zugang zu neuen Hydrogelen auf

Basis von Dextran (**17**), Pullulan (**22**), Glykogen (**93**), Lentinan (**97**), Lichenin (**101**), Fucoidan (**105**) und Chitosan (**109**) geschaffen werden. Dabei konnte, ausgehend von einer Funktionalisierung der Polysaccharide mit einer Carboxymethylgruppe bzw. mit einem Aldehyd (Abbildung 127) diverse reaktive Derivate von den verschiedenen Polysacchariden erzeugt werden. Hieraus resultierte eine Vielzahl von Hydrogelen, die bezüglich ihrer Wasseraufnahmefähigkeit untersucht werden konnten. Hierbei wurde der Einfluss des Substitutionsgrads und des durchschnittlichen Molekulargewichts auf die chemische Architektur der neuartigen Polysaccharide und deren Grad der Quervernetzung und Wasseraufnahmefähigkeit untersucht. Ferner wurden Untersuchungen zur Degradierbarkeit der Hydrogele in Anwesenheit des Enzyms Dextranase durchgeführt. Hierfür dienten Fluoreszein-modifizierte Dextran-Hydrazide für die Entwicklung einer Visualisierungsstrategie. Es zeigte sich Degradierbarkeit der Hydrogele in Abhängigkeit vom Grad der Funktionalisierung. Einige Hydrogele konnten positiv auf Kompatibilität mit Fibroblasten geprüft werden. Die Einzelkomponenten und die Hydrogele zeigten dabei keine nennenswerte Cytotoxizität. Es war jedoch nicht möglich, die Bildung eines künstlichen Herzmuskelgewebes durch Kultivierung von myokardialen Stammzellen in Gegenwart der Hydrogele zu induzieren und einen ECM-Ersatz zu erzeugen. Es konnte nicht geklärt werden, was der limitierende Faktor hierfür ist. Allerdings weisen die hier geführten Untersuchungen darauf hin, dass der Einsatz von Collagen unverzichtbar für eine erfolgreiche Gewebebildung mit den ausgewählten Polysacchariden ist.



Schema 60: Darstellung von Dimethylpyranosid **48** als Referenzsubstanz für die Oxidation und Carboxymethylierung der Polysaccharide und des internen Standards **67**. Dieser sollte für den TNBS-Assay zur Bestimmung von Hydrazid-Modifizierungen an Polysacchariden genutzt werden.

Neben der Funktionalisierung der genannten Polysaccharide konnte ein monosaccharidisches Modell (**48**) dargestellt werden (Schema 60). Es diente dazu, die Reaktionsbedingungen der Oxidation und der Carboxymethylierung der Polysaccharide auf eine niedermolekulare Ebene zu übertragen. Vergleiche von ^1H NMR- und ^{13}C NMR-

Spektroskopie bestätigten die Produkte auf der Ebene der Polysaccharide. Über eine Abweichung der Synthese von **46** konnte ebenfalls die Darstellung eines geeigneten Standards für den TNBS-Assay zur Bestimmung von Hydrazid-funktionalisierten Polysacchariden vorbereitet werden (Schema 60).

6.1.2 AUSBLICK

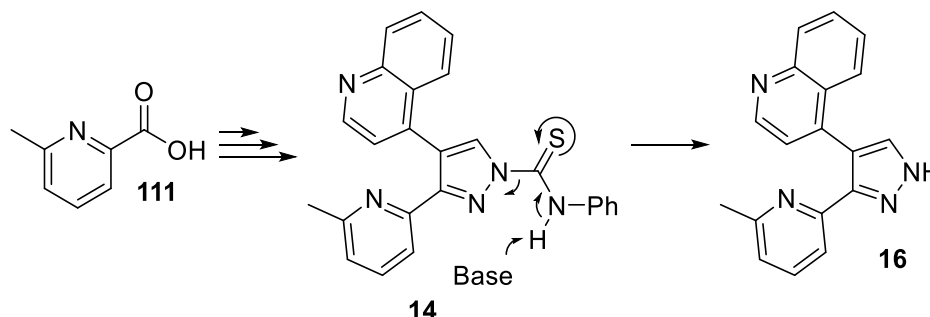
Da sich die erzeugte Bibliothek von Hydrogelen auf Polysaccharidbasis für die Bildung bzw. den Ersatz der natürlichen ECM zur Bildung eines Herzmuskelgewebes als ungeeignet erwiesen, bleibt der Wechsel der Zellen und damit der Art des resultierenden Gewebes zu untersuchen. Ein Wechsel zu einer Anwendung auf dem Gebiet des Gewebe von Dermis bzw. Epidermis^[231] könnte aufgrund der bereits gezeigten Affinität der hier untersuchten Hydrogele zu Collagen zu der erfolgreichen Bildung einer ECM führen. Weiterhin könnten Untersuchungen mit verschiedenen stark funktionalisierten Polysacchariden unter Verwendung von RGDfK durchgeführt werden. Die vorgestellten Experimente offenbarten zwar nur eine minimale Formänderung des Hydrogels im Zellexperiment, induziert durch den Adhäsionsfaktor RGDfK, jedoch sollten Untersuchungen mit höherer Beladung durchgeführt werden. Da bei den Cytotoxizitätstests Fibroblasten und nicht myokardiale Stammzellen untersucht wurden, könnte eine Änderung der Vernetzungsvariante in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen werden. Diese strukturelle Veränderung könnte ebenfalls zu einer besseren Zellerkennung führen. Dabei können z. B. Vernetzungsvarianten eingesetzt werden, die in Kapitel 2.3 beschrieben wurden.

6.2 STUDIEN ZUR DARSTELLUNG NEUER KINASEINHIBITOREN

6.2.1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese des bekannten Kinaseinhibitors A 83-01 (**14**) lieferte das überraschende Ergebnis, dass dieser chemisch nicht stabil ist. Diese Beobachtung eröffnete prinzipielle Untersuchungen über den kommerziell erhältlichen TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitor A 83-01 (**14**) und dem ebenfalls kommerziell erhältlichen Inhibitor A 77-01 (**16**). Dieser stellte sich als das Zersetzungsprodukt von **14** heraus. Der Mechanismus der Zersetzung und die Bildung

von **14** konnte in der vorgelegten Arbeit größtenteils aufgeklärt werden (Schema 61). Eine Base, selbst DMSO, ermöglicht einen Protonentransfer, der zum Zerfall des Zielmoleküls führt.



Schema 61: Zersetzung des A 83-01 (**14**) zu A 77-01 (**16**) in Lösung und in Anwesenheit einer Base.

Ein Wechsel von der Thioharnstoff- zur Harnstoffgruppe führte nur bedingt zu einer Erhöhung der Stabilität der dargestellten Derivate. Es wurde ferner gefunden, dass ein aliphatisches Verbindungselement (**126**, **127**) zwischen dem aromatischen Substituenten und der Harnstoffeinheit zu einer deutlich langsameren Zersetzung führt (Abbildung 128). Auch der monosubstituierte Harnstoff **128** zeigte nur einen sehr langsamen Zerfall im Vergleich zu den disubstituierten Derivaten (Kapitel 5.1.1).

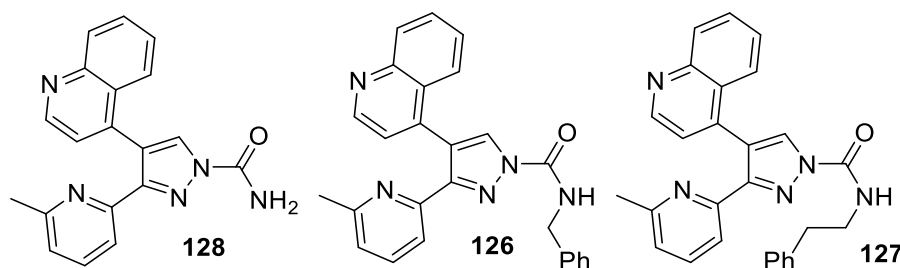
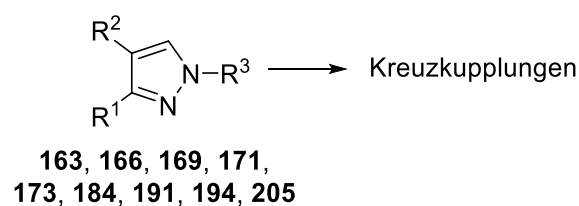


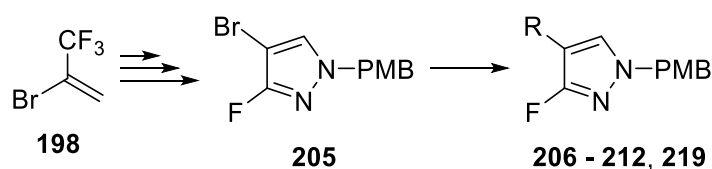
Abbildung 128: Auflistung der Derivate mit erhöhter chemischer Stabilität

Mehrere Derivate wurden bezüglich ihrer Fähigkeit zur Inaktivierung von acht verschiedenen Kinasen herangezogen. Diese Kinase-Profilung-Studie zeigte, dass prinzipiell alle untersuchten Substanzen Inhibitoren für verschiedene Kinasen sind. Berechnungen der Wechselwirkung ausgewählter Derivate mit der aktiven und inaktiven Konformation der Kinasen ALK2 und ALK4 konnten keine Erklärung für diese Aktivitäten liefern. Ein *in vitro* Experiment zur Expression des Transkriptionsfaktors MIXL1 zeigte zusätzlich, dass die Verbindungen A 83-01 (**14**) und A 77-01 (**16**) ein ähnliches Aktivitätsprofil aufweisen.



Schema 62: Verschiedene Ansätze zum divergenten Aufbau einer Wirkstoffbibliothek aus Derivaten des A 83-01 (**14**).

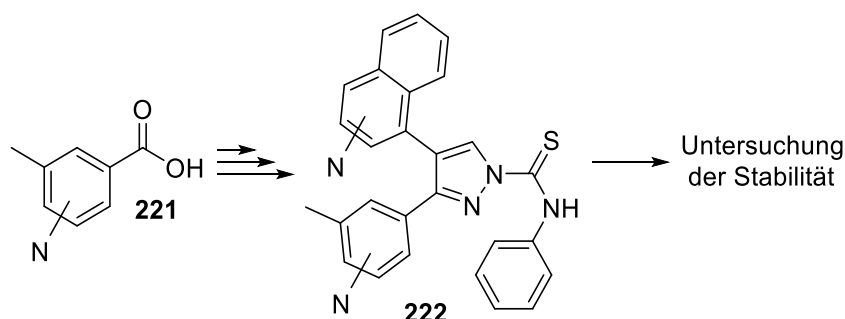
Weitere Thioharnstoff- bzw. Harnstoffderivate, die über einen flexibleren, divergenten Syntheseweg dargestellt wurden, zeigten ebenfalls die bekannten Zerfallsreaktionen. Bei diesen Synthesen erwiesen sich funktionelle Gruppen wie Brom und Trimethylsilyl in der 3-Position des Pyrazolrings als zu reaktiv und resultierten in zusätzlicher chemischer Labilität. Dennoch konnte über eine siebenstufige Synthese der Vorläufer **205** generiert werden. Dieser Vorläufer (**205**) erlaubte es, verschiedene Pyrazolderivate über Kreuzkupplungsreaktionen darzustellen (Schema 63).



Schema 63: Synthese von **205** und davon abgeleitete dargestellte Pyrazolderivate über SUZUKI-Kreuzkupplungsreaktionen.

6.2.2 AUSBLICK

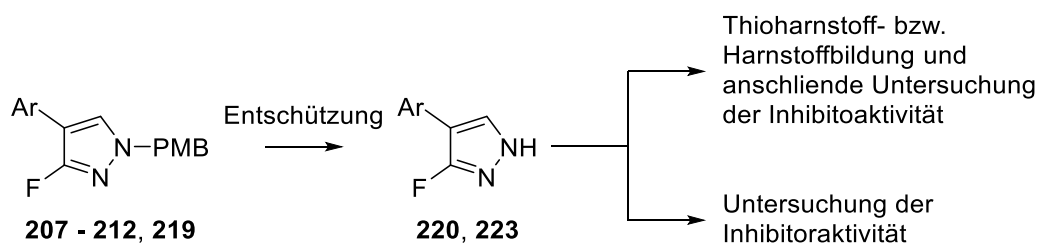
Die lineare Synthese des Kinaseinhibitors A 83-01 (**14**) und seiner Derivate sollte ferner bezüglich der Einbringung verschiedener aromatischer Reste in der 3- und 4-Position untersucht werden.



Schema 64: Mögliche Variationen der linearen Synthese zu Derivaten von **14**.

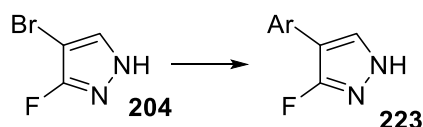
Hierfür könnten verschiedene stickstoffhaltige und stickstofffreie Aromaten in die Synthese integriert werden, die es erlauben die Rolle der Position des Stickstoffs am Pyridin- und Chinolinrest in Bezug auf die Inhibitoraktivität zu prüfen. Diese Derivate können dann

außerdem auf ihre Stabilität in Abhängigkeit der Anzahl an aromatischen Stickstoffen geprüft werden.



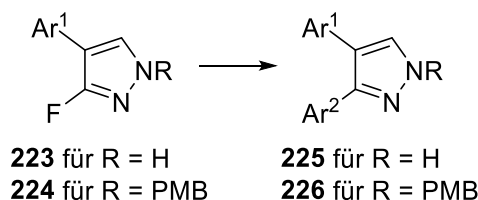
Schema 65: Weitere Vorgehensweise mit den dargestellten Derivaten aus Kapitel 5.3.4.

Für die divergente Syntheseroute sollten verschiedene Kreuzkupplungsmethoden mit **204** geprüft werden. Wie bereits gezeigt, sind mögliche Reaktionsbedingungen durch die Art der Boronsäure limitiert. Weiterhin könnten die Bedingungen der PMB-Entschützung optimiert werden, um die resultierenden freien Pyrazole oder die davon abgeleiteten Harnstoffderivate auf ihre Inhibitoraktivität zu untersuchen (Schema 65).



Schema 66: Vorschlag zur Optimierung der Synthese zu Derivaten von **223** (Schema 65).

Weiterhin kann die Syntheseroute um PMB-Schützung und Entschützung gekürzt werden und die SUZUKI-Kreuzkupplungen bereits am freien Pyrazol durchgeführt werden. Hier zeigen Arbeiten von PLETTENBURG *et al.*^[232] eine erfolgreiche Umsetzung halogenierter aromatischer Aminosäuren in einer Palladium-katalysierten Kreuzkupplung unter Zuhilfenahme eines Aminopyrimidin Liganden. Dies könnte eine Koordination von **204** am Palladium verhindern und erfolgreich zu einer Verkürzung der linearen Synthese des Kreuzkupplungsvorläufers (**204**) führen.



Schema 67: Mögliche HIYAMA-Kreuzkupplung mit Derivaten von **223** bzw. **224**.

Weiterhin eröffnet das eingebrachte Fluoratom die Möglichkeit der Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungsreaktion aromatischer Reste. Die Gruppe von OGOSHI *et al.*^[233] zeigte, dass die Aktivierung von Arylfluoriden durch den Katalysator $[\text{Ni}_2(\text{Pr}_2\text{Im})_4(\text{cod})]$ und

die Verwendung eines Aryltrimethoxysilans als Kupplungspartner im Sinne einer HIYAMA-Kreuzkupplungsreaktion gelingt. Diese Methode könnte auf das freie Pyrazol **223** bzw. das PMB-geschützte Pyrazol **224** übertragen werden und würde somit neue Optionen zur Synthese von Pyrazolderivaten führen (Schema 67).

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN CHEMISCH SYNTHETISCHEN ARBEITEN

Reaktionen: Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in im Vakuum ausgeheizten Glasgefäßen in einer sauerstofffreien, trockenen Inertgasatmosphäre (Stickstoff) durchgeführt. Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 Å von Acros durchgeführt. Qualitative Dünnschichtchromatographie erfolgte mittels Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck oder mittels beschichteten Aluminiumfolien Alugram® Xtra SIL G/UV254 der Firma Macherey&Nagel. Der Nachweis erfolgte unter einer UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder mit Tauchreagenzien (DNPH-, Bromkresolgrün-, Anisaldehyd-, Vanillin-, Kieselgel/Iod- oder Kaliumpermanganat-Tauchreagenz). Alle Reagenzien deren Herstellung nicht beschrieben ist, wurden von den Firmen ABCR, Acros, Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, Solvay, Bayer, Fluorochem oder TCI käuflich erworben.

Polysaccharide: Die verwendeten Polysaccharide wurden aus folgenden Quellen bezogen: Alle Dextrane mit unterschiedlichen durchschnittlichen Molekulargewichten wurde von Alfa Aesar, Pullulan mit einem ungefähren durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 kDa von TCI, Glykogen, Chitosan und Hyaluronsäure mit einem ungefähren durchschnittlich Molekulargewicht von 1000 kDa von Sigma Aldrich und die Polysaccharide Lichenin und Lentinan wurden von Carbosynth erworben.

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden entweder wie folgt getrocknet und unter einer Inertgasatmosphäre (Stickstoff) aufbewahrt oder dem Lösungssystem SPS der Firma MBraun entnommen, oder von der Firma Aldrich käuflich erworben. Tetrahydrofuran wurde über Natrium mit Benzophenon als Indikator unter Rückfluss erhitzt und dann destilliert. Zum vollständigen Entgasen der Lösungsmittel wurde entweder die *freeze-pump-thaw* Technik verwendet, oder über 1 h Stickstoff eingeleitet.

Kernresonanzspektren: Die Messungen der Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten DPX 200, DPX 400, AVANCE-400 und DRX-500 der Firma Bruker aufgenommen. Die ¹³C-NMR-Spektren wurden ¹H-breitbandentkoppelt mit dem Gerät DPX 400 der Firma Bruker durchgeführt. Alle Messungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, in deuteriertem Chloroform aufgenommen. ¹H NMR-Spektren und ¹³C NMR-Spektren wurden auf das

Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels (für CHCl_3 : 7.26 ppm und 77.16 ppm) kalibriert. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm und Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der Kopplungskonstanten, sowie COSY-, HSQC und HMBC-Spektren. Für die Beschreibung der Multiplizitäten der ^1H NMR-Spektren und ^{13}C NMR-Spektren wurden die Abkürzungen s (Singulett), br s (breites Singulett), d (Duplett), dd (doppeltes Dublett), ddd (doppeltes Dublett von Dubletts), ddt (doppeltes Dublett von Tripletts), t (Triplett), q (Quartett), dq (Dublett von Quartetts) und m (Multiplett) verwendet.

Massenspektrometrie: Die hochaufgelösten Massenspektren wurden nach dem Elektrospray-Verfahren (ESI) an einem Micromass LCT mit Lock-Spray-Einheit der Firma Waters aufgenommen. Die Injizierung der in Methanol, Wasser oder Acetonitril gelösten Proben erfolgte über einen Loop in einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Alliance 2695). Alternativ wurde mit einem Micromass Q-TOF in Verbindung mit einer Waters Aquity UPLC-Anlage gemessen.

Rheologie: Die rheologischen Untersuchungen wurden an dem Rheometer MCR302 von Anton Paar durchgeführt. Die standardisierten Messbedingungen waren wie folgt: Spaltabstand = 0.5 mm, Normalkraft = 0.1 N, Amplitude = 0.1 %, Frequenz = 1 Hz und Temperatur = 25 °C.

Titration: Die Titrations der Polysaccharide wurden mit dem automatischen Titrator T50 von Mettler Toledo durchgeführt.

Gefriertrocknung: Die Lyophilisation der wässrigen Polysaccharidlösungen wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Firma Christ durchgeführt. Die Proben wurden vorher mit flüssigem Stickstoff der Firma Linde gefroren.

Dialyse: Die Dialyse der wässrigen Reaktionslösungen wurde mittels Dialysierschläuche Membra-Cel™ mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa durchgeführt. Das Gefäß in dem die Dialyse stattgefunden hat war ein Griffinbecher (5000 mL) der Firma Vitlab bezogen von CarlRoth®.

Schmelzpunkte: Die gemessenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Messung erfolgte mit dem Gerät Optimelt der Firma SRS (Stanford Research System, Sunnyvale, USA).

Gaschromatographische Massenanalyse: GC-MS-Spektren wurden auf den Geräten GC-17 und QP-500 der Firma Shimadzu Europa GmbH (Duisburg) mit einer Optima-5-MS-Kapillarsäule (0.25 mm, 30 m, 0.32 mm) der Firma Macherey&Nagel (Düren) gemessen.

Pufferlösungen: Für den verwendeten Phosphatpuffer (pH = 7) wurde KH_2PO_4 (17.7 g, 0.13 mol) und Na_2HPO_4 (28.9 g, 0.24 mol) in deion. H_2O (1000 mL) gelöst und vor jeder Verwendung dieses Konzentrat mit deion. H_2O (10:1) verdünnt. Für den verwendeten Citratpuffer (pH = 5.6) wurde eine vorgefertigte Lösung von Zitronensäure Monohydrat (0.1 M, Lösung A) mit einer vorgefertigten Lösung von Trinatriumcitrat Dihydrat (0.1 M, Lösung B) in einem Verhältnis von 21:79 (Lösung A:Lösung B) vermischt. Für den verwendeten TrisHCl-Puffer (pH = 7.4) wurde nach einem Protokoll von Promega eine Lösung aus TrisHCl (200 mM), MgCl_2 (100 mM) und BSA (0.5 mg/mL) in deion. H_2O angesetzt.

7.2. DARSTELLUNG VON MODIFIZIERTEN POLYSACCHARIDEN

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von oxidiertem Dextran (27, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa), oxidiertem Pullulan (28), oxidiertem Glykogen (96), oxidiertem Lentinan (100) und oxidiertem Lichenin (104)

Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (1.0 g, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (100 mL) wurde unter Lichtausschluss NaIO₄ (1.00 g, 4.70 mmol, 0.8 Äq.) gegeben und das Gemisch für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und drei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das oxidierte Polysaccharid (900 mg) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Bestimmung des Substitutionsgrades von oxidiertem Dextran (27, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und oxidiertem Pullulan (28)

Um den Substitutionsgrad von oxidierten Polysacchariden (27 und 28) zu bestimmen wurde das lyophilisierte Polysaccharid (100 mg) in deion. H₂O (75 mL) und Hydroxylaminhydrochlorid-Lsg. (0.25 M, 25 mL) gelöst und für 12 h bei RT geschüttelt, um einen vollständigen Umsatz der Aldehyde zum Oxim zu garantieren. Anschließend wurden drei Chargen (je 25 mL) gegen NaOH-Lsg. (0.2 M) titriert, um den Substitutionsgrad zu ermitteln.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von carboxymethyliertem Dextran (33, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa), carboxymethyliertem Pullulan (34), carboxymethyliertem Glykogen (94), carboxymethyliertem Lentinan (98), carboxymethyliertem Lichenin (102) und carboxymethyliertem Fucoïdan (106)

Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharid (10 g, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (150 mL) wurden Chloressigsäure (20 g, 3.4 Äq.) und NaOH-Lsg. (8.0 M, 50 mL) gegeben und das Gemisch für 1.5 h bei 62 °C gerührt. Nach Neutralisation mit wässriger HCl (6.0 M) wurde die Lösung in MeOH getropft, das ausgefallene Polysaccharid filtriert und mit MeOH gewaschen. Nachdem

das frisch gefällte Polysaccharid im Trockenofen (15 mbar, 40 °C) getrocknet wurde, konnte das jeweilige carboxymethylierte Polysaccharid (12.5 g) als farbloser Feststoff erhalten werden.

Um einen höheren Substitutionsgrad zu erhalten, wurde das einfach carboxymethylierte Polysaccharid bis zu sechsmal den oben genannten Bedingungen unterzogen.

Bestimmung des Substitutionsgrades von carboxymethyliertem Dextran (**33**, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und carboxymethyliertem Pullulan (**34**)

Um den Substitutionsgrad der carboxymethylierten Polysaccharide (**33** und **34**) zu bestimmen, wurde das gefällte und getrocknete Polysaccharid (1.0 g) über Nacht in MeOH/Salpetersäure (10:1, 14 mL) gerührt, um die protonierte Form der Carbonsäuren zu erhalten. Der gummiartige Feststoff wurde anschließend filtriert, mit Ethanol gewaschen und im Trockenofen (15 mbar, 40 °C) getrocknet. Der erhaltene Feststoff (600 mg) wurde in deion. H₂O (60 mL) suspendiert und durch Zugabe von NaOH-Lsg. (0.2 M, 18 mL) gelöst. Anschließend wurden drei Chargen (je 15 mL) gegen wässrige HCl (0.05 M) titriert um den Substitutionsgrad zu ermitteln.

Darstellung von Carboxymethyliertem Chitosan (**110**)

Zu einer Suspension von Chitosan (1.0 g) in H₂O/*i*-PrOH (4:1, 10.0 mL) wurde bei 50 °C NaOH (1.35 g) gegeben und das Gemisch für 1 h gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Chloressigsäure (1.5 g) in *i*-PrOH (2.0 mL) hinzugegeben und die Suspension für 4 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Ethanol (20 mL), Filtration und mehrmaligem Waschen mit Ethanol wurde das Produkt **110** (1.0 g) als farbloser Feststoff erhalten.

Um die Wasserlöslichkeit des carboxymethylierten Chitosan zu erhöhen, wurde diese Reaktion mit dem gebildeten Produkt wiederholt.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Hydrazid-modifiziertem Dextran (35, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa), Hydrazid-modifiziertem Pullulan (36), Hydrazid-modifiziertem Glykogen (95), Hydrazid-modifiziertem Lentinan (99), Hydrazid-modifiziertem Lichenin (103), Hydrazid-modifiziertem Fucoidan (107), Hydrazid-modifiziertem Chitosan (110)

Zu einer Lösung des carboxymethylierten Polysaccharids (200 mg, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (100 mL) wurden nacheinander EDC (348 mg, 2.2 Äq.), HOBt (250 mg, 2.2 Äq.), DIPEA (0.16 mL, 1.1 Äq.) und Hydrazin (1.0 M in THF, 8.0 mL, 10 Äq.) gegeben und das Gemisch für vier Tage bei RT gerührt. Die gelbliche Lösung wurde anschließend zwei Tage gegen eine NaCl-Lsg. (1 d gegen 20 g/L, 1 d gegen 10 g/L) und zwei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das jeweilige Hydrazid-modifizierte Polysaccharid (190 mg) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Bestimmung des Substitutionsgrades von Hydrazid-modifiziertem Dextran (35, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und Hydrazid-modifiziertem Pullulan (36)

Um den Substitutionsgrad der Hydrazid-modifizierten Polysaccharide (35 und 36) zu bestimmen, wurde eine Lösung des lyophilisierten Polysaccharids (0.2 mg/mL, 0.25 mL) mit einer NaHCO₃-Lsg. (0.1 M, 0.25 mL) und einer TNBS-Lsg (0.01 % in H₂O, 0.25 mL) versetzt und für 2 h bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde eine SDS-Lsg. (10 % in H₂O, 0.25 mL) und eine wässrige HCl (1.0 M, 0.125 mL) hinzugegeben und das gebildete Chromophor im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 325 nm vermessen. Über eine zuvor erstellte Kalibriergrade mit Glycin anstatt des Hydrazid-modifizierten Polysaccharids wurde der Substitutionsgrad ermittelt.

Allgemeine Vorschrift zur Bildung von Hydrogelen

Eine Lösung der Aldehyd-Komponente (20 mg/mL) wurde mit dem äquivalenten Volumen einer Lösung der Hydrazid-Komponente (20 mg/mL) bei RT vermennt. Nach wenigen Sekunden trat die Gelbildung ein.

Bestimmung der Cytotoxizität von Polysacchariden und Hydrogelen (durchgeführt von Julio-Cesar Rios-Camacho)

Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde ein "Pierce LDH Cytotoxicity assay kit" (Thermo Scientific® Rockford USA) verwendet. Wie in der Vorschrift des Kits verzeichnet wurden 6×10^3 Fibroblasten aus der menschliche Vorhaut pro Schacht in einer Mikrotiterplatte platziert. Die Zellen wurden über Nacht im Kulturmedium (inklusive Pferdeserum und Insulin) gelagert. Anschließend wurden die Polysaccharide in PBS suspendiert, filtriert und der pH-Wert, falls nötig, auf pH = 7.5 gebracht. Diese Lösungen (2wt%, 100 μ L) wurden in die vorbereitete Mikrotiterplatte gegeben und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Als Nullwert wurde eine PBS-Pufferlösung (10 μ L) und für den Maximalwert ein Lysat-Puffer (10x, 100 μ L) verwendet. Ein bekanntes, nicht toxisches System (Ratten Collagen Typ I und Matrigel®) wurde ebenfalls verwendet, um den Nullwert zu kontrollieren und eine interne Referenz zu generieren. Nach der Inkubation wurde Kulturmedium (50 μ L) und je eine Charge (50 μ L) in eine neue Mikrotiterplatte (flat bottom Nunc® (Sigma Aldrich)) überführt und diese für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Abbruchlösung (50 μ L) hinzugegeben und die Absorption der einzelnen Schächte bei 490 nm und 680 nm vermessen.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von oxidiertem Dextran CM 1 (68, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und oxidiertem Pullulan CM 1 (69)

Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (100 mg, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (10 mL) wurde unter Lichtausschluss NaIO₄ (100 mg, 0.47 mmol, 0.8 Äq.) gegeben und das Gemisch für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und drei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das oxidierte und carboxymethylierte Polysaccharid (90 mg) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Linker-modifiziertem Dextran CM (75, 150 kDa, 250 kDa und 500 kDa) und Linker-modifiziertem Pullulan CM (76)

Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (100 mg) in deion. H₂O (10 mL) wurden nacheinander EDC (8.2 mg), HOBt (6.00 mg), DIPEA (0.02 mL) und der Linker **71** (5.3 mg)

gegeben und das Gemisch für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung zwei Tage gegen eine NaCl-Lsg. (1 d gegen 20 g/L, 1 d gegen 10 g/L) und zwei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das Linker-modifizierte und carboxymethylierte Polysaccharid (70.0 mg) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Kupfer-freien „Click“-Reaktion an Linker-modifizierten Polysacchariden mit dem RGDfK-Azid (74)

Zu einer Lösung des Linker-modifizierten Polysaccharids **75** bzw. **76** (60 mg) in deion. H₂O (15 mL) wurde das RGDfK-Azid (3.0 mg) gegeben und die Lösung für vier Tage bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung für drei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurde das jeweilige modifizierte Polysaccharid (58 mg) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur direkten RGDfK-Modifizierung und Hydrazid-Generierung von Dextran CM (90, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa, 500 kDa) und Pullulan CM (91)

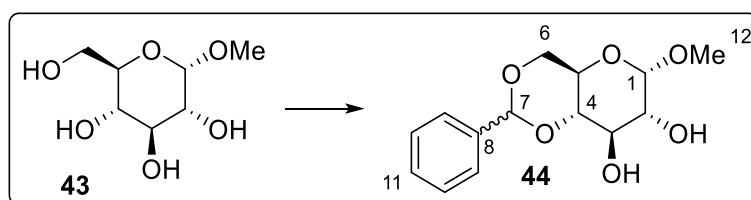
Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (100 mg) in deion. H₂O (50 mL) wurden nacheinander EDC (8.2 mg), HOBt (6.0 mg), DIPEA (0.02 mL) und das RGDfK (**73**, 1.0 mg) gegeben und das Gemisch für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurden nacheinander EDC (348 mg, 2.2 Äq.), HOBt (250 mg, 2.2 Äq.), DIPEA (0.16 mL, 1.1 Äq.) und Hydrazin (1.0 M in THF, 8.0 mL, 10 Äq.) gegeben und das Gemisch für vier Tage bei RT gerührt. Die gelbliche Lösung wurde anschließend zwei Tage gegen eine NaCl-Lsg. (1 d gegen 20 g/L, 1 d gegen 10 g/L) und zwei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das jeweilige Hydrazid-RGDfK-modifizierte Polysaccharid (190 mg) als farbloser watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Fluoreszeinmodifizierung und Hydrazidgenerierung am Dextran CM (92, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa, 500 kDa)

Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (100 mg) in deion. H₂O (50 mL) wurden nacheinander EDC (8.2 mg), HOBt (6.0 mg), DIPEA (0.02 mL) und Fluoreszinamin (3.0 mg) gegeben und das Gemisch für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurden nacheinander EDC (348 mg, 2.2 Äq.), HOBt (250 mg, 2.2 Äq.), DIPEA (0.16 mL, 1.1 Äq.) und Hydrazin (1.0 M in THF, 8.0 mL, 10 Äq.) gegeben und das Gemisch für vier Tage bei RT gerührt. Die gelbliche Lösung wurde anschließend zwei Tage gegen eine NaCl-Lsg. (1 d gegen 20 g/L, 1 d gegen 10 g/L) und zwei Tage gegen deion. H₂O dialysiert. Nach der Gefriertrocknung wurde das Fluoreszein-modifizierte Polysaccharid **92** (190 mg) als gelblicher, watteartiger Feststoff erhalten.

7.3 DARSTELLUNG UND UNTERSUCHUNG EINES MONOMER-MODELLS VON POLYSACCHARIDEN

Methyl 4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**44**)

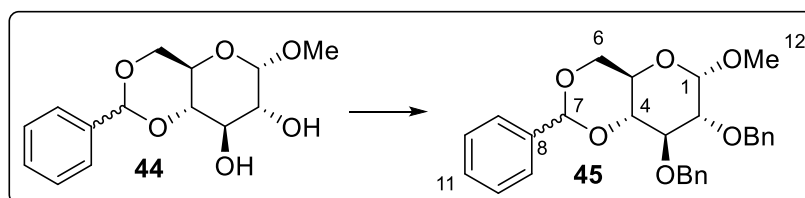


Eine Suspension aus Methyl α -D-glucopyranosid (12.2 g, 62.9 mmol, 1.0 Äq.) in MeCN (250 mL) wurde mit Benzaldehyddimethylacetal (16.9 mL, 113 mmol, 1.8 Äq.) und Camphersulfonsäure (1.46 g, 6.29 mmol, 0.1 Äq.) versetzt und das Reaktionsgemisch bei 95 °C gerührt bis eine homogene Lösung entstand. Die Reaktionslösung wurde auf RT erwärmt und Triethylamin (1.75 mL, 12.6 mmol, 0.2 Äq.) hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend mit EtOAc (200 mL) versetzt, die organische Phase mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Umkristallisation (CH₂Cl₂/PE 1:1) wurde das Produkt **44** (10.7 g, 37.8 mmol, 60 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52-7.47 (m, 2H, H-9), 7.39-7.34 (m, 3H, H-10/11), 5.52 (s, 1H, 7), 4.78 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-1), 4.29 (dd, $J = 9.6, 4.2$ Hz, 1H, H-6a), 3.92 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 3.84-3.77 (m, 1H, H-5), 3.75 (dd, $J = 19.8, 10.1$ Hz, 1H, H-6b), 3.66-3.58 (m, 1H, H-2), 3.48 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-4), 3.45 (s, 3H, 12), 2.91 (s, 1H, H-OH), 2.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-OH) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 137.2 (C_q -8), 129.4 (C-11), 128.5 (C-10), 126.5 (C-9), 102.1 (C-7), 99.9 (C-1), 81.1 (C-4), 73.0 (C-2), 71.8 (C-3), 69.1 (C-6), 62.5 (C-5), 55.7 (C-12) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 305.1001, gefunden bei 305.1005 m/z.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein.^[136]

Methyl 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (45)



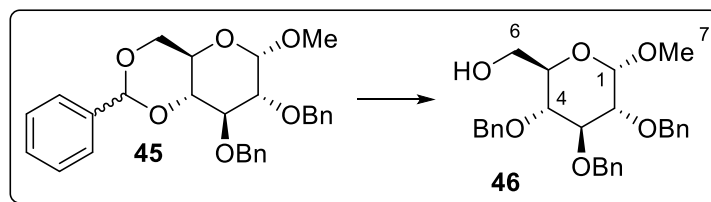
Eine Lösung von Methyl 4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (1.44 g, 5.11 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (50 mL) wurde bei 0 °C mit NaH (644 mg, 21.5 mmol, 4.2 Äq.) versetzt, für 30 min bei RT und weitere 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Benzylbromid (2.62 g, 15.3 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 17 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Methanol (1.10 mL) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Umkristallisation (Ethanol) wurde das Produkt **45** (1.85 g, 4.00 mmol, 78 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87-7.80 (m, 2H, H-Ar), 7.77-7.61 (m, 13H, H-Ar), 5.90 (s, 1H, H-7), 5.26 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H- CH_2Ph), 5.20 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, H- CH_2Ph), 5.18 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H- CH_2Ph), 5.05 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, H- CH_2Ph), 4.94 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.61 (dd, $J = 10.1, 4.7$ Hz, 1H, H-6a), 4.39 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 4.17 (td, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 1H, H-5), 4.05 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-6b), 3.95 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-4), 3.90 (dd, $J = 9.3, 3.8$ Hz, 1H, H-2), 3.75 (s, 1H, H-12) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 138.9 (C_q -Ar), 138.3 (C_q -Ar), 137.5 (C_q -Ar), 129.0 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 126.2 (C-Ar), 101.4 (C-7), 99.4 (C-1), 82.3 (C-4), 79.3 (C-2), 78.7 (C-3), 75.5 (C-

CH₂Ph), 74.0 (C-CH₂Ph), 69.2 (C-6), 62.5 (C-5), 55.5 (C-12) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₈H₃₀O₆Na ([M+Na]⁺) 485.1940, gefunden bei 485.1939 m/z.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein.^[137]

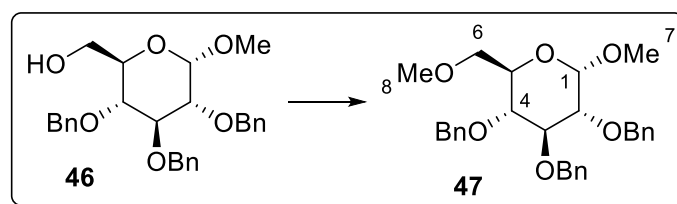
Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosid (**46**)



Zu einer Lösung von Methyl 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (2.07 g, 4.47 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂/Et₂O (1:1, 100 mL) wurde LiAlH₄ (1.19 g, 31.3 mmol, 7.0 Äq.) gegeben, das Gemisch auf 50 °C erhitzt und anschließen AlCl₃ (2.68 g, 20.1 mmol, 4.5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere drei Stunden bei 50 °C gerührt und die Reaktion durch Zugabe eine Kaliumnatriumtartrat-Lsg. (100 mL) abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt **46** (1.87 g, 4.02 mol, 90 %) als farblose ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.27 (m, 15H, H-Ar), 5.00 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.89 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.84 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.81 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.67 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.65 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.57 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.01 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-3), 3.81-3.74 (m, 1H, H-6a), 3.73-3.63 (m, 2H, H-5/6b), 3.56-3.48 (m, 2H, H-2/4), 3.37 (s, 3H, H-12), 1.67-1.62 (m, 1H, H-OH) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 138.9 (C_q-Ar), 138.3 (C_q-Ar), 138.3 (C_q-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 128.0 (C-Ar), 127.8(C-Ar), 98.3 (C-1), 82.1 (C-3), 80.1 (C-4), 77.5 (C-2), 75.9 (C-CH₂Ph), 75.2 (C-CH₂Ph), 73.6 (C-CH₂Ph), 70.8 (C-6), 62.0 (C-5), 55.3 (C-12) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₈H₃₂O₆Na ([M+Na]⁺) 487.2097, gefunden bei 487.2095 m/z.

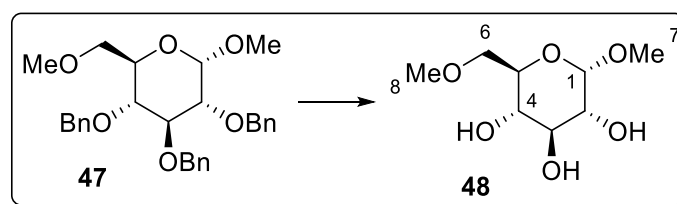
Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein.^[137]

Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (**47**)

Zu einer Lösung von Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosid (1.86 g, 4.01 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (100 mL) bei 0 °C wurde NaH (95 %, 253 mg, 10.3 mmol, 2.5 Äq.) gegeben und das Gemisch für 60 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde MeI (1.42 g, 10.3 mmol, 2.5 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für weitere 3 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung wurden Methanol (20 mL) und Wasser (100 mL) gegeben und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt **47** (1.86 g, 3.89 mmol, 97 %) als gelbliche ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.27 (m, 15H, H-Ar), 4.98 (d, J = 10.9 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.87 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.83 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.79 (d, J = 12.1 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.65 (d, J = 12.1 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 4.60 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H-1), 4.59 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-CH₂Ph), 3.98 (t, J = 9.3 Hz, 1H, H-3), 3.71 (ddd, J = 10.1, 3.3, 2.2 Hz, 1H, H-5), 3.63-3.50 (m, 4H, H-2/4/6), 3.37 (s, 3H, H-7), 3.34 (s, 3H, H-8) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 139.0 (C_q-Ar), 138.5 (C_q-Ar), 138.3 (C_q-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 128.0 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 98.5 (C-1), 82.2 (C-3), 79.9 (C-2/4), 77.9 (C-2/4), 75.9 (C-CH₂), 75.2 (C-CH₂Ph), 73.6 (C-CH₂Ph), 71.1 (C-6), 70.0 (C-5), 59.3 (C-8), 55.3 (C-7) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₉H₃₄O₆Na ([M+Na]⁺) 501.2253, gefunden bei 501.2252 m/z.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein.^[234]

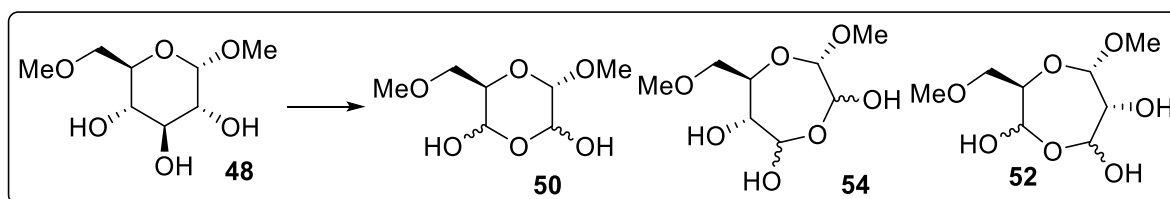
Methyl 6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (**48**)

Eine Suspension von Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (1.86 g, 3.89 mmol, 1.0 Äq.) und Palladium auf Kohle (10 wt/%, 164 mg) in MeOH (50 mL) wurde über 6 h mit Wasserstoff (1 bar) zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH 100%→99:1→9:1) wurde das Produkt **48** (485 mg, 2.33 mmol, 60 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.77 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.25 (s, 1H, H-OH), 3.84 (s, 1H, H-OH), 3.77-3.47 (m, 6H, H-2/3/4/5/6), 3.43 (s, 3H, H-7), 3.42 (s, 3H, H-8), 3.41-3.33 (m, 1H, H-OH) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 99.5 (C-1), 74.5 (C-2/3/4/5/6), 72.0 (C-2/3/4/5/6), 71.9 (C-2/3/4/5/6), 70.6 (C-2/3/4/5/6), 70.2 (C-2/3/4/5/6), 59.5 (C-8), 55.3 (C-7) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₈H₁₆O₆Na ([M+Na]⁺) 231.0845, gefunden bei 231.0840 m/z.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein.^[234]

Darstellung von (3*S*,5*R*)-3-Methoxy-5-(methoxymethyl)-1,4-dioxan-2,6-diol (**50**), (3*S*,5*R*,6*R*)-3-Methoxy-5-(methoxymethyl)-1,4-dioxepan-2,6,7-triol (**54**) und (3*R*,5*S*,6*R*)-5-Methoxy-3-(methoxymethyl)-1,4-dioxepan-2,6,7-triol (**52**)



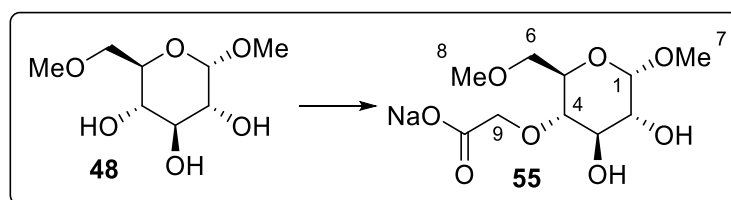
Zu einer Lösung von Methyl 6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (239 mg, 1.15 mmol, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (12 mL) wurde unter Lichtausschluss NaIO₄ (245 mg, 1.15 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und das Gemisch für 17 h bei RT gerührt. Nachdem dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt über eine präparative HPLC (MACHERY&NAGEL;

NUCLEODUR C18 Isis, 5 μm ; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 97:3 \rightarrow 85:15, 90 min) gereinigt und das Produktgemisch aus **50**, **52** und **54** (62.0 mg, 0.32 mmol, 28 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 5.80 (s, 1H), 5.68 (s, 4H), 5.62 (s, 4H), 5.51 (s, 1H), 5.16 (d, $J = 5.3$ Hz, 3H), 5.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H), 4.74 (s, 5H), 4.42 (s, 1H), 4.28 (d, $J = 0.7$ Hz, 5H), 4.03 (dd, $J = 7.9, 4.0$ Hz, 4H), 3.82-3.74 (m, 3H), 3.73-3.34 (m, 80H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ 100.9, 98.7, 97.3, 96.1, 95.0, 94.5, 93.1, 89.6, 88.0, 80.2, 79.4, 72.8, 70.9, 70.6, 70.4, 69.3, 69.0, 69.0, 58.6, 58.6, 58.5, 55.4, 55.2, 55.1 ppm; **49 Aldehyd: ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 199.0582, gefunden bei 199.0580 m/z; **50 Aldehyd-Hydrat: ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 217.0688, gefunden bei 217.0684 m/z; **51 und 53 Aldehyd: ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 229.0688, gefunden bei 229.0686 m/z; **52 und 54 Aldehyd-Hydrate: ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_7\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 247.0794, gefunden bei 247.0790 m/z.

Aufgrund der geringen Ausbeuten wurden keine $[\alpha]_D^{20}$ -Werte bestimmt.

Methyl 4-O-natriumacetyl-6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (**55**)



Zu einer Lösung von Methyl 6-O-methyl- α -D-glucopyranosid (464 mg, 2.23 mmol, 1.0 Äq.) in deion. H_2O (7.5 mL) wurde NaOH-Lsg. (8.0 M, 2.5 mL) und Chloressigsäure (1.0 g, 10.6 mmol, 4.8 Äq.) gegeben und das Gemisch für 1.5 h bei 62 $^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit HCl (6.0 M) neutralisiert und lyophilisiert. Der erhaltene farblose Feststoff wurde in mehreren Chargen mittels einer präparative HPLC (Macherey&Nagel, Nucleodur C18 Isis, 5 μm , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 97:3 \rightarrow 85:15, 90 min) gereinigt. Das gewünschte Produkt **55** (15.0 mg, 0.056 mmol, 3 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

55 ($\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$, R^2 und $\text{R}^3 = \text{H}$)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 4.75 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 4.29 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.81-3.75 (m, 2H, H-3/5), 3.69 (m, 2H, H-6), 3.54 (dd, $J = 9.8, 3.8$ Hz, 1H, H-2), 3.38 (s, 3H, H-7), 3.38 (s, 3H, H-8), 3.33 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-4) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, D_2O) δ 175.4 ($\text{C}_q\text{-CO}_2\text{H}$), 99.1 (C-1), 79.1 (C-4), 72.6 (C-3/5), 71.1 (C-2), 70.4 (C-6), 69.8 (C- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 68.9 (C-3/5), 58.3 (C-8), 55.1 (C-7) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 289.0899, gefunden bei 289.0894 m/z.

Des Weiteren konnte ein Gemisch aus **56** und **57** mittels HPLC isoliert werden. Dieses konnten jedoch nicht voneinander getrennt werden.

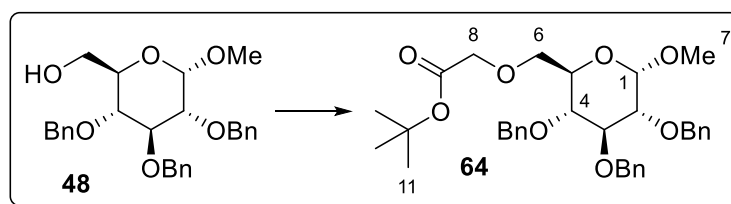
56 (R^1 und $\text{R}^3=\text{H}$; $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$) und **57** (R^1 und $\text{R}^2=\text{H}$; $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 4.99 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.77 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.38 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 4.30 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.77-3.61 (m, 8H, H-3/3'/5/5'/6/6'), 3.53 (m, 2H, H-2/2'), 3.46-3.35 (m, 13H, H-4/4'/7/8), 3.40 – 3.35 (m, 11H) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, D_2O) δ 175.8 ($\text{C}_q\text{-CO}_2\text{H}$), 174.7 ($\text{C}_q\text{-CO}_2\text{H}$), 99.1 (C-1), 97.2 (C-1'), 83.1 (C-2), 79.9 (C-3'), 72.1 (C-5), 70.8 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 70.7 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 70.0 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 69.8 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 69.5 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 69.1 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 68.0 (C-3/4/6/2'/4'/5'/6'/ $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 58.4 (C-7/8), 58.4 (C-7/8), 55.1 (C-7/8), 54.9 (C-7/8) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 289.0899, gefunden bei 289.0894 m/z.

58 (R^1 und $\text{R}^3=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$; $\text{R}^2=\text{H}$)

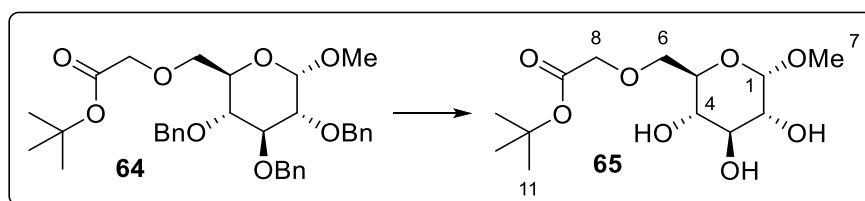
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 4.98 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-1), 4.29 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 4.27 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.91 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 3.80-3.75 (m, 1H, H-2/4/5/6), 3.71-3.68 (m, 2H, H-2/4/5/6), 3.45 (dd, $J = 9.7, 3.7$ Hz, 1H, H-2/4/5/6), 3.41-3.36 (m, 7H, H-2/4/5/6/7/8) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, D_2O) δ 173.8 ($\text{C}_q\text{-CO}_2\text{H}$), 97.1 (C-1), 79.9 (C-2), 78.9 (C-4), 71.9 (C-3/5/6), 70.3 (C-3/5/6), 68.7 (C-3/5/6), 58.3 (C-7/8), 54.9 (C-7/8) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 347.0954, gefunden bei 347.0948 m/z.

Aufgrund der geringen Ausbeute wurde kein Schmelzpunkt und kein $[\alpha]_D^{20}$ -Wert bestimmt.

Methyl 6-tert-butoxyacetyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosid (64)

Zu einer Lösung von Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosid (500 mg, 1.07 mmol, 1.0 Äq) in DMF (5 mL) wurde NaH (60 %, 86.1 mg, 2.15 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und das Gemisch für 30 min gerührt. Anschließend wurde Bromessigsäure-*tert*-butylester (0.32 mL, 2.15 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und die Lösung für weitere 3 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von CH_2Cl_2 (30 mL) wurde die organische Phase mit einer NaCl-Lsg. (100 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 10:1→2:1) wurde das Produkt **64** (530 mg, 0.92 mmol, 85 %) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41-7.27 (m, 15H, H-Ar), 5.04-4.64 (m, 6H, H- CH_2Ph), 4.62 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1), 4.00 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 3.97 (s, 2H, H-8), 3.77 (m, 2H, H-6), 3.65 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-2), 3.59-3.53 (m, 1H, H-5), 3.38 (s, 3H, H-7), 1.46 (s, 9H, H-11) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 169.4 (C_q -9), 139.0 (C_q -Ar), 138.6 (C_q -Ar), 138.3 (C_q -Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 128.2 (C-Ar), 128.0 (C-Ar), 128.0 (C-Ar), 127.8 (C-Ar), 127.6 (C-Ar), 98.3 (C-1), 82.2 (C-3), 81.6 (C_q -10), 79.8 (C-5), 75.8 (C- CH_2Ph), 75.1 (C- CH_2Ph), 73.5 (C- CH_2Ph), 70.2 (C-2), 69.9 (C-6), 69.3 (C-8), 55.3 (C-7), 28.2 (C-11) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{O}_8$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 279.2958, gefunden bei 579.2958 m/z.

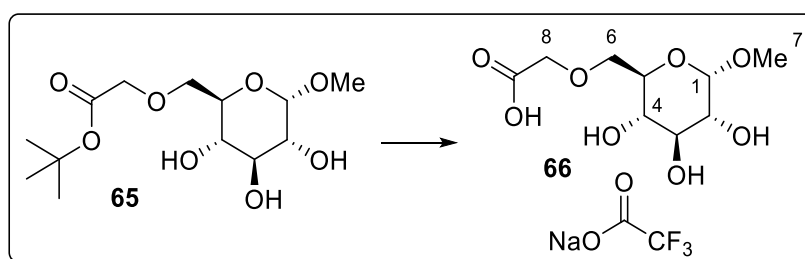
Methyl 6-tert-butoxyacetyl- α -D-glucopyranosid (65)

Zu einer Lösung von Methyl 6-tert-butoxyacetyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosid (500 mg, 0.86 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (25 mL) wurde Pd/C (300 mg) gegeben und das

Gemisch anschließend unter H₂-Atmosphäre (1 bar) für 12 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde dann über Celite® filtriert, mit MeOH (50 mL) gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt **65** (250 mg, 0.81 mmol, 94 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.76 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.09 (dd, *J* = 16.9, 1.4 Hz, 1H, H-8), 3.94 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, H-8), 3.88-3.61 (m, 9H, H-3/4/5/6/OH), 3.58 (dd, *J* = 9.3, 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.40 (s, 3H, H-7), 1.46 (s, 9H, H-11) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.8 (C-9), 99.8 (C-1), 82.5 (C_q-10), 74.0 (C-3/4/5/6), 72.3 (C-2), 70.8 (C-3/4/5/6), 70.1 (C-3/4/5/6), 70.1 (C-3/4/5/6), 68.5 (C-8), 55.5 (C-7), 28.2 (C-11) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₁₃H₂₅O₈ ([M+H]⁺) 309.1549, gefunden bei 309.1548 m/z.

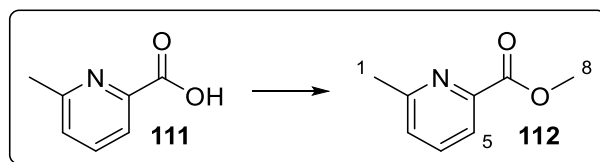
Methyl 6-acetyl-α-D-glucopyranosid (**66**)



Zu einer Lösung von Methyl 6-tert-butoxyacetyl-α-D-glucopyranosid (250 mg, 0.81 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (5.0 mL) wurde TFA (0.81 mL, 10.5 mmol, 13 Äq.) und Triethylsilan (0.32 mL, 2.03 mmol, 2.5 Äq.) gegeben und das Gemisch für 17 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, dem Rückstand deion. H₂O (10 mL) und Amberlite Na⁺ Form zugegeben und für weitere 3 h bei RT gerührt. Nach dem das Gemisch filtriert und lyophilisiert wurde, konnte das Produkt **66** (319 mg, 0.78 mmol, 96 %) als farbloser Feststoff erhalten werden. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.81 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.26 (s, 1H, H-8), 3.92-3.81 (m, 2H, H-6), 3.81-3.75 (m, 1H, H-5), 3.71-3.64 (m, 1H, H-3), 3.57 (dd, *J* = 9.8, 3.8 Hz, 1H, H-2), 3.48 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-4), 3.43 (s, 3H, H-7) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 174.3 (C_q-9), 163.0 (q, *J*_{CF} = 35 Hz, C_q-NaOTf), 116.31 (q, *J*_{CF} = 292 Hz, C_q-NaOTf) 99.3 (C-1), 72.9 (C-3), 71.1 (C-2), 70.3 (C-5), 70.0 (C-6), 69.5 (C-4), 68.0 (C-8), 55.2 (C-7) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₉H₁₆NaO₈ ([M+Na]⁺) 275.0743, gefunden bei 275.0738 m/z.

7.4 DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 5.1

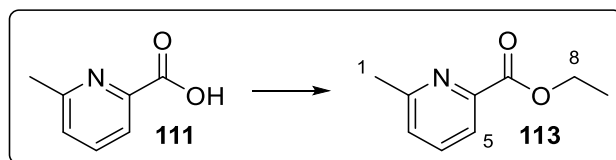
Methyl 6-methylpicolinat (112)



Zu einer Lösung von 6-Methylpicolinsäure (10.8 g, 78.8 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (250 mL) wurde H_2SO_4 (55 mL) gegeben und das Gemisch für 48 h auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit einer NaHCO_3 -Lsg. (200 mL) versetzt und die wässrige Phase mit CHCl_3 (3x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt **112** (11.8 g, 78.1 mmol, 99 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5), 7.71 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-4), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 3.98 (s, 3H, H-OMe), 2.64 (s, 3H, H- CH_3) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166.1 (C_q -7), 159.1 (C_q -2), 147.6 (C_q -6), 137.2 (C-4), 127.0 (C-3), 122.5 (C-5), 53.0 (C-OMe), 24.8 (C- CH_3) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 152.0712, gefunden bei 152.0712 m/z.

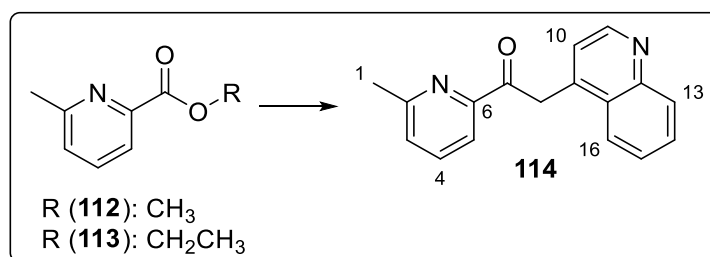
Ethyl 6-methylpicolinat (113)



Zu einer Lösung von 6-Methylpicolinsäure (10.0 g, 72.9 mmol, 1.0 Äq.) in EtOH (250 mL) wurde H_2SO_4 (55 mL) gegeben und das Gemisch für 48 h auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit einer NaHCO_3 -Lsg. (200 mL) versetzt und die wässrige Phase mit CHCl_3 (3x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt **113** (10.5 g, 63.4 mmol, 87 %) als gelbliche, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5), 7.71 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-4), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 4.47 (qd, $J = 7.1, 0.7$ Hz, 2H, H-8), 2.66 (s, 3H, H-1), 1.43 (td, $J = 7.1, 0.7$ Hz, 3H, H-9) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 165.6 (C_q -7), 159.2 (C_q -2), 148.0 (C_q -6), 137.2 (C-4), 126.8 (C-3), 122.4 (C-5), 62.0 (C-8), 24.8 (C-1), 14.5 (C-9) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 166.0868, gefunden bei 166.0864 m/z.

1-(6-Methylpyridin-2-yl)-2-(chinolin-4-yl)ethan-1-on (**114**)

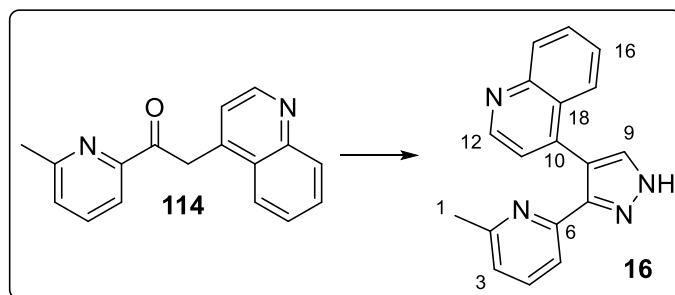


Zu einer Lösung von Lepidin (1.02 mL, 7.70 mmol, 1.0 Äq.) in THF (30 mL) wurde bei -78°C portionsweise KHMDS (0.5 M in Toluol, 17.0 mL, 1.1 Äq.) und anschließend Methyl-6-methylpicolinat (1.28 g, 8.50 mmol, 1.1 Äq.) bzw. Ethyl-6-methylpicolinat (1.40 g, 8.50 mmol, 1.1 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Et_2O (3x 60 mL) gewaschen. Der bräunliche Feststoff wurde mit einer NH_4Cl -Lsg. (60 mL) versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt **114** (0.90 g, 3.40 mmol, 45 % beim Einsatz des Methylesters **112** und 1.01 g, 3.85 mmol, 50 % beim Einsatz des Ethylesters **113**) als orangefarbene, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-11), 8.11 (dt, $J = 5.0, 2.5$ Hz, 1H, H-13), 8.07 (dd, $J = 8.5, 0.9$ Hz, 1H, H-16), 7.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5), 7.72 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-4), 7.70 (ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.4$ Hz, 1H, H-14), 7.54 (ddd, $J = 8.3, 6.9, 1.3$ Hz, 1H, H-15), 7.41 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-10), 7.37 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 5.03 (s, 2H, H-8), 2.68 (s, 3H, H-1) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 198.2 (C_q -7), 158.3 (C_q -2), 152.2 (C_q -6), 150.2 (C-11), 148.6 (C_q -12), 142.0 (C_q -9), 137.3 (C-4), 130.3 (C-13), 129.3 (C-14), 128.2 (C_q -17), 127.4 (C-15), 126.7 (C-

3), 124.5 (C-10), 123.5 (C-16), 119.7 (C-5), 41.0 (C-8), 24.6 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $C_{17}H_{15}N_2O$ ($[M+H]^+$) 263.1184, gefunden bei 263.1185 m/z.

4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (16)



Zu einer Lösung von 1-(6-Methylpyridin-2-yl)-2-(chinolin-4-yl)ethan-1-on (900 mg, 3.40 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (14 mL) wurden Essigsäure (0.71 mL, 12.4 mmol, 3.6 Äq.) und N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal (1.06 mL, 10.3 mmol, 3.0 Äq.) gegeben und das Gemisch für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Hydrazin-Hydrat (2.42 mL, 75.5 mmol, 22.0 Äq.) versetzt und für weiter 2 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit deion. H_2O (30 mL) versetzt und mit EtOAc (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit einer $NaHCO_3$ -Lsg. (50 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Umkristallisation (MeCN bei 8 °C) wurde das Produkt **16** (680 mg, 2.40 mmol, 70 %) als bräunlicher Feststoff erhalten.

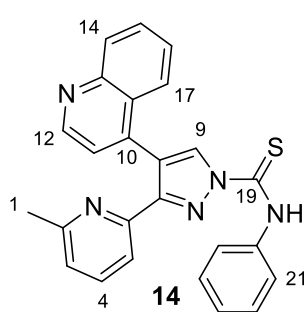
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.81 (s, 1H, H-NH), 8.97 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-12), 8.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-14), 7.81 (dd, $J = 8.4, 0.8$ Hz, 1H, H-17), 7.76-7.70 (m, 1H, H-15), 7.75 (s, 1H, H-9), 7.47-7.41 (m, 2H, H-11/16), 7.22 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-4), 6.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-3), 6.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 2.55 (s, 3H, H-1) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.7 (C_q-2), 150.3 (C-12), 148.8 (C_q-13), 146.8 (C_q-6), 141.5 (C-9), 140.7 (C_q-10), 139.7 (C_q-7), 137.1 (C-4), 130.0 (C-14), 129.8 (C-15), 127.6 (C_q-18), 127.0 (C-11), 126.1 (C-17), 122.9 (C-3), 122.8 (C-18), 118.0 (C-5), 115.4 (C_q-8), 24.6 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $C_{18}H_{15}N_4$ ($[M+H]^+$) 287.1297, gefunden bei 287.1298 m/z; **Smp.** 190.6 °C.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung verschiedener Derivate von A 83-01 (14)

Zu einer Lösung von 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 1.0 Äq.) in THF (20 mg/mL) wurde NaH (1.5 Äq.) und das korrespondierende Isothio- bzw. Isocyanat (1.2 Äq.) gegeben und das Gemisch für 12 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Phosphatpuffer (pH=7, 20 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 5:1→1:1 bzw. PE/EtOAc/NEt₃ 8:1:1→4:5:1) bzw. Kristallisation wurde das jeweilige Harnstoff- bzw. Thioharnstoffderivat erhalten.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-phenyl-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carbothioamid (14)

Für die Darstellung von **14** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und Phenylisothiocyanat (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (EtOAc, 8 °C) wurde das Produkt **14** (16.0 mg, 0.04 mmol, 11 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

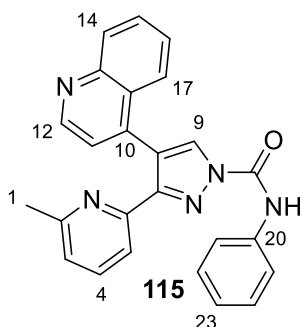


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.98 (s, 1H, H-NH), 9.00 (s, 1H, H-9), 8.93 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-14), 7.85 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3/4/11/15/16/17/21/22/23), 7.72-7.67 (m, 1H, H-3/4/11/15/16/17/21/22/23), 7.49 (m, 2H, H-3/4/11/15/16/17/21/22/23), 7.45-7.32 (m, 5H, H-3/4/11/15/16/17/21/22/23), 7.22 (m, 2H, H-3/4/11/15/16/17/21/22/23), 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 2.25 (s, 3H, H-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₅H₁₉N₅S ([M+H]⁺) 422.1439, gefunden bei 422.1439 m/z; **Smp.** 168.0 °C.

Wegen der geringen Stabilität der Verbindung **14** in Lösung konnte kein ¹³C NMR-Spektrum aufgenommen werden.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-phenyl-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**115**)

Für die Darstellung von **115** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und Isocyanatobenzol (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **115** (114 mg, 0.28 mmol, 80 %) als farbloser Feststoff erhalten.



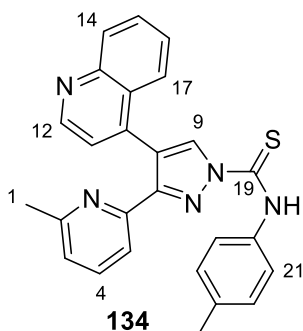
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.36 (s, 1H, NH), 8.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-17), 7.76-7.65 (m, 4H, H-14/16/21), 7.46-7.34 (m, 5H, H-4/11/15/22), 7.24-7.18 (m, 2H, H-5/23), 7.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-3), 2.27 (s, 3H, H-1) ppm;

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8 (C_q-2), 152.2 (C_q-13), 149.9 (C-12), 149.5 (C_q-6), 148.4 (C_q-19), 146.7 (C_q-10), 139.5 (C_q-7), 136.8

(C-4), 136.5 (C_q-20), 130.2 (C-9), 129.8 (C-17), 129.6 (C-5), 129.4 (C-22), 127.6 (C_q-18), 126.8 (C-15), 125.9 (C-14), 125.1 (C-23), 123.3 (C-3), 122.6 (C-11), 120.5 (C_q-8), 120.1 (C-21), 119.9 (C-16), 24.2 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₅H₁₉N₅ONa ([M+Na]⁺) 428.1487, gefunden bei 428.1489 m/z.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-N-(p-tolyl)-1H-pyrazol-1-carbothioamid (**134**)

Für die Darstellung von **134** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und *p*-Tolylisothiocyanat (63.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (EtOAc, 8 °C) wurde das Produkt **134** (31 mg, 0.07 mmol, 20 %) als gelblicher Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.86 (s, 1H, H-NH), 9.00 (s, 1H, H-9), 8.92 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-3/4/11/15/16/17/21/22), 7.68 (m, 3H, H-3/4/11/15/16/17/21/22), 7.47-7.35 (m, 4H, H-3/4/11/15/16/17/21/22), 7.31-7.25 (m, 4H, H-3/4/11/15/16/17/21/22), 7.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 2.41 (s, 3H, H-1), 2.22 (s, 3H, H-24) ppm;

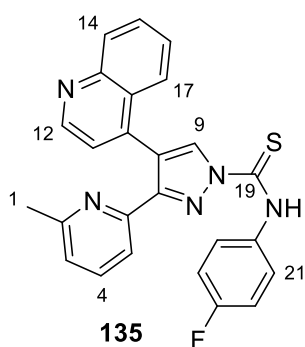
¹H NMR (400 MHz, d₁₈-HMPA) δ 12.78 (s, 1H, H-NH), 9.07 (d,

$J = 4.4$ Hz, 1H, H-12), 8.96 (s, 1H, H-9), 8.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-14), 8.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 7.88 (m, 2H, H-4/15), 7.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-21), 7.71 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-17), 7.65 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-11), 7.61-7.53 (m, 1H, H-16), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-22), 7.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-3), 2.50 (s, 3H, H-1), 1.81 (s, 3H, H-24) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $C_{26}H_{21}N_5SNa$ ($[M+Na]^+$) 458.1415, gefunden bei 458.1418 m/z; **Smp.** 159.3 °C.

Wegen der geringen Stabilität der Verbindung **134** in Lösung konnte kein ^{13}C NMR-Spektrum in $CDCl_3$ aufgenommen werden.

N-(4-Fluorophenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carbothioamid (**135**)

Für die Darstellung von **135** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 4-Fluorophenylisothiocyanat (64.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (EtOAc, 8 °C) wurde das Produkt **135** (23.0 mg, 0.05 mmol, 15 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

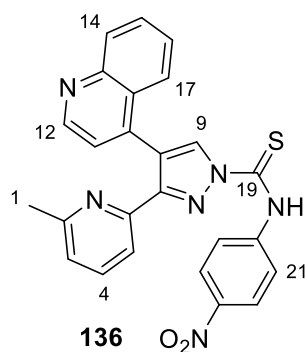


ESI-MS (HRMS) berechnet für $C_{25}H_{18}N_5SFNa$ ($[M+Na]^+$) 462.1165, gefunden bei 462.1166 m/z; **Smp.** 184.9 °C.

Wegen der geringen Stabilität der Verbindung **135** in Lösung konnten keine 1H NMR- und ^{13}C NMR-Spektren aufgenommen werden.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-(4-nitrophenyl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carbothioamid (**136**)

Für die Darstellung von **136** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 4-Nitrophenylisothiocyanat (76.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (EtOAc, 8 °C) wurde das Produkt **136** (19.0 mg, 0.04 mmol, 11 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

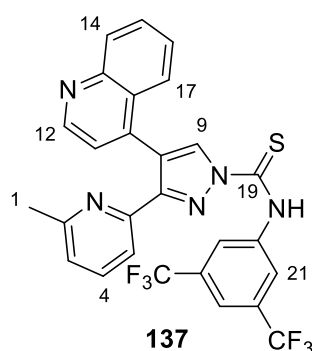


ESI-MS (HRMS) berechnet für $C_{25}H_{18}N_6O_2SNa$ ($[M+Na]^+$) 489.1110, gefunden bei 489.1112 m/z; **Smp.** 179.9 °C.

Wegen der geringen Stabilität der Verbindung **136** in Lösung konnten keine 1H NMR- und ^{13}C NMR-Spektren aufgenommen werden.

N-(3,5-bis(Trifluoromethyl)phenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carbothioamid (**137**)

Für die Darstellung von **137** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 3,5-bis(Trifluoromethyl)phenylisothiocyanat (0.08 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (EtOAc, 8 °C) wurde das Produkt **137** (16.0 mg, 0.03 mmol, 8 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

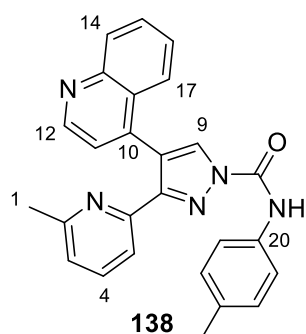


ESI-MS (HRMS) berechnet für $C_{27}H_{17}N_5F_6SNa$ ($[M+Na]^+$) 580.1007, gefunden bei 580.1007 m/z.

Wegen der geringen Stabilität der Verbindung **137** in Lösung konnten keine 1H NMR- und ^{13}C NMR-Spektren aufgenommen werden.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-N-(p-tolyl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**138**)

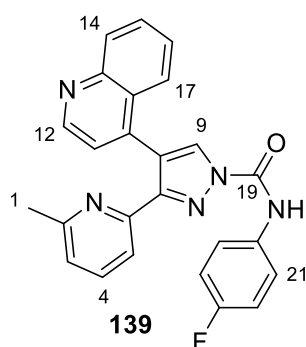
Für die Darstellung von **138** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-4-methylbenzol (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **138** (79 mg, 0.19 mmol, 54 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.31 (s, 1H, H-NH), 8.91 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-14), 7.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-17), 7.72-7.65 (m, 1H, H-15), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-21), 7.44-7.34 (m, 3H, H-4/11/16), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-22), 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 7.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 2.36 (s, 3H, H-23), 2.27 (s, 3H, H-1) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ 158.8 (C_q -2), 152.0 (C_q -19), 149.7 (C_q -13), 149.5 (C-12), 148.2 (C_q -6), 146.7 (C_q -7), 139.7 (C_q -10), 136.8 (C-4), 134.9 (C_q -20), 133.9 (C_q -23), 130.2 (C-9), 129.9 (C-22), 129.7 (C-15), 129.6 (C-14), 127.6 (C_q -18), 126.9 (C-16), 125.9 (C-17), 123.3 (C-3), 122.6 (C-11), 120.3 (C_q -8), 120.2 (C-21), 120.0 (C-5), 24.2 (C-1), 21.1 (C-24) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 442.1644, gefunden bei 442.1644 m/z; **Smp.** 162.2 °C.

N-(4-fluorphenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**139**)

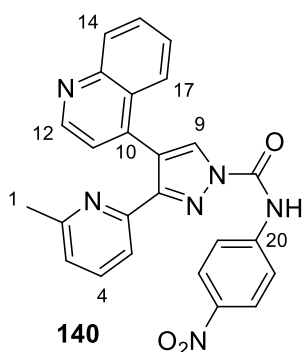
Für die Darstellung von **139** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 4-Fluorphenylisocyanat (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **139** (22.3 mg, 0.05 mmol, 16 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.34 (s, 1H, NH), 8.92 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-12), 8.55 (s, 1H, H-9), 8.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-14), 7.77-7.67 (m, 4H, H-15/17,21), 7.47-7.34 (m, 5H, H-4/11/16/22), 7.25-7.19 (m, 1H, H-5), 7.02 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 2.26 (s, 3H, H-1) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ 158.8 (C_q -2), 152.1 (C_q -19), 149.7 (C_q -6), 149.4 (C_q -13), 148.2 (C_q -7), 146.7 (C-12), 139.7 (C_q -10), 136.9 (C-4), 136.6 (C_q -20), 130.3 (C-9), 129.7 (C-15), 129.7 (C-14), 129.4 (C-21), 127.6 (C_q -18), 125.9 (C-16), 125.2 (C-17), 123.4 (C-3), 122.6 (C-11), 120.4 (C-8), 120.2 (C-22), 112.0 (C-5), 24.2 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{OF}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 424.1574, gefunden bei 424.1573 m/z; **Smp.** 178.1 °C.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-(4-nitrophenyl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (140)

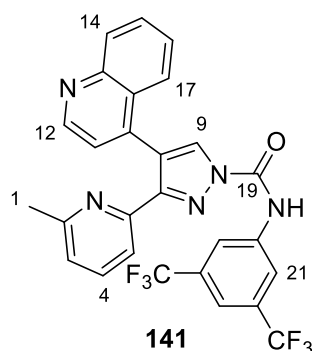
Für die Darstellung von **140** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-4-nitrobenzol (69.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (CH₂Cl₂/PE 1:10) wurde das Produkt **16** (32.0 mg, 0.07 mmol, 20 %) als gelber Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.82 (s, 1H, H-NH), 8.94 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.35-8.29 (m, 2H, H-21), 8.18 (dd, *J* = 8.8, 1.0 Hz, 1H, H-14), 7.96-7.90 (m, 2H, H-22), 7.74-7.69 (m, 2H, H-15/17), 7.46-7.39 (m, 2H, H-4/16), 7.37 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-11), 7.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 2.32 (s, 3H, H-1) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.0 (C_q-2), 152.3 (C_q-19), 149.9 (C-12), 148.8 (C_q-6), 148.4 (C_q-13), 146.5 (C_q-7), 144.3 (C_q-23), 142.6 (C_q-20), 139.0 (C_q-10), 137.2 (C-4), 130.4 (C-9/14/15/16), 129.9 (C-9/14/15/16), 129.8 (C-9/14/15/16), 127.4 (C_q-18), 127.1 (C-16), 125.7 (C-15/17), 125.4 (C-21), 123.8 (C-3), 122.6 (C-11), 121.1 (C_q-8), 120.1 (C-5), 119.5 (C-22), 24.2 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₅H₁₉N₆O₃Na ([M+Na]⁺) 451.1519, gefunden bei 451.1519 m/z; **Smp.** 212.8 °C.

N-(3,5-bis(Trifluormethyl)phenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (141)

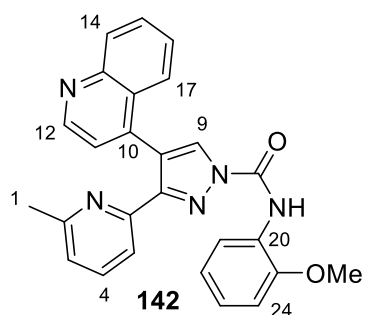
Für die Darstellung von **141** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-4-nitrobenzol (0.08 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (CH₂Cl₂/PE 1:10) wurde das Produkt **141** (32.0 mg, 0.07 mmol, 20 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.83 (s, 1H, H-NH), 8.94 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.53 (s, 1H, H-9), 8.27 (s, 2H, H-21), 8.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-14), 7.76-7.67 (m, 3H, H-15/17/23), 7.48-7.36 (m, 3H, H-4/11/16), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.07 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 2.32 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8 (C_q-2), 149.5 (C-19), 148.5 (C_q-6), 148.0 (C_q-13), 147.5 (C_q-7), 146.6 (C-12), 139.1 (C_q-10), 138.0 (C-4), 137.2 (C-20), 132.71 (C_q-22, q, *J*_{CF} = 34 Hz), 130.2 (C-9), 129.9 (C-16), 129.6 (C-15/17), 127.3 (C_q-18), 127.1 (C-16), 125.6 (C-15/17), 123.8 (C-3), 123.0 (C_q-CF₃, q, *J*_{CF} = 277 Hz), 122.5 (C-11), 120.9 (C_q-8), 120.0 (C-5), 119.6 (C_q-21, q, *J*_{CF} = 4.1 Hz), 118.2 (C_q-23, q, *J*_{CF} = 3.6 Hz) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₇H₁₇N₅O₆Na ([M+Na]⁺) 564.1235, gefunden bei 564.1235 m/z.

N-(2-Methoxyphenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid
(**142**)

Für die Darstellung von **142** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-2-methoxybenzol (0.06 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **142** (79.0 mg, 0.18 mmol, 52 %) als farbloser Feststoff erhalten.

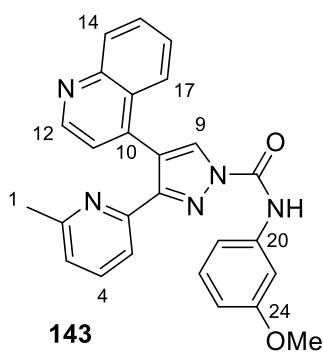


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.83 (s, 1H, H-NH), 8.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.53 (s, 1H, H-9), 8.33 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-24), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.73 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H-17), 7.67 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H-15), 7.52-7.42 (m, 2H, H-4/5), 7.39-7.33 (m, 2H, H-11/16), 7.15 (td, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, H-22), 7.06 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-23), 6.98 (m, 2H, H-3/21), 4.00 (s, 3H, H-26), 2.10 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.4 (C_q-2), 152.1 (C_q-19), 149.9 (C-12), 149.8 (C_q-6), 149.0 (C_q-25), 148.4 (C_q-13), 146.6 (C_q-10), 139.8 (C_q-7), 136.7 (C-5), 130.1 (C-9), 129.7 (C-14), 129.3 (C-15), 127.8 (C-18), 126.5 (C-4), 126.3 (C_q-20), 126.1 (C-17), 124.8 (C-22), 123.0 (C-3), 122.6 (C-11), 121.3 (C-23), 120.6 (C_q-8), 119.7 (C-16), 119.4 (C-24), 110.5 (C-21), 56.1 (C-26), 24.01 (C-1) ppm; **ESI-MS**

(HRMS) berechnet für $C_{26}H_{21}N_5O_2Na$ ($[M+Na]^+$) 458.1593, gefunden bei 458.1593 m/z ; **Smp.** 168.9 °C.

N-(3-Methoxyphenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-carboxamid
(143)

Für die Darstellung von **143** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-3-methoxybenzol (0.06 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (CH_2Cl_2/PE 1:10) wurde das Produkt **143** (15.0 mg, 0.04 mmol, 10 %) als farbloser Feststoff erhalten.



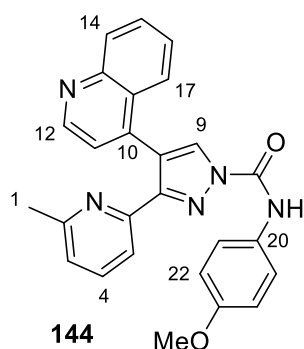
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.32 (s, 1H, H-NH), 8.92 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-14), 7.76-7.72 (m, 1H, H-17), 7.69 (ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.4$ Hz, 1H, H-15), 7.44-7.29 (m, 5H, H-4/11/16/22/25), 7.25-7.18 (m, 2H, H-5/21), 7.02 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 6.77 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.8$ Hz, 1H, H-23), 3.86 (s, 3H, H-26), 2.28 (s, 3H, H-1) ppm; **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.5 (C_q -2), 158.9 (C_q -24), 152.3 (C_q -19), 150.0 (C-12),

149.5 (C_q -6), 148.6 (C_q -13), 146.6 (C_q -10), 139.3 (C_q -7), 137.7 (C_q -25), 136.8 (C-5), 130.2 (C-9), 130.2 (C-14), 129.9 (C_q -20), 129.5 (C-15), 127.5 (C_q -18), 126.8 (C-4), 125.9 (C-17), 123.3 (C-3), 122.6 (C-11), 120.6 (C_q -8), 120.0 (C-16), 112.3 (C-21), 111.0 (C-23), 105.8 (C-22), 55.6 (C-26), 24.3 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $C_{26}H_{21}N_5O_2Na$ ($[M+Na]^+$) 458.1593, gefunden bei 458.1593 m/z; **Smp.** 166.6 °C.

N-(4-Methoxyphenyl)-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-carboxamid
(144)

Für die Darstellung von **144** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-4-methoxybenzol (0.06 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger

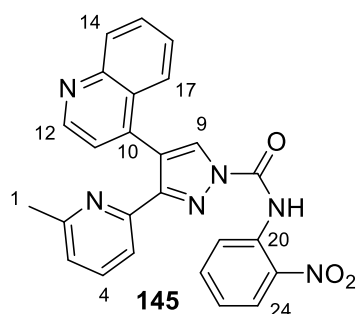
Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **144** (58.0 mg, 0.13 mmol, 38 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.21 (s, 1H, H-NH), 8.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.75 (dd, *J* = 8.4, 0.7 Hz, 1H, H-17), 7.69 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H-15), 7.63-7.56 (m, 2H, H-21), 7.39 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 3.3 Hz, 2H, H-4/16), 7.35 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-11), 7.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 6.99-6.93 (m, 2H, H-22), 3.84 (s, 3H, H-24), 2.28 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8 (C_q-2), 157.2 (C_q-23), 152.2 (C_q-19), 150.0 (C-12), 149.6 (C_q-6), 148.6 (C_q-13), 146.9 (C_q-10), 139.4 (C_q-7), 136.8 (C-5), 130.2 (C-9), 129.9 (C_q-20), 129.5 (C-14), 129.5 (C-15), 127.6 (C_q-18), 126.8 (C-4), 125.9 (C-17), 123.3 (C-3), 122.6 (C-11), 122.1 (C-21), 120.4 (C_q-8), 120.0 (C-16), 114.6 (C-22), 55.7 (C-24), 24.3 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₆H₂₁N₅O₂Na ([M+Na]⁺) 458.1593, gefunden bei 458.1593 m/z.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-(2-nitrophenyl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**145**)

Für die Darstellung von **145** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-2-nitrobenzol (69.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (CH₂Cl₂/PE 1:10) wurde das Produkt **145** (20.0 mg, 0.05 mmol, 13 %) als gelber Feststoff erhalten.

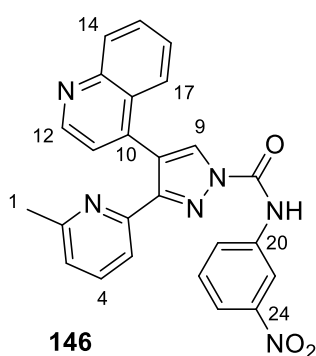


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12.51 (s, 1H, H-NH), 8.93 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.85 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H, H-24), 8.50 (s, 1H, H-9), 8.36 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, H-21), 8.15 (dd, *J* = 8.9, 1.2 Hz, 1H, H-14), 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.80-7.74 (m, 1H, H-23), 7.69-7.64 (m, 2H, H-15/17), 7.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4), 7.40 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-11), 7.33 (m, 2H, H-16/22), 6.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 1.89 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.0 (C_q-2), 152.6 (C_q-19), 149.9 (C-12), 149.4 (C_q-6), 148.3 (C_q-13), 147.0 (C_q-7), 140.0 (C-10), 137.2 (C_q-20), 136.9 (C-4), 136.3 (C-23), 133.9 (C_q-25), 130.0 (C-9), 129.7 (C-14), 129.2 (C-15/17), 128.0

(C-18), 126.4 (C-15/16/17/21), 126.4 (C-15/16/17/21), 126.2 (C-15/16/17/21), 124.1 (C-22), 123.1 (C-3), 122.4 (C-11), 121.7 (C_q-8), 121.5 (C-24), 119.0 (C-5), 23.7 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₅H₁₉N₆O₃Na ([M+Na]⁺) 451.1519, gefunden bei 451.1519 m/z; **Smp.** 211.8 °C.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-(3-nitrophenyl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**146**)

Für die Darstellung von **146** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-3-nitrobenzol (69.0 mg, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation (CH₂Cl₂/PE 1:10) wurde das Produkt **146** (86.0 mg, 0.19 mmol, 55 %) als gelber Feststoff erhalten.



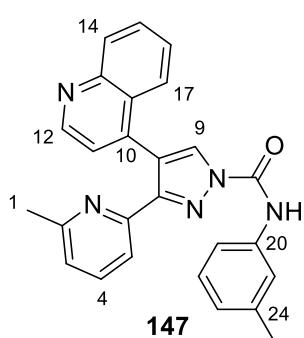
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.11 (s, 1H, H-NH), 8.94 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.66 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-25), 8.52 (s, 1H, H-9), 8.18 (dd, *J* = 9.0, 1.1 Hz, 1H, H-14), 8.16-8.12 (m, 1H, H-23), 8.08-8.04 (m, 1H, H-21), 7.75-7.68 (m, 2H, H-15/17), 7.60 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-22), 7.45-7.34 (m, 3H, H-4/11/16), 7.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 7.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ

159.0 (C_q-2), 152.1 (C_q-19), 150.1 (C-12), 149.0 (C_q-6), 149.0 (C_q-24), 148.6 (C_q-13), 146.9 (C_q-7), 138.9 (C_q-10), 138.3 (C_q-20), 137.0 (C-4), 130.3 (C-9/14/15/17/22), 130.3 (C-9/14/15/17/22), 130.0 (C-9/14/15/17/22), 129.8 (C-9/14/15/17/22), 127.4 (C_q-18), 127.1 (C-16), 125.7 (C-23), 125.5 (C-15/17), 123.7 (C-3), 122.7 (C-11), 120.7 (C_q-8), 120.1 (C-21), 119.5 (C-5), 114.9 (C-25), 24.3 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₅H₁₉N₆O₃Na ([M+Na]⁺) 451.1519, gefunden bei 451.1519 m/z; **Smp.** 167.9 °C.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-N-(*m*-tolyl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**147**)

Für die Darstellung von **147** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und 1-Isocyanato-3-methylbenzol (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger

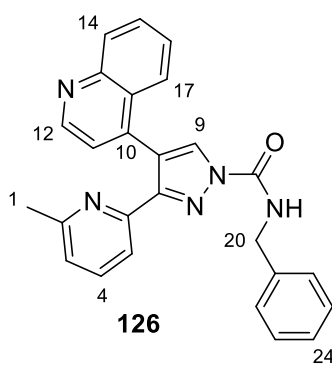
Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **147** (72 mg, 0.17 mmol, 49 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.25 (s, 1H, H-NH), 8.92 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.77-7.72 (m, 1H, H-17), 7.69 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H-15), 7.53 (s, 1H, H-25), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-23), 7.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.39 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H-16), 7.35 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-11), 7.31 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-22), 7.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.02 (m, 2H, H-3/21), 2.41 (s, 3H, H-26), 2.25 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8 (C_q-2), 152.2 (C_q-19), 150.0 (C-12), 149.6 (C_q-13), 148.5 (C_q-6), 146.7 (C_q-7), 139.4 (C_q-20), 139.4 (C_q-10), 136.8 (C-4), 136.4 (C_q-24), 130.2 (C-9), 129.9 (C-14), 129.5 (C-15), 129.3 (C-22), 127.6 (C_q-18), 126.8 (C-16), 126.0 (C-21), 125.9 (C-17), 123.3 (C-3), 122.6 (C-11), 120.8 (C-25), 120.6 (C_q-8), 119.9 (C-5), 117.2 (C-23), 24.3 (C-1), 21.7 (C-26) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₆H₂₁N₅ONa ([M+Na]⁺) 442.1644, gefunden bei 442.1644 m/z; **Smp.** 176.5 °C.

N-Benzyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**126**)

Für die Darstellung von **126** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und (Isocyanatomethyl)benzol (0.05 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **126** (107 mg, 0.26 mmol, 73 %) als schwach gelber Feststoff erhalten.

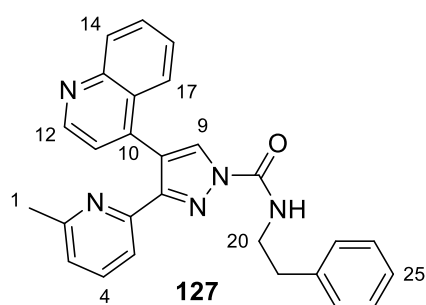


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.48 (s, 1H, H-9), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-17), 7.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-NH), 7.73 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H-14), 7.67 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H-16), 7.46-7.30 (m, 8H, H-4/11/15/22/23/24), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 4.69 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-20), 2.21 (s, 3H, H-1) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.7 (C_q-2), 152.1 (C_q-13), 149.9 (C-12), 149.7 (C_q-6), 149.6 (C_q-19), 148.5 (C_q-10), 139.5 (C_q-7), 137.3 (C_q-21), 136.7 (C-4), 130.2 (C-9), 129.8 (C-17), 129.5 (C-5), 129.0 (C-22), 128.1 (C-23), 128.1 (C-24), 127.6 (C_q-

18), 126.7 (C-11), 126.0 (C-14), 123.1 (C-3), 122.6 (C-15), 120.0 (C_q-8), 119.8 (C-16), 44.7 (C-20), 24.2 (C-1) ppm; ¹H NMR (500 MHz, d₁₈-HMPA) δ 10.24 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-NH), 9.02 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-12), 8.51 (s, 1H, H-9), 8.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.89 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.84 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-15), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.62 (m, 3H, H-22/24), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-16), 7.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-23), 7.39 (m, 1H, H-17), 7.24 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-3), 4.72 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-20), 1.81 (s, 3H, H-1) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, d₁₈-HMPA) δ 157.5 (C_q-2), 151.6 (C_q-19), 151.3 (C_q-7), 150.7 (C-12), 150.5 (C_q-16), 149.1 (C_q-13), 140.9 (C_q-10), 140.5 (C_q-21), 137.7 (C-4), 130.5 (C-9), 130.3 (C-14), 129.5 (C-15), 129.1 (C-22), 128.9 (C-24), 128.6 (C-23), 127.8 (C_q-18), 127.1 (C-16), 126.8 (C-17), 123.5 (C-11), 123.3 (C-3), 120.4 (C_q-8), 119.3 (C-5), 44.8 (C-20), 23.7 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₆H₂₂N₅O ([M+H]⁺) 420.1824, gefunden bei 420.1824 m/z; **Smp.** 111.7 °C.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-phenethyl-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (**127**)

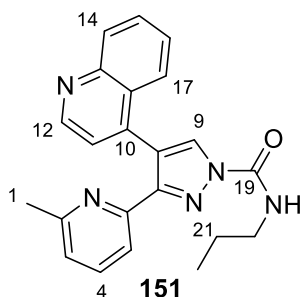
Für die Darstellung von **127** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und (2-Isocyanatoethyl)benzol (0.06 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **127** (90.0 mg, 0.21 mmol, 59 %) als schwach gelber Feststoff erhalten.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.44 (s, 1H, H-9), 8.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-17), 7.72 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H-14), 7.67 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.4 Hz, 1H, H-16), 7.52 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-NH), 7.42-7.24 (m, 8H, H-4/11/15/23/24/25), 7.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-3), 3.81-3.69 (m, 2H, H-20), 3.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-21), 2.19 (s, 3H, H-1) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.6 (C_q-2), 151.9 (C_q-13), 149.9 (C-12), 149.8 (C_q-6), 149.5 (C_q-19), 148.5 (C_q-10), 139.6 (C_q-7), 138.4 (C_q-22), 136.6 (C-4), 130.1 (C-9), 129.8 (C-17), 129.4 (C-5), 128.9 (C-23), 128.9 (C-24), 127.6 (C_q-18), 126.9 (C-25), 126.6 (C-11), 126.0 (C-14), 123.0 (C-3), 122.6 (C-15), 119.9 (C_q-8), 119.7 (C-16), 42.1 (C-20), 36.1 (C-21), 24.2 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₇H₂₄N₅O ([M+H]⁺) 434.1981, gefunden bei 434.1981 m/z; **Smp.** 173.6 °C.

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-N-propyl-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (151)

Für die Darstellung von **151** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und Propylisocyanat (0.04 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **151** (34.0 mg, 0.09 mmol, 26 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.



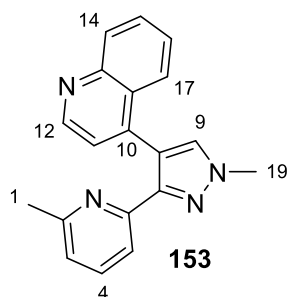
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.46 (s, 1H, H-9), 8.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.77-7.72 (m, 1H, H-17), 7.69 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-15), 7.46 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H-NH), 7.41-7.36 (m, 2H, H-4/16), 7.34 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-11), 7.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 6.99 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 3.47 (dd, *J* = 14.1, 6.4 Hz, 2H, H-20), 2.24 (s, 3H, H-1), 1.81-1.67 (m, 2H, H-21), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-22) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 158.7 (C_q-2), 151.8 (C_q-19), 149.7 (C-12), 149.6 (C_q-13), 149.5 (C_q-7), 148.1 (C_q-6), 140.1 (C_q-10), 136.8 (C-4), 130.2 (C-9), 129.7 (C-15), 129.5 (C-14), 127.6 (C_q-18), 126.8 (C-16), 126.0 (C-17), 123.1 (C-3), 122.6 (C-11), 119.9 (C-5), 119.7 (C-8), 42.5 (C-20), 29.8, 24.2 (C-1), 23.1 (C-21), 11.5 (C-22) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₂₂H₂₂N₅O ([M+H]⁺) 372.1824, gefunden bei 372.1823 m/z; **Smp.** 122.4 °C.

N-Hexyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (152)

Für die Darstellung von **152** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und *N*-Hexylisocyanat (0.04 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **152** (22.0 mg, 0.05 mmol, 15 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

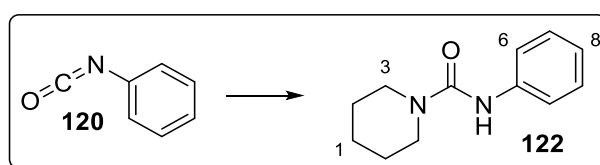
4-(1-Methyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (153)

Für die Darstellung von **153** wurden 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 100 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.), THF (5.0 mL), NaH (21.0 mg, 0.52 mmol, 1.5 Äq.) und Mel (0.03 mL, 0.42 mmol, 1.2 Äq.) verwendet. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 4:1→1:1) wurde das Produkt **153** (13.0 mg, 0.04 mmol, 12 %) als farbloser Feststoff erhalten.



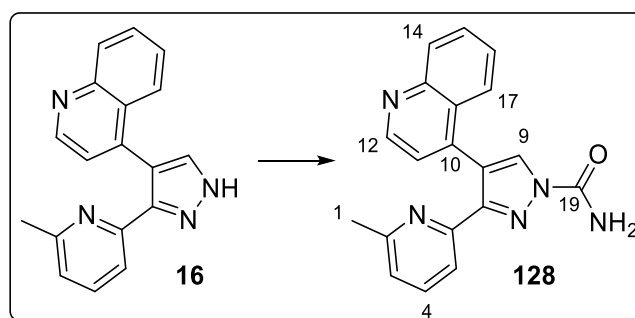
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.85 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-12), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-17), 7.64 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-15), 7.56 (s, 1H, H-9), 7.37-7.31 (m, 1H, H-4), 7.27 (m, 2H, H-11/16), 6.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.90 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 4.09 (s, 3H, H-19), 2.32 (s, 3H, H-1) ppm;

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.6 (C_q-2), 150.9 (C_q-13), 149.9 (C-12), 149.5 (C_q-7), 148.5 (C_q-6), 140.9 (C_q-10), 136.4 (C-4), 132.0 (C-14), 129.6 (C-15), 129.3 (C-16), 127.8 (C_q-18), 126.4 (C-17), 126.3 (C-9), 122.6 (C-5), 122.0 (C-3), 119.4 (C-11), 117.2 (C_q-8), 39.6 (C-19), 24.5 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₁₉H₁₆N₄Na ([M+Na]⁺) 323.1273, gefunden bei 323.1273 m/z; **Smp.** 117.6 °C.

N-Phenylpiperidin-1-carboxamid (122)

Zu einer Lösung von Phenylisocyanat (0.08 M in CDCl₃, 0.7 mL, 1.0 Äq.) wurde eine Lösung von Piperidin (0.80 M in CDCl₃, 0.07 mL, 1.0 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch nach 1 h NMR-spektroskopisch untersucht. Es wurde ein vollständiger Umsatz zum Produkt **122** festgestellt werden.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (m, 2H, H-6), 7.30-7.23 (m, 2H, H-7), 7.01 (tt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-8), 6.39 (s, 1H, H-NH), 3.51-3.38 (m, 4H, H-3), 1.68-1.57 (m, 6H, H-1/2) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 155.1 (C_q-4), 139.4 (C_q-5), 129.0 (C-7), 122.9 (C-8), 119.9 (C-6), 45.4 (C-3), 25.8 (C-1/2), 24.5 (C-1/2) ppm.

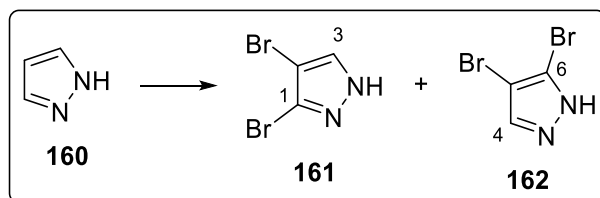
3-(6-Methylpyridin-2-yl)-4-(chinolin-4-yl)-1H-pyrazol-1-carboxamid (128)

Zu einer Lösung von 4-(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (**16**, 30 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) in CHCl_3 (1.0 mL) wurde Trichlormethylchlorformiat (0.02 mL, 0.16 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und das Gemisch für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Reaktionslösung Ammoniak (0.3 mL) gegeben und für weitere 2 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von deion. H_2O (5.0 mL) wurde die wässrige Phase mit CHCl_3 (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 10:1→1:1) wurde das Produkt **128** (15.0 mg, 0.05 mmol, 41 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-12), 8.45 (s, 1H, H-9), 8.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-14), 7.74-7.66 (m, 2H, H-15/17), 7.45-7.33 (m, 4H, 4/11/16/NH), 7.25 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-5), 6.99 (d, $J = 7.6$ Hz., 1H, H-3), 5.65 (s, 1H, H-NH), 2.18 (s, 3H, H-1) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.6 (C_q -19), 152.3 (C_q -7), 150.3 (C_q -13), 149.5 (C-12), 148.0 (C_q -6), 140.1 (C_q -10), 136.8 (C-4), 130.3 C-14), 129.7 (C-15), 129.4 (C_q -18), 127.7 (C-16), 126.9 (C-9), 126.0 (C-17), 123.2 (C-5), 122.6 (C-3), 120.4 (C_q -8), 119.7 (C-11), 24.1 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 330.1355, gefunden bei 330.1355 m/z; **Smp.** 164.5 °C.

7.5 DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 5.3

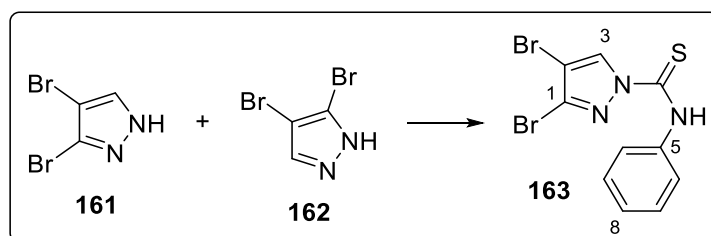
3,4-(4,5)-Dibrom-1H-pyrazol (161 und 162)



Zu einer Lösung von 1H-Pyrazol (2.06 g, 30.2 mmol, 1.0 Äq.) in NaOH-Lsg. (3 M, 100 mL) wurde Brom (9.66 g, 60.5 mmol, 2.0 Äq.) über 3 h zugegeben und das Gemisch für weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung neutralisiert (1 M HCl), der gebildete farblose Feststoff durch Zugabe von Et₂O gelöst und die wässrige Phase mit Et₂O (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 20:1→5:1) wurde das Produktgemisch aus **161** und **162** (6.16 g, 27.3 mmol, 90 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.11 (s, 1H, H-NH), 11.01 (s, 1H, H-NH), 7.63 (s, 1H, H-3/6), 7.60 (s, 1H, H-3/6) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 134.5 (C-4), 134.5 (C_q-1), 131.5 (C-3), 127.9 (C_q-6), 96.9 (C_q-1/5), 93.9 (C_q-1/5) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₃H₃N₂Br₂ ([M+H]⁺) 224.8663, gefunden bei 224.8666 m/z; **Smp.** 90.4 °C.

3,4-Dibrom-N-phenyl-1H-pyrazol-1-carbothioamid (163)

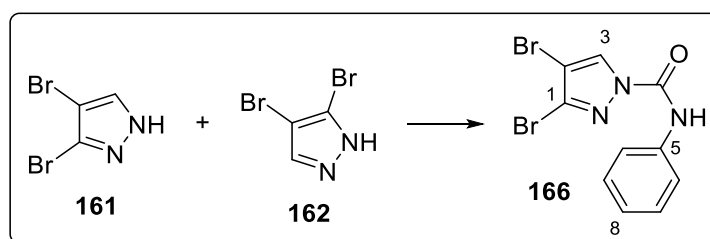


Eine Lösung von 3,4-(4,5)-dibrom-1H-pyrazol (2.53 g, 11.2 mmol, 1.0 Äq.) in THF (50 mL) wurde bei 0 °C mit NaH (60 %, 1.79 g, 44.8 mmol, 4.0 Äq.) versetzt und für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der Suspension Phenylisothiocyanat (1.46 mL, 12.3 mmol,

1.1 Äq.) und die Reaktionslösung für weitere 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe einer NaCl-Lsg (100 mL) wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Umkristallisation MeCN wurde das Produkt **163** (880 mg, 2.44 mmol, 22 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

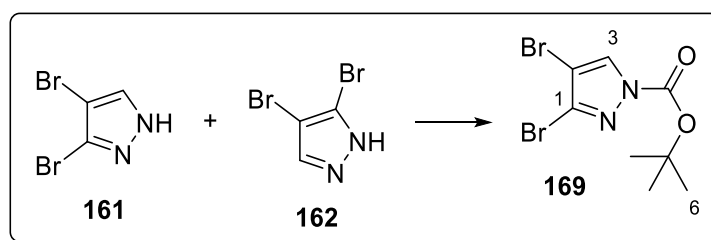
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.37 (s, 1H, H-NH), 8.74 (s, 1H, H-3), 7.79-7.71 (m, 2H, H-6), 7.48-7.42 (m, 2H, H-7), 7.32 (m, 1H, H-8) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (C_q-4), 136.7 (C_q-5), 133.2 (C_q-1), 132.0 (C-3), 129.3 (C-7), 127.4 (C-8), 123.7 (C-6), 102.4 (C-2) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₁₀H₈N₃Br₂S ([M+H]⁺) 359.8806, gefunden bei 359.8802 m/z; **Smp.** 108.7 °C.

3,4-Dibrom-N-phenyl-1H-pyrazol-1-carboxamid (**166**)



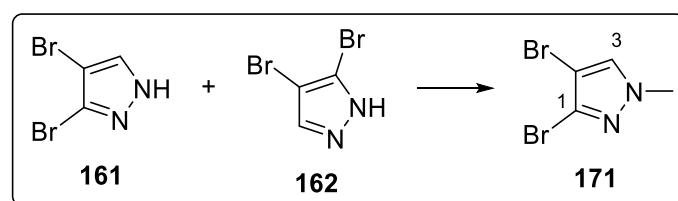
Eine Mischung aus 3,4-(4,5)-dibrom-1H-pyrazol (543 mg, 2.40 mmol, 1.0 Äq.) und Phenylisocyanat (0.28 mL, 2.52 mmol, 1.05 Äq.) wurde für 15 min auf 80 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf RT mit PE (30 mL) gewaschen. Nach Umkristallisation (EtOH) wurde das Produkt **166** (364 mg, 1.06 mmol, 44 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (s, 1H, H-NH), 8.28 (s, 1H, H-3), 7.64-7.53 (m, 2H, H-6), 7.44-7.35 (m, 2H, H-7), 7.24-7.14 (m, 1H, H-8) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.0 (C_q-4), 136.0 (C_q-5), 132.7 (C_q-1), 130.3 (C-3), 129.5 (C-7), 125.4 (C-8), 120.0 (C-6), 101.7 (C_q-2) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₁₀H₇N₃Br₂O_{Na} ([M+Na]⁺) 365.8854, gefunden bei 365.8854 m/z; **Smp.** 113.1 °C.

tert-Butyl 3,4-dibrom-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (**169**)

Zu einer Lösung von 3,4-(4,5)-dibrom-1*H*-pyrazol (414 mg, 1.83 mmol, 1.0 Äq.) in MeCN (20 mL) wurden nacheinander Boc₂O (520 mg, 2.38 mmol, 1.3 Äq.) und DMAP (448 mg, 0.37 mmol, 0.2 Äq.) gegeben und das Gemisch für 3.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der erhaltene Feststoff umkristallisiert (n-Pentan) und das Produkt **169** (155 mg, 0.48 mmol, 26 %) als farblose Feststoff erhalten.

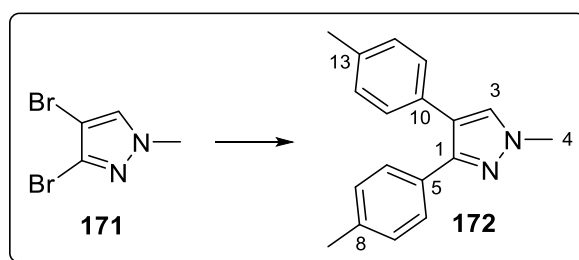
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (s, 1H, H-3), 1.63 (s, 9H, H-6) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.8 (C_q-4), 134.5 (C_q-1), 131.9 (C-3), 101.4 (C_q-2), 87.2 (C_q-5), 27.9 (C-6) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₈H₁₁N₂Br₂O₂ ([M+H]⁺) 324.9187, gefunden bei 324.9187 m/z; **Smp.** 73.8 °C.

3,4-Dibrom-1-methyl-1*H*-pyrazol (**171**)

Zu einer Suspension aus 3,4 (4,5)-Dibrom-1*H*-pyrazol (1.14 g, 5.07 mmol, 1.0 Äq.) in deion. H₂O (5.0 mL) wurde KOH (0.37 g, 6.58 mmol, 1.3 Äq.) und vorsichtig Methyljodid (0.41 mL, 6.58 mmol, 1.3 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 12 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von deion. H₂O (5.0 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 9:1) wurde das Produkt **171** (379 mg, 1.58 mmol, 32 %) als farbloser Feststoff erhalten.

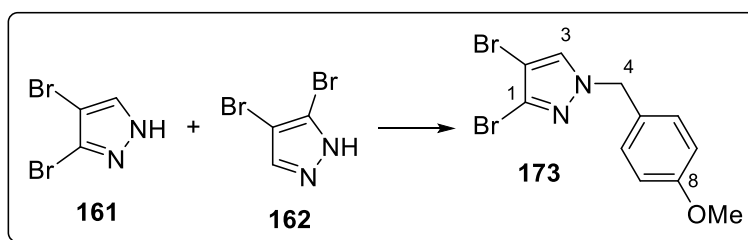
R_f (PE/EE 4:1): 0.4, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3), 3.85 (d, $J = 3.8$ Hz, 3H, H-4) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 132.0 (C-3), 127.3 (C_q -2), 96.1 (C_q -1), 40.3 (C-4) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{Br}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 238.8819, gefunden bei 238.8814 m/z; **Smp.** 60.1 °C.

1-Methyl-3,4-di-*p*-tolyl-1H-pyrazol (172)



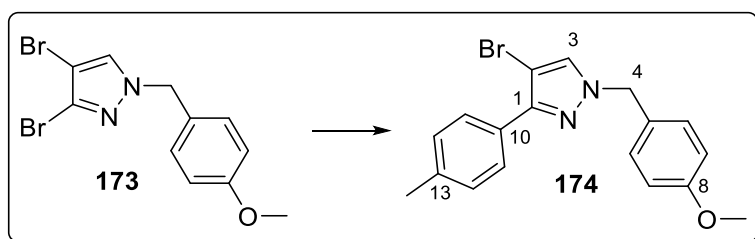
Zu einer Lösung von 3,4-Dibrom-1-methyl-1H-pyrazol (60.0 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.), *p*-Toluolboronsäure (74.8 mg, 0.55 mmol, 2.2 Äq.), K_2CO_3 (138 mg, 1.00 mmol, 4.0 Äq.) und SPhos (10.3 mg, 0.03 mmol, 0.1 Äq.) in Dioxan/Wasser (4:1, 2.5 mL) wurde $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2.80 mg, 0.01 mmol, 5.0 mol%) gegeben und das Gemisch für 15 h bei 100 °C gerührt. Nach der Zugabe von deion. H_2O (10 mL) wurde die Mischung mit CH_2Cl_2 (3x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 20:1→10:1) wurde das Produkt **172** (52.0 mg, 0.20 mmol, 80 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.42 (s, 1H, H-3), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-Ar), 7.20-7.16 (m, 2H, H-Ar), 7.11 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 4H, H-Ar), 3.96 (s, 3H, H-NMe), 2.36 (s, 3H, H-9), 2.35 (s, 3H, H-14) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 148.8 (C-1), 137.2 (C_q -5), 136.2 (C_q -10), 130.9 (C_q -8), 130.6 (C_q -13), 130.2 (C-3), 129.2 (C-6), 129.1 (C-11), 128.6 (C-7), 128.2 (C-12), 120.7 (C-2), 39.1 (C-4), 21.4 (C-9), 21.3 (C-14) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 263.1548, gefunden bei 263.1549 m/z.

3,4-Dibrom-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (173)

Zu einer Suspension aus NaH (95 %, 500 mg, 20.1 mmol, 1.5 Äq.) in trockenem DMF (100 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung von 3,4-(4,5)-Dibrom-1H-pyrazol (3.03 g, 13.4 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (10 mL) und *p*-Methoxybenzylchlorid (2.00 mL, 14.8 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und die Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von deion. H₂O (10 mL) wurde das Gemisch mit EtOAc (3x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 20:1→10:1) wurde das Produkt **173** (1.16 g, 3.35 mmol, 25 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (s, 1H, H-3), 7.21-7.14 (m, 2H, H-7), 6.86 (dd, *J* = 6.7, 2.0 Hz, 2H, H-6), 5.12 (s, 2H, H-4), 3.76 (s, 3H, H-9) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.8 (C_q-8), 130.8 (C-3), 129.7 (C-7), 127.4 (C_q-1), 126.6 (C_q-5), 114.3 (C-6), 96.3 (C_q-2), 56.8 (C-4), 55.3 (C-9) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für C₁₁H₁₁Br₂N₂O ([M+H]⁺) 366.9052, gefunden bei 366.9049 m/z.

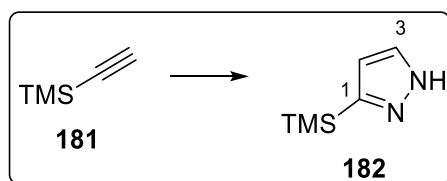
4-Brom-1-(4-methoxybenzyl)-3-(*p*-tolyl)-1H-pyrazol (174)

Zu einer Suspension aus 3,4-Dibrom-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (31,0 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.), *p*-Toluolboronsäure (13,4 mg, 0.01 mmol, 1.1 Äq.) und K₃PO₄ (28,5 mg, 0.13 mmol, 1.5 Äq.) in Dioxan (6.5 mL) wurde Pd(PPh₃)₄ (3.1 mg, 2.70 μmol, 3.0 mol%) gegeben und das Gemisch für 15 h bei 100 °C gerührt. Nach der Zugabe von deion. H₂O (10 mL) wurde die

wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 20:1→10:1) wurde das Produkt **174** (5.2 mg, 14.4 μmol , 16 %) als farbloser Feststoff erhalten.

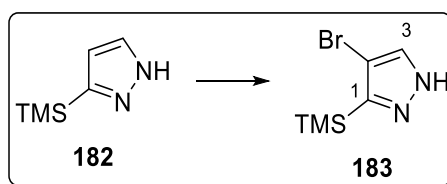
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42-7.38 (m, 2H, H-11), 7.32 (s, 1H, H-3), 7.27-7.24 (m, 2H, H-7), 7.20-7.16 (m, 2H, H-12), 6.92-6.88 (m, 2H, H-6), 5.21 (s, 2H, H-4), 3.81 (s, 3H, H-9), 2.35 (s, 3H, H-14) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.9 (C_q -8), 137.0 (C_q -13), 129.9 (C-7), 129.3 (C-12), 128.6 (C-3), 128.5 (C_q -10), 127.7 (C-11), 127.5 (C_q -5), 124.4 (C_q -2), 122.8 (C_q -1), 114.5 (C-6), 56.4 (C-4), 55.5 (C-9), 21.3 (C-14) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 379.0422, gefunden bei 379.0417 m/z.

3-(Trimethylsilyl)-1H-pyrazol (**182**)



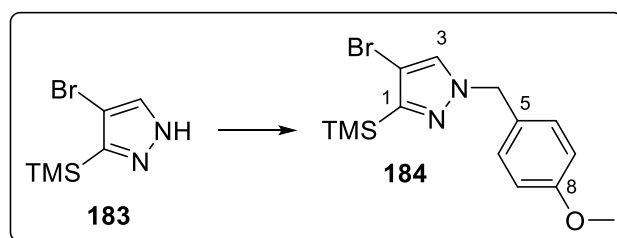
Eine Mischung aus Trimethylsilyl-acetylen (1.20 mL, 8.40 mmol, 1.0 Äq.) und Trimethylsilyl-diazomethan (2 M in Et_2O , 4.2 mL, 8.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Mikrowellenreaktor (250 W, 120 °C, 30 min) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 5:1) wurde das Produkt **182** (834 mg, 6.00 mmol, 71 %) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2), 6.45 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-3), 0.32 (s, 9H, H-TMS) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 142.6 (C_q -1), 139.1 (C-2), 112.4 (C-3), -1.0 (C-TMS) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Si}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 141.0848, gefunden bei 141.0853 m/z; **Smp.** 75.4 °C.

4-Brom-3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol (183)

Zu einer Lösung von 3-(Trimethylsilyl)-1H-pyrazol (51.0 mg, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) in CCl_4 (5.0 mL) wurde *N*-Bromsuccinimid (65.0 mg, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und das Gemisch für 3 h bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, die organische Phase mit deion. H_2O (2x 10.0 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10:1→5:1) wurde das Produkt **183** (78.0 mg, 0.36 mmol, 98 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (s, 1H, H-3), 0.39 (s, 9H, H-TMS) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 140.9 (C_q -1, C-3), 102.0 (C_q -2), -1.7 (C-TMS) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{Si}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 218.9953, gefunden bei 218.9946 m/z; **Smp.** 98.8 °C.

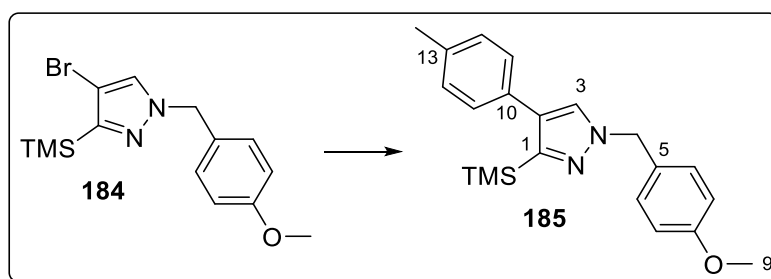
4-Brom-1-(4-methoxybenzyl)-3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol (184)

Zu einer Suspension von NaH (31.4 mg, 1.31 mmol, 1.2 Äq.) in trockenem DMF (10 mL) bei 0 °C wurde eine Lösung von 4-Brom-3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol (239 mg, 1.09 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (3 mL) vorsichtig hinzu getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei 0 °C gerührt und anschließend auf RT erwärmt. Anschließend wurde *para*-Methoxybenzylchlorid (0.16 mL, 1.20 mmol, 1.1 Äq.) vorsichtig hinzugegeben und das Gemisch für 18 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von deion. H_2O (10 mL) wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc (3x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaCl-Lsg. (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10:1) wurde das Produkt **184** (41.5 mg, 0.12 mmol, 11 %) als farbloser Feststoff erhalten.

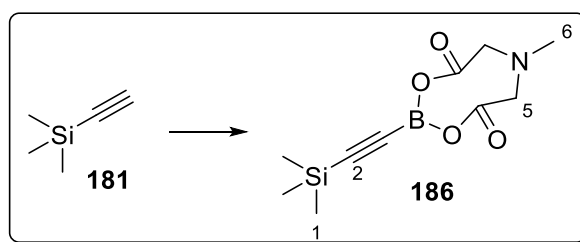
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (s, 1H, H-3), 7.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-6), 6.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7), 5.23 (s, 2H, H-4), 3.80 (s, 3H, H-9), 0.37 (s, 9H, H-TMS) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 159.7 (C_q -8), 151.34 (C_q -1), 129.8 (C-6), 127.0 (C_q -5), 114.4 (C-3), 100.8 (C_q -2), 56.1 (C-4), 55.4 (C-9), -1.0 (C-TMS) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{BrN}_2\text{OSi}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 339.0526, gefunden bei 339.0528 m/z.

1-(4-Methoxybenzyl)-4-(*p*-tolyl)-3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol (**185**)



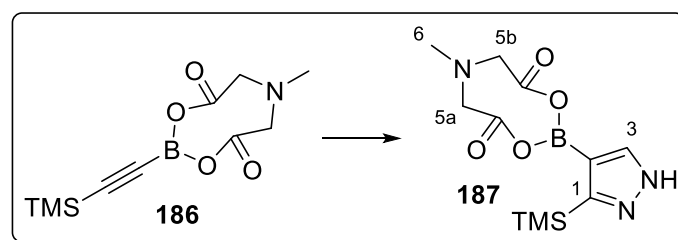
Eine Mischung aus 4-Brom-1-(4-Methoxybenzyl)-3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol (42.0 mg, 0.12 mmol, 1.00 Äq.), *p*-Toluolboronsäure (29.0 mg, 0.21 mmol, 1.70 Äq.), K_3PO_4 (61.0 mg, 0.29 mmol, 2.30 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (6.60 mg, 6.00 μmol , 0.06 Äq.) in Dioxan (2 mL) wurde bei 70 °C für 30 h gerührt. Nach Zugabe von deion. H_2O (10 mL) wurde die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **185** ließ sich nur massenspektrometrisch nachweisen.

ESI-MS (HR-MS) berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{OSi}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 351.1899, gefunden bei 351.1893 m/z.

6-Methyl-2-((trimethylsilyl)ethynyl)-1,3,6,2-dioxazaborocan-4,8-dion (186)

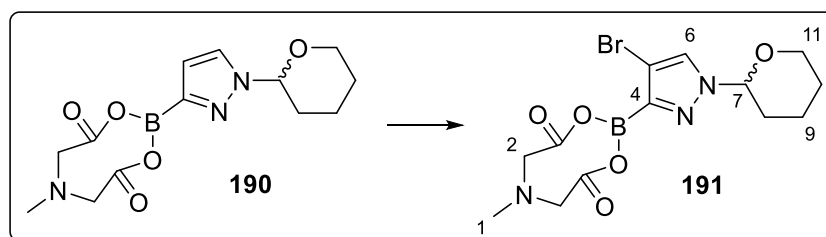
In einem Schlenkgefäß wurde eine Lösung von TMS-Acetylen (2.13 g, 21.7 mmol, 1.0 Äq.) und THF (20 mL) auf 0 °C gekühlt, tropfenweise EtMgBr (3 M in Et₂O, 7.20 mL, 21.7 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch anschließend für 40 min bei 0 °C gerührt. In einem separaten Zweihalskolben wurde B(OMe)₃ (2.48 g, 23.8 mmol, 1.1 Äq.) in THF (20 mL) vorgelegt, auf -78 °C gekühlt und die Lösung von dem ersten Kolben über eine Transferkanüle langsam hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf RT gebracht und 3 h bei RT gerührt. In einem weiteren Dreihalskolben mit Thermometer und Destillationsbrücke wurde 2,2'-(Methylazandiyl)diessigsäure (7.01 g, 47.6 mmol, 2.2 Äq.) in DMSO (30 mL) suspendiert und auf 130 °C gebracht. Anschließend wurde der At-Komplex aus dem zweiten Kolben über eine Transferkanüle hinzugegeben und das entstehende MeOH abdestilliert. Das Gemisch wurde auf RT gebracht, mit deion. H₂O (150 mL), NaCl-Lsg. (150 mL), EtOAc (200 mL) und Aceton (150 mL) versetzt, die wässrige Phase mit EtOAc/Aceton (2/1, 3x 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt **186** (2.25 g, 15.6 mmol, 72 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 3.91 (m, 4H, H-5), 3.01 (s, 3H, H-6), 0.17 (s, 9H, H-1) ppm;
¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 168.7 (C_q-4), 118.3 (C_q-2), 62.4 (C-5), 48.8 (C-6), -0.26 (C-1) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für C₁₀H₁₆BNNaO₄Si ([M+Na]⁺) 276.0839, gefunden bei 276.0841 m/z; **Smp.** 232.3 °C.

6-Methyl-2-(3-(trimethylsilyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,6,2-dioxazaborocan-4,8-dion (187)

Eine Lösung von 6-Methyl-2-((trimethylsilyl)ethynyl)-1,3,6,2-dioxazaborocan-4,8-dion (50.0 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) in Xylol (5 mL) wurde mit frisch destilliertem Diazomethan (50.0 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) in Xylol (5 mL) versetzt und für 24 h auf 160 °C erhitzt. Nach Zugabe von deion. H₂O (10 mL) wurde die wässrige Phase mit EtOAc/Aceton (2:1, 3x 30 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **187** ließ sich nur massenspektrometrisch nachweisen

ESI-MS (HR-MS) berechnet für C₁₁H₁₉N₃O₄SiB ([M+H]⁺) 296.1238, gefunden bei 296.1237 m/z.

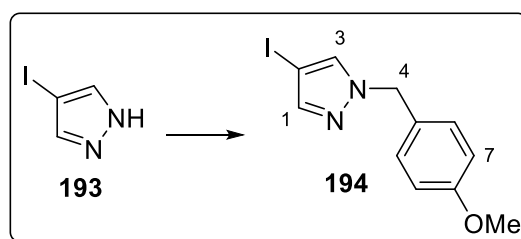
2-(4-Brom-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)-6-methyl-1,3,6,2-dioxazaborocan-4,8-dion (191)

Zu einer Lösung von 6-Methyl-2-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)-1,3,6,2-dioxazaborocan-4,8-dion (20.0 mg, 65.1 µmol, 1.00 Äq.) in Acetonitril (1.0 mL) wurde NBS (12.2 mg, 68.4 µmol, 1.05 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend direkt säulenchromatographisch gereinigt (PE/Et₂O 20:1→100 % Et₂O) und das Produkt **191** (23.1 mg, 59.9 µmol, 92 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 7.50 (s, 1H, H-6), 5.61 (dd, J = 9.9, 2.4 Hz, 1H, H-7), 4.05 (m, 4H, H-2), 3.87-3.77 (m, 1H, H-11), 3.58-3.47 (m, 1H, H-11), 2.68 (s, 3H, H-1), 2.45-2.28 (m, 1H, H-

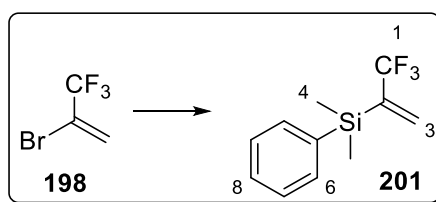
8), 2.09-1.97 (m, 2H, H-8/9), 1.72-1.47 (m, 3H, H-9/10) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3CN) δ 169.1 (C_q -3), 169.0 (C_q -3), 140.3 (C-6), 126.4 (C_q -4) 103.4 (C_q -5), 87.5 (C-7), 68.1 (C-11), 65.2 (C-2), 64.4 (C-2), 50.0 (C-1), 29.5 (C-8), 25.7 (C-10), 23.3 (C-9) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}^{11}\text{BN}_3\text{O}_5\text{Br}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 386.0523, gefunden bei 386.0521 m/z; **Smp.** 145.1 °C.

4-Iod-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (194)



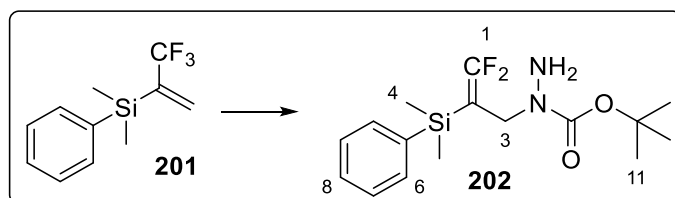
Zu einer Lösung von 4-Iod-1H-pyrazol (170 mg, 0.88 mmol, 1.0 Äq) in DMF (1.5 mL) wurden Cs_2CO_3 (429 mg, 1.32 mmol, 1.5 Äq) und PMB-Br (0.25 mL, 1.76 mmol, 2.0 Äq) hinzugegeben und das Gemisch für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit deion. H_2O (5.0 mL) versetzt, mit CH_2Cl_2 (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 6:1) wurde das Produkt **194** (185 mg, 0.59 mmol, 67 %) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE/EtOAc 4:1) = 0.35; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (s, 1H, H-1), 7.35 (s, 1H, H-3), 7.22-7.15 (m, 2H, H-7), 6.91-6.85 (m, 2H, H-6), 5.22 (s, 2H, H-4), 3.80 (s, 3H, H-9) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 159.8 (C_q -8), 144.5 (C-1), 133.4 (C-3), 129.6 (C-7), 127.8 (C_q -5), 114.4 (C-6), 56.4 (C_q -2), 56.2 (C-4), 55.43 (C-9) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OI}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 314.9994, gefunden bei 314.992 m/z.

Dimethyl(phenyl)(3,3,3-trifluorprop-1-en-2-yl)silan (201)

Zu einem Gemisch aus Magnesiumspäne (2.50 g, 103 mmol, 1.2 Äq.) in THF (150 mL) wurde Chlor(dimethyl)phenylsilan (29.3 g, 172 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Anschließend wurde über eine Spritzenpumpe (0.74 mL/h), bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2-Brom-3,3,3-trifluor-1-propen (15.0 g, 85.7 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und nach beendeter Zugabe für 8 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Phosphatpuffer (pH=7, 300 mL) wurde die wässrige Phase mit Et_2O (3x 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (max. 300 mbar) entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE 100 %) wurde das Produkt **201** (18.5 g, 80.2 mmol, 94 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.58-7.51 (m, 2H, H-6), 7.45-7.36 (m, 3H, H-7/8), 6.41 (dt, $J = 3.7, 2.1$ Hz, 1H, H-3), 5.76 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-3), 0.51 (s, 6H, H-4) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 140.9 (q, $J_{\text{CF}} = 30$ Hz, C_q -2), 135.8 (C_q -5), 134.4 (q, $J_{\text{CF}} = 9$ Hz, C-3), 134.2 (C-6), 129.8 (C-8), 128.1 (C-7), 125.8 (q, $J_{\text{CF}} = 274$ Hz, C_q -1), -2.8 (C-4) ppm; **GC-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{SiF}_3$ ([M]) 230.0739, gefunden bei 230.0744 m/z; R_f (PE): 0.85; $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -134.36 ppm.

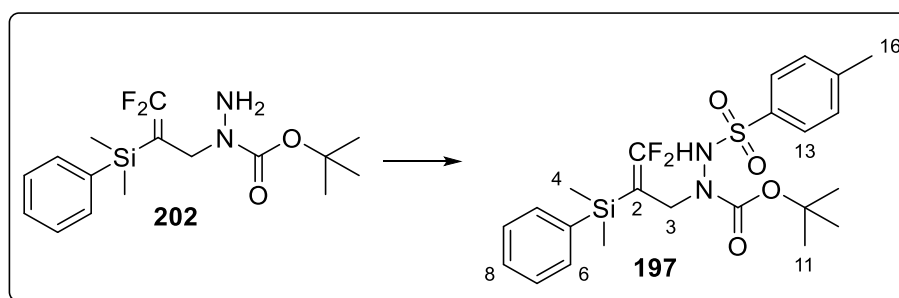
tert-Butyl 1-(2-(dimethyl(phenyl)silyl)-3,3-difluorallyl)hydrazin-1-carboxylat (202)

Zu einer Lösung von Dimethyl(phenyl)(3,3,3-trifluorprop-1-en-2-yl)silan (376 mg, 1.63 mmol, 1.0 Äq.) und tert-Butyl-hydrazincarboxylat (388 mg, 2.94 mmol, 1.8 Äq.) in THF (4 mL) wurde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ NaH (60 %, 70.6 mg, 2.94 mmol, 1.8 Äq.) hinzugegeben und weitere 3 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$

gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phosphatpuffer (pH=7, 30 mL) versetzt und mit Et₂O (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 4:1) wurde das Produkt **202** (375 mg, 1.10 mmol, 67 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55-7.48 (m, 2H, H-6), 7.39-7.32 (m, 3H, H-7/8), 4.04 (s br, 2H, H-3), 3.50 (s br, 2H, H-NH), 1.42 (s, 9H, H-11), 0.47 (s, 3H, H-4), 0.46 (s, 3H, H-4) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.2 (dd, J_{CF} = 309, 286 Hz, C_q-1), 156.3 (C_q-9) 137.3 (C_q-5), 133.6 (C-6), 129.5 (C-8), 128.1 (C-7), 80.9 (C_q-10), 79.1 (dd, J_{CF} = 27, 6 Hz, C_q-2), 46.4 (m, C-3), 28.4 (C-11), -2.4 (C-4) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -70.2 (d, J_{CF} = 26 Hz), -72.6 (d, J_{CF} = 27 Hz) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für C₁₆H₂₄SiF₂N₂O₂Na ([M+Na]⁺) 365.1473, gefunden bei 365.1470 m/z; R_f (PE/EE 4:1): 0.5.

tert-Butyl 1-(2-(dimethyl(phenyl)silyl)-3,3-difluorallyl)-2-tosylhydrazin-1-carboxylat (**197**)

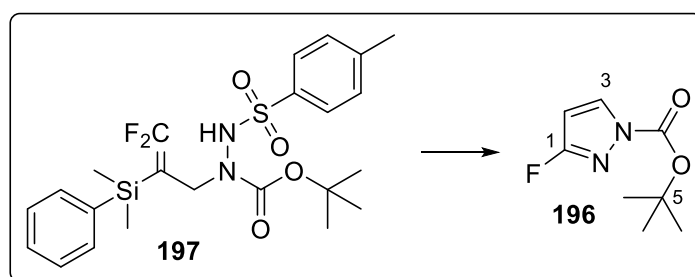


Eine Lösung von *tert*-Butyl 1-(2-(dimethyl(phenyl)silyl)-3,3-difluorallyl)hydrazin-1-carboxylat (330 mg, 0.96 mmol, 1.0 Äq.) und Tosylchlorid (496 mg, 2.60 mmol, 2.7 Äq.) in Pyridin (2 mL) wurde für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Phosphatpuffer (pH=7, 20 mL) versetzt, mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 4:1) und anschließender Umkristallisation (PE) wurde das Produkt **197** (379 mg, 0.76 mmol, 80 %) als schwach gelblicher Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-13), 7.52-7.46 (m, 2H, H-6), 7.42-7.33 (m, 3H, H-7/8), 7.25 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H-14), 6.16 (s br, 1H, H-NH), 4.46 (s br, 1H, H-3), 4.06

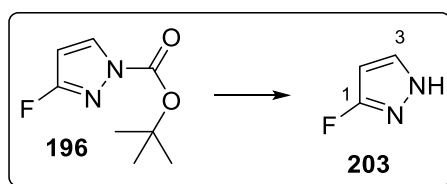
(s br, 1H, H-3), 2.38 (s, 3H, H-16), 1.11 (s, 9H, H-11), 0.49 (s, 6H, H-4) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 158.3 (dd, $J_{\text{CF}} = 312, 287$ Hz, $\text{C}_{\text{q}}-1$), 144.5 ($\text{C}_{\text{q}}-15$), 136.9 ($\text{C}_{\text{q}}-5$), 134.3 ($\text{C}_{\text{q}}-12$), 133.7 (C-6), 129.7 (C-8), 129.6 (C-13), 128.7 (C-14), 128.2 (C-7), 82.7 ($\text{C}_{\text{q}}-9$), 78.1 ($\text{C}_{\text{q}}-2$), 46.5 (C-3), 27.7 (C-11), 21.7 (C-16), -2.2 (C-4) ppm; **ESI-MS (HR-MS)** berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{SSiNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 519.1561, gefunden bei 519.1556 m/z; R_f (PE/EE 4:1): 0.45; $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -67.31, -71.61 ppm; **Smp.** 101.2 °C.

tert-Butyl 3-fluor-1H-pyrazol-1-carboxylat (**196**)



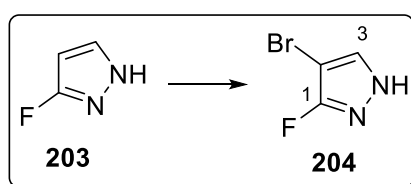
Zu einer Lösung von *tert*-Butyl 1-(2-(dimethyl(phenyl)silyl)-3,3-difluorallyl)-2-tosylhydrazin-1-carboxylat (422 mg, 0.85 mmol, 1.0 Äq) in DMF (2 mL) bei 0 °C wurde NaH (60 %, 75.0 mg, 1.87 mmol, 2.2 Äq) gegeben und das Reaktionsgemisch 12 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Phosphatpuffer (pH=7, 10 mL) wurde die wässrige Phase mit Et_2O (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (max. 300 mbar) entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE→PE/ Et_2O 20:1→5:1) wurde das Produkt **196** (164 mg, 0.80 mmol, 95 %) als farblose Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (t, $J = 2.9$ Hz, 1H, H-3), 6.02 (dd, $J = 2.9, 6.0$ Hz, 1H, H-2), 1.62 (s, 9H, H-6) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 165.4 (d, $J_{\text{CF}} = 253$ Hz, $\text{C}_{\text{q}}-1$), 147.2 ($\text{C}_{\text{q}}-4$), 132.8 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-3), 95.5 (d, $J_{\text{CF}} = 26$ Hz, C-2), 86.1 ($\text{C}_{\text{q}}-5$), 28.0 (C-6) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{FNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 209.0702, gefunden bei 209.0702 m/z; R_f (PE/EE 4:1): 0.3.

3-Fluor-1H-pyrazol (203)

Zu einer Lösung von *tert*-Butyl 3-fluor-1H-pyrazol-1-carboxylat (400 mg, 2.15 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (25 mL) wurde K_3PO_4 (100 mg, 0.47 mmol, 0.2 Äq) gegeben und das Reaktionsgemisch für 48 h bei 40 °C gerührt. Nach der Zugabe von H_2O (10 mL) wurde die wässrige Phase mit Et_2O (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (max. 300 mbar) entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE→PE/ Et_2O 1:1) wurde das Produkt **203** (110 mg, 1.28 mmol, 60 %) als farbloser Feststoff erhalten.

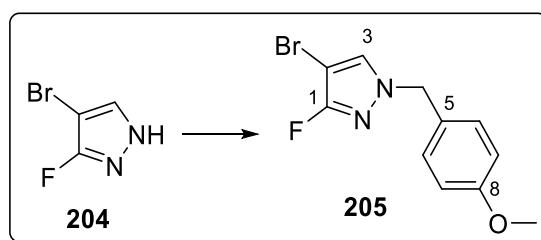
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.81 (s br, 1H, NH), 7.42 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3), 5.87 (dd, $J = 5.9$, 2.0 Hz, 1H, H-2) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.7 (d, $J_{CF} = 243$ Hz, C_{q-1}), 130.5 (d, $J_{CF} = 2$ Hz, C-3), 89.5 (d, $J_{CF} = 25$ Hz, C-2) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $C_3H_3FN_2Na$ ($[M+Na]^+$) 109.0178, gefunden bei 109.0177 m/z; R_f (PE/ Et_2O 1:1): 0.2.

4-Brom-3-fluor-1H-pyrazol (204)

Zu einer Lösung von 3-Fluor-1H-pyrazol (110 mg, 1.28 mmol, 1.0 Äq.) in CCl_4 (20 mL) wurde NBS (228 mg, 1.28 mmol, 1.0 Äq) unter Lichtausschluss hinzugegeben und das Gemisch für 8 h bei RT gerührt. Nach Filtration des Reaktionsgemisches und der Zugabe von deion. H_2O (20 mL) wurde die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE→PE/ Et_2O 1:1) wurde das Produkt **204** (209 mg, 1.27 mmol, 99 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.52 (s br, 1H, NH), 7.48 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-3) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 161.6 (d, $J_{\text{CF}} = 243$ Hz, C-1), 130.8 (C-3), 77.7 (d, $J_{\text{CF}} = 25$ Hz, C-2) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_3\text{H}_1\text{BrFN}_2$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$) 162.9307, gefunden bei 162.9307 m/z; R_f (PE/Et₂O 1:1): 0.8; **Smp.** 109.2 °C.

4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (**205**)



Zu einer Suspension aus 4-Brom-3-fluor-1H-pyrazol (209 mg, 1.27 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (5 mL) und Cs_2CO_3 (618 mg, 1.89 mmol, 1.5 Äq.) wurde PMB-Cl (0.35 mL, 2.53 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 16 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von deion. H_2O (20 mL) wurde die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10:1) wurde das Produkt **205** (263 mg, 0.93 mmol, 73 %) als farblose, ölige Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-6), 7.15 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H; H-3), 6.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7), 5.04 (s, 2H, H-4), 3.81 (s, 3H, 9) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.5 (d, $J_{\text{CF}} = 243$ Hz, C_q-1), 160.0 (C_q-8), 130.7 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-3), 129.9 (C-6), 126.8 (C_q-5), 114.5 (C-7), 76.5 (d, $J_{\text{CF}} = 26$ Hz, C-2) 56.8 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-4), 55.48 (C-9) ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -133.0 (F-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrFN}_2\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 285.0039, gefunden bei 285.0041 m/z; R_f (PE/EE 4:1): 0.5.

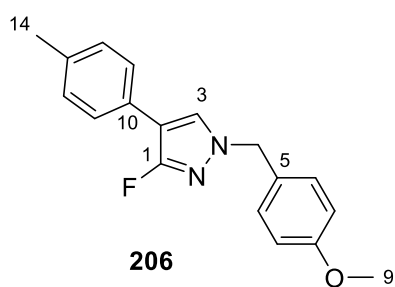
Allgemeine Vorschrift zur Suzuki-Kreuzkupplung mit **205**

Zu einer Lösung von 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (1.00 Äq.) in Dioxan (0.12 M) wurde unter Stickstoffatmosphäre ein Gemisch aus der jeweiligen Boronsäure (1.1 Äq, 0.52 M) und K_2CO_3 (2.75 Äq, 1.3 M) in Wasser hinzugegeben. Anschließend wurde

Pd(PPh₃)₄ (0.03 Äq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 105 °C für 12 h gerührt. Nach säulenchromatographischer Vorreinigung (EtOAc) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

3-Fluor-1-(4-methoxybenzyl)-4-(*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol (**206**)

Für die Darstellung von **206** wurden 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol (33.1 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq), Dioxan (1.0 mL), *p*-Toluolboronsäure (17.4 mg, 0.13 mmol, 1.1 Äq), K₂CO₃ (44.1 mg, 0.32 mmol, 2.75 Äq), dest H₂O (0.25 mL) und Pd(PPh₃)₄ (4.00 mg, 4.0 µmol, 0.03 Äq) verwendet. Nach Reinigung mittels HPLC (RP18, H₂O/MeOH 80:20→0:100) wurde das Produkt **206** (10.6 mg, 40.0 µmol, 34 %) als farbloser Feststoff erhalten.

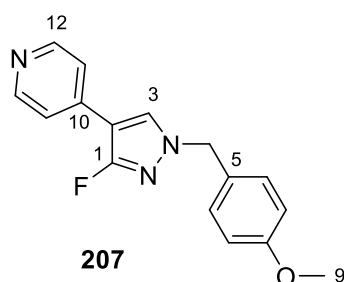


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (m, 3H, H-3/11), 7.26-7.21 (m, 2H, H-12), 7.15 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-6), 6.93-6.86 (m, 2H, H-7), 5.09 (s, 2H, H-4), 3.81 (s, 3H, H-9), 2.34 (s, 3H, H-14) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.5 (d, J_{CF} = 248 Hz, C_q-1), 159.8 (C_q-8), 136.4 (C_q-13), 129.8 (C-6/12), 129.6 (C-6/12), 127.5 (d, J_{CF} = 8.3 Hz, C-3), 127.5 (C_q-5), 127.3 (d,

J_{CF} = 4.6 Hz, C_q-10), 125.9 (d, J_{CF} = 3.3 Hz, C-11), 114.5 (C-7), 105.9 (C_q-2), 56.2 (C-4), 55.5 (C-9), 21.3 (C-14) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -131.2 ppm; ESI-MS (HRMS) berechnet für C₁₈H₁₇FN₂O ([M+H]⁺) 297.1403, gefunden bei 297.1408 m/z.

4-(3-Fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)pyridin (**207**)

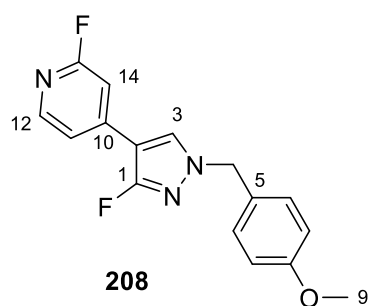
Für die Darstellung von **207** wurden 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol (30.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq), Dioxan (1.0 mL), Pyridin-4-boronsäure (14.2 mg, 0.12 mmol, 1.1 Äq), K₂CO₃ (40.0 mg, 0.29 mmol, 2.75 Äq), dest H₂O (0.25 mL) und Pd(PPh₃)₄ (4.0 mg, 4.0 µmol, 0.03 Äq) verwendet. Nach Reinigung mittels HPLC (RP18, H₂O/MeOH 80:20→0:100) wurde das Produkt **207** (8.0 mg, 27.4 µmol, 26 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (s br, 2H, H-12), 7.53 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-3), 7.40 (s br, 2H, H-11), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-6), 6.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7), 5.11 (s, 2H, H-4), 3.82 (s, 3H, H-9) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ 161.0 (d, $J_{\text{CF}} = 250$ Hz, C_q -1), 160.1 (C_q -8), 149.8 (C-12), 138.4 (d, $J_{\text{CF}} = 4$ Hz, C_q -10), 130.0 (C-6), 128.5 (C_q -5), 126.7 (C-3), 120.4 (C-11), 114.6 (C-7), 103.5 (d, $J_{\text{CF}} = 17$ Hz), 56.6 (C-4), 55.5 (C-9) ppm; **$^{19}\text{F NMR}$** (376 MHz, CDCl_3) δ -127.5 (F-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 284.1199, gefunden bei 284.1199 m/z.

2-Fluor-4-(3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)pyridin (**208**)

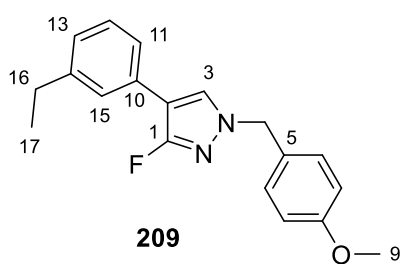
Für die Darstellung von **208** wurden 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (15.0 mg, 52.6 μmol , 1.0 Äq), Dioxan (1.0 mL), (2-Fluorpyridin-4-yl)boronsäure (8.0 mg, 57.9 μmol , 1.1 Äq), K_2CO_3 (19.9 mg, 0.15 mmol, 2.75 Äq), dest H_2O (0.25 mL) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.0 mg, 2.0 μmol , 0.03 Äq) verwendet. Nach Reinigung mittels HPLC (RP18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 80:20 \rightarrow 0:100) wurde das Produkt **208** (15.7 mg, 52.1 μmol , 99 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-12), 7.52 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-3), 7.28-7.23 (m, 3H, H-6/11), 6.99 (s br, 1H, H-14), 6.95-6.89 (m, 2H, H-7), 5.12 (s, 1H, H-4), 3.82 (s, 3H, H-9) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ 164.7 (d, $J_{\text{CF}} = 237$ Hz, C_q -13), 160.9 (d, $J_{\text{CF}} = 250$ Hz, C_q -1), 160.1 (C_q -8) 148.2 (d, $J_{\text{CF}} = 16$ Hz, C-12), 143.2 (dd, $J_{\text{CF}} = 9, 5$ Hz, C_q -10), 130.1 (C-6), 128.7 (C_q -5), 126.5 (C-3), 117.8 (t, $J_{\text{CF}} = 2$ Hz, C-11), 114.6 (C-7), 105.2 (dd, $J_{\text{CF}} = 39, 4$ Hz, C-14), 103.0 (dd, $J_{\text{CF}} = 17, 4$ Hz, C_q -2) 56.6 (C-4), 55.5 (C-9) ppm; **$^{19}\text{F NMR}$** (376 MHz, CDCl_3) δ -67.9 (F-13), -127.4 (C-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 302.1105, gefunden bei 302.1106 m/z.

4-(3-Ethylphenyl)-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (209)

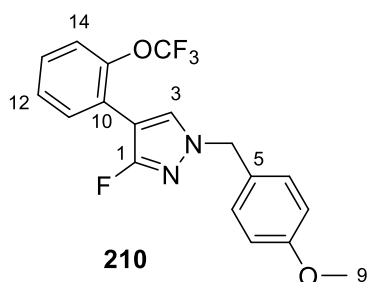
Für die Darstellung von **209** wurden 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (15.0 mg, 52.6 μmol , 1.0 Äq), Dioxan (1.0 mL), (3-Ethylphenyl)boronsäure (8.7 mg, 57.9 μmol , 1.1 Äq), K_2CO_3 (19.9 mg, 0.15 mmol, 2.75 Äq), dest H_2O (0.25 mL) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.0 mg, 2.0 μmol , 0.03 Äq) verwendet. Nach Reinigung mittels HPLC (RP18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 80:20 \rightarrow 0:100) wurde das Produkt **209** (7.0 mg, 21.6 μmol , 41 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H; H-3), 7.32-7.22 (m, 5H, H-6/11/12/15), 7.07 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-13), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7), 5.10 (s, 2H, H-4), 3.81 (s, 3H, H-9), 2.65 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-16), 1.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.6 (d, $J_{\text{CF}} = 248$ Hz, C_q -1), 159.8 (C_q -8), 144.9 (C_q -14), 130.1 (d, $J_{\text{CF}} = 5$ Hz, C_q -10), 129.7 (C-6), 128.9 (C-12), 127.7 (C-13), 127.5 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-15), 126.3 (C_q -5), 125.57 (d, $J_{\text{CF}} = 3$ Hz, C-3), 123.4 (d, $J_{\text{CF}} = 3$ Hz, C-11), 114.5 (C-7), 106.2 (d, $J_{\text{CF}} = 17$ Hz, C_q -2), 56.2 (C-4), 55.5 (C-9), 29.1 (C-16), 15.8 (C-17) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 311.1560, gefunden bei 311.1562 m/z.

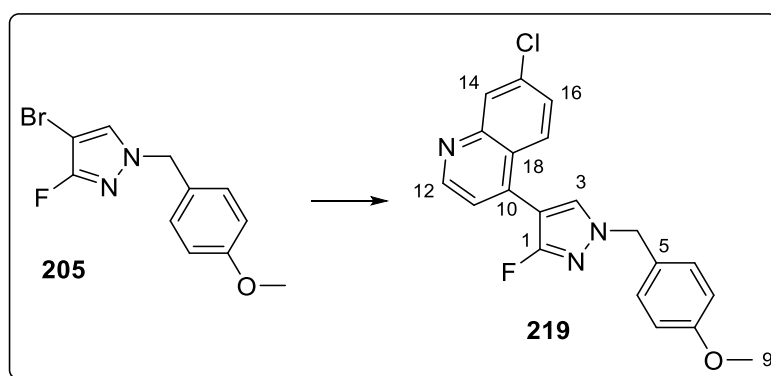
3-Fluor-1-(4-methoxybenzyl)-4-(2-(trifluormethoxy)phenyl)-1H-pyrazol (210)

Für die Darstellung von **210** wurden 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (15.0 mg, 52.6 μmol , 1.0 Äq), Dioxan (1.0 mL), (2-(Trifluormethoxy)phenyl)boronsäure (11.9 mg, 57.9 μmol , 1.1 Äq), K_2CO_3 (19.9 mg, 0.15 mmol, 2.75 Äq), dest H_2O (0.25 mL) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.0 mg, 2.0 μmol , 0.03 Äq) verwendet. Nach Reinigung mittels HPLC (RP18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 80:20 \rightarrow 0:100) wurde das Produkt **210** (4.5 mg, 12.1 μmol , 23 %) als farbloser Feststoff erhalten.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (dt, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H-11), 7.54 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-3), 7.33-7.21 (m, 5H, H-6/12/13/14), 6.95-6.86 (m, 2H, H-7), 5.12 (s, 2H, H-4), 3.81 (s, 3H, H-9) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ 167.8-167.1 (m, C_q -15), 160.9 (d, $J_{\text{CF}} = 248$ Hz, C_q -1), 159.9 (C_q -8), 130.17 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-11), 129.9 (d, $J_{\text{CF}} = 3$ Hz, C-3), 129.7 (C-6), 129.7 (C-13), 129.6 (C-12), 129.3 (q, $J_{\text{CF}} = 251$ Hz, C_q -16), 127.3 (m, C_q -10), 127.2 (C_q -5), 120.9 (q, $J_{\text{CF}} = 2$ Hz, C-14), 114.5 (C-7), 100.2 (d, $J_{\text{CF}} = 17$ Hz, C_q -2), 56.3 (C-4), 55.5 (C-9) ppm; **$^{19}\text{F NMR}$** (376 MHz, CDCl_3) δ -56.9 (F- OCF_3), -56.9 (F- OCF_3), -67.9 (F-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 389.0889, gefunden bei 389.0887 m/z.

7-Chlor-4-(3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)chinolin (219)



Zu einer Lösung von 4-Brom-3-fluor-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol (15.0 mg, 52.6 μmol , 1.0 Äq) in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 2 mL) wurden nacheinander 7-Chlor-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)chinolin (16.8 mg, 57.9 μmol , 1.1 Äq.), K_2CO_3 (19.9 mg, 0.15 mmol, 2.75 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.00 mg, 2.0 μmol , 0.03 Äq) gegeben und das Gemisch für 12 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde deion. H_2O (10 mL) hinzugegeben und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc 10:1 \rightarrow 1:1) wurde das Produkt **219** (10.8 mg, 29.5 μmol , 56 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-12), 8.17 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-3), 7.95 (dd, $J = 9.0, 1.7$ Hz, 1H, H-17), 7.53 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 1H, H-16), 7.50 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-

14), 7.37 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-11), 7.36-7.31 (m, 2H, H-6), 7.00-6.93 (m, 2H, H-7), 5.22 (s, 2H, H-4), 3.84 (s, 3H, H-9) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.41 (d, $J_{\text{CF}} = 249$ Hz, C_q -1), 160.0 (C_q -8), 150.8 (C-12), 148.9 (C_q -13), 136.6 (d, $J_{\text{CF}} = 3$ Hz, C_q -10), 135.6 (C_q -15), 130.3 (C-14), 129.9 (C-6), 128.7 (C-17), 127.9 (C_q -5), 126.6 (d, $J_{\text{CF}} = 1$ Hz, C-3), 126.6 (C-16), 124.7 (C_q -18), 121.5 (C-11), 114.5 (C-7), 101.9 (d, $J_{\text{CF}} = 20$ Hz), 56.5 (C-4), 55.4 (C-9) ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -129.2 (F-1) ppm; **ESI-MS (HRMS)** berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClFN}_3\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 390.0785, gefunden bei 390.0785 m/z.

8 ANHANG

8.1 SPEKTRENANHANG ZU KAPITEL 4

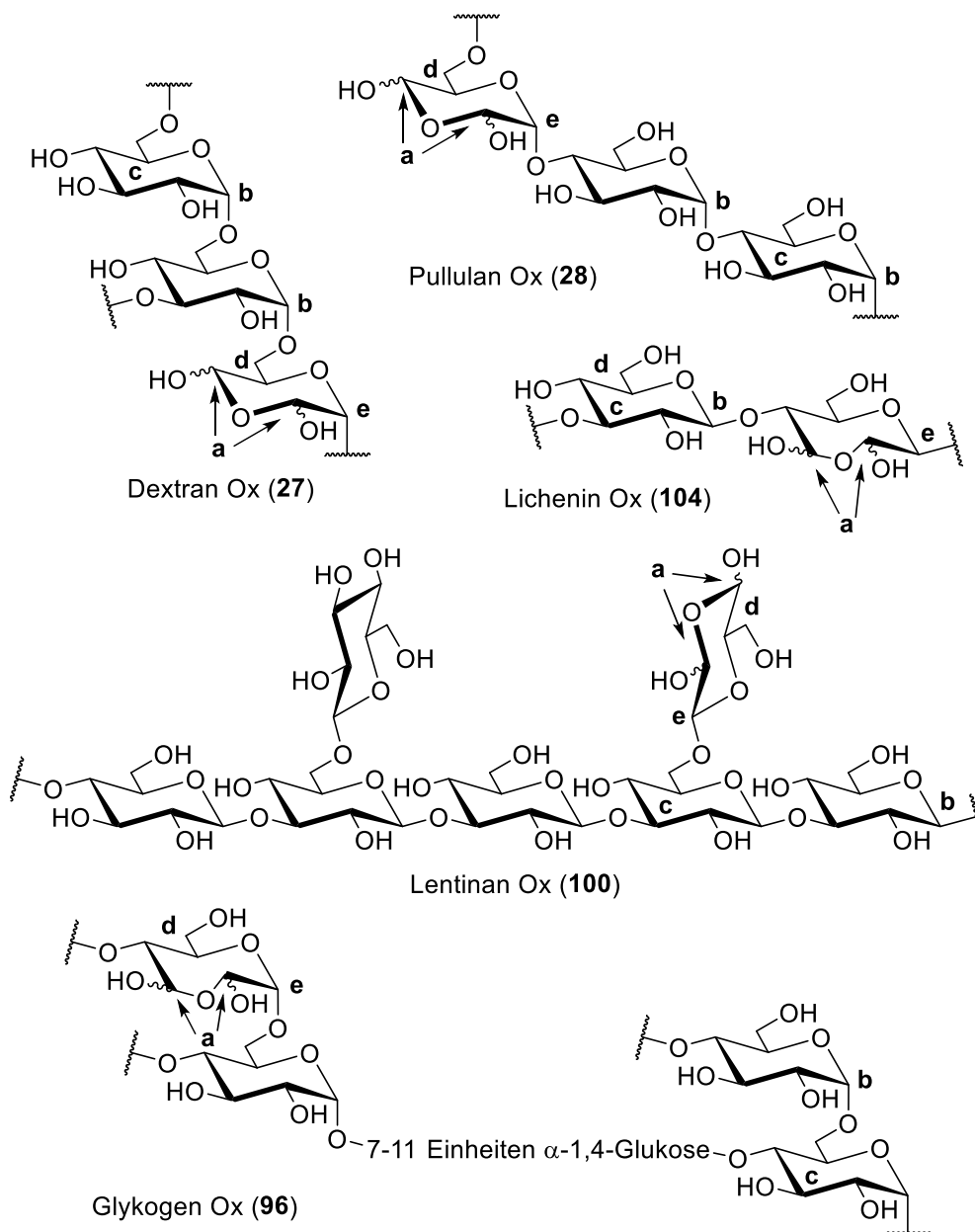
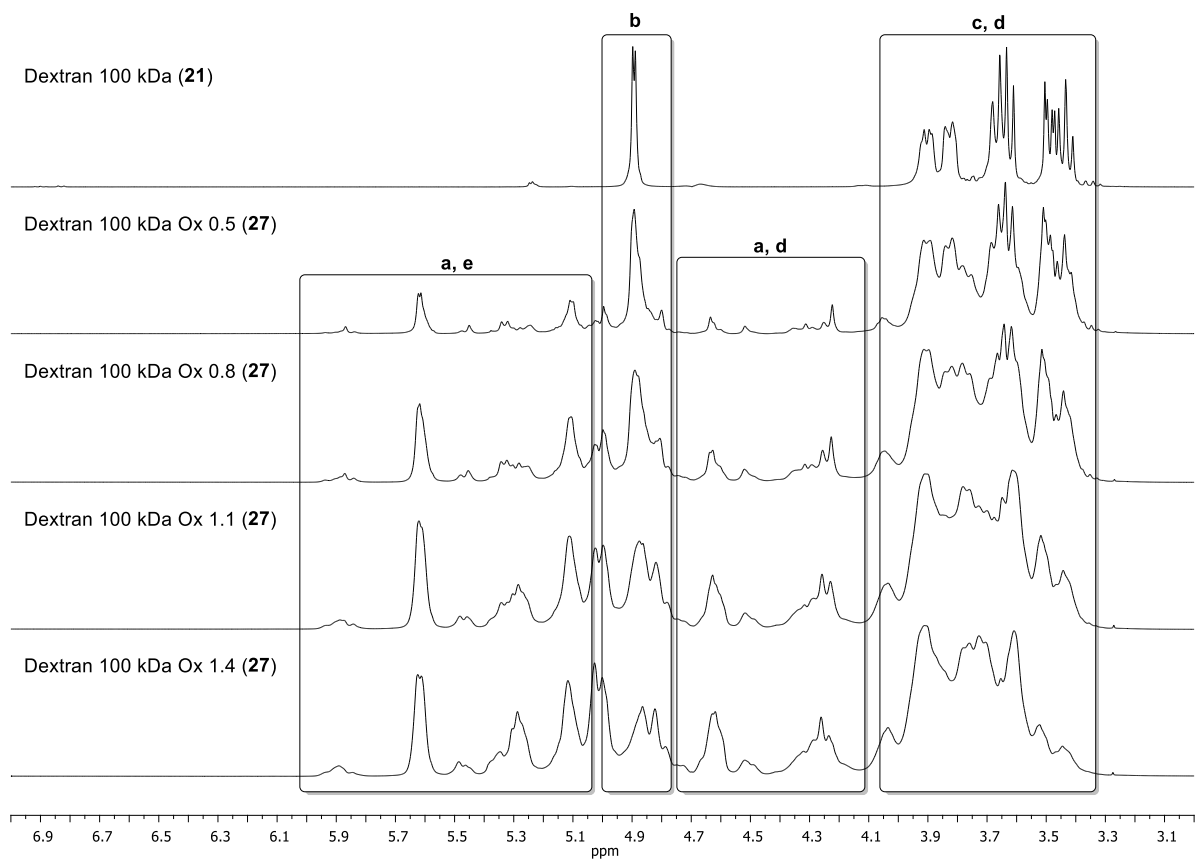
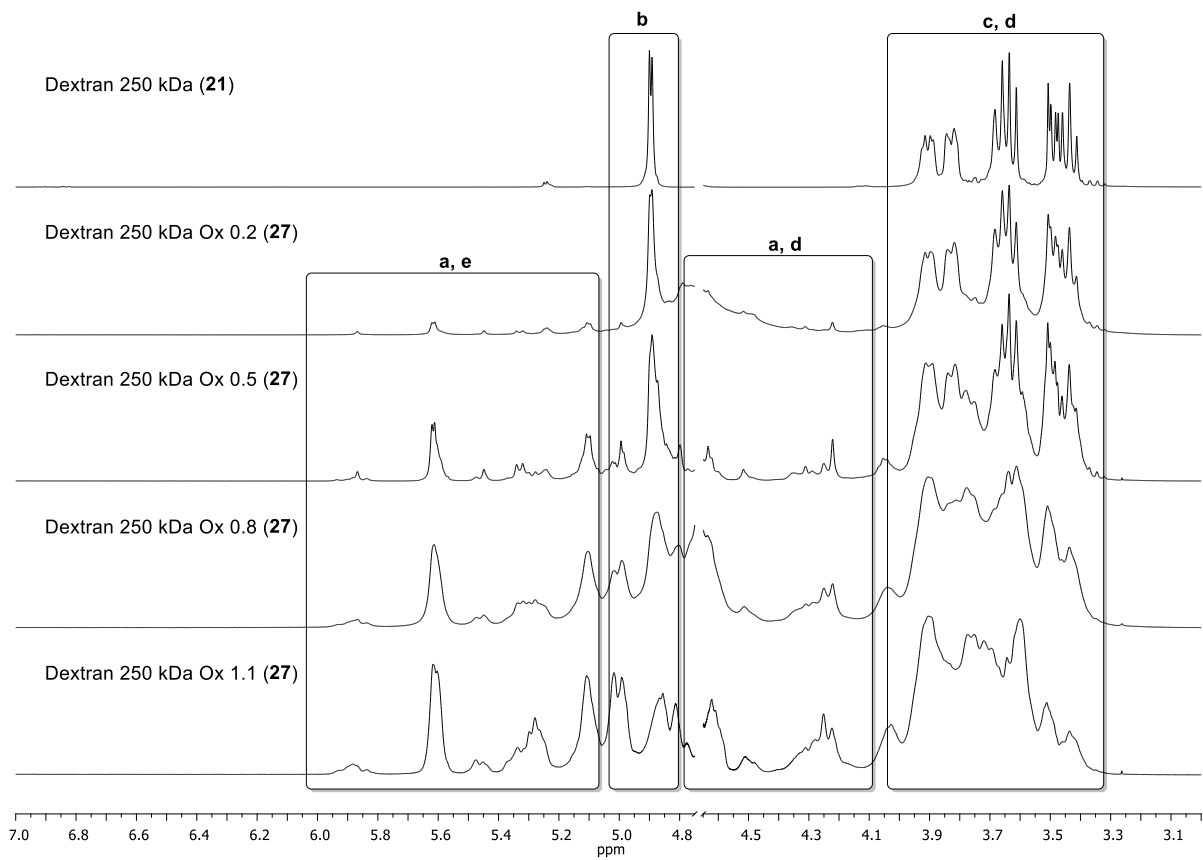
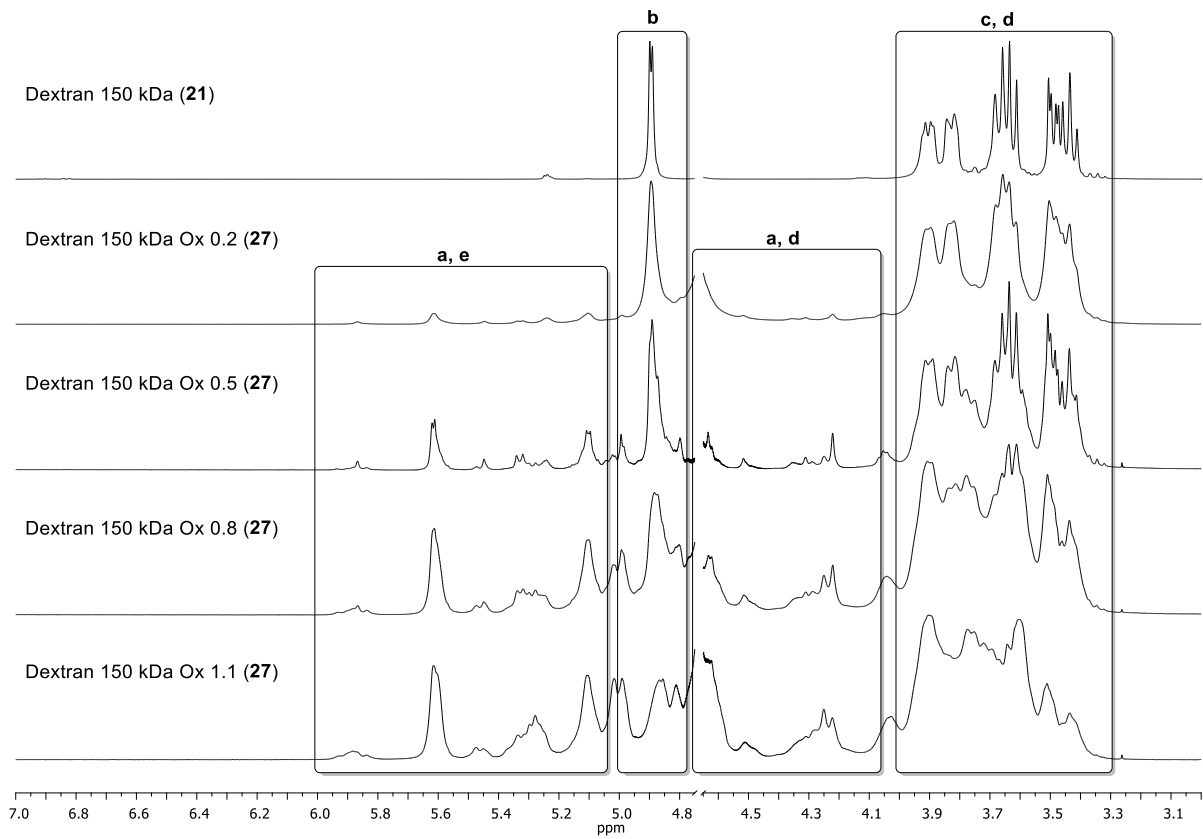


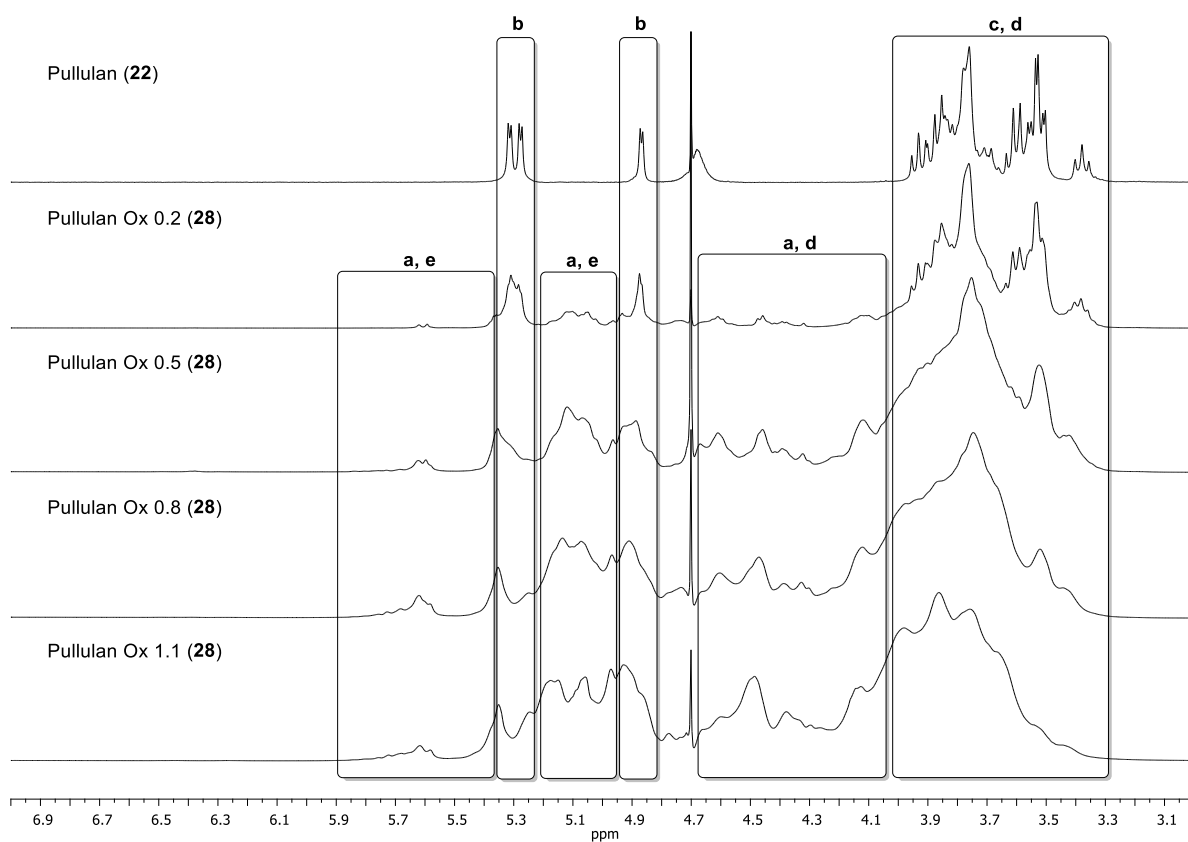
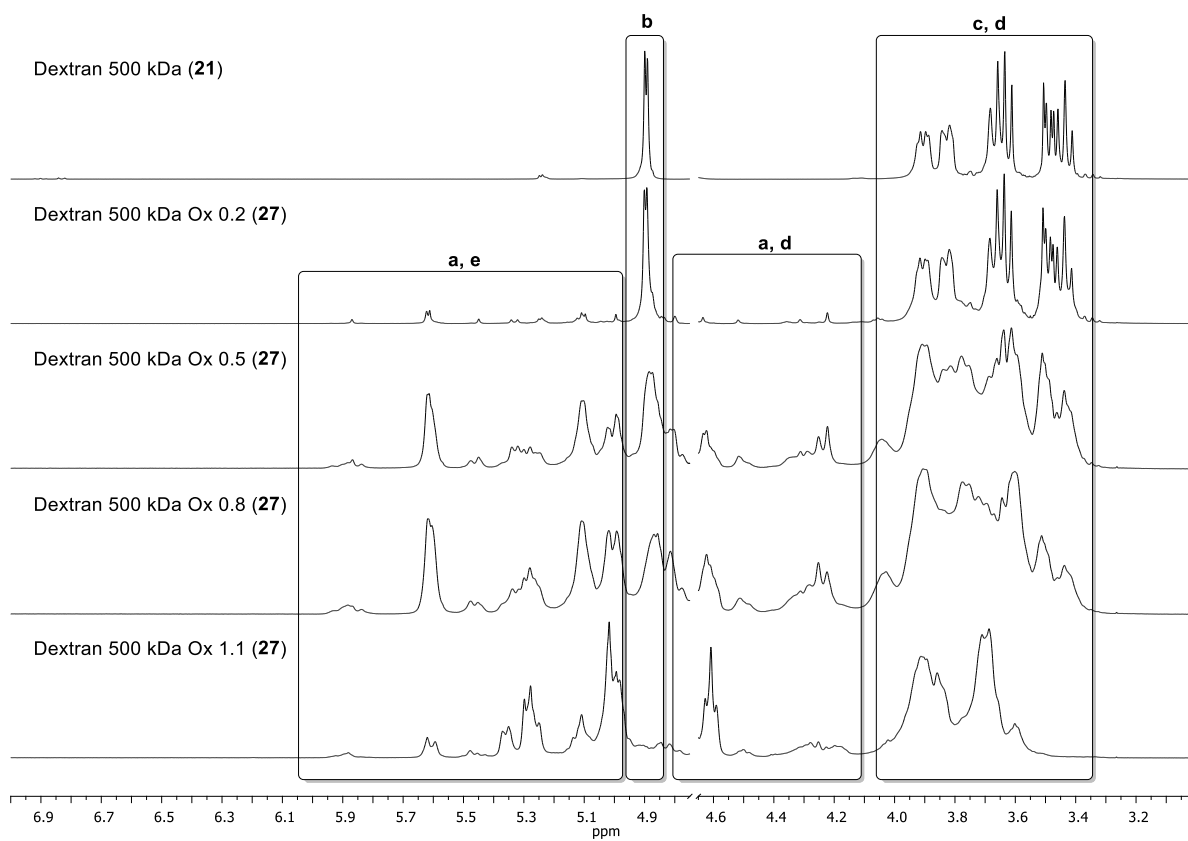
Abbildung 129: Liste der oxidierten Polysaccharide, die gemäß Kapitel 4 dargestellt wurden. Um die vorgenommene Modifizierung zu verdeutlichen, sind Ausschnitte der Polysaccharide mit je einer modifizierten glykosidischen Einheit dargestellt.

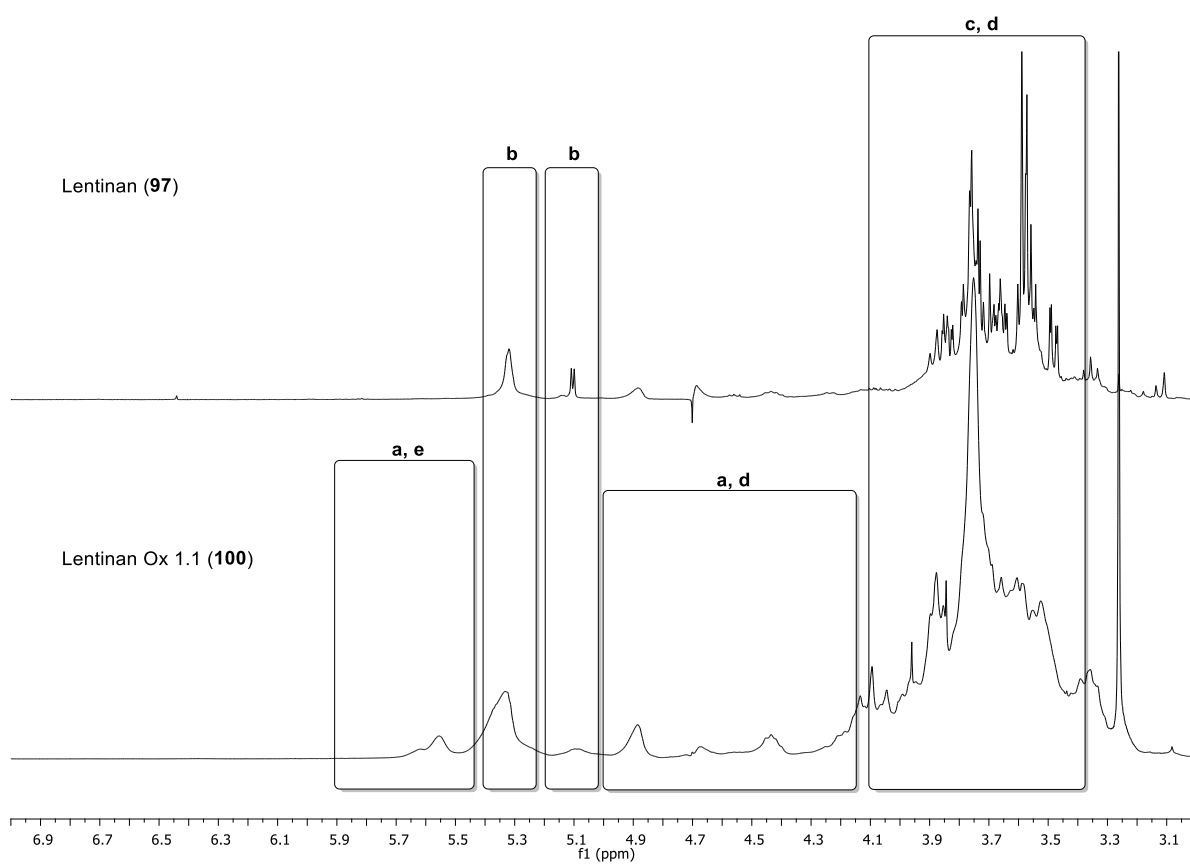
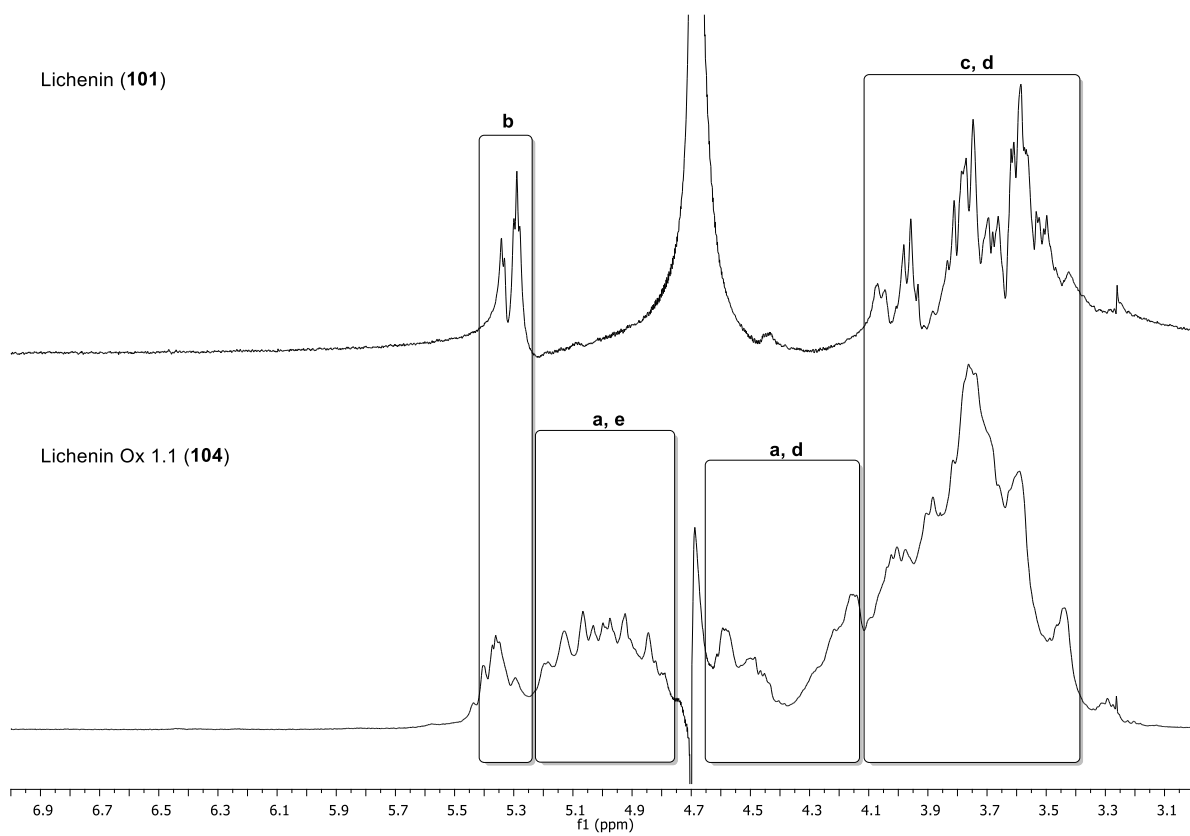
Im Folgenden sind Spektren der oxidierten Polysaccharide gelistet. In diesen befinden sich hervorgehobene Bereiche, die mit den Symbolen **a-e** beschriftet sind. Dabei schlüsselt sich die Symbolik wie folgt auf: **a)** repräsentiert die Protonen der gebildeten Aldehyd-Hydrate; **b)** repräsentiert die anomeren Protonen der nicht modifizierten glykosidischen Einheiten,

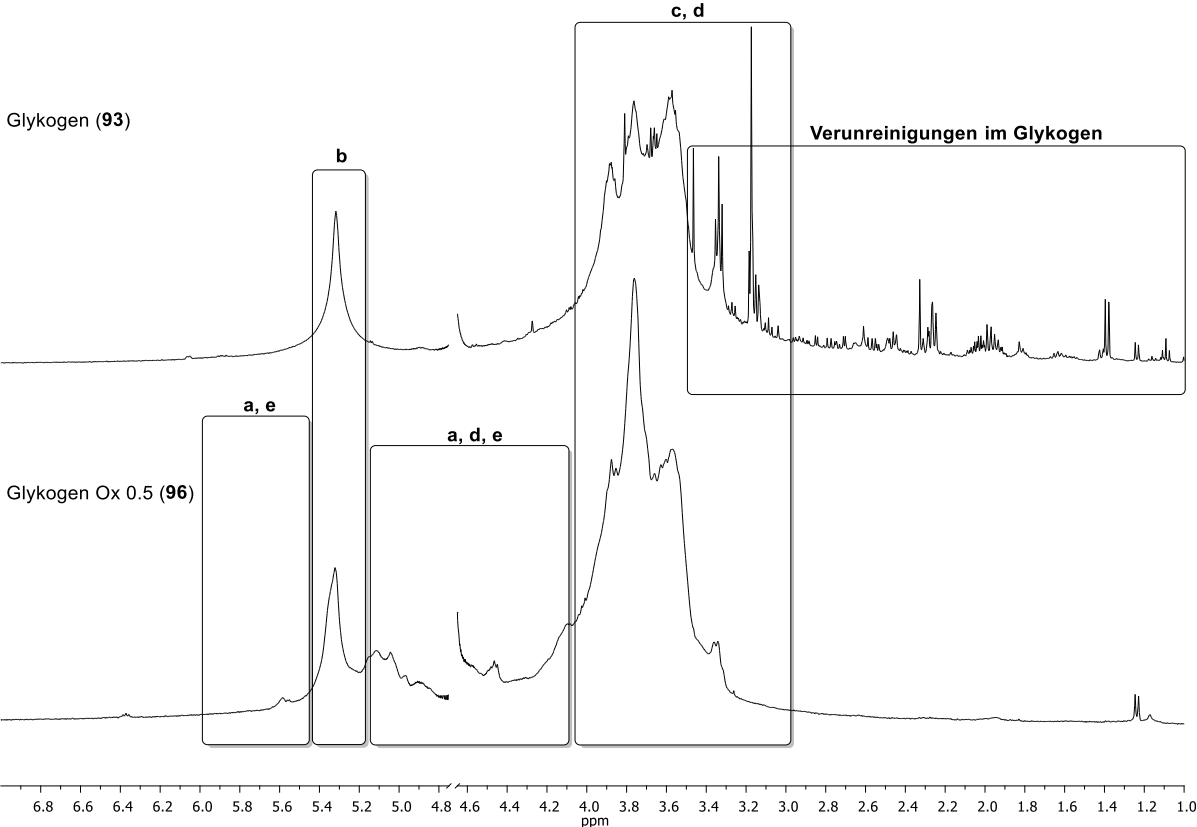
wobei diese Signale mit fortschreitender Modifizierung von anderen überlagert werden; **c)** repräsentiert die Protonen der Position 2-6 nach Zuckernomenklatur der nichtmodifizierten glykosidischen Einheiten; **d)** repräsentiert die Protonen der modifizierten glykosidischen Einheiten mit Ausnahme der in **a** und **e** genannten; **e)** repräsentiert die Protonen der modifizierten glykosidischen Einheiten.











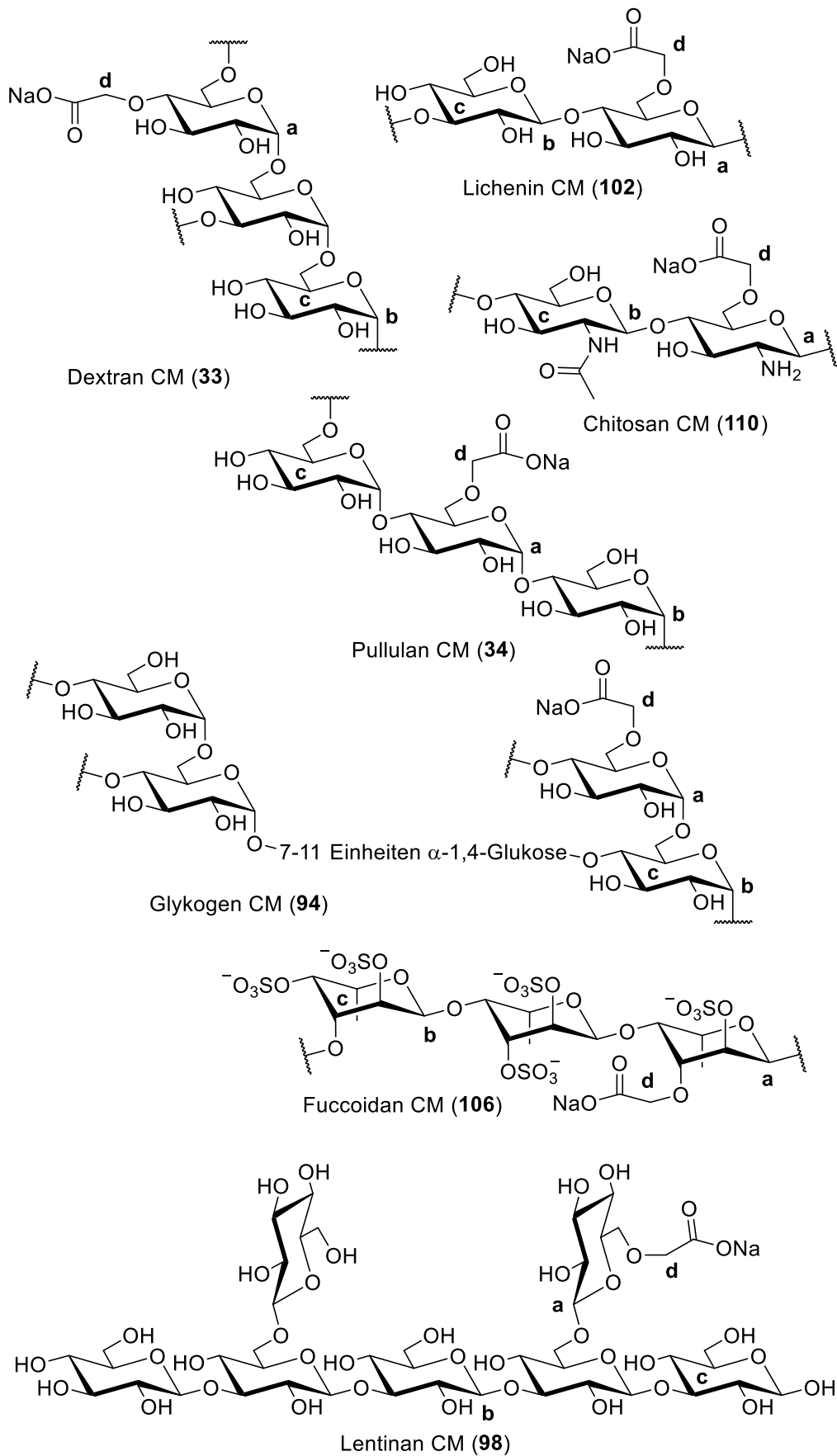
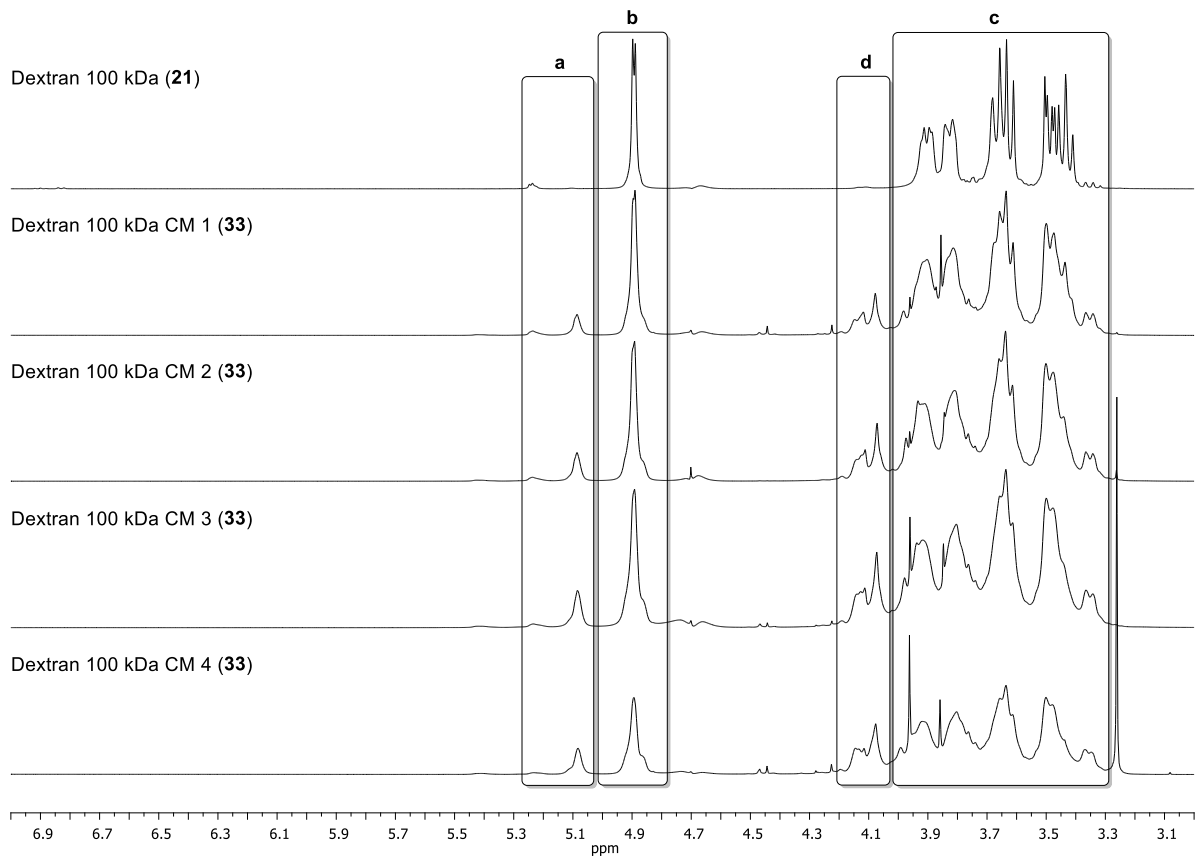
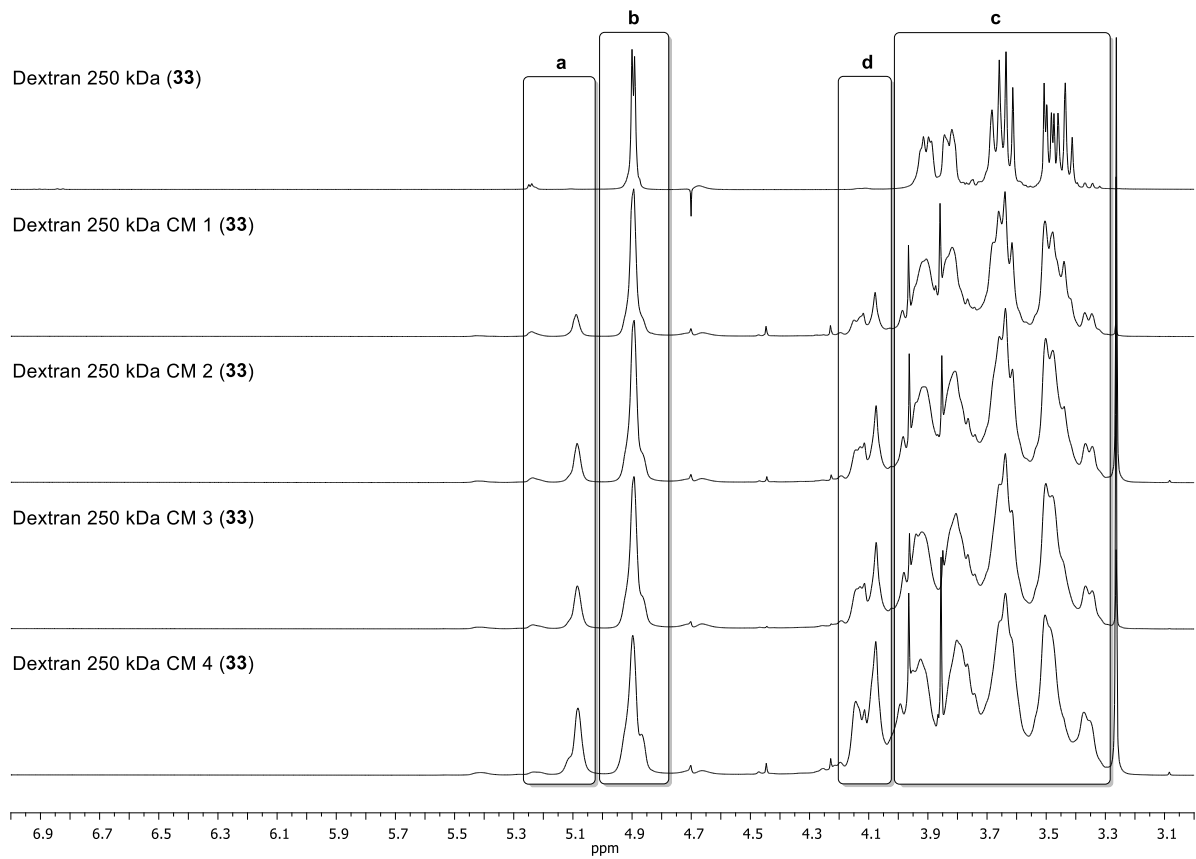
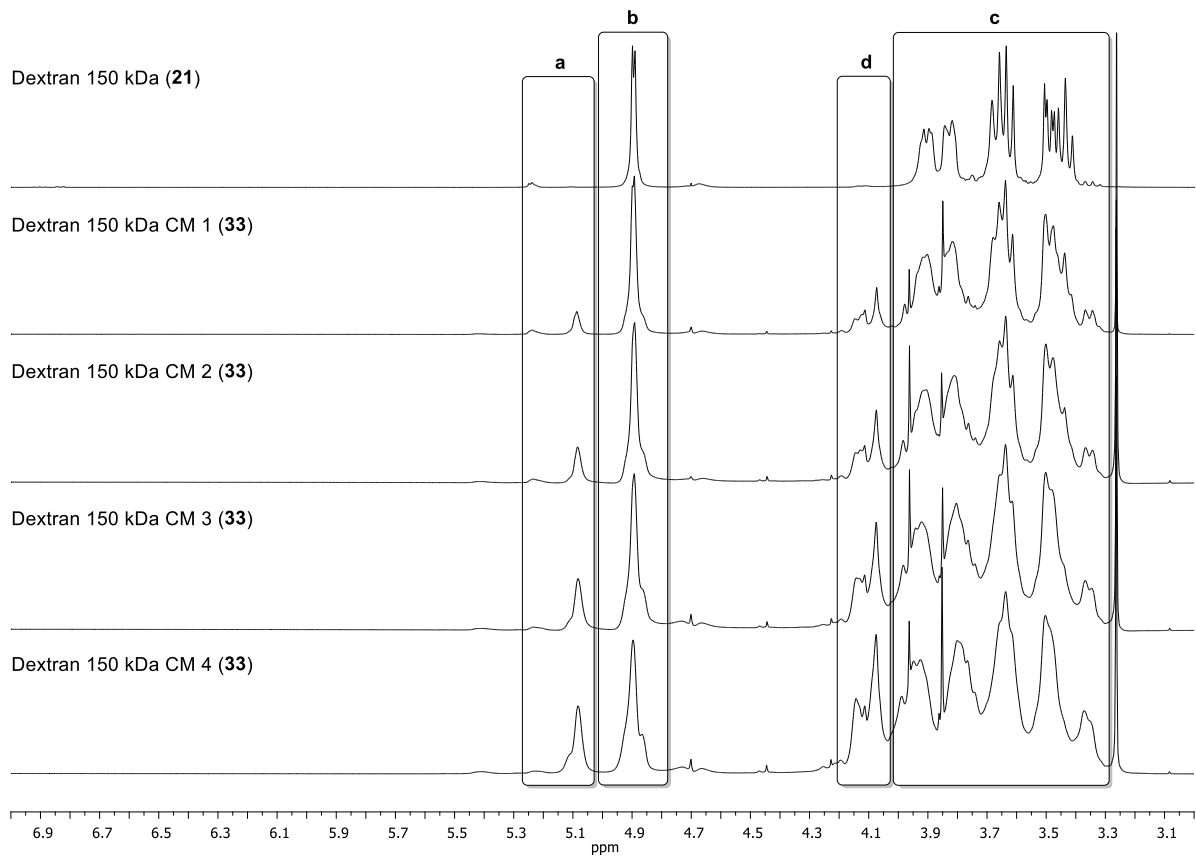
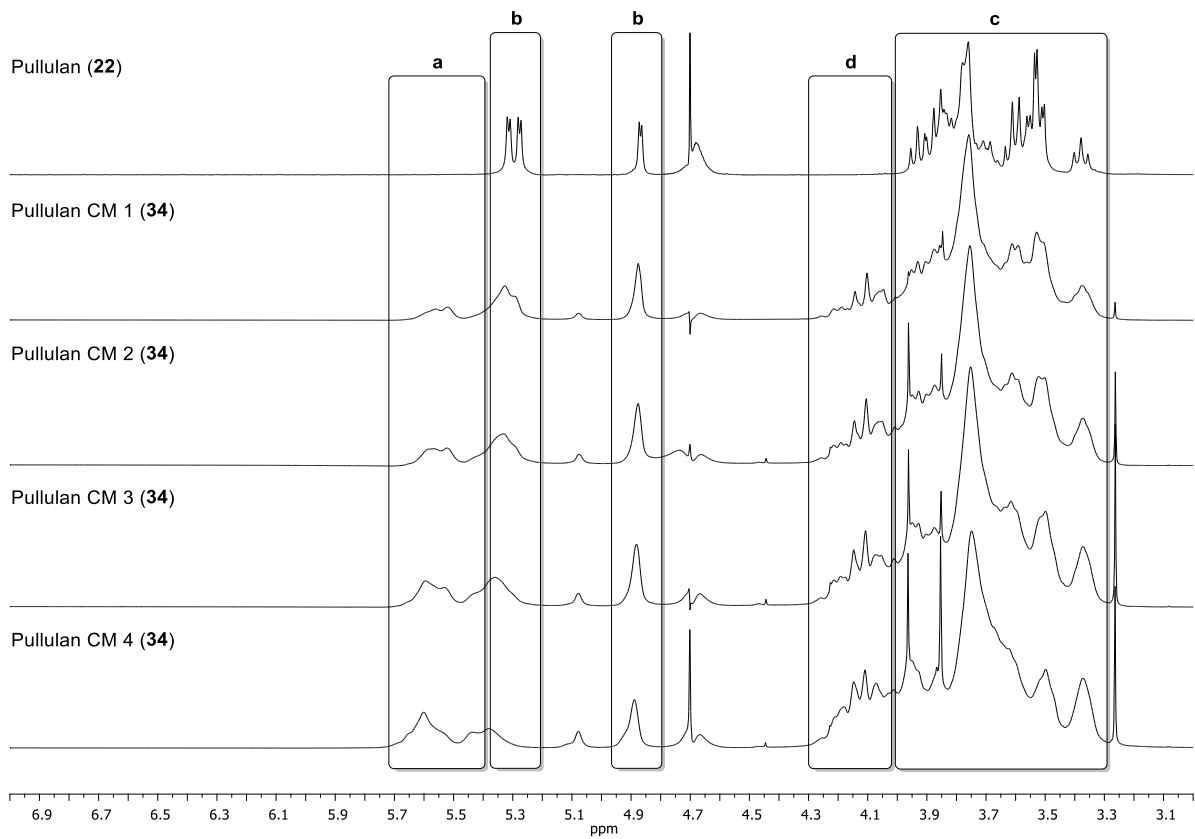
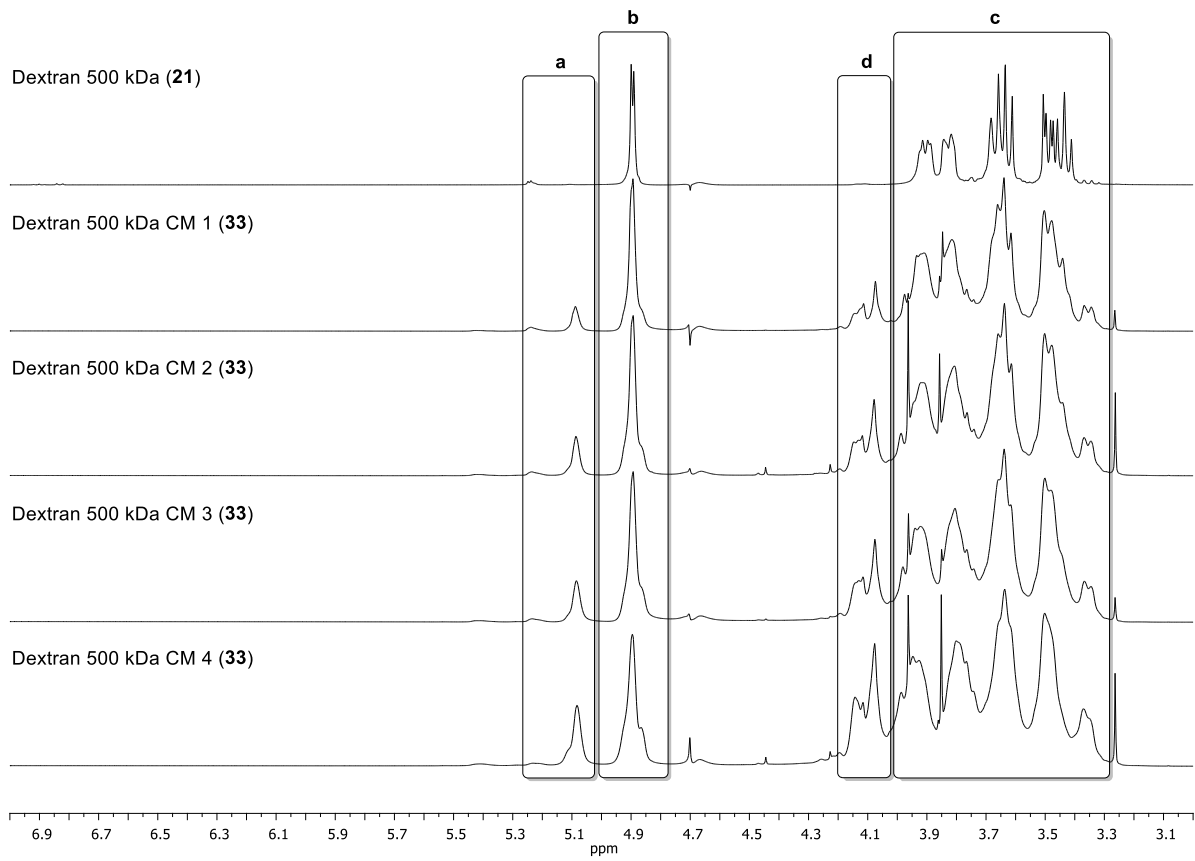


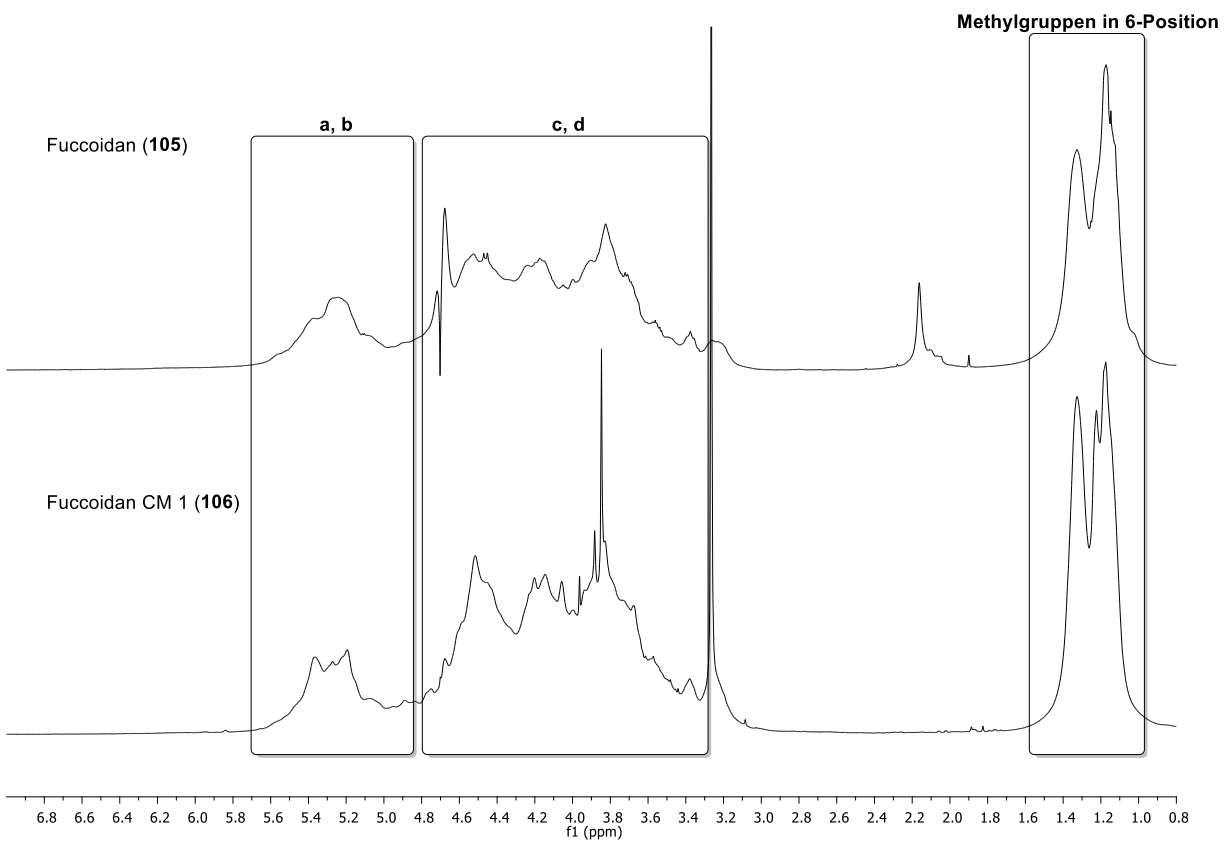
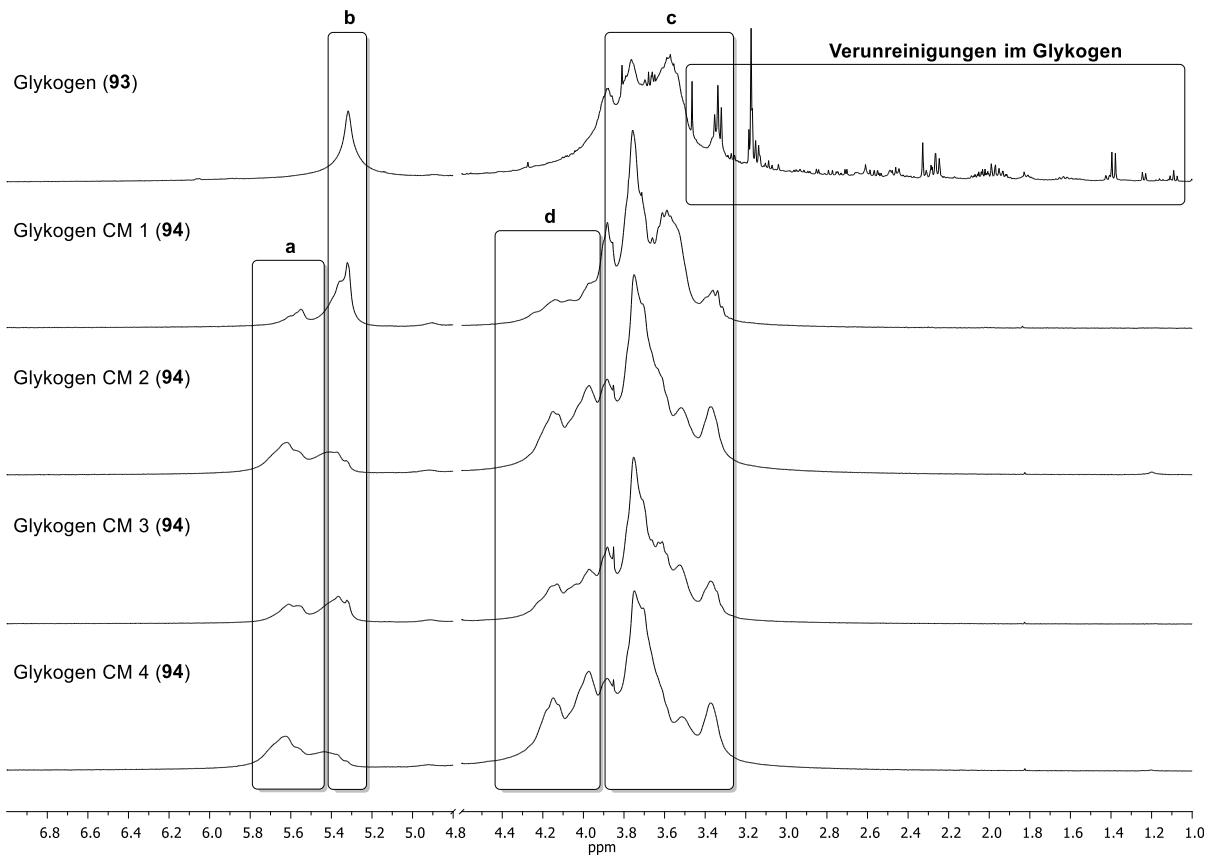
Abbildung 130: Liste der carboxymethylierten Polysaccharide, die gemäß Kapitel 4 dargestellt wurden. Um die vorgenommene Modifizierung zu verdeutlichen sind Ausschnitte der Polysaccharide mit je einer modifizierten glykosidischen Einheit dargestellt.

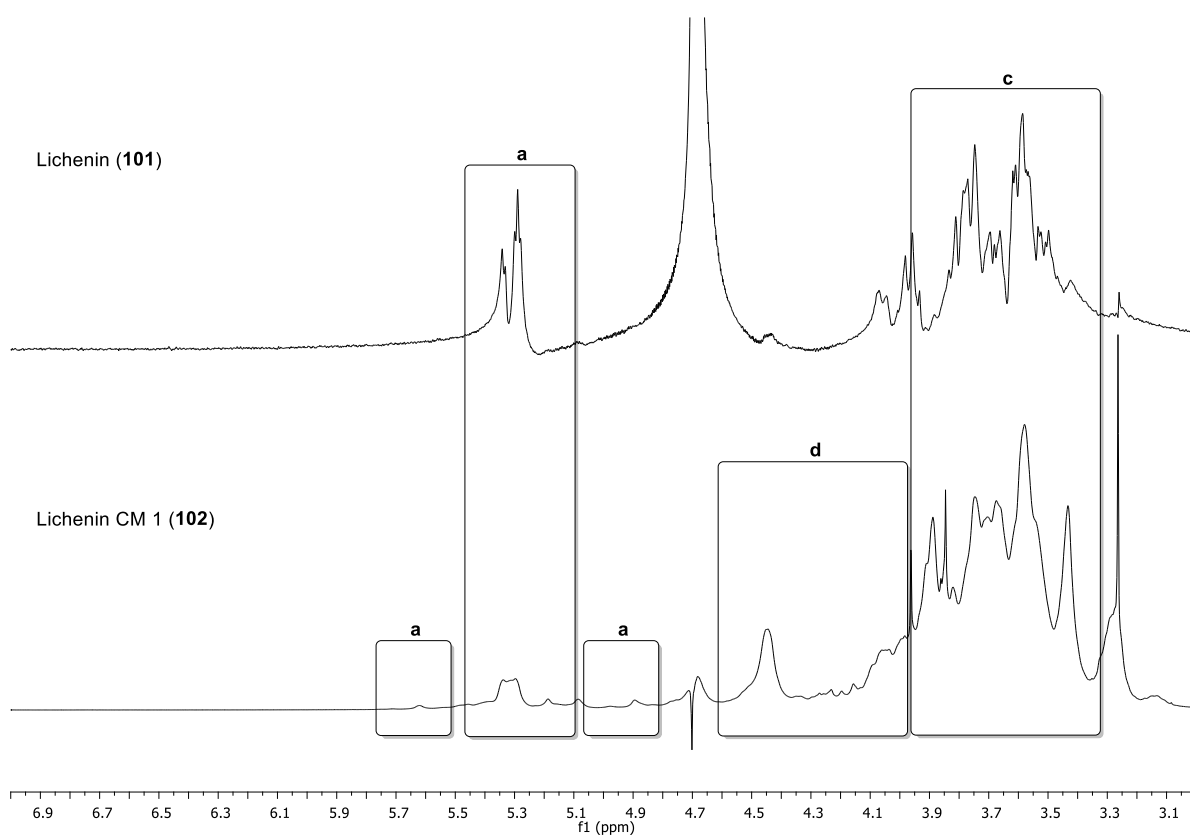
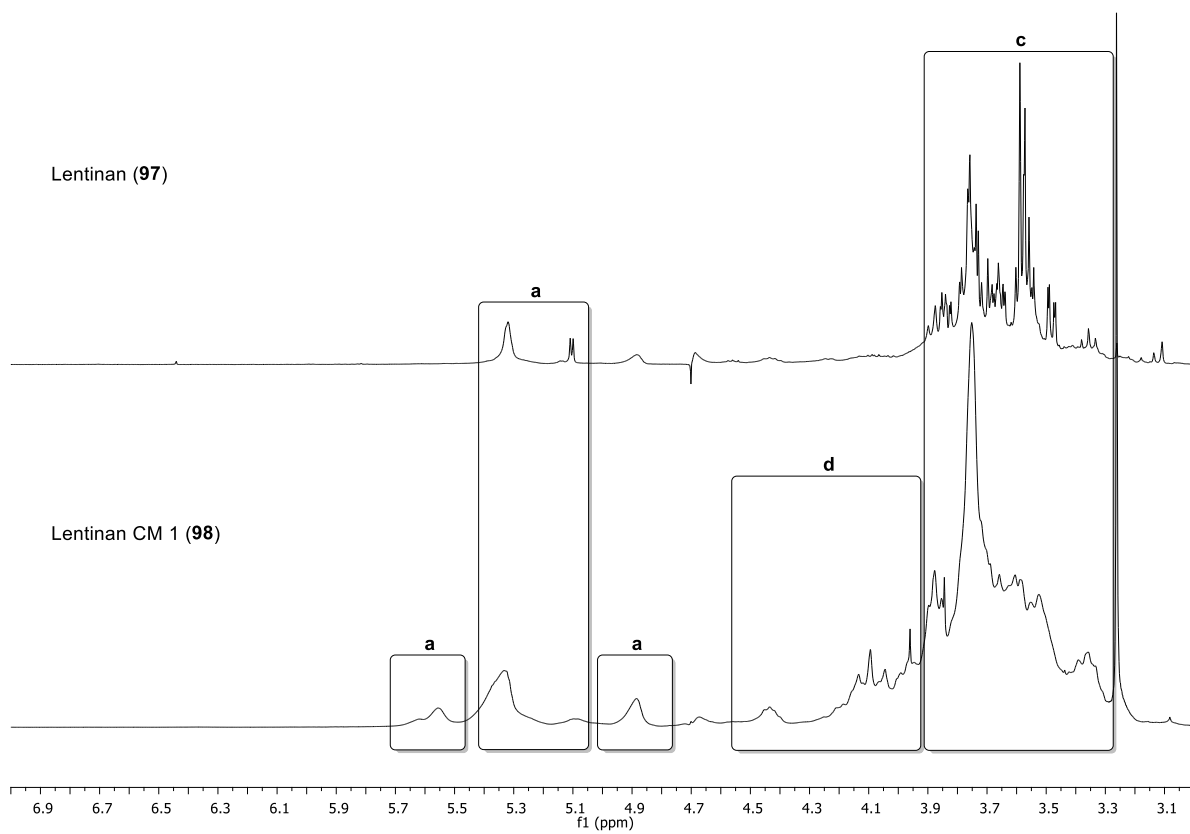
Im Folgenden sind Spektren der carboxymethylierten Polysaccharide gelistet. In diesen befinden sich hervorgehobene Bereiche, die mit den Symbolen **a-d** beschriftet sind. Dabei schlüsselt sich die Symbolik wie folgt auf: **a)** repräsentiert die anomeren Protonen der modifizierten glykosidischen Einheiten; **b)** repräsentiert die anomeren Protonen der nicht modifizierten glykosidischen Einheiten, wobei diese Signale mit fortschreitender Modifizierung von anderen überlagert wird; **c)** repräsentiert die Protonen der Position 2-6 nach Zuckernomenklatur der modifizierten und nichtmodifizierten glykosidischen Einheiten; **d)** repräsentiert die Protonen der substituierten Essigsäurereste. Auf die Darstellung der Protonenspektren von Hydrazid-modifizierten Polysacchariden wurde aufgrund der Ähnlichkeit zu denen der carboxymethylierten Polysaccharide verzichtet.

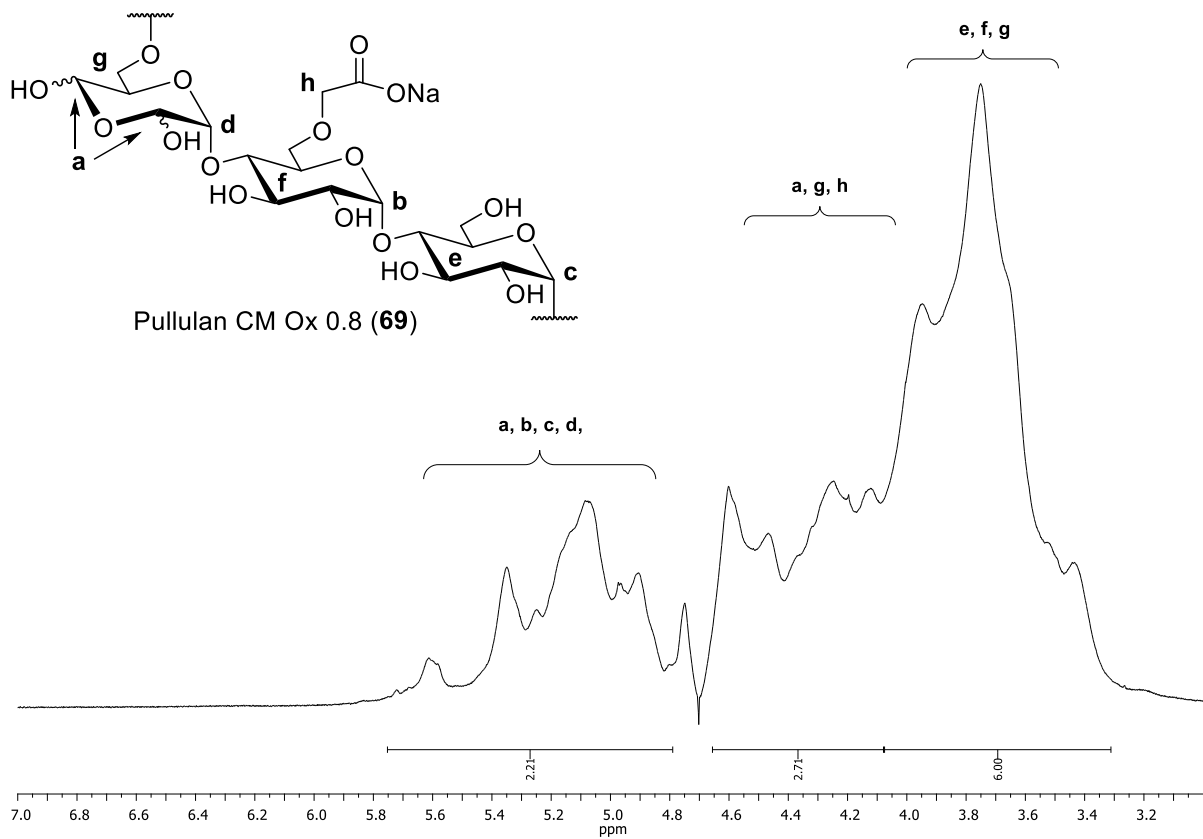
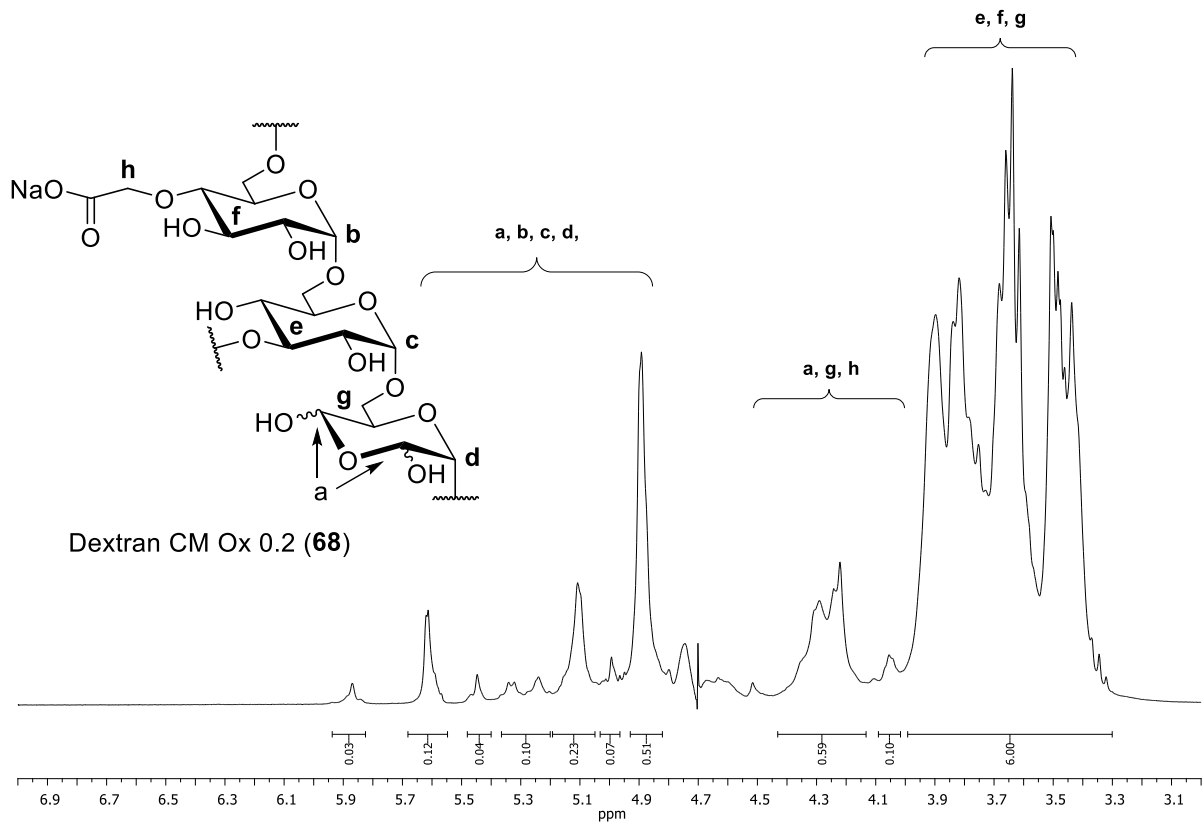


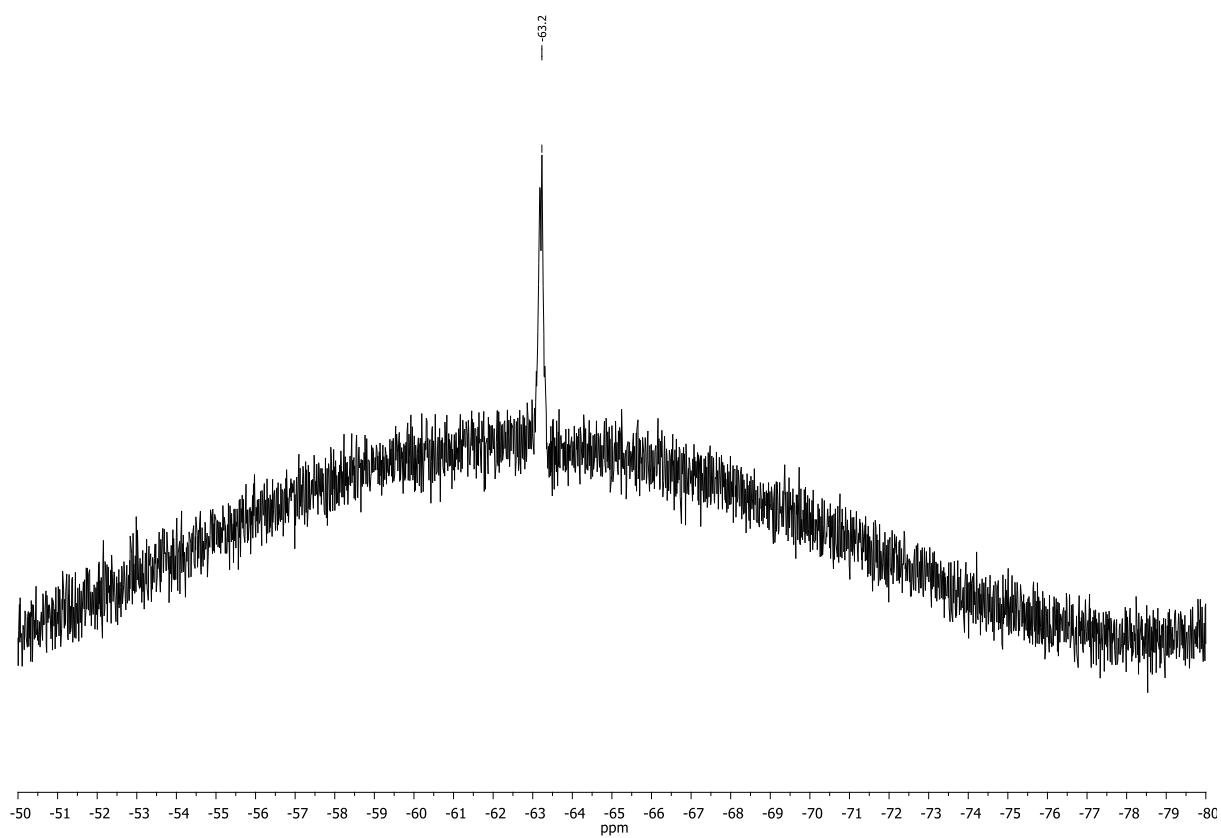
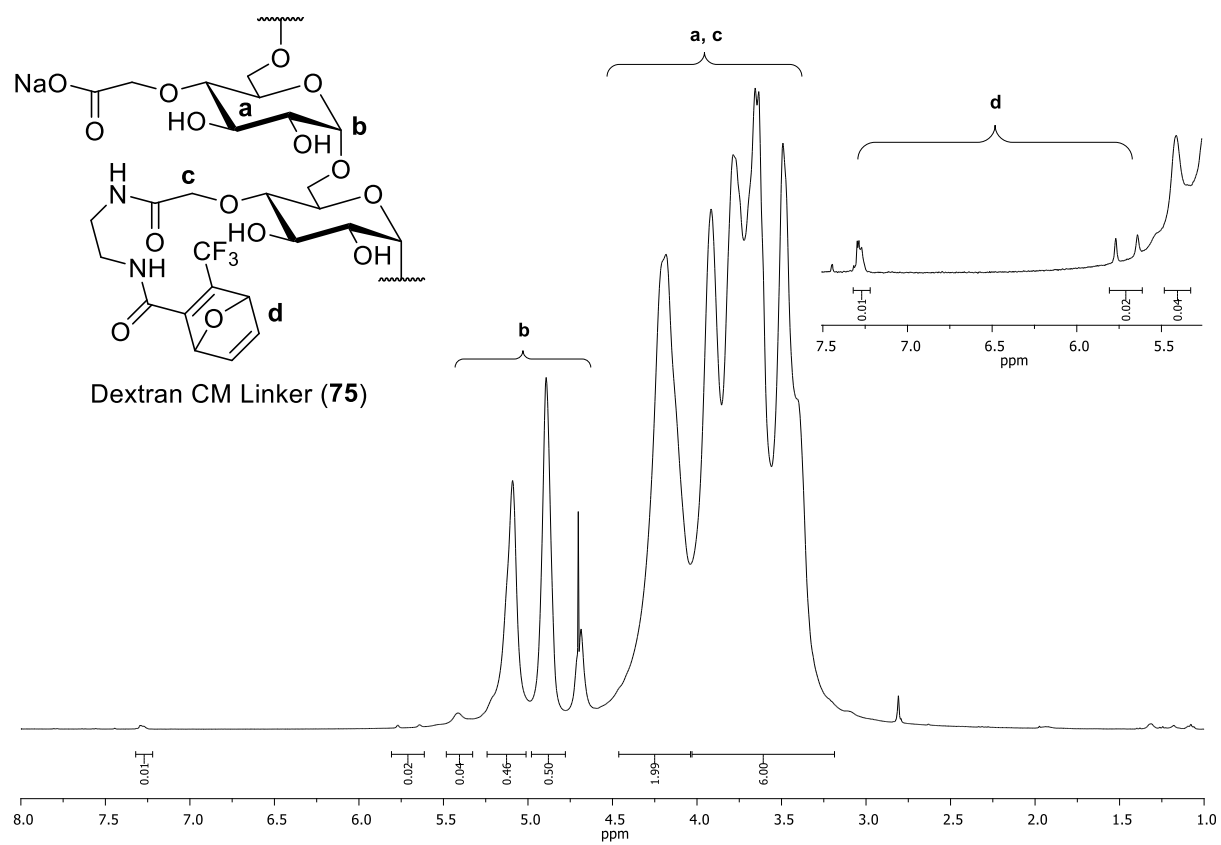


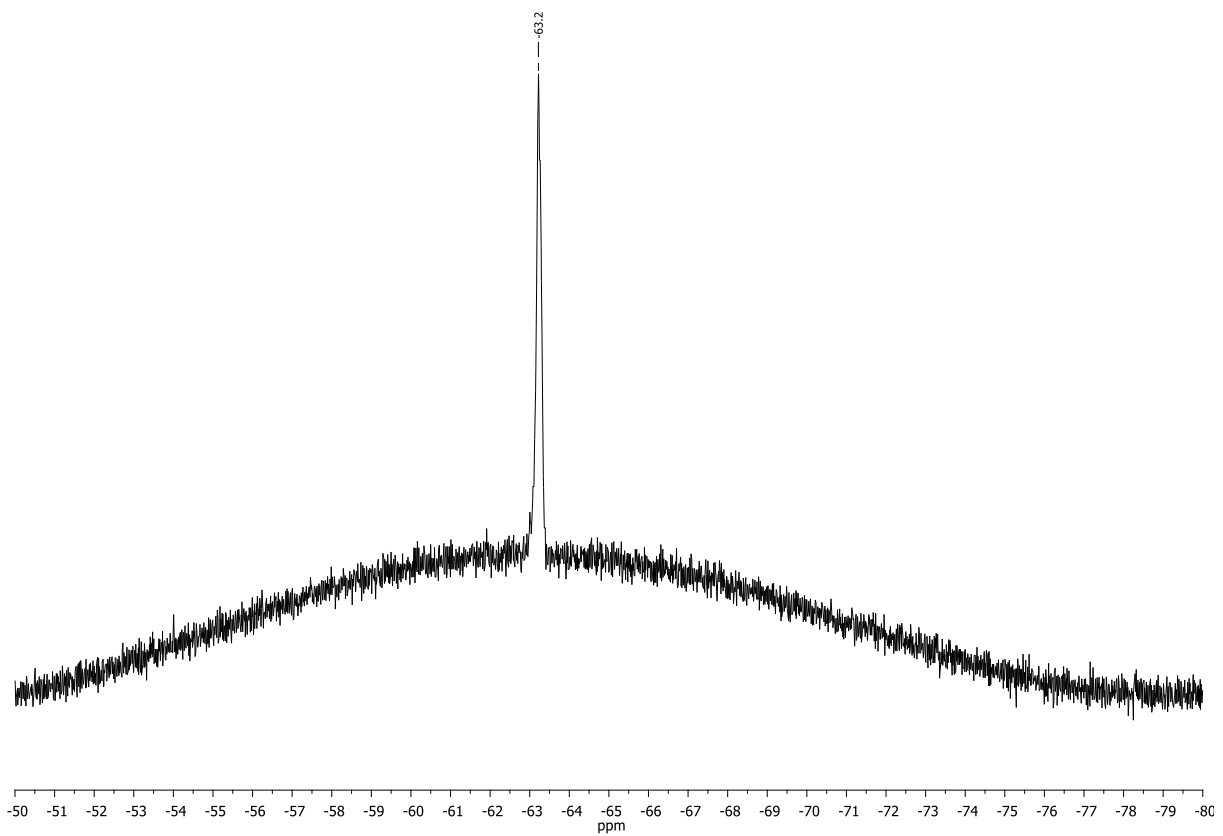
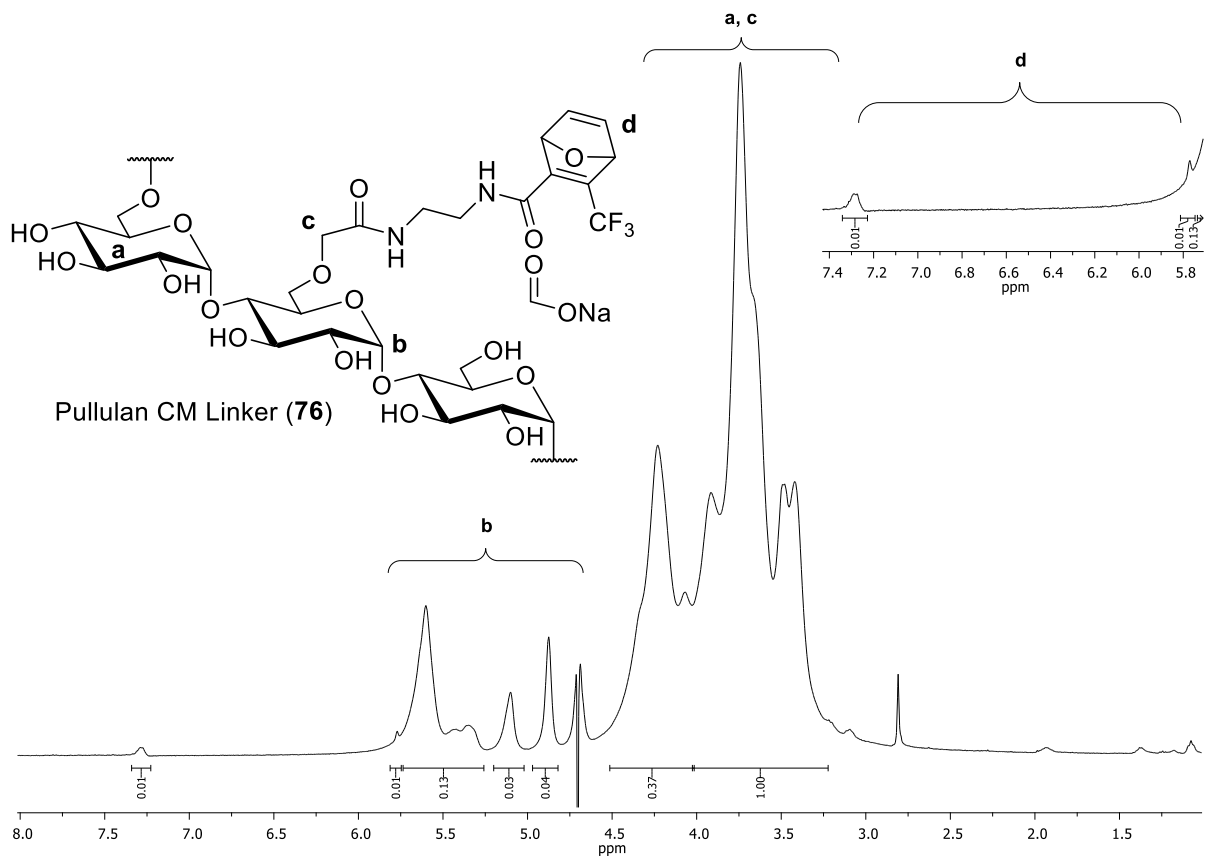


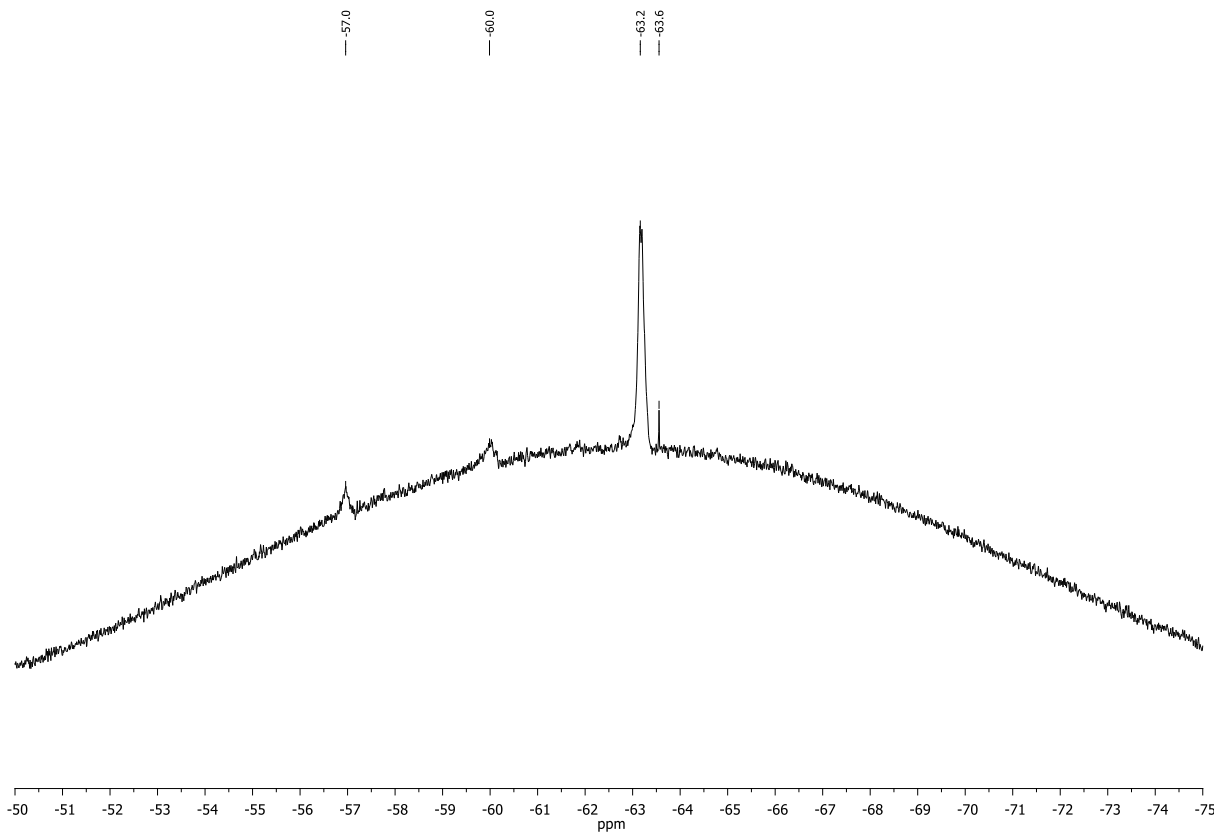
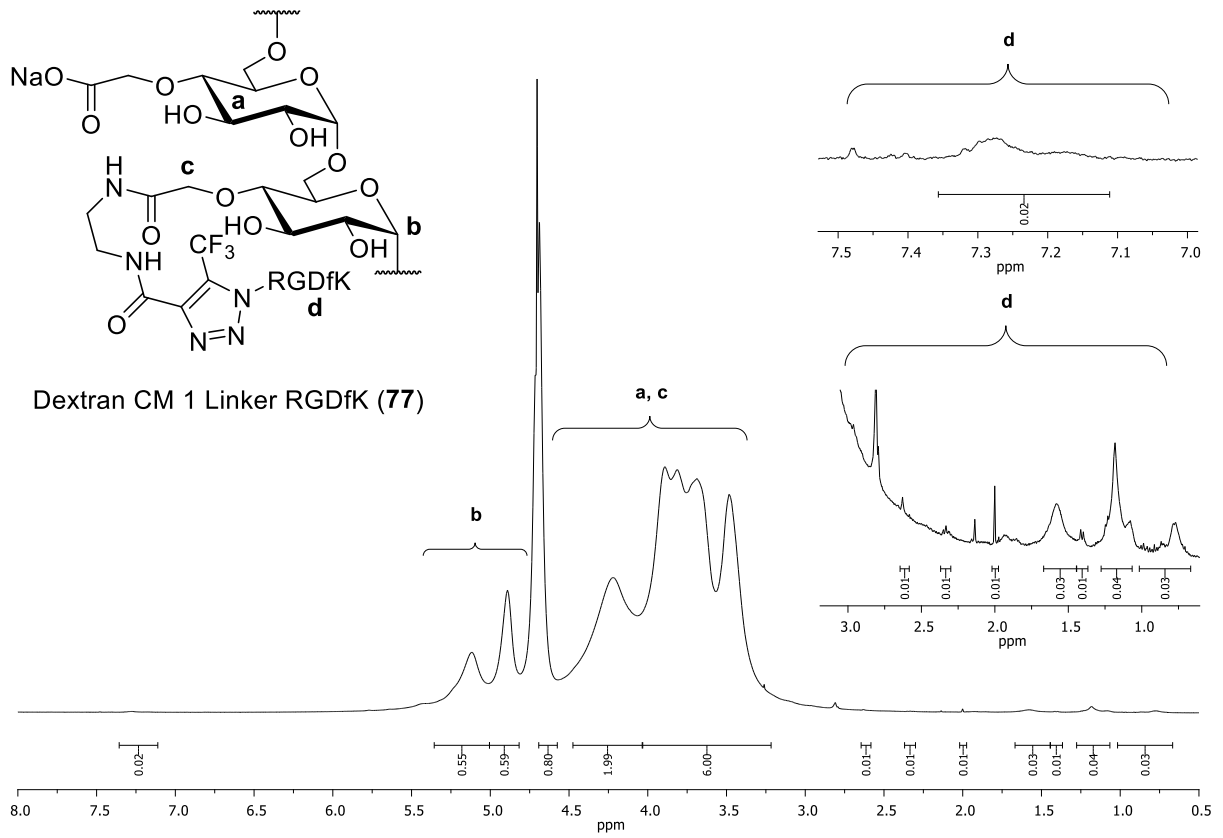


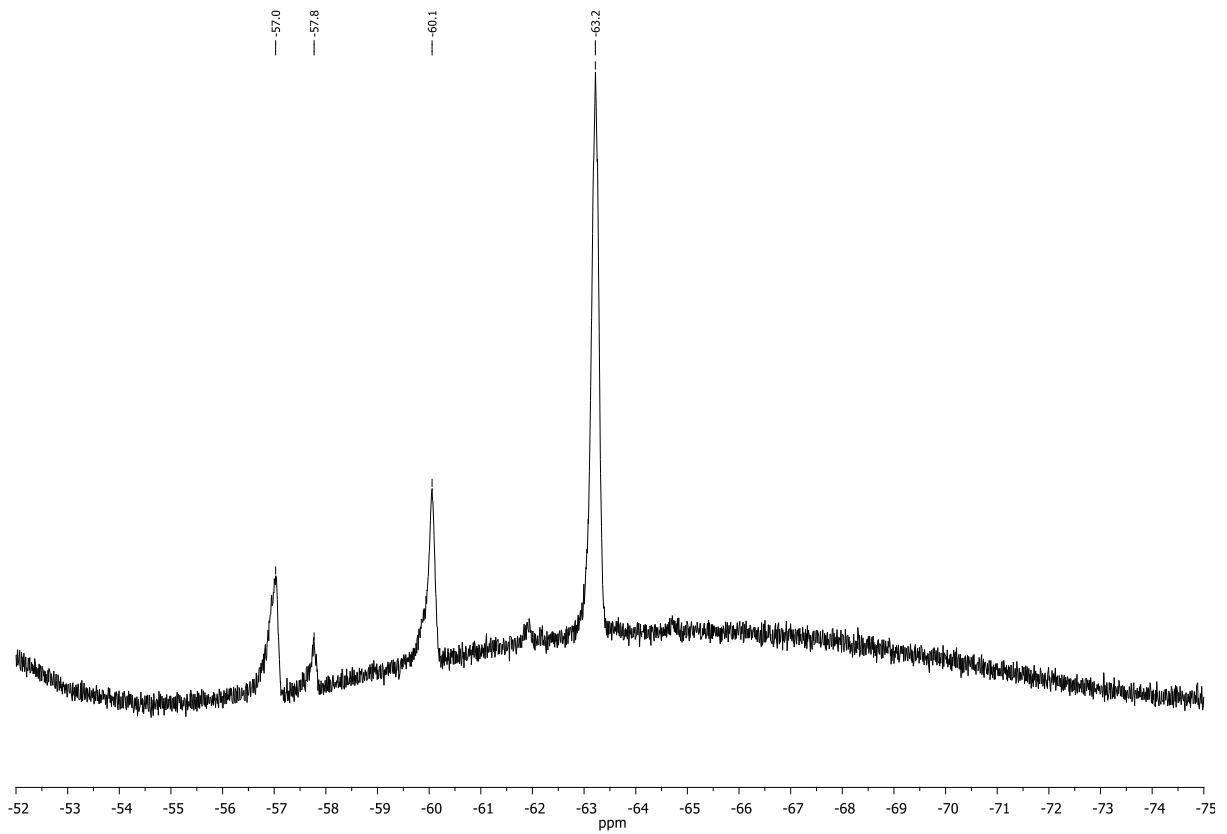
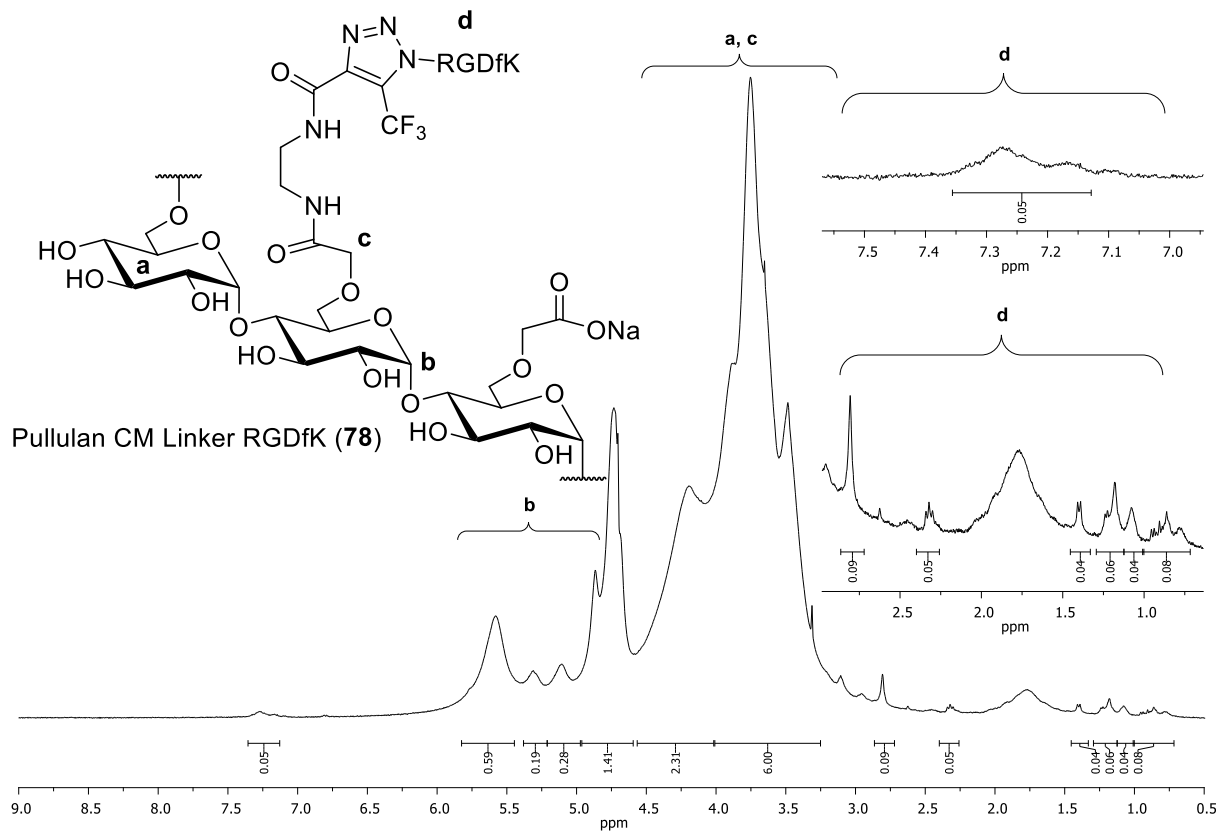


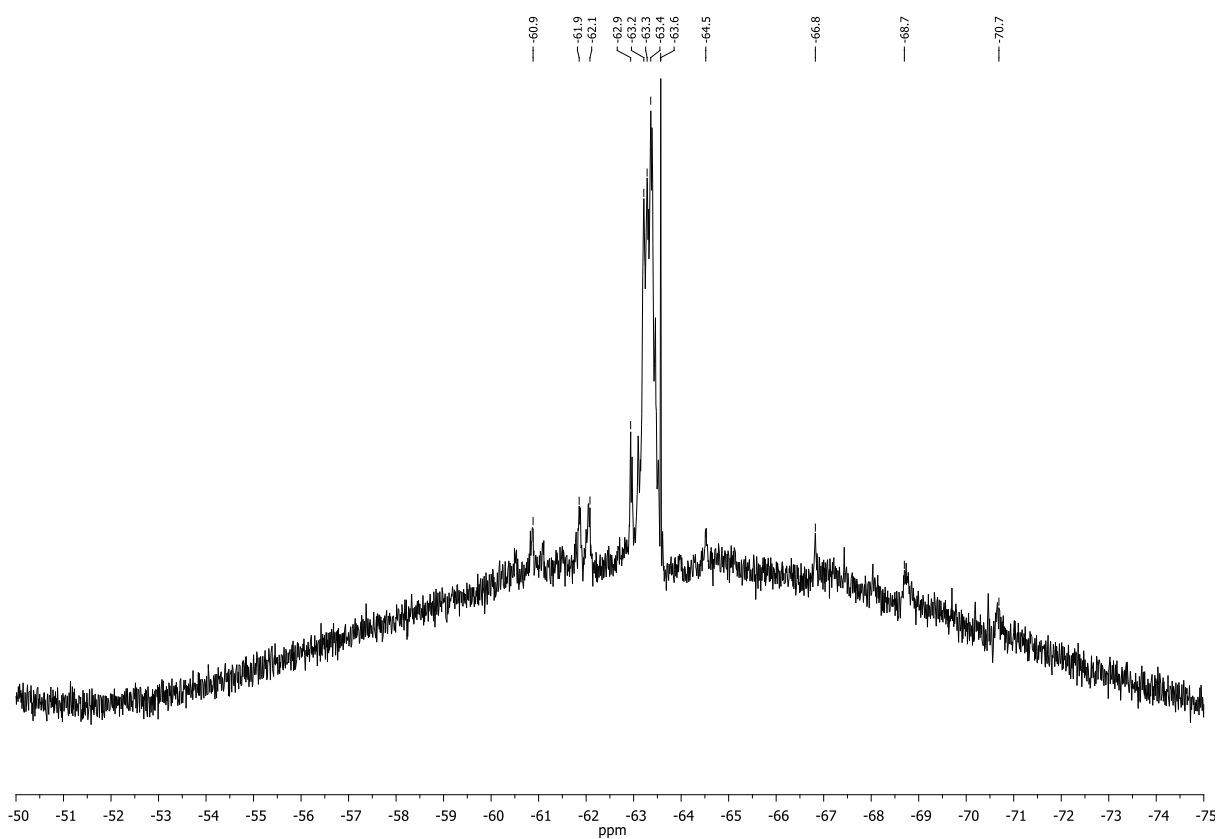
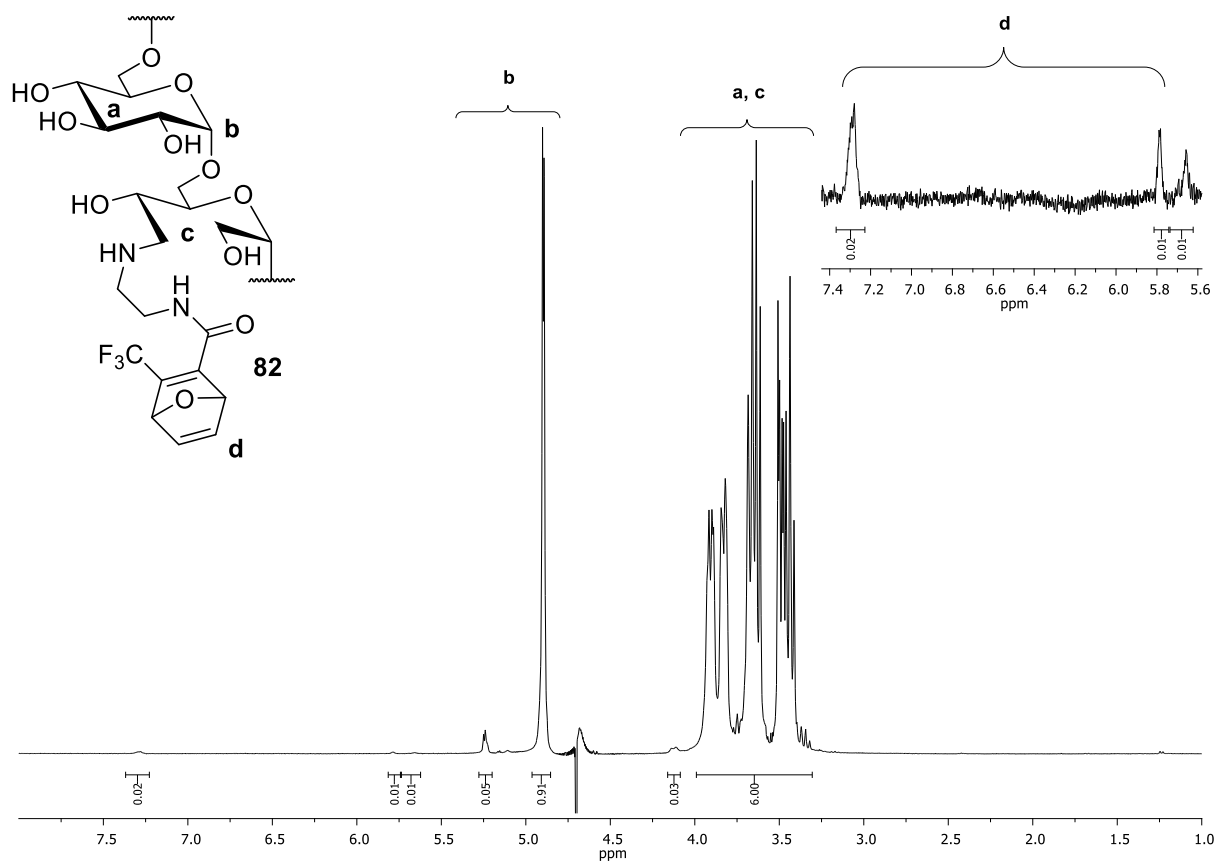


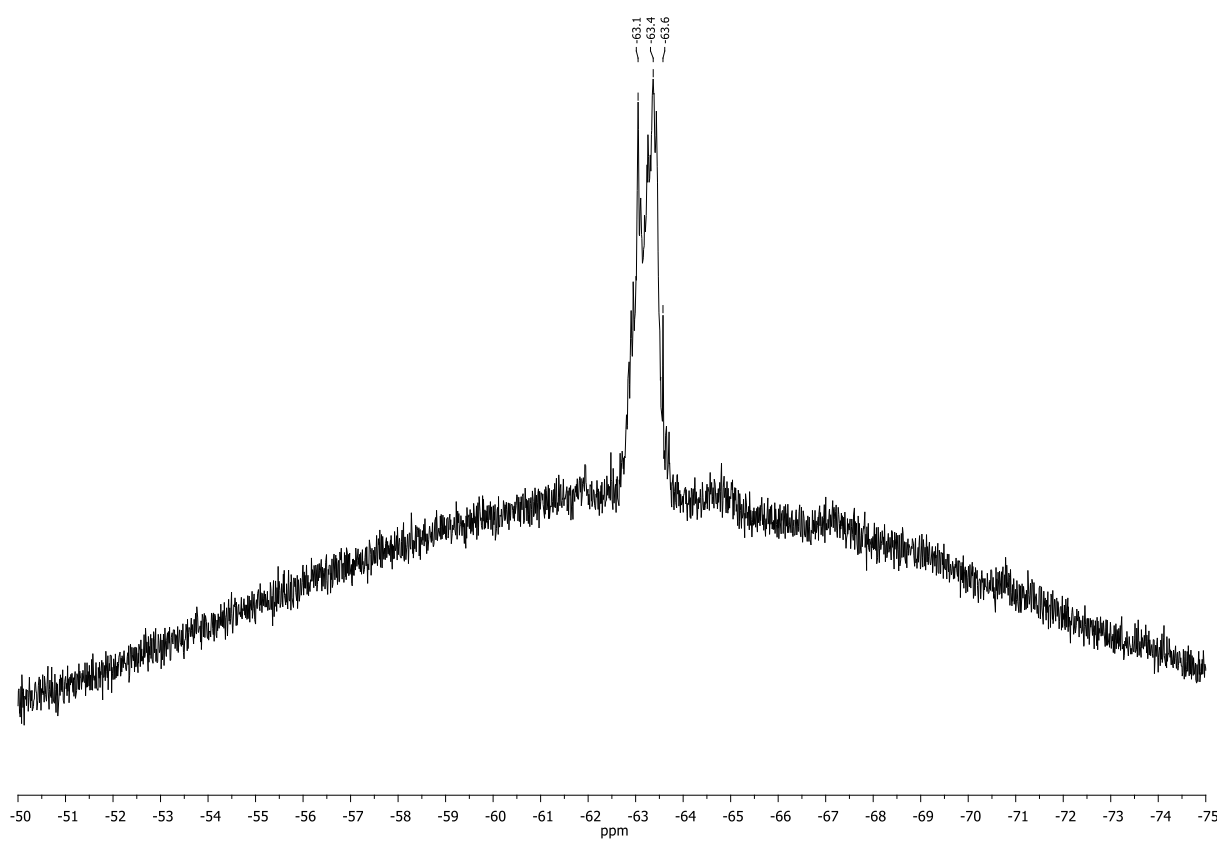
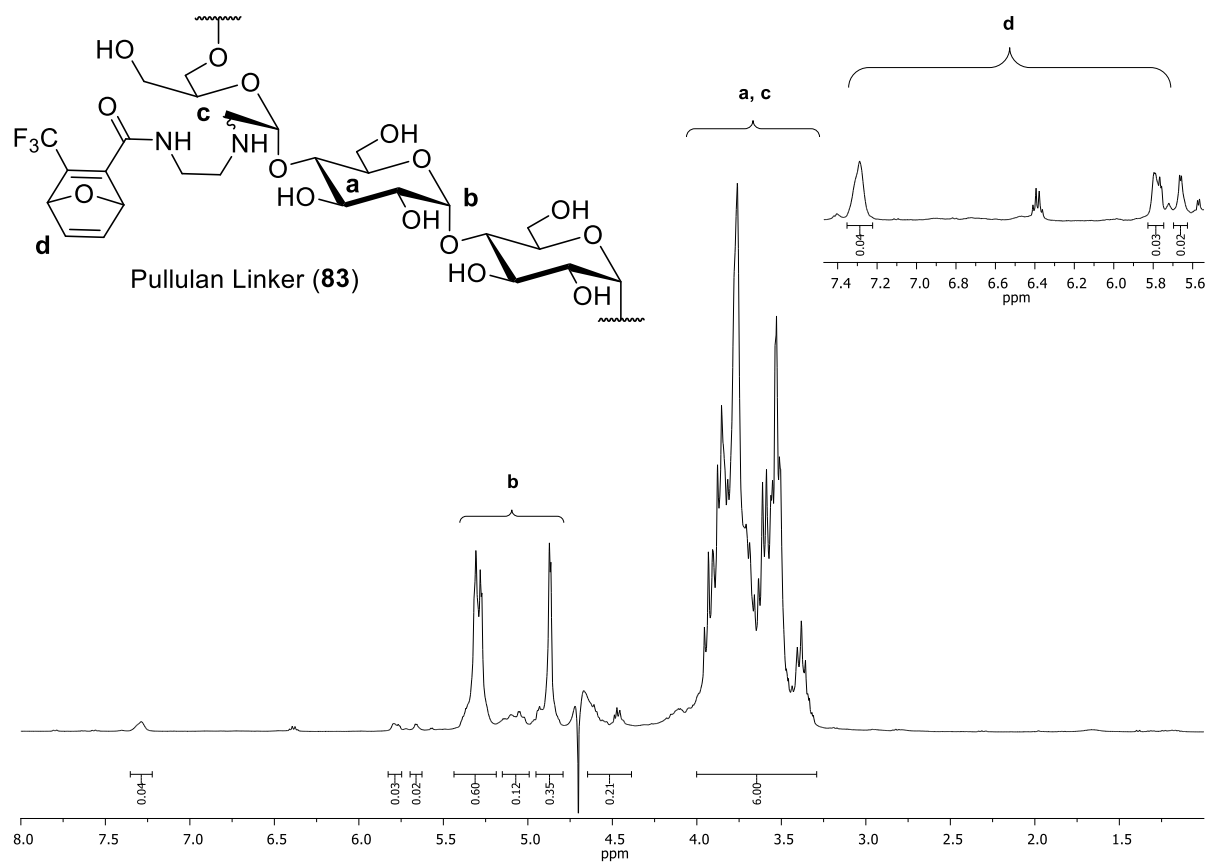


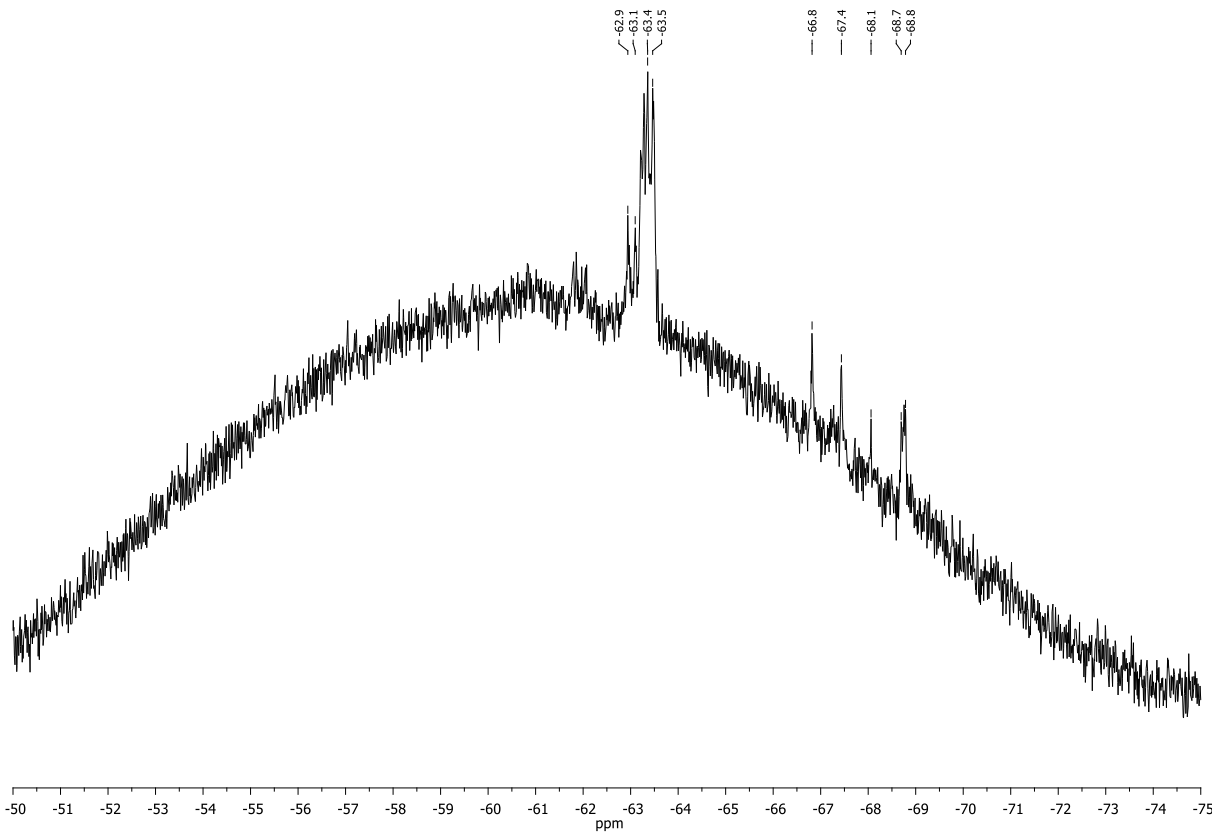
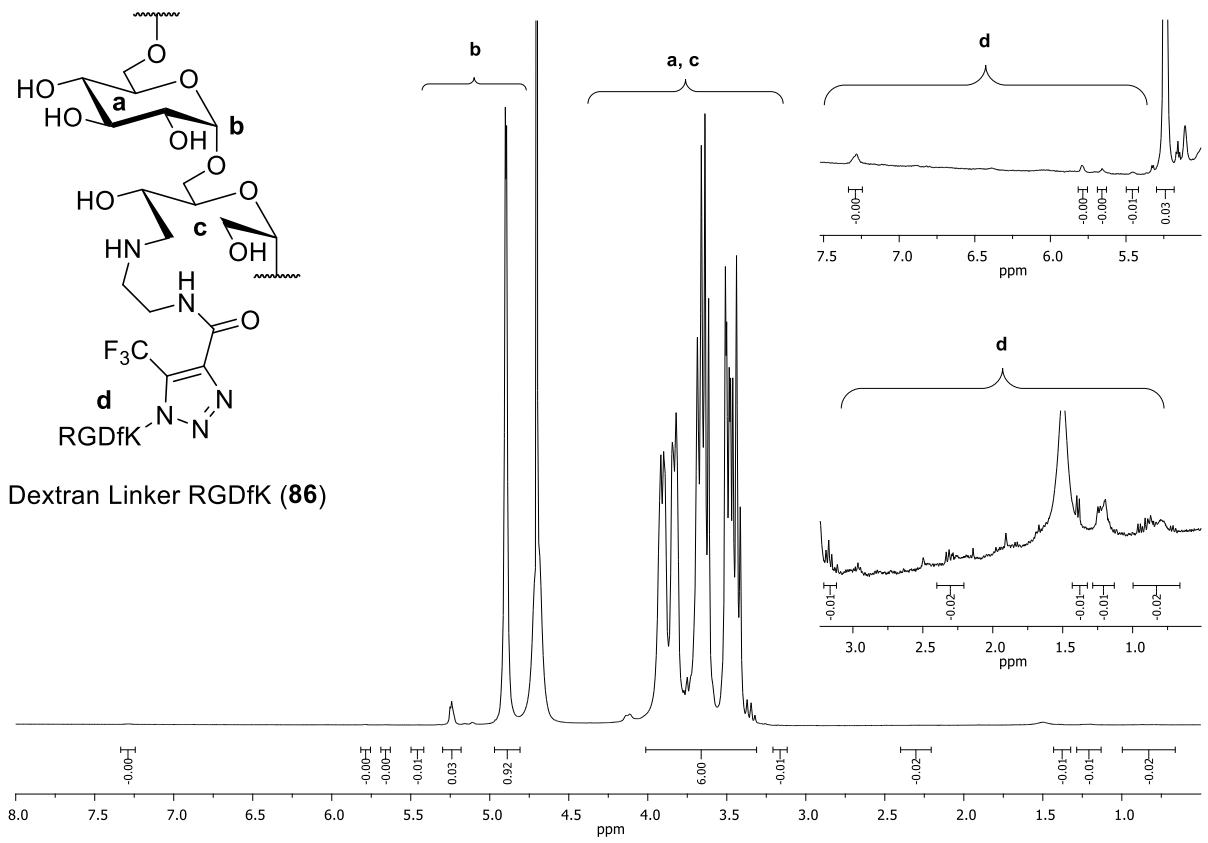


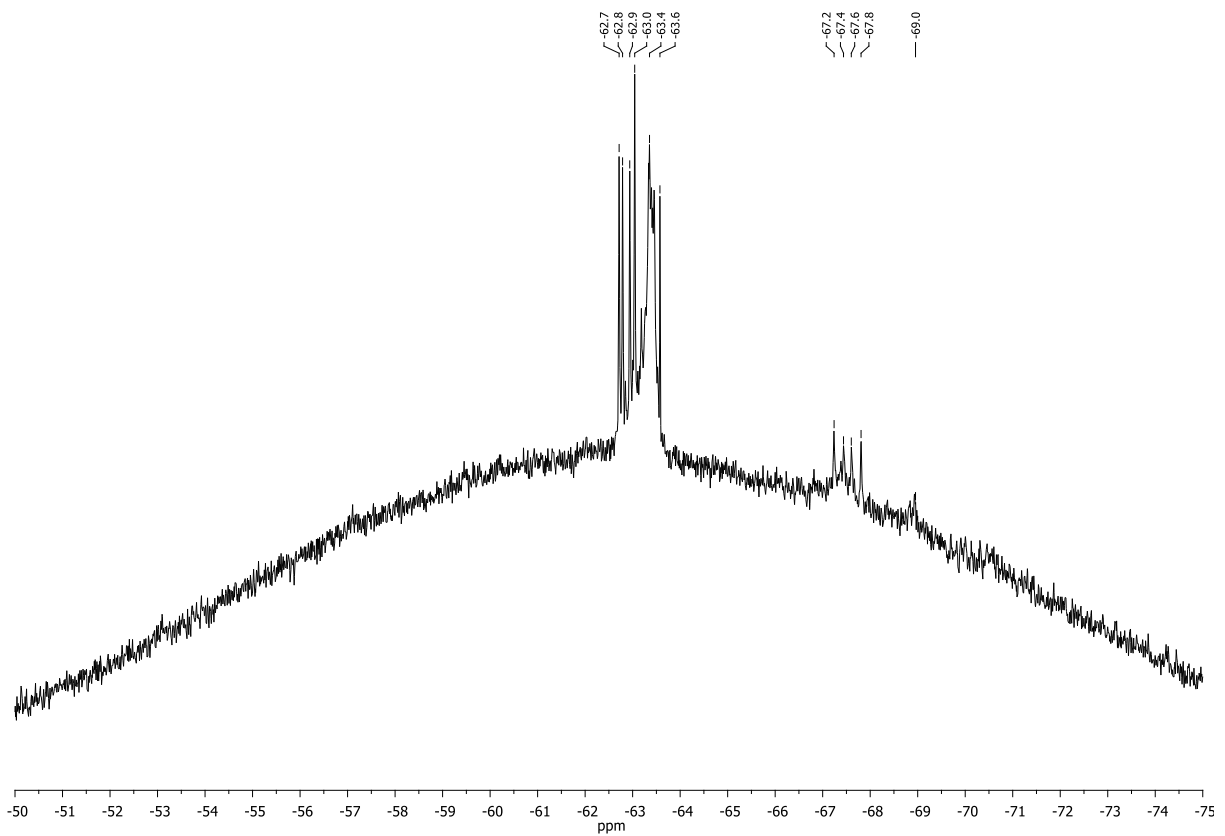
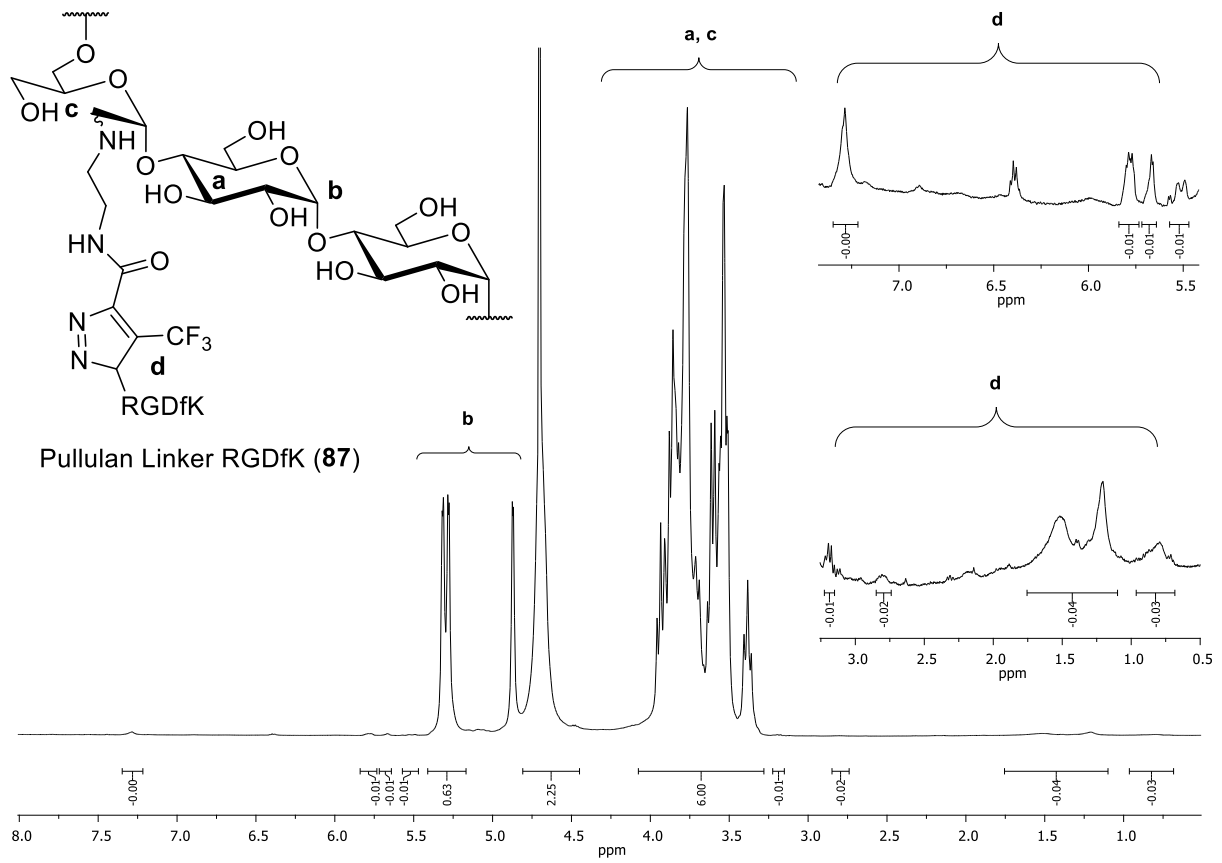


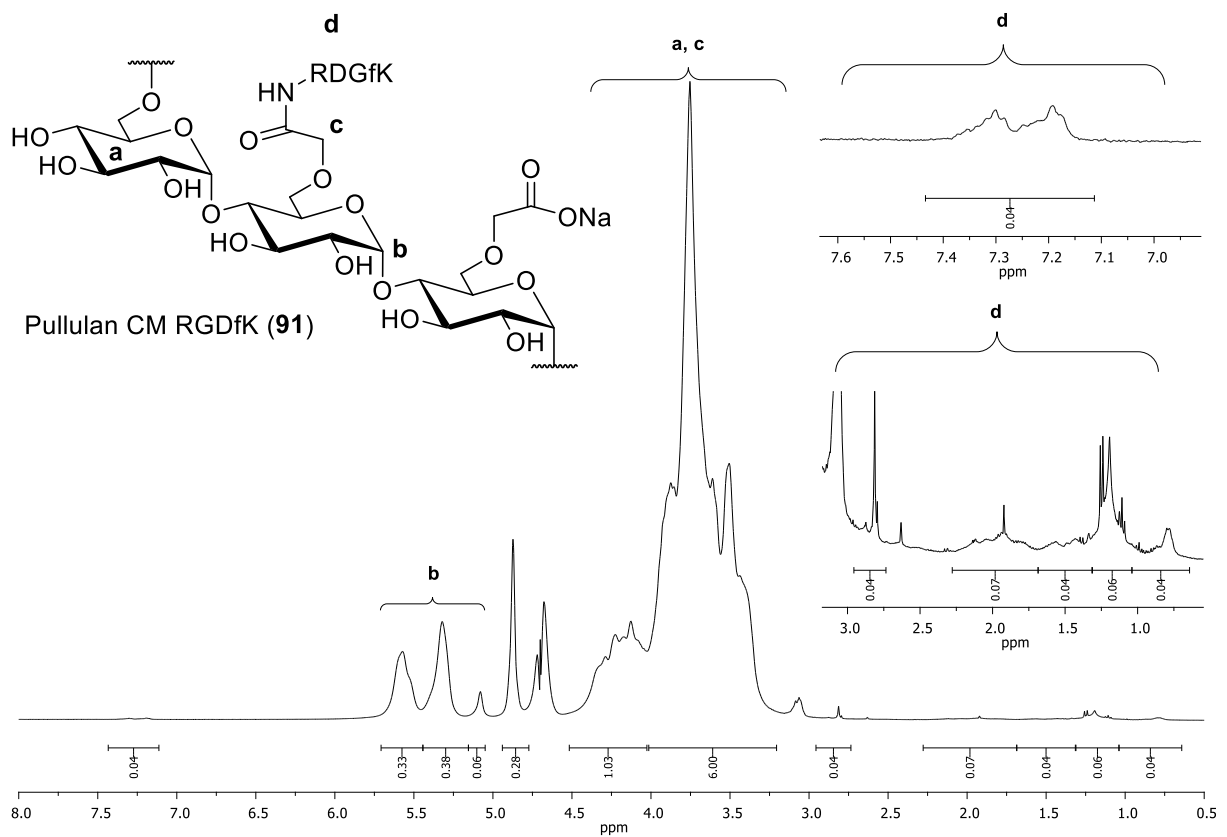
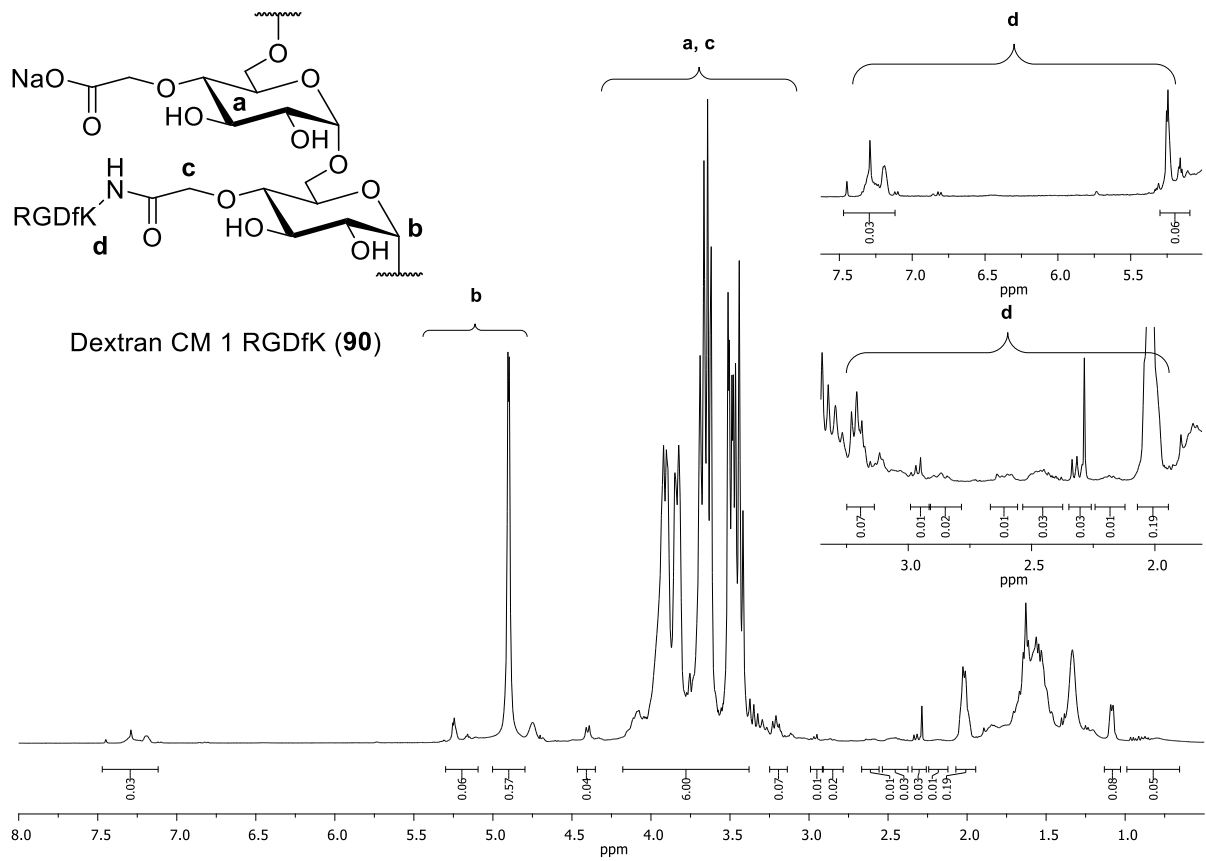


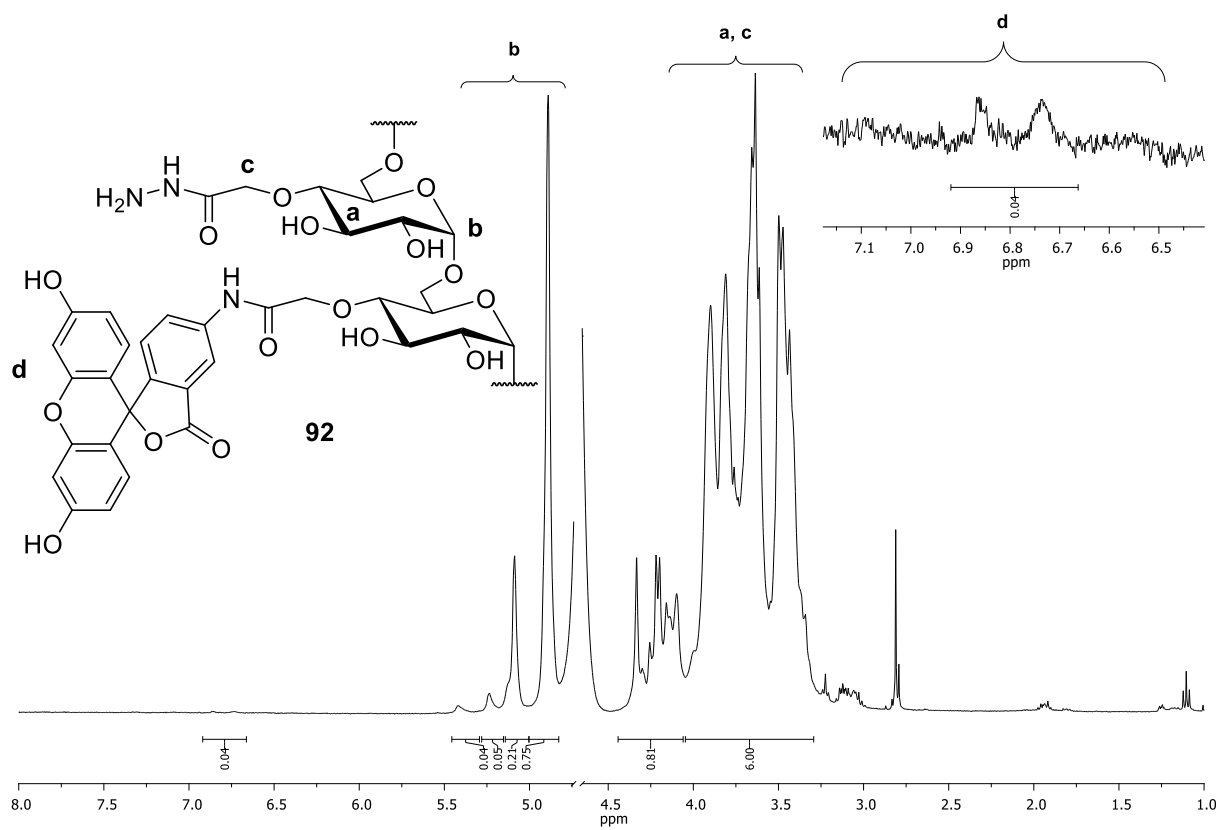


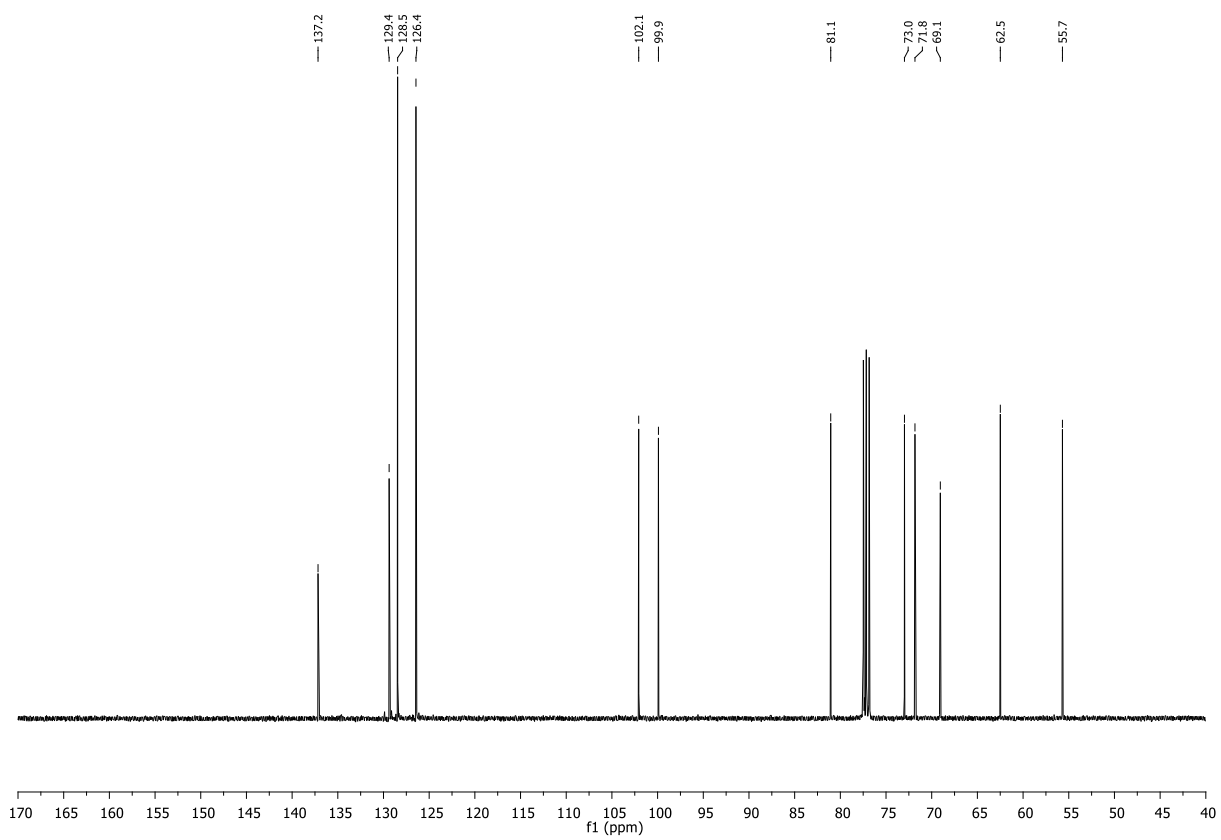
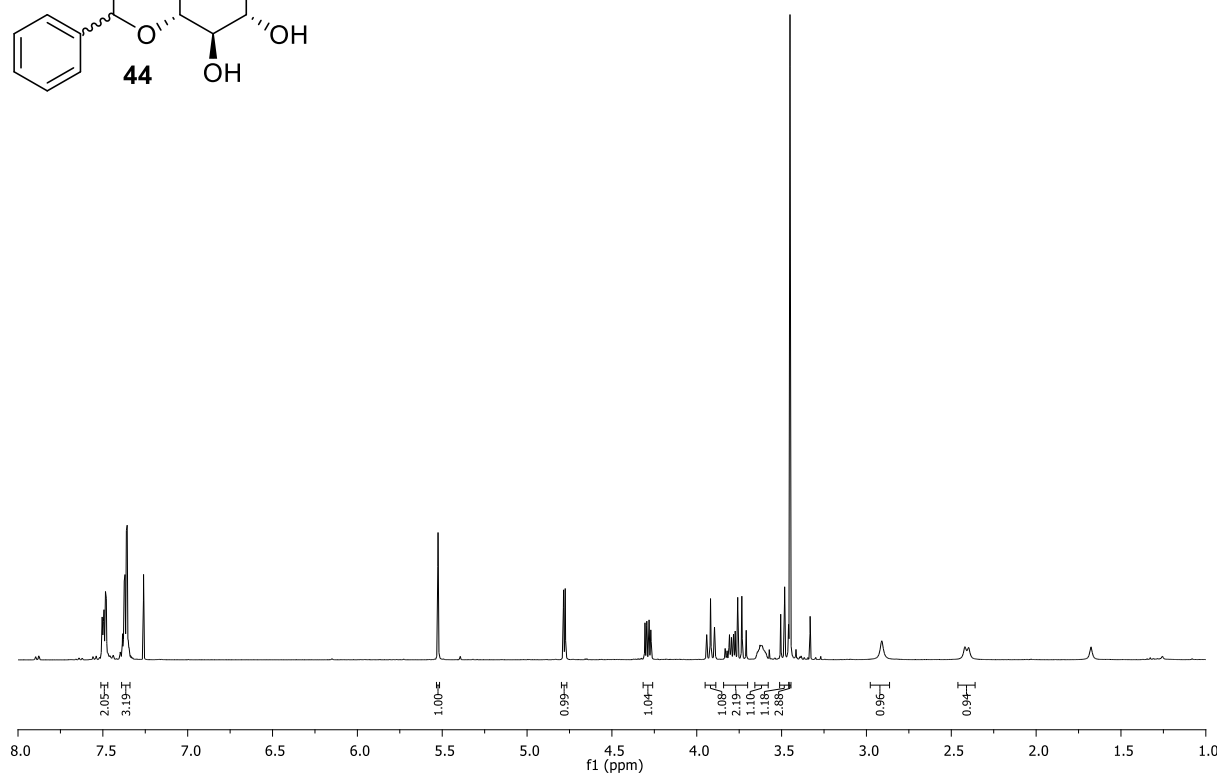
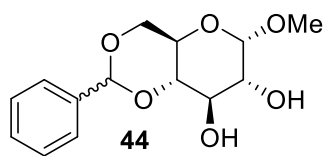


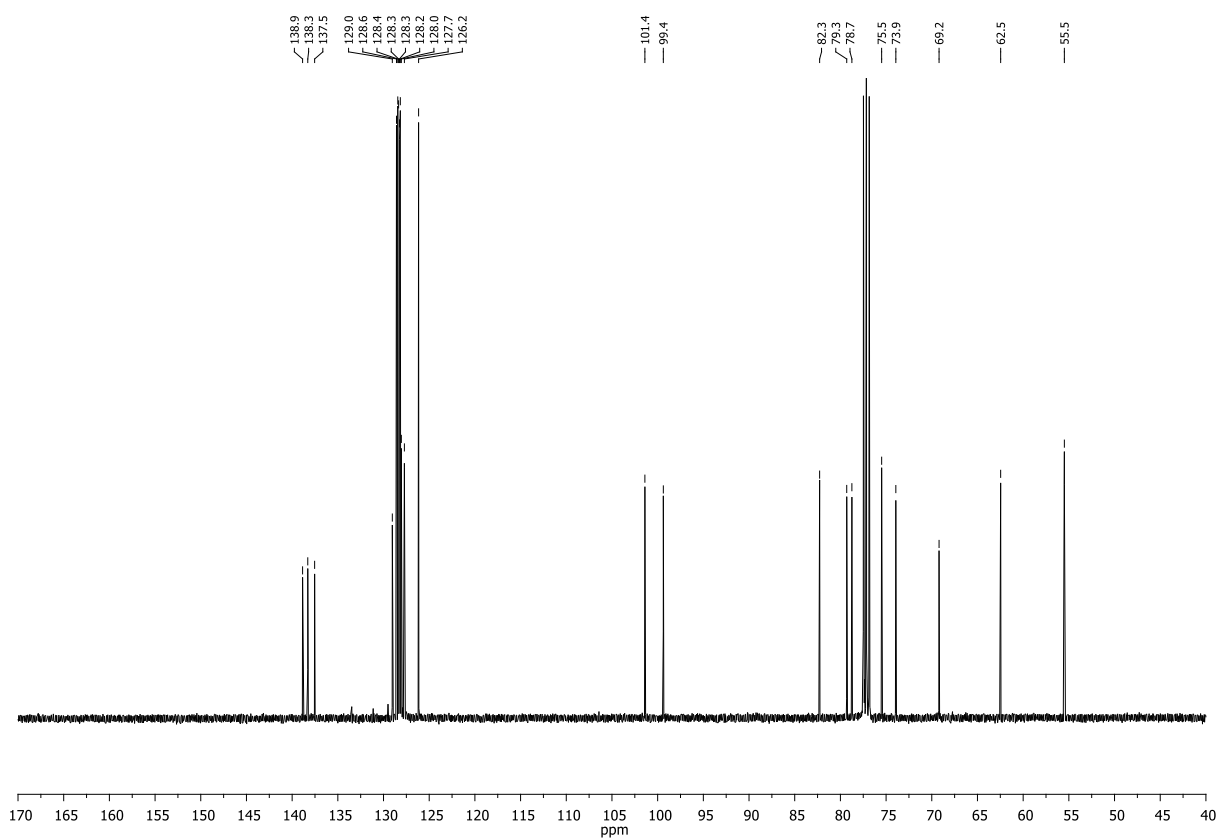
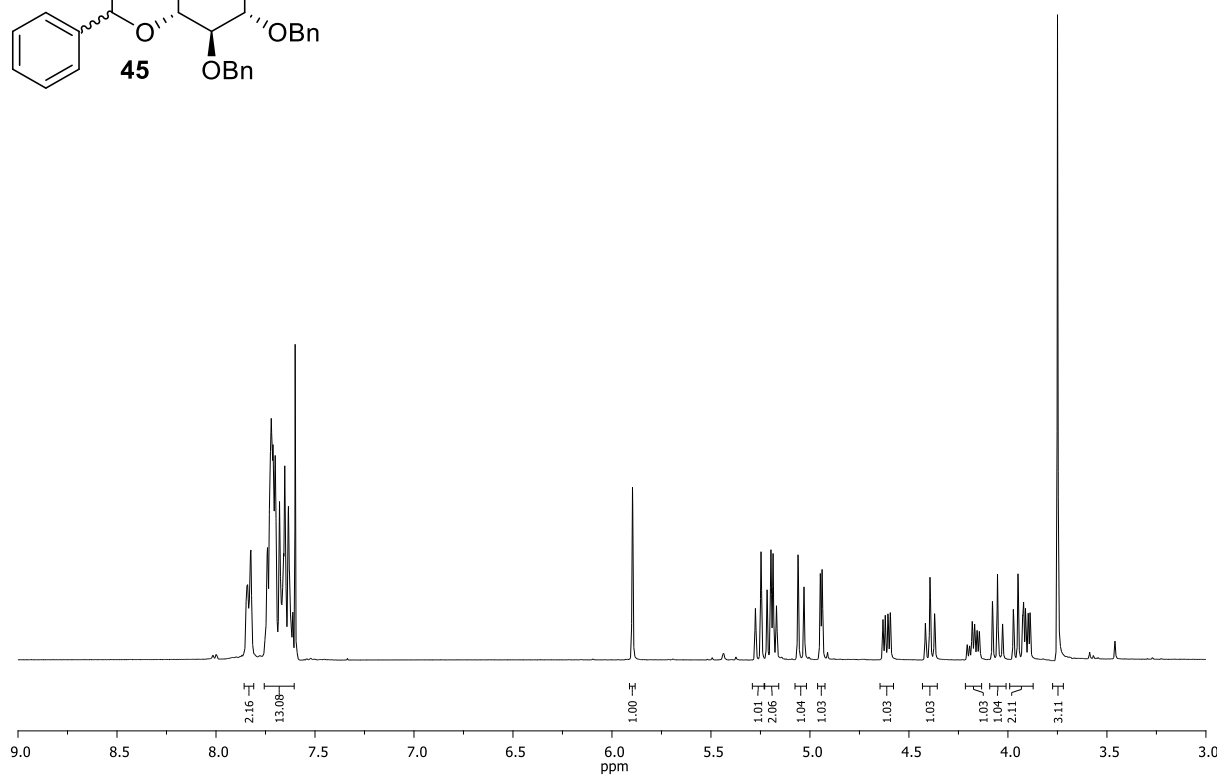
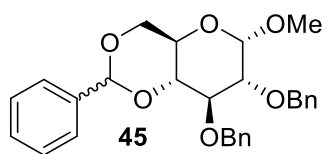


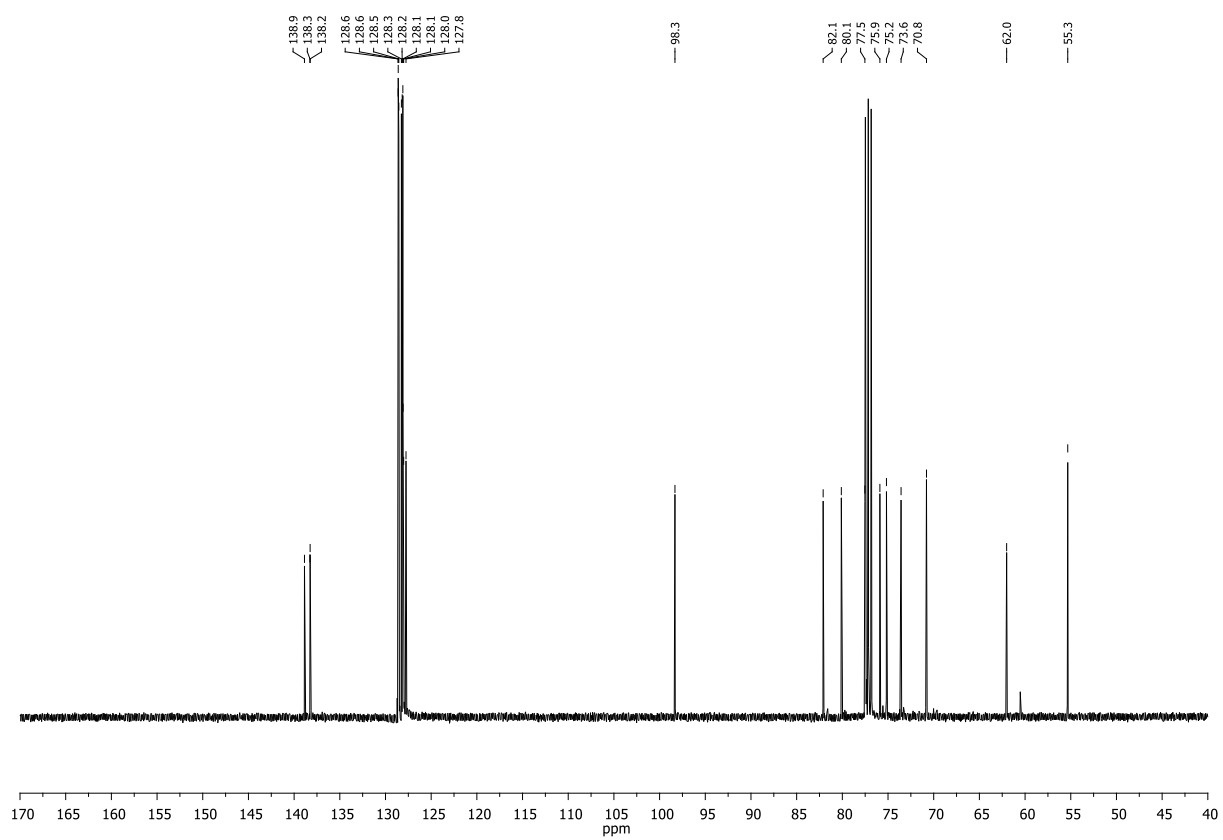
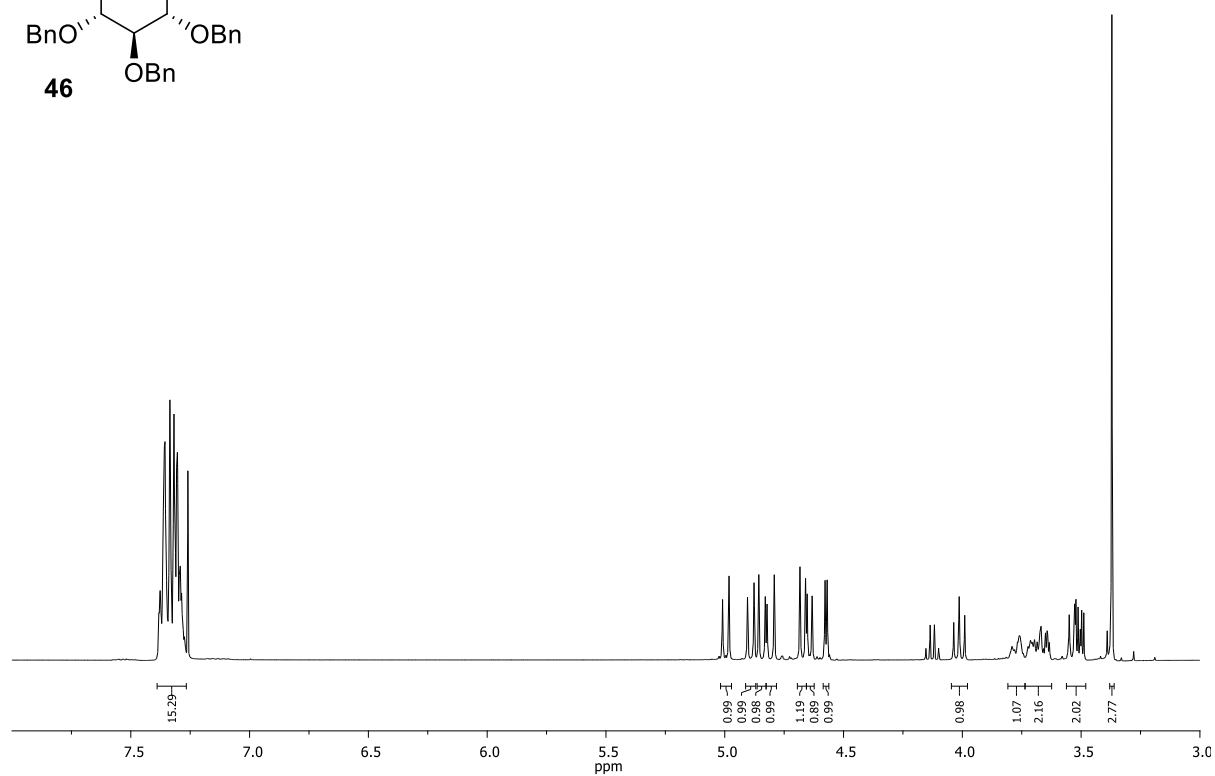
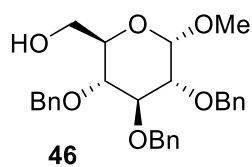


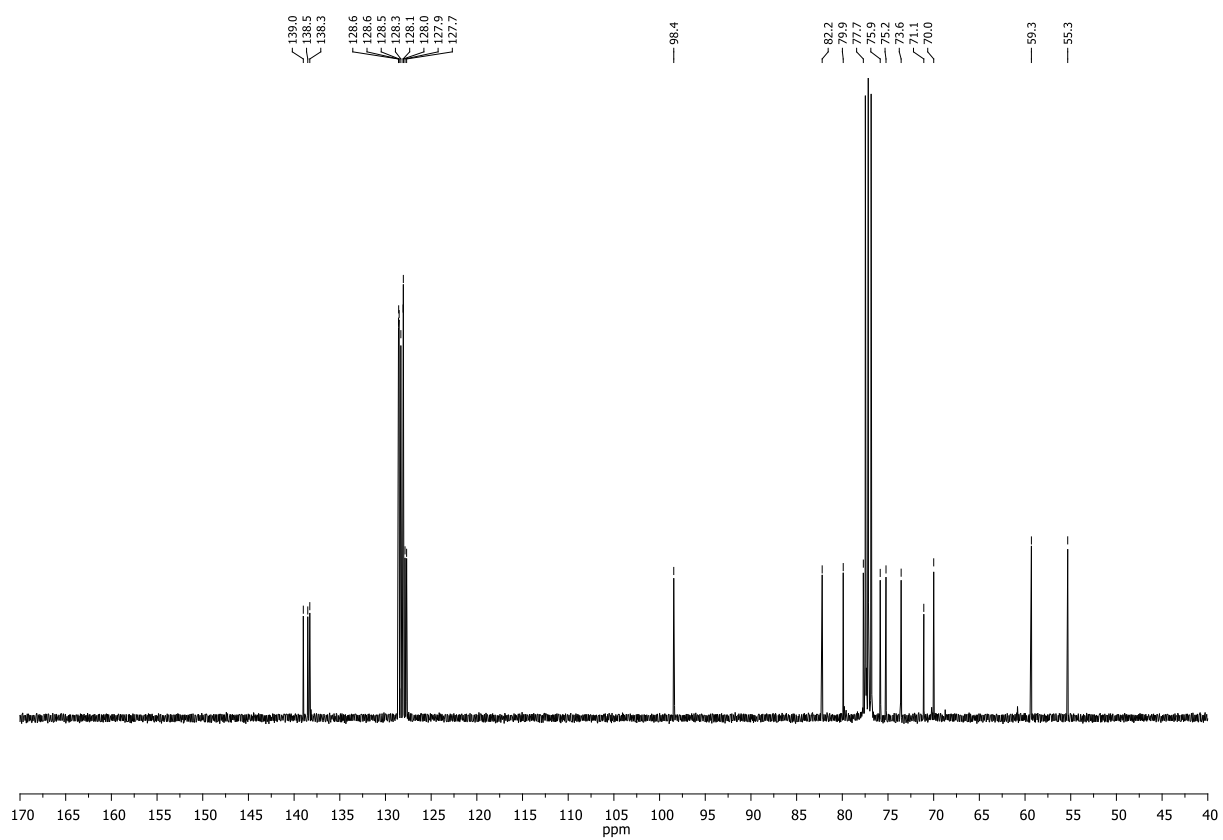
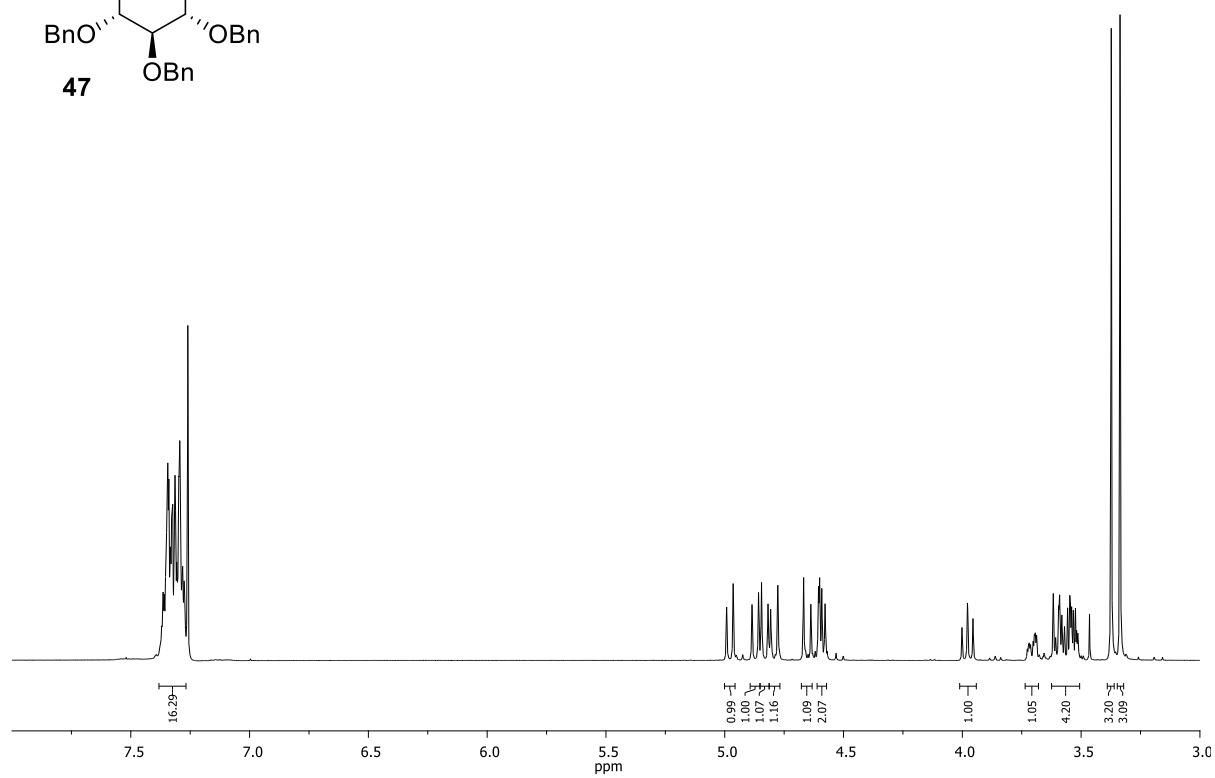
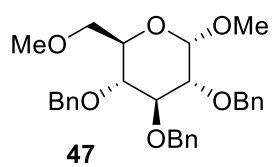


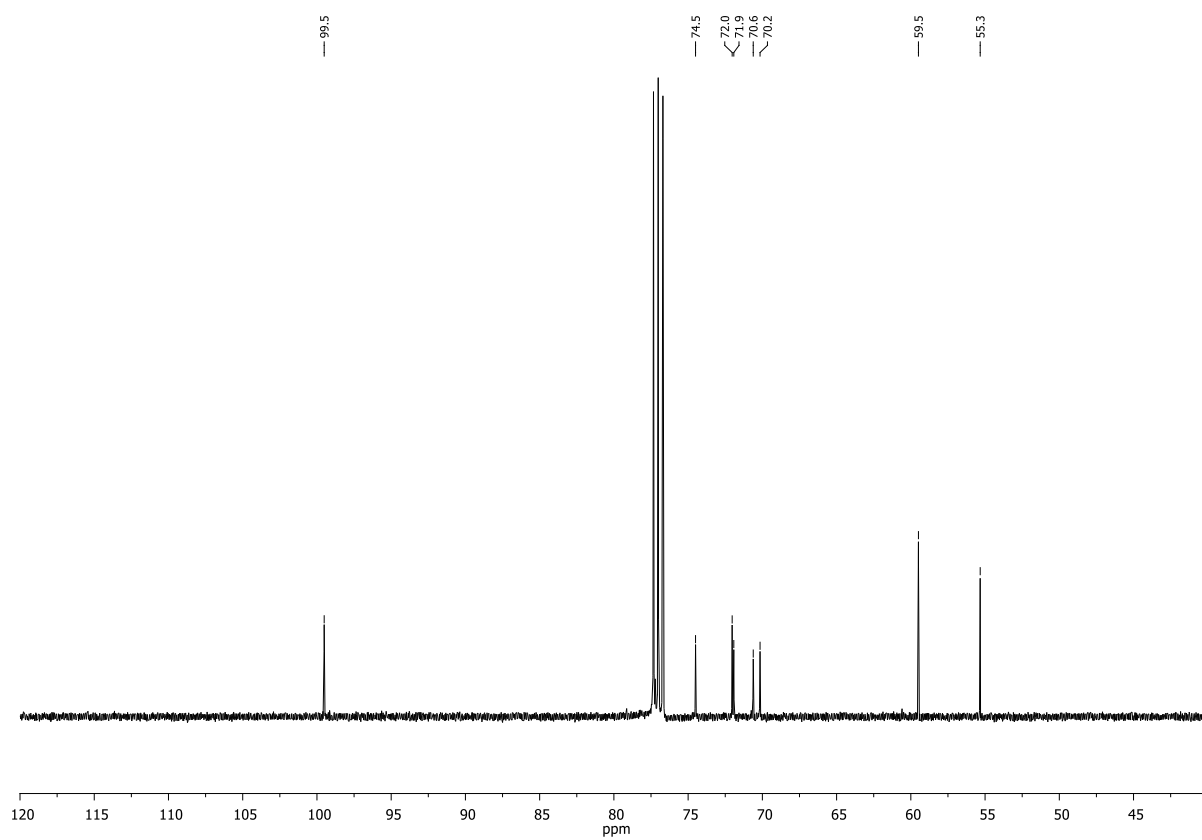
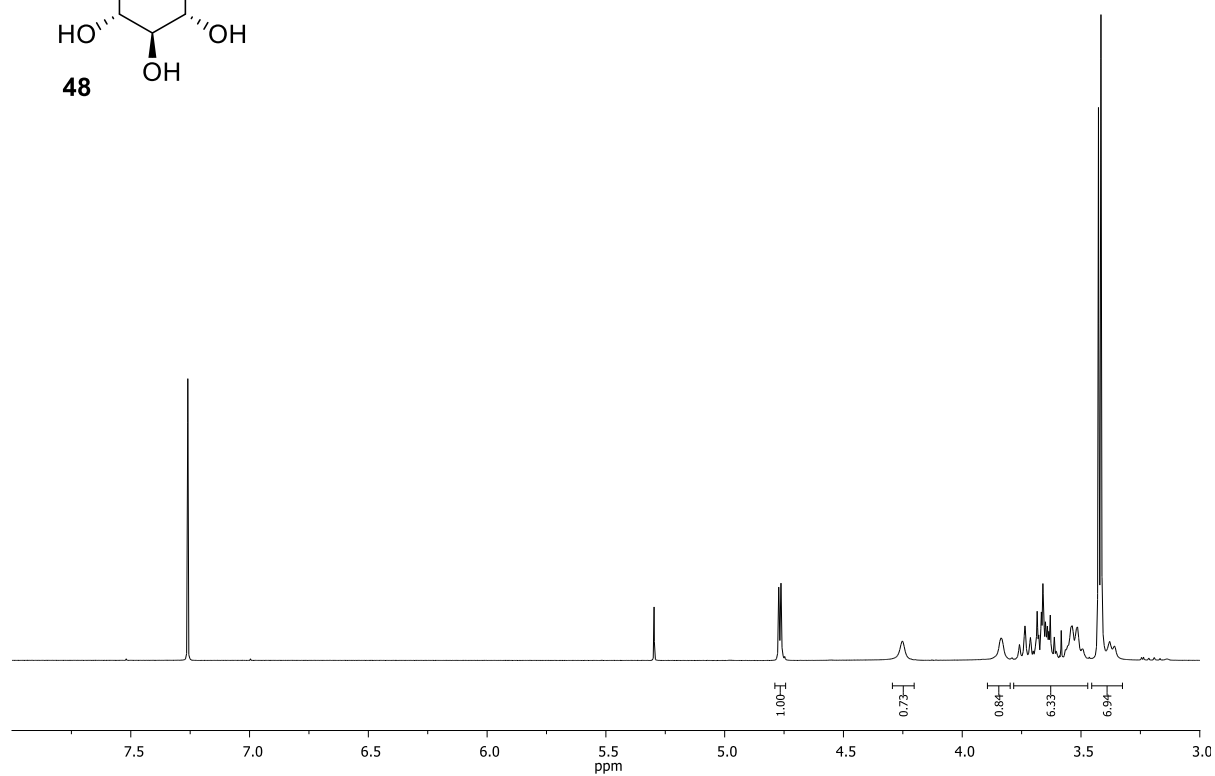
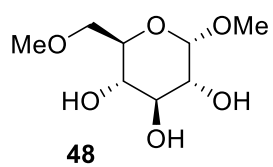


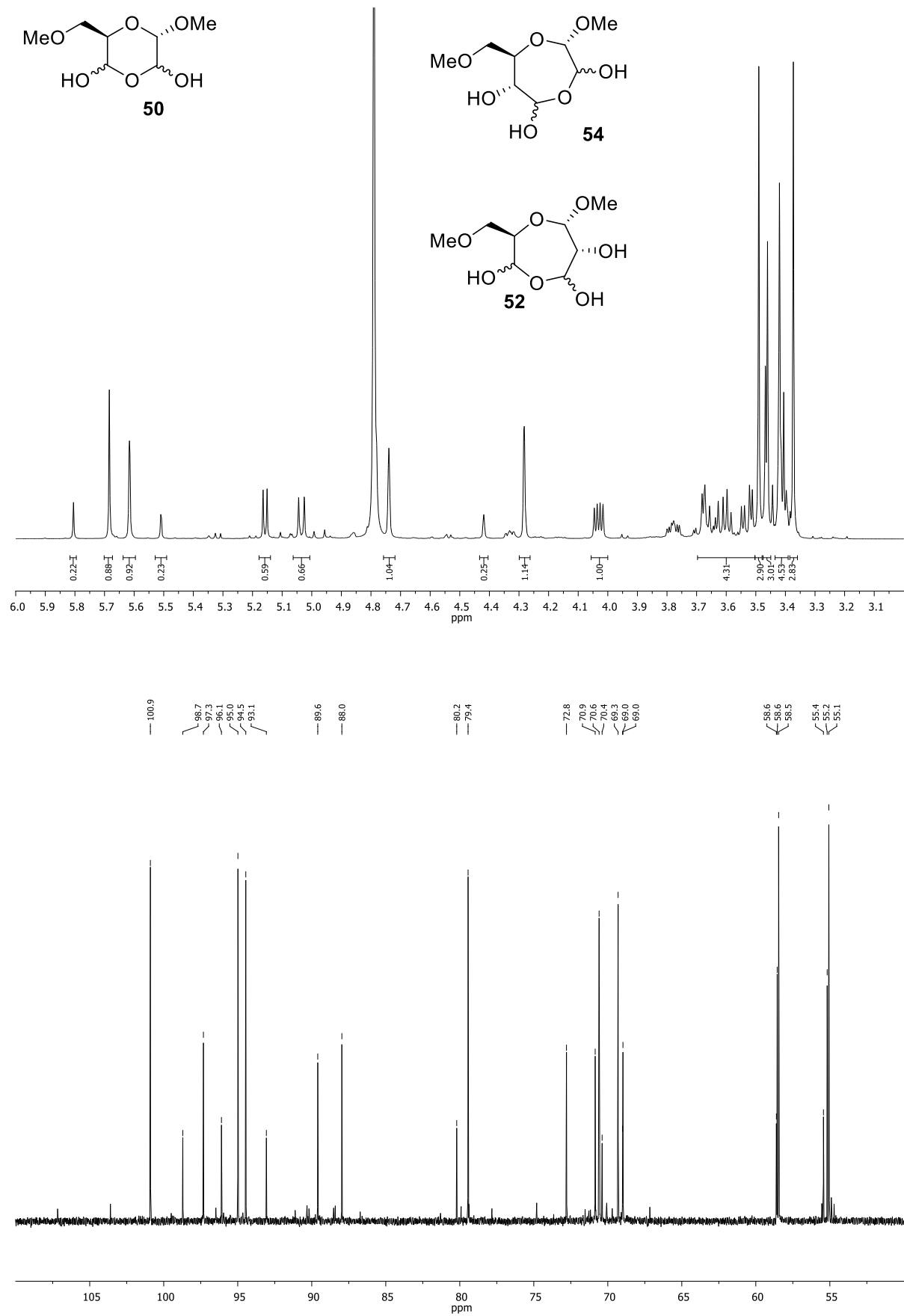


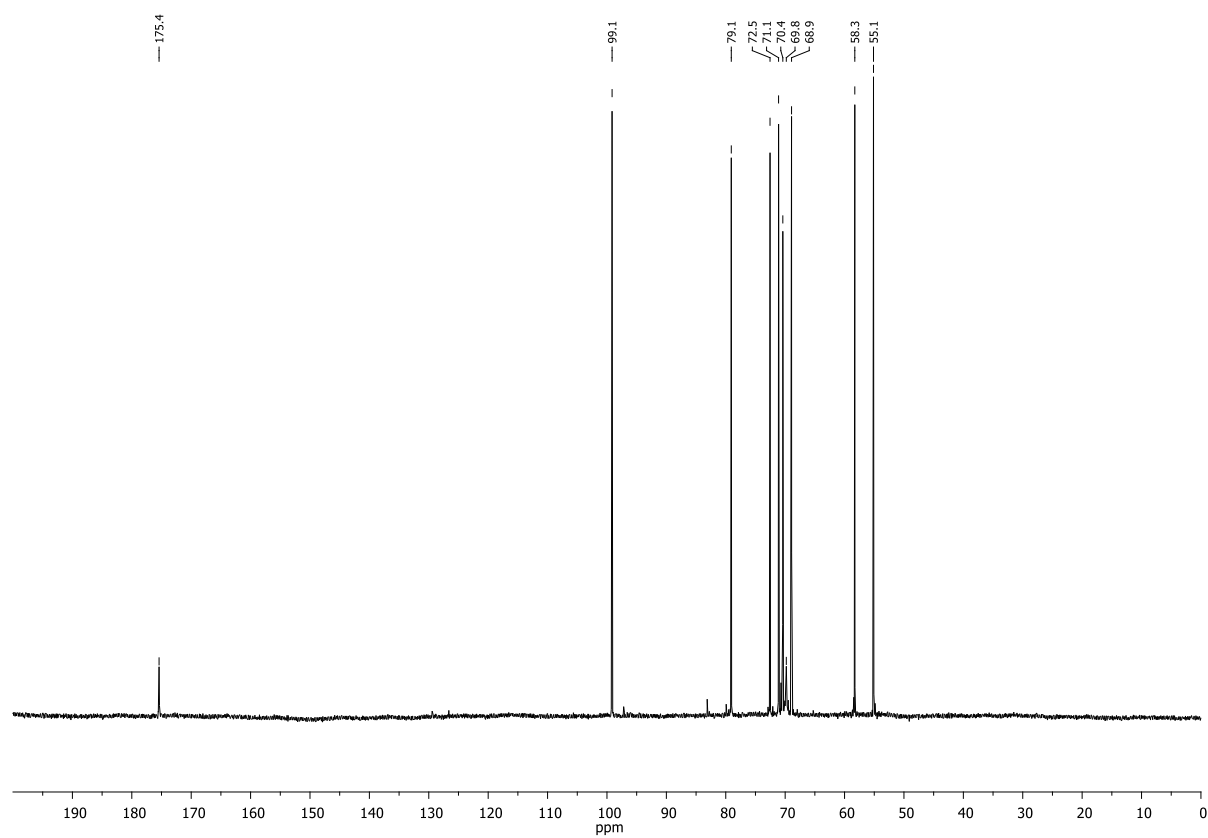
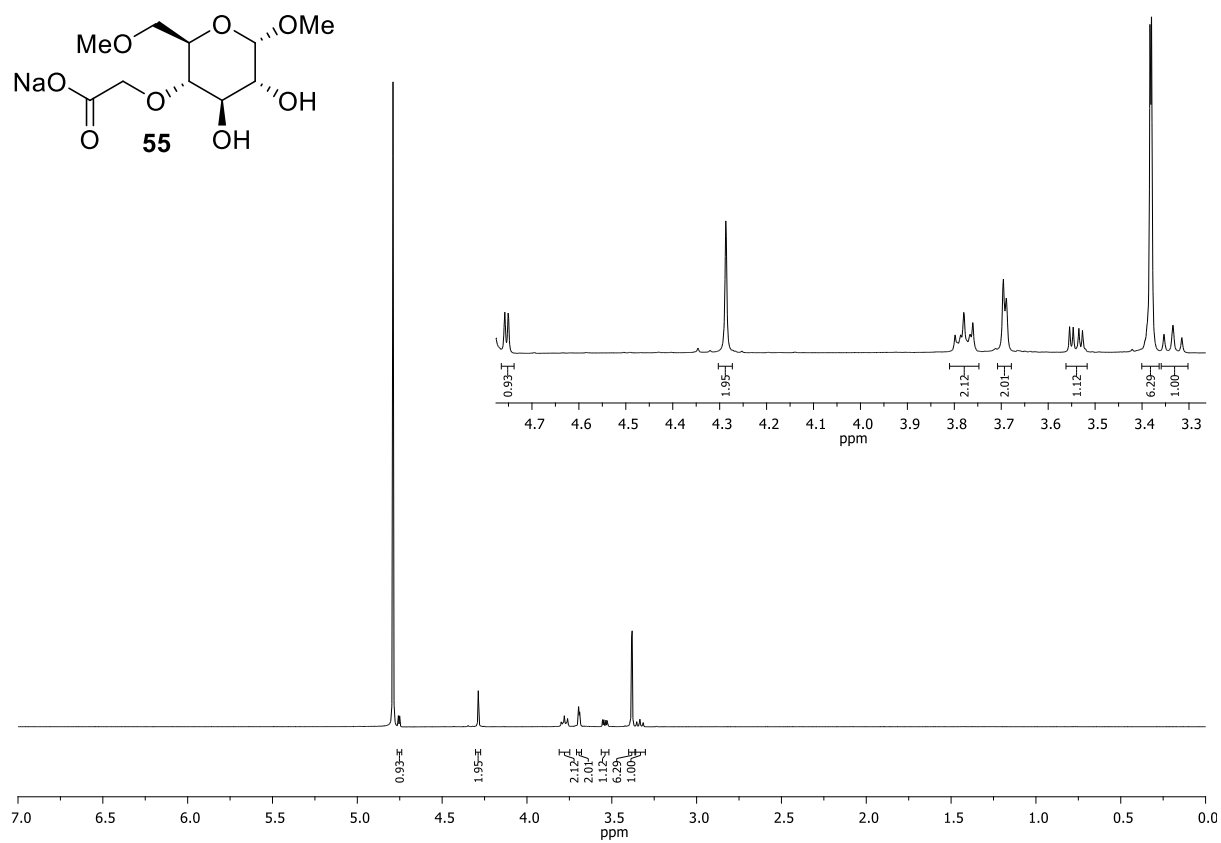
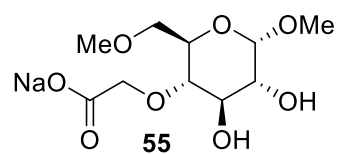


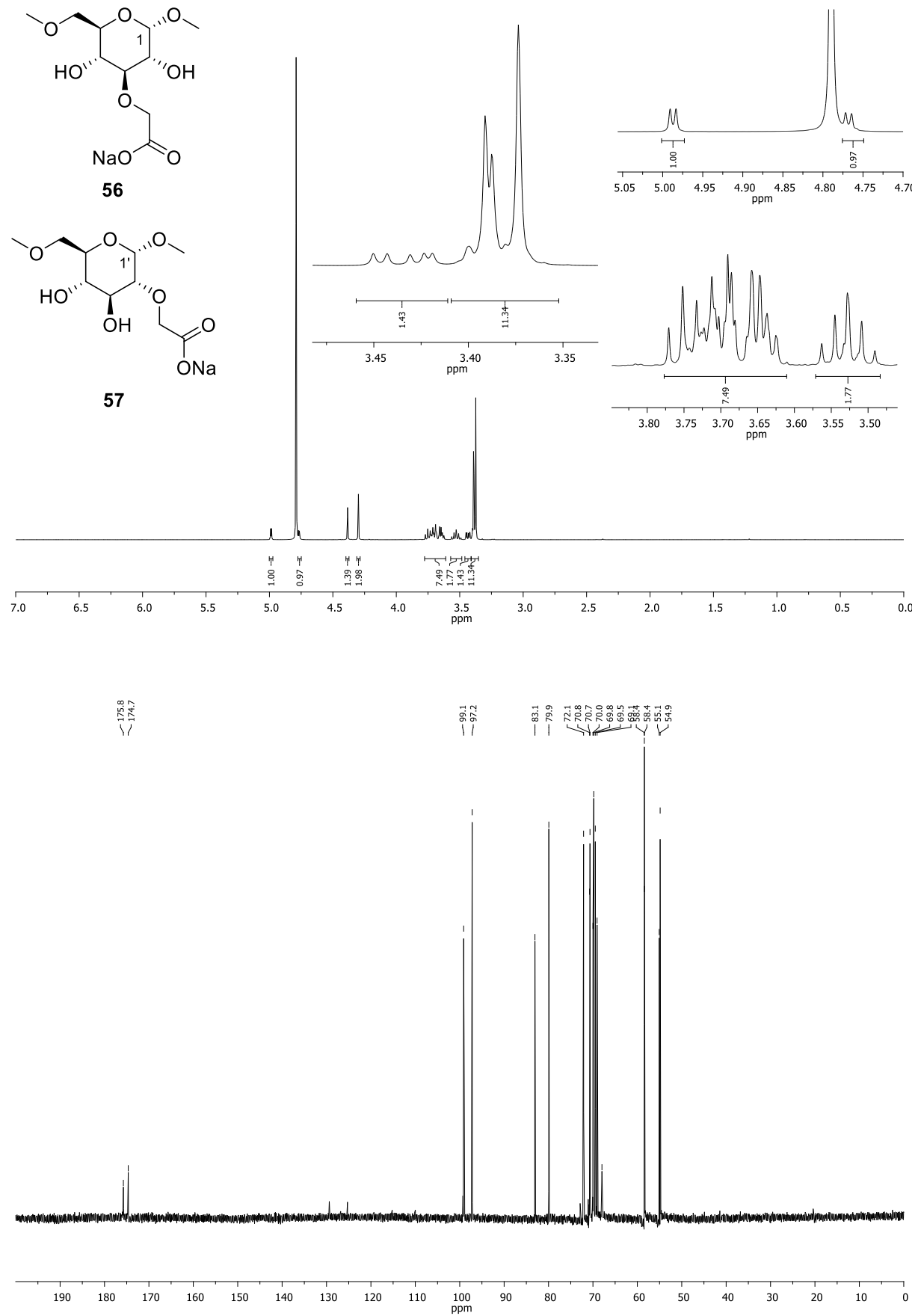


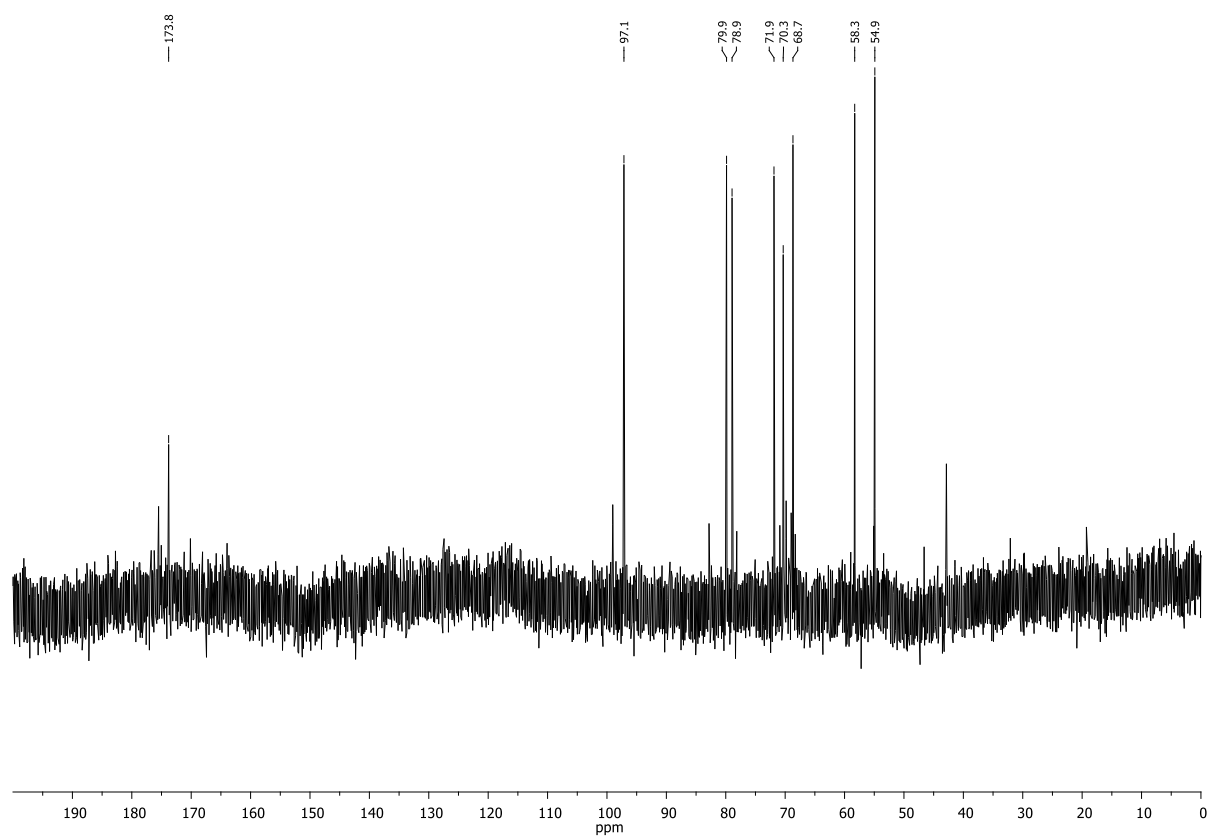
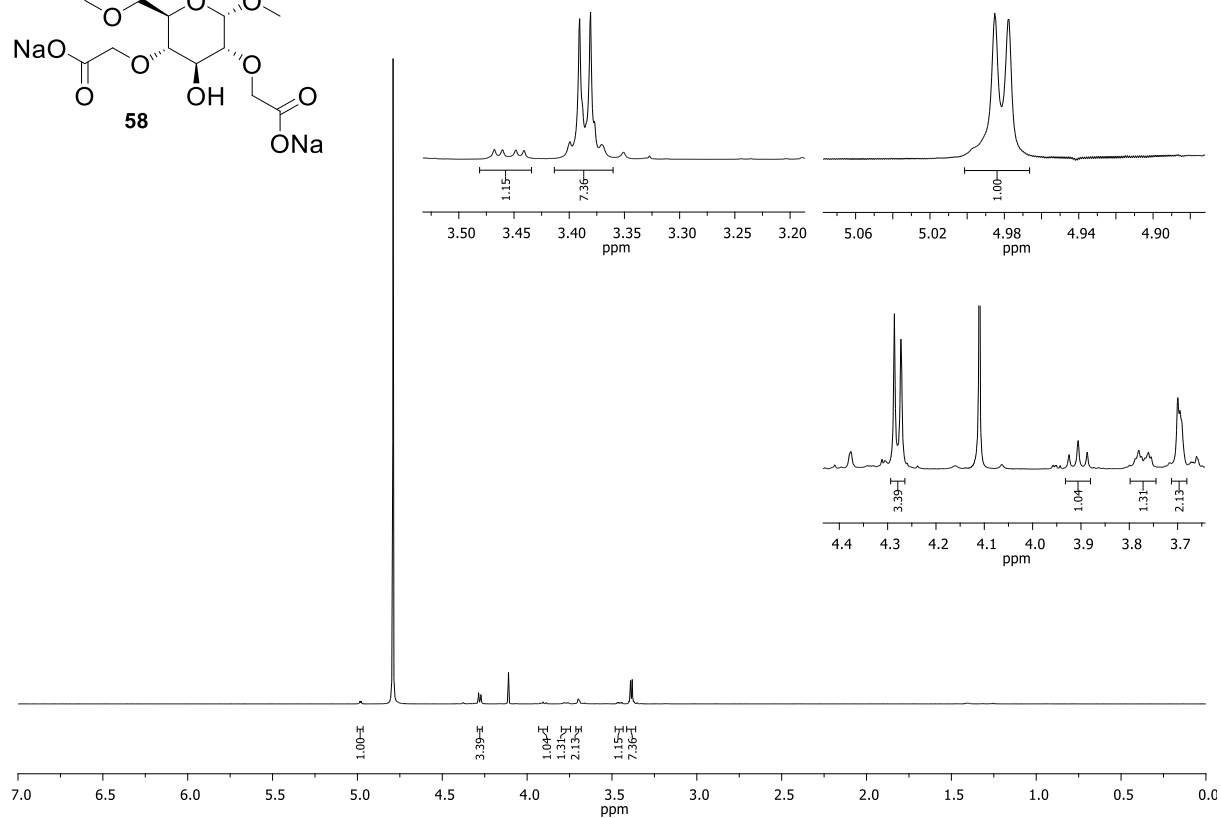
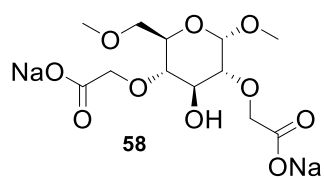


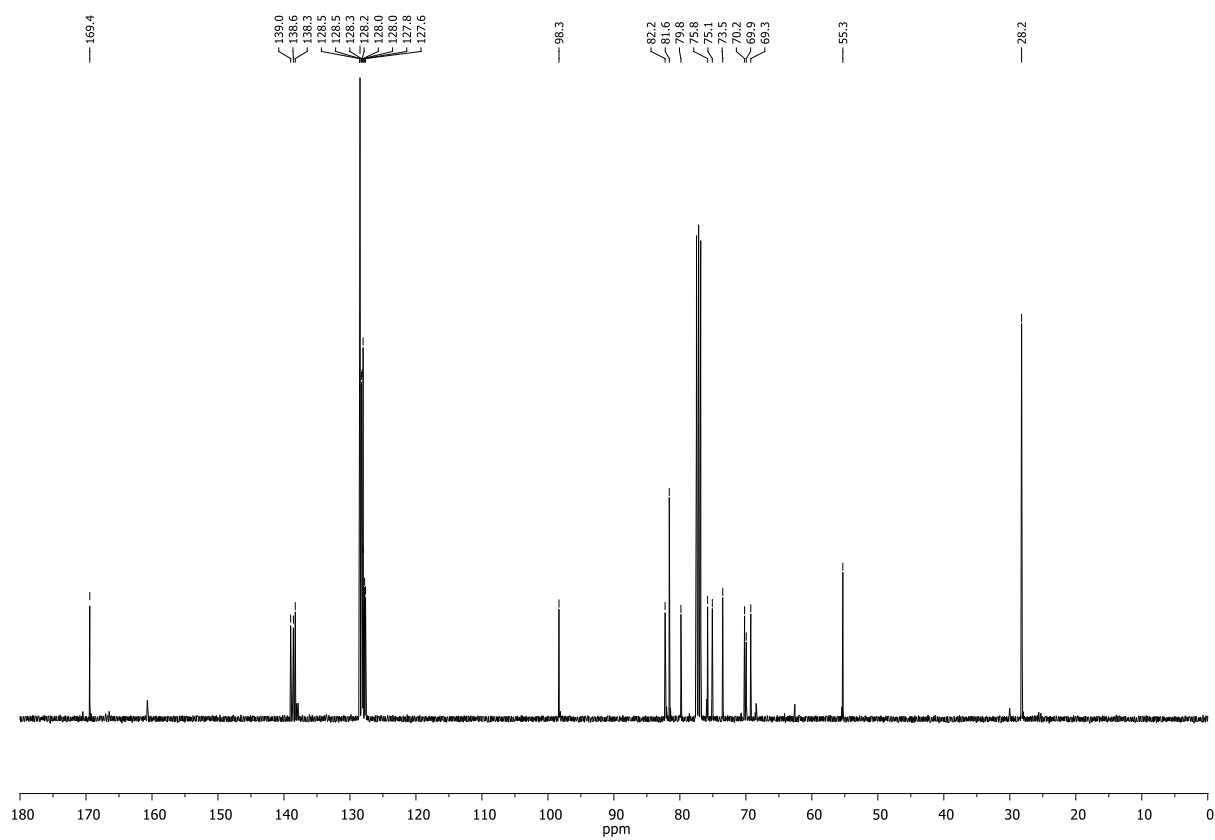
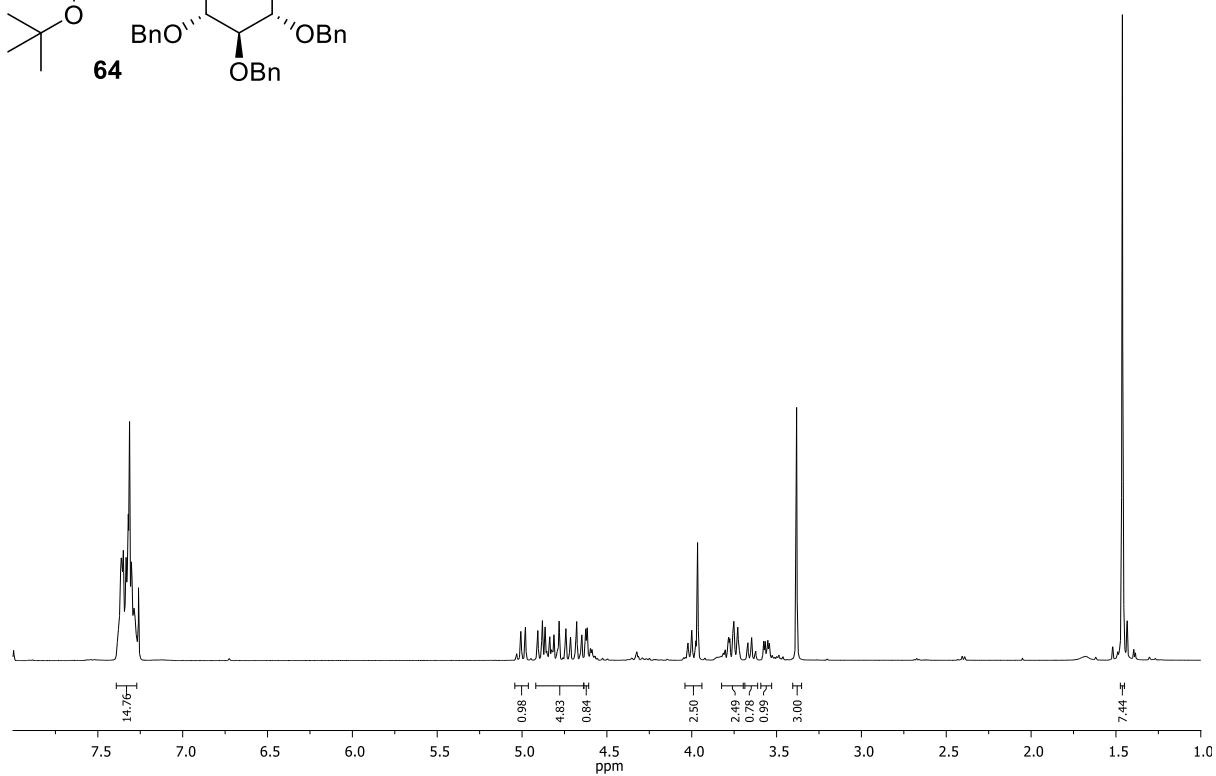
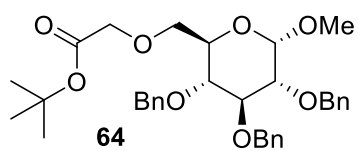


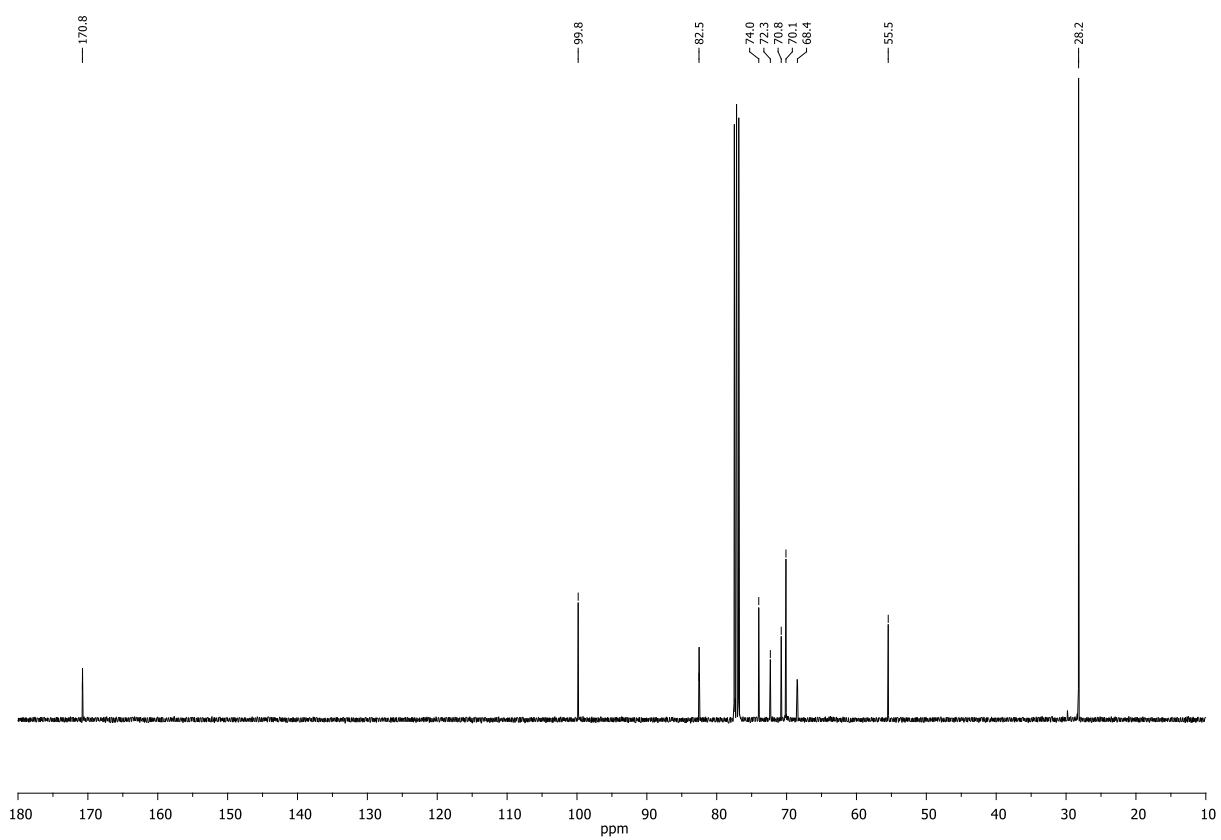
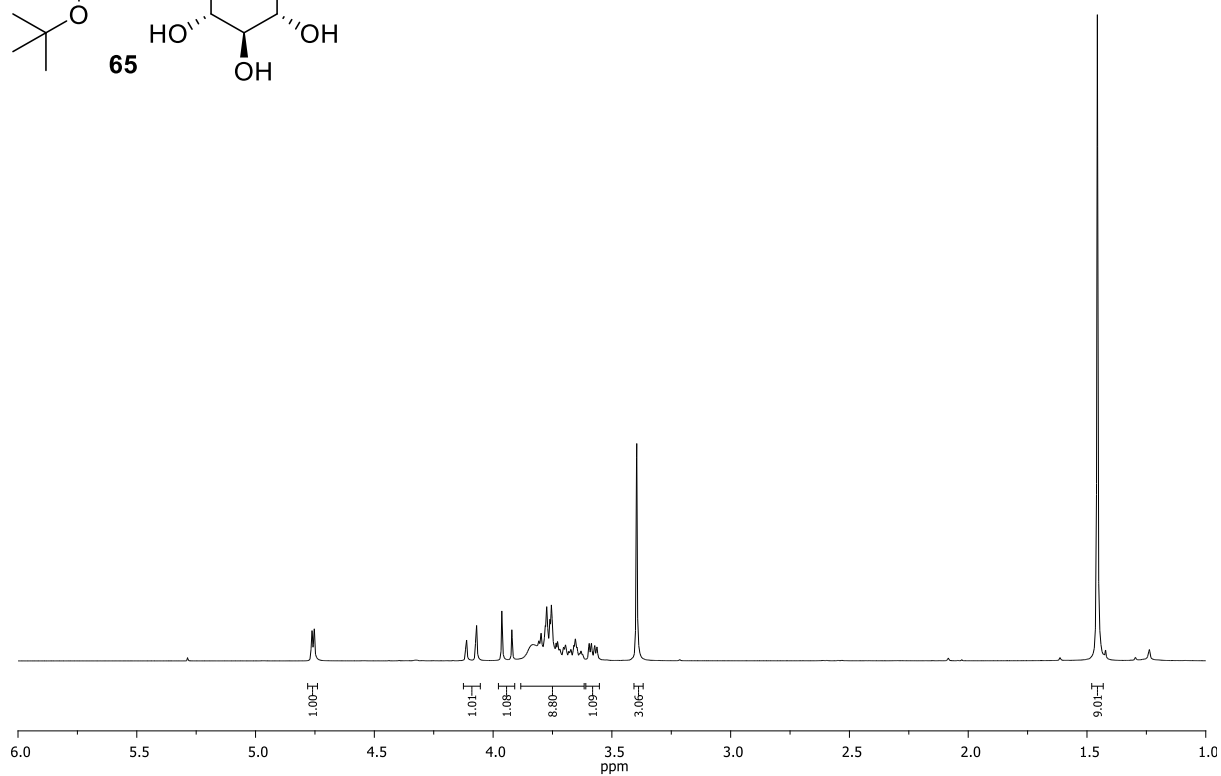
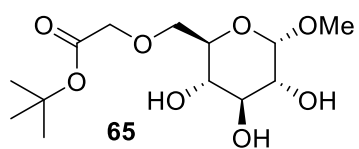


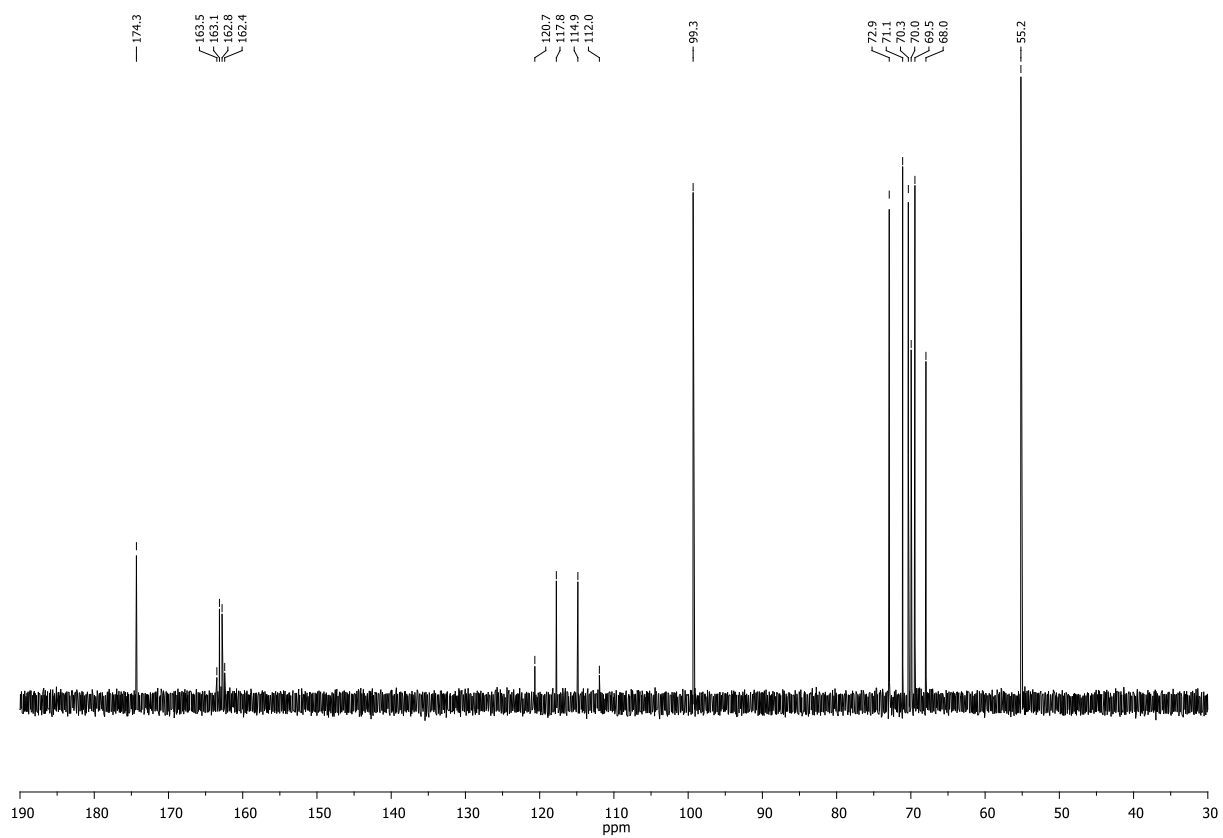
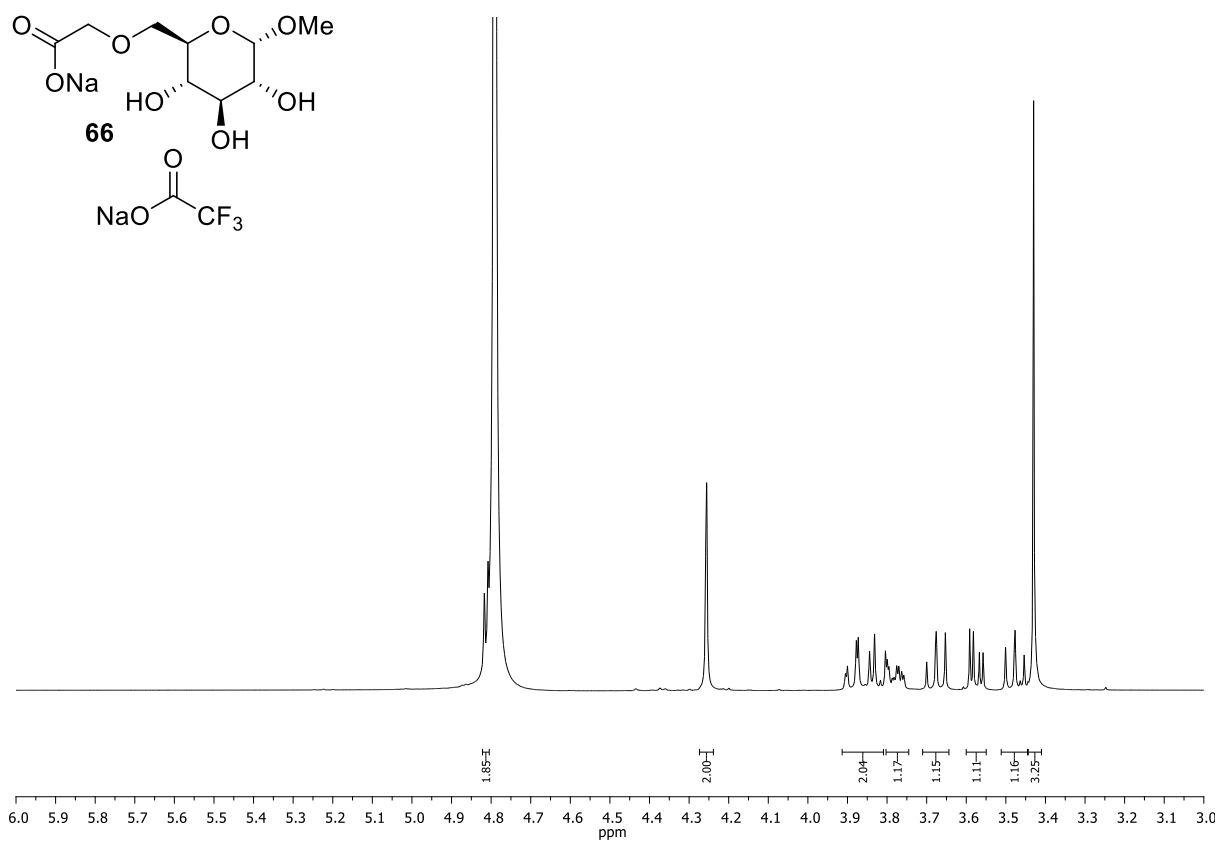




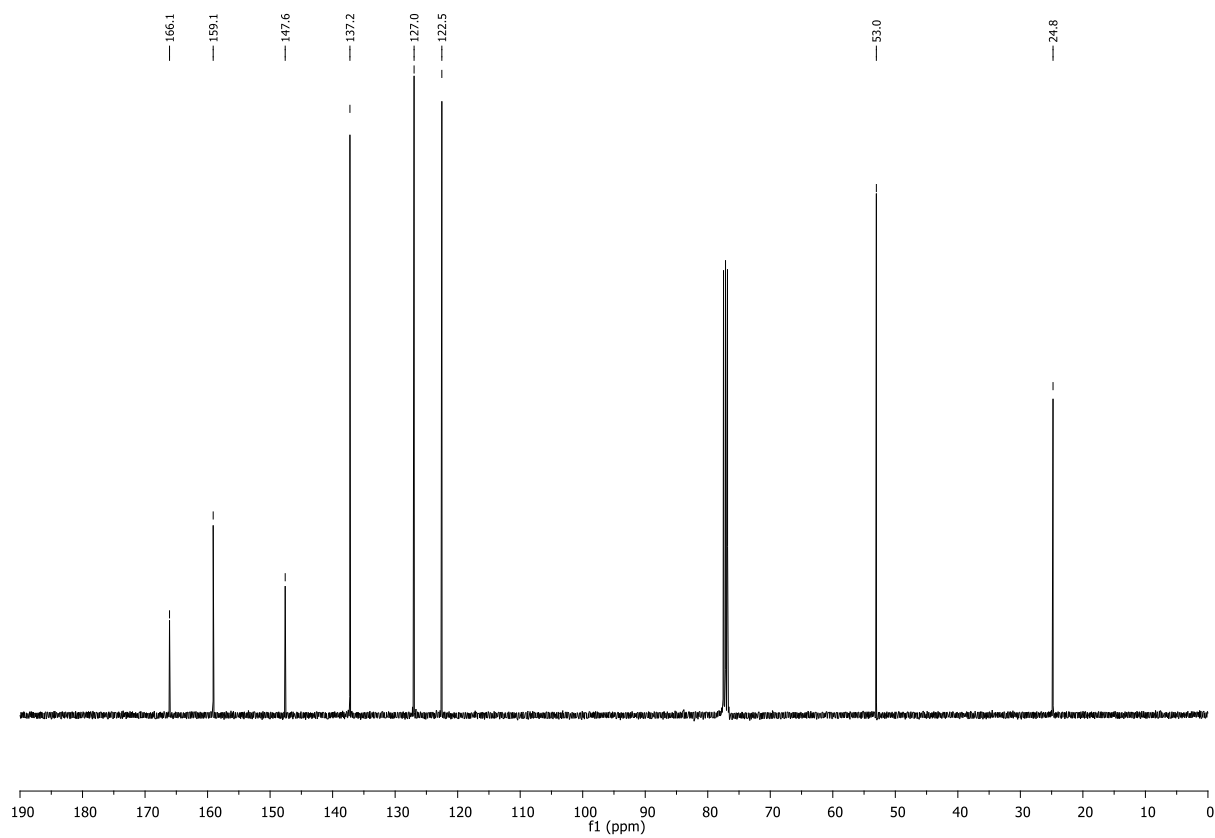
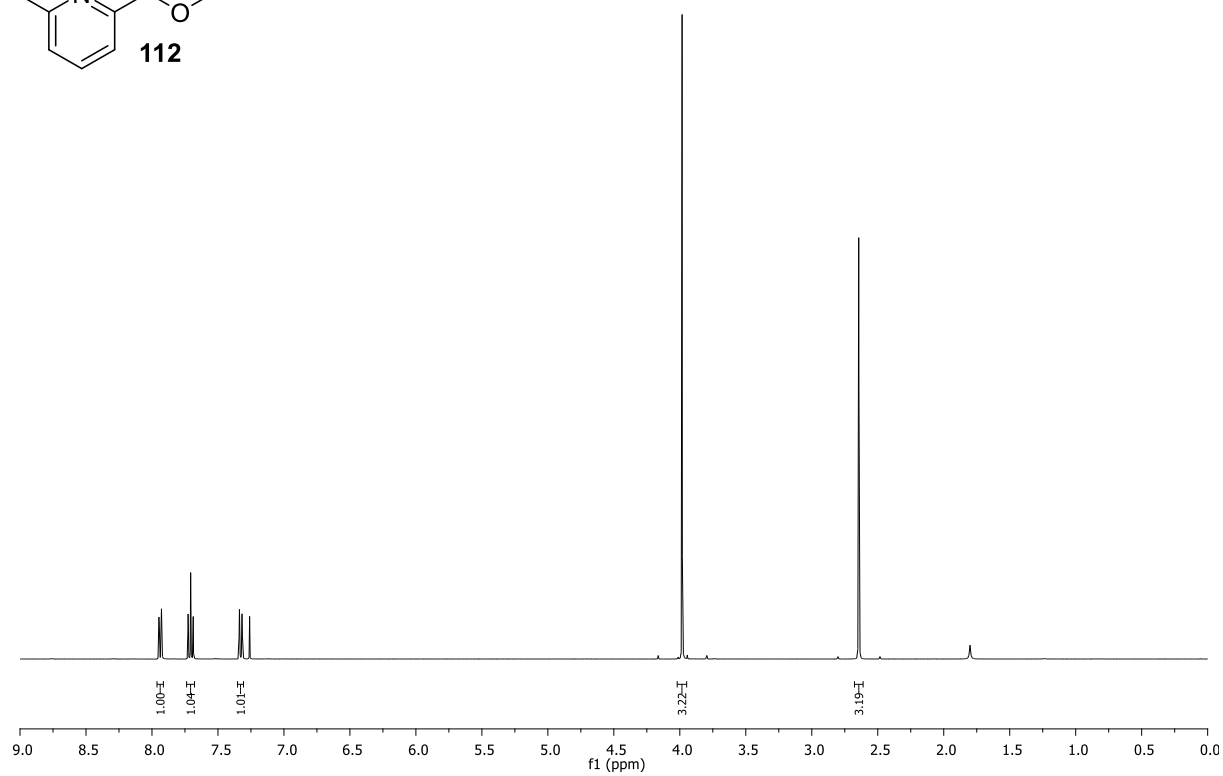
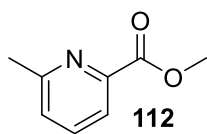


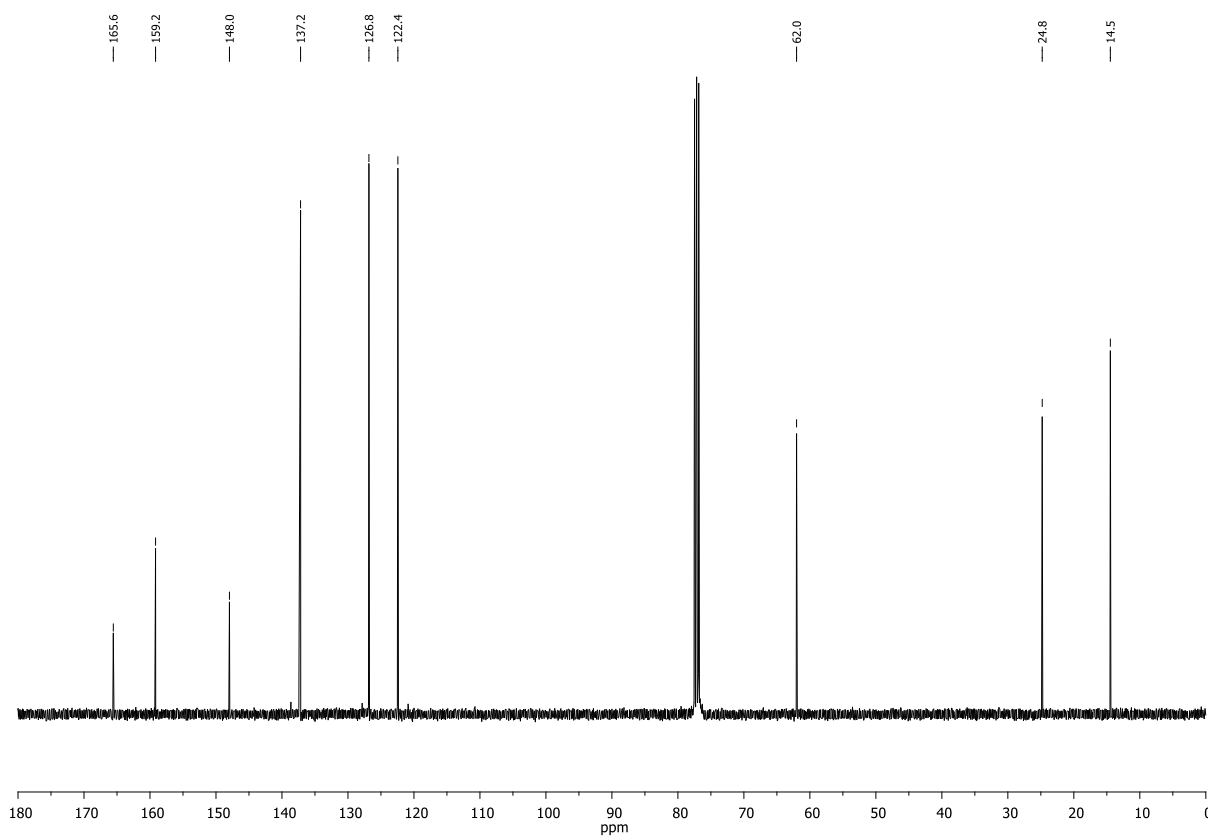
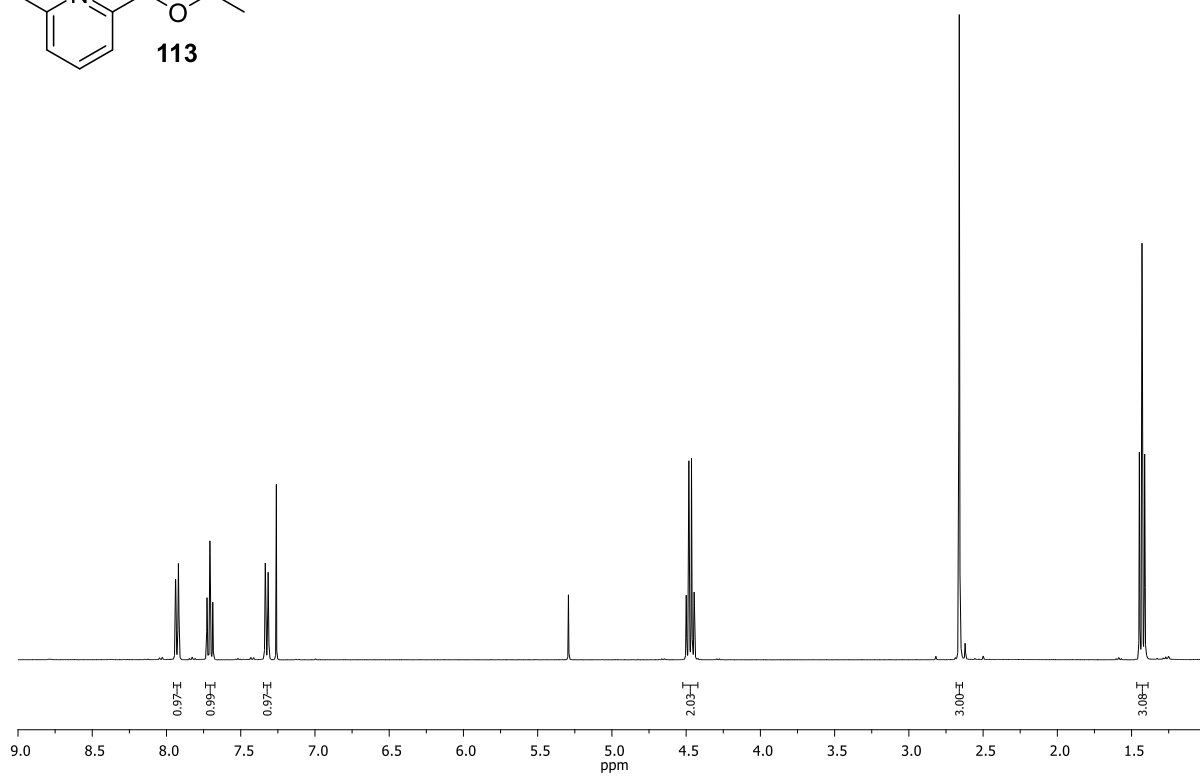
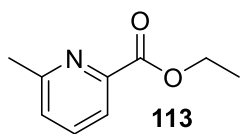


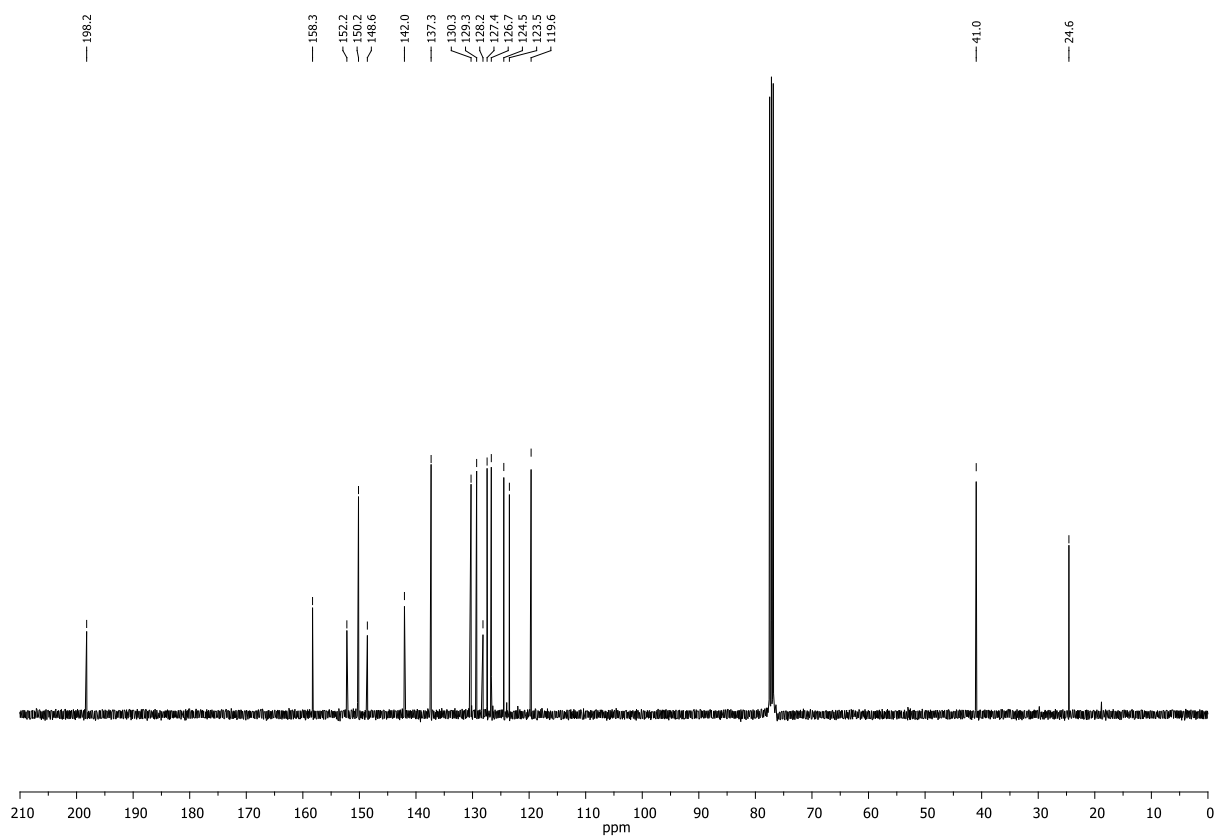
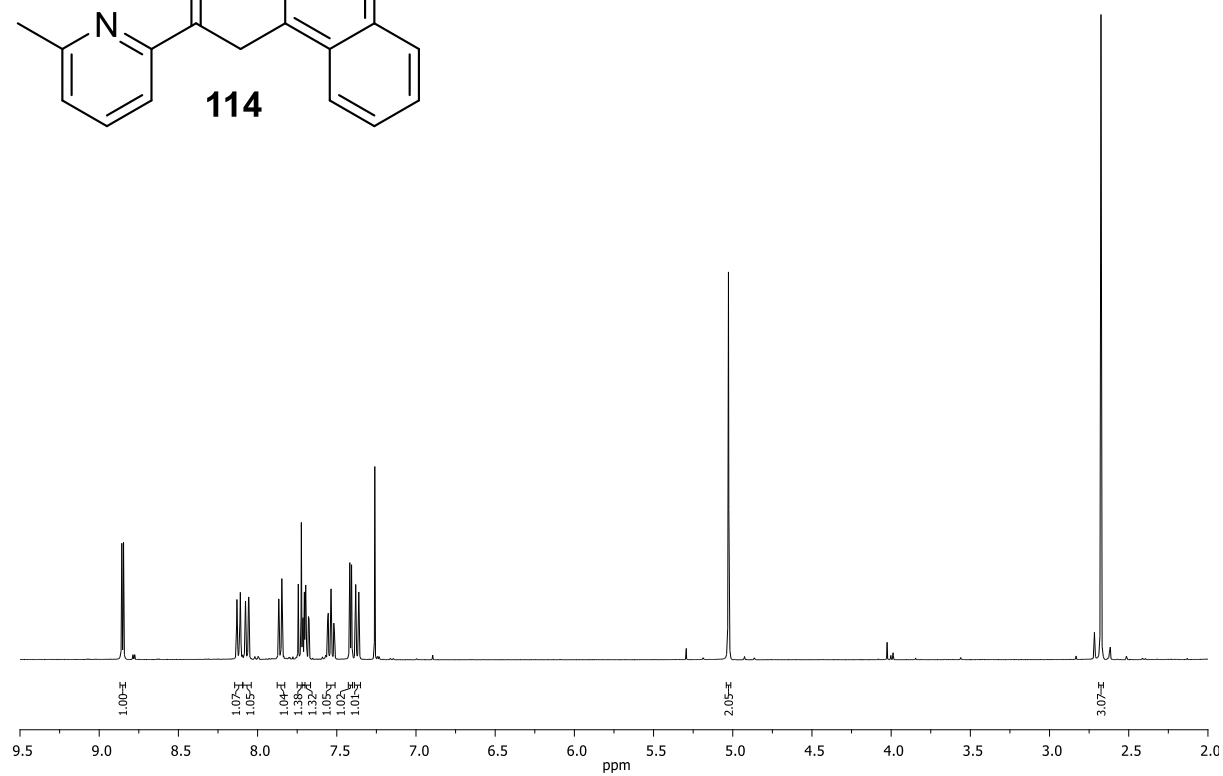
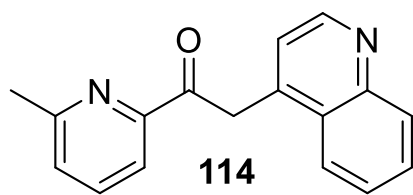


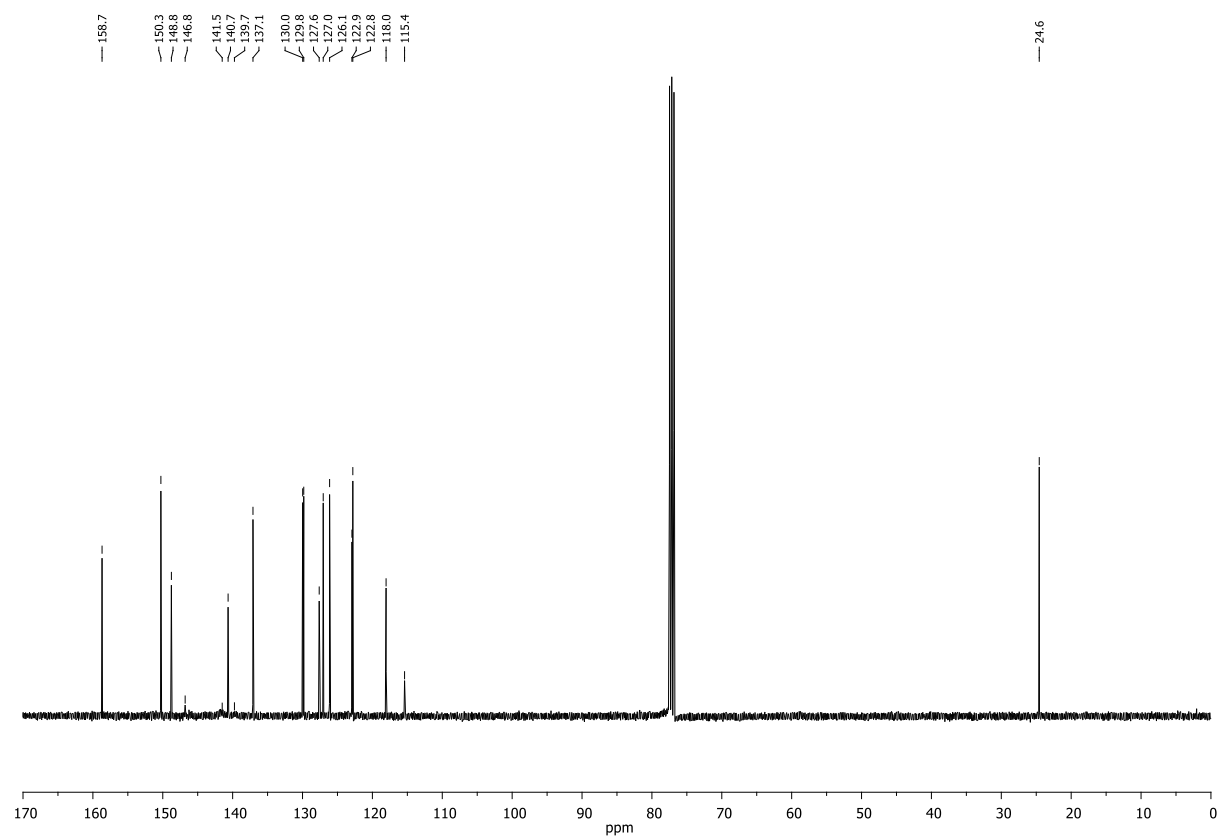
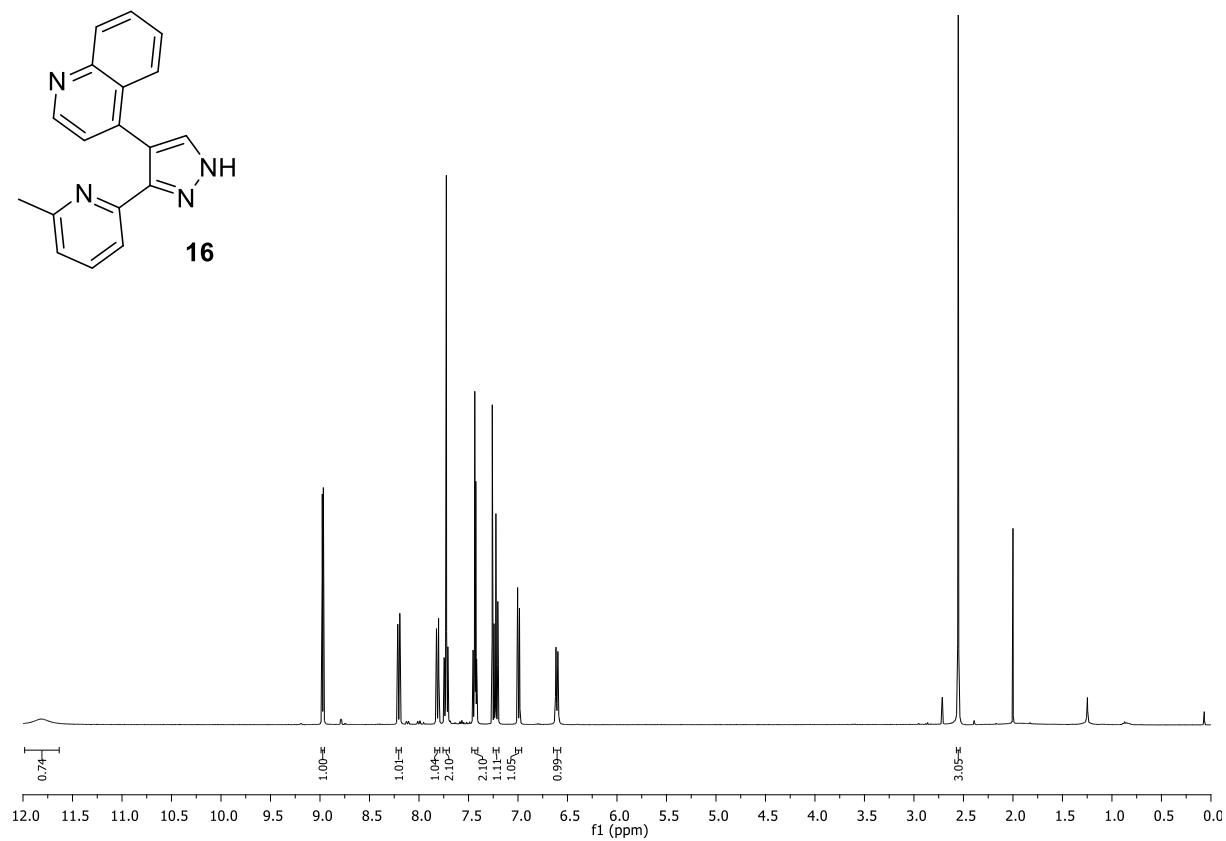
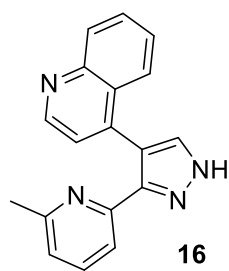


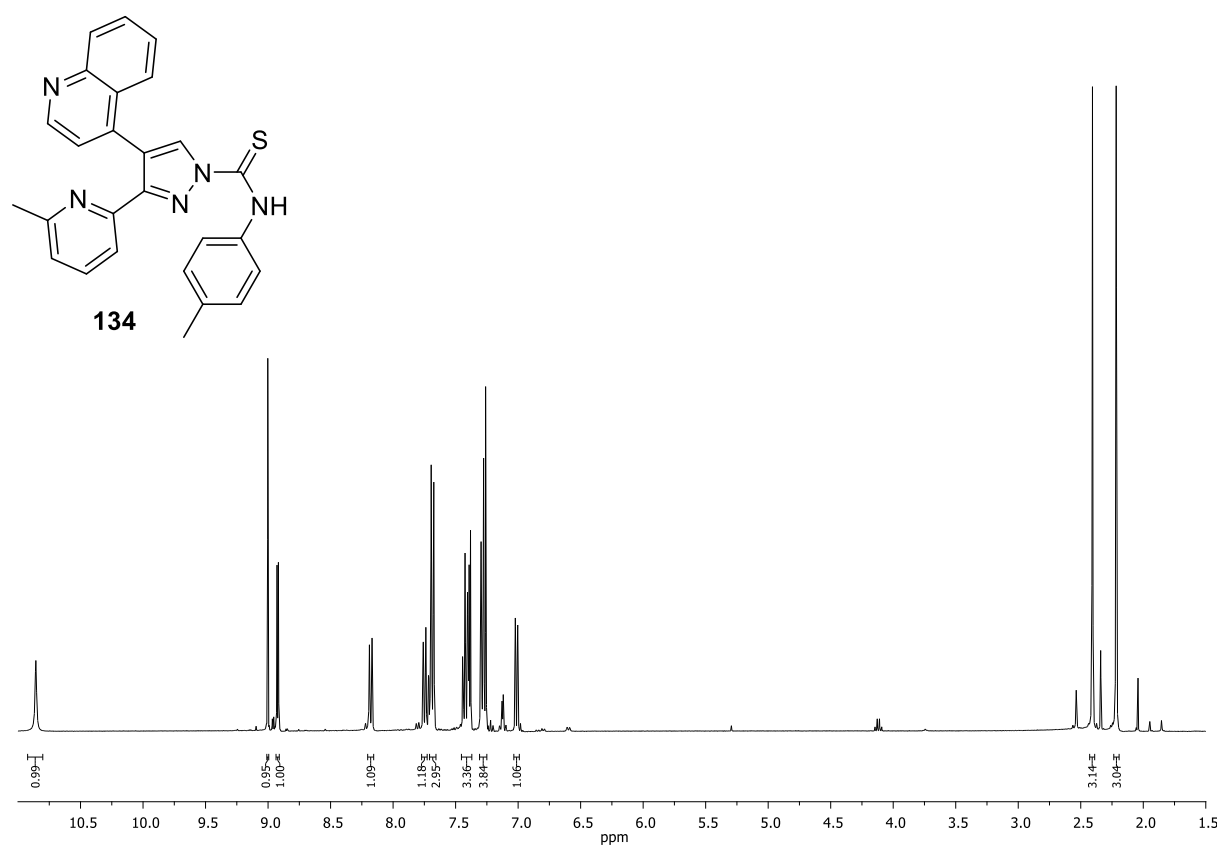
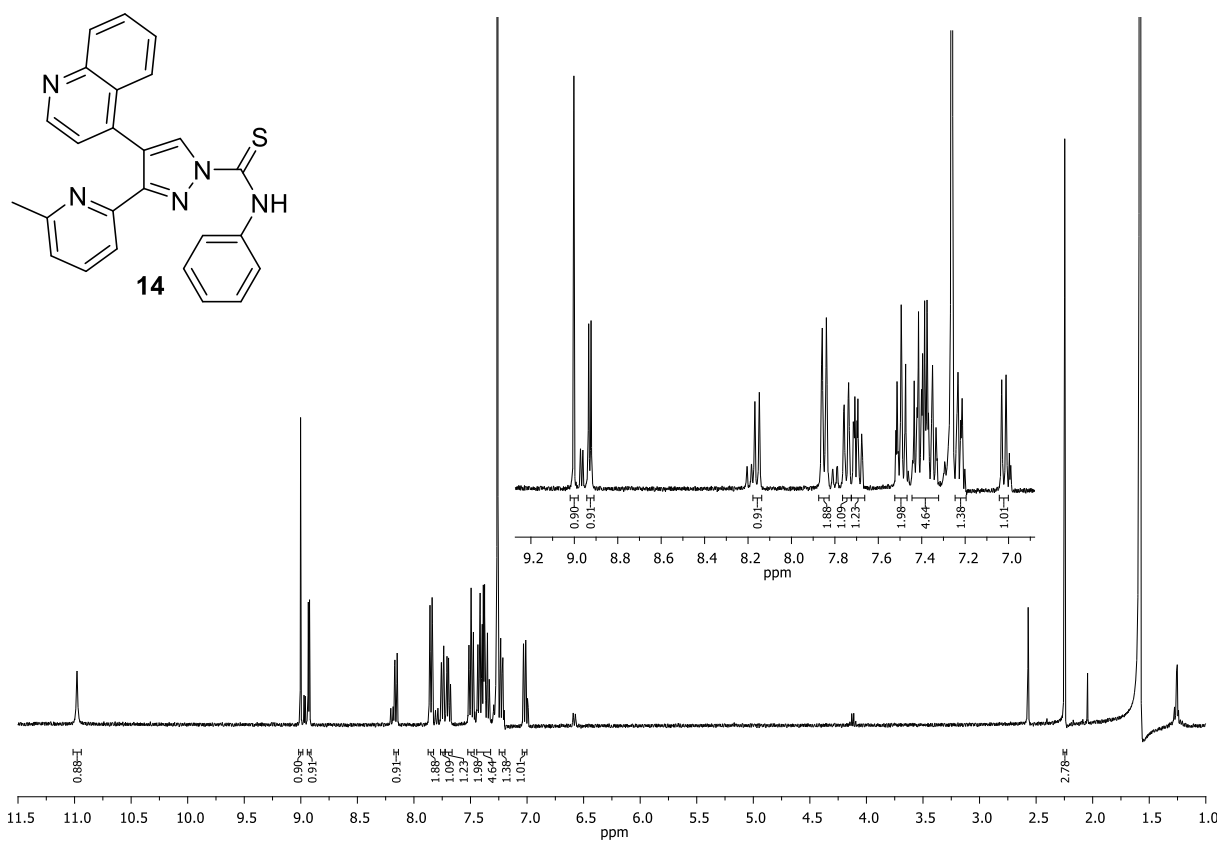
8.2 SPEKTRENANHANG ZU KAPITEL 5

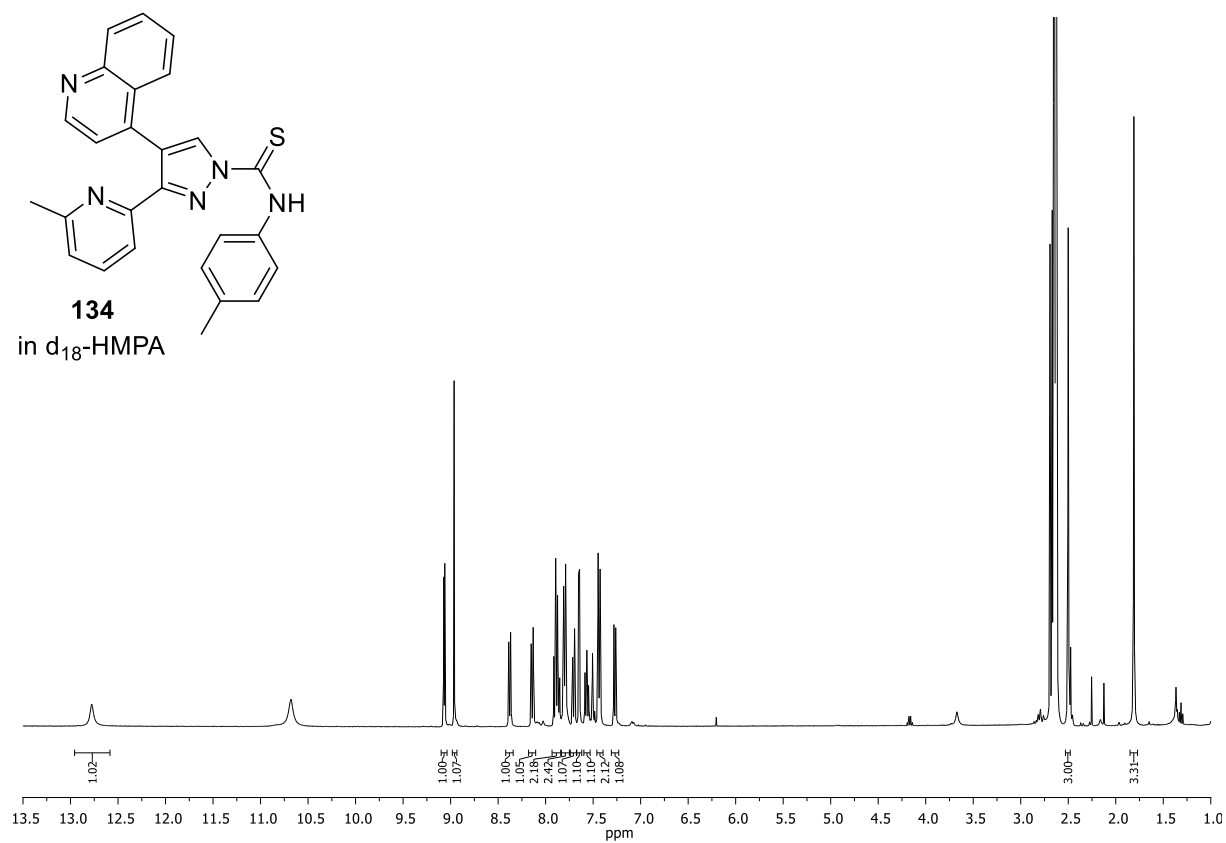


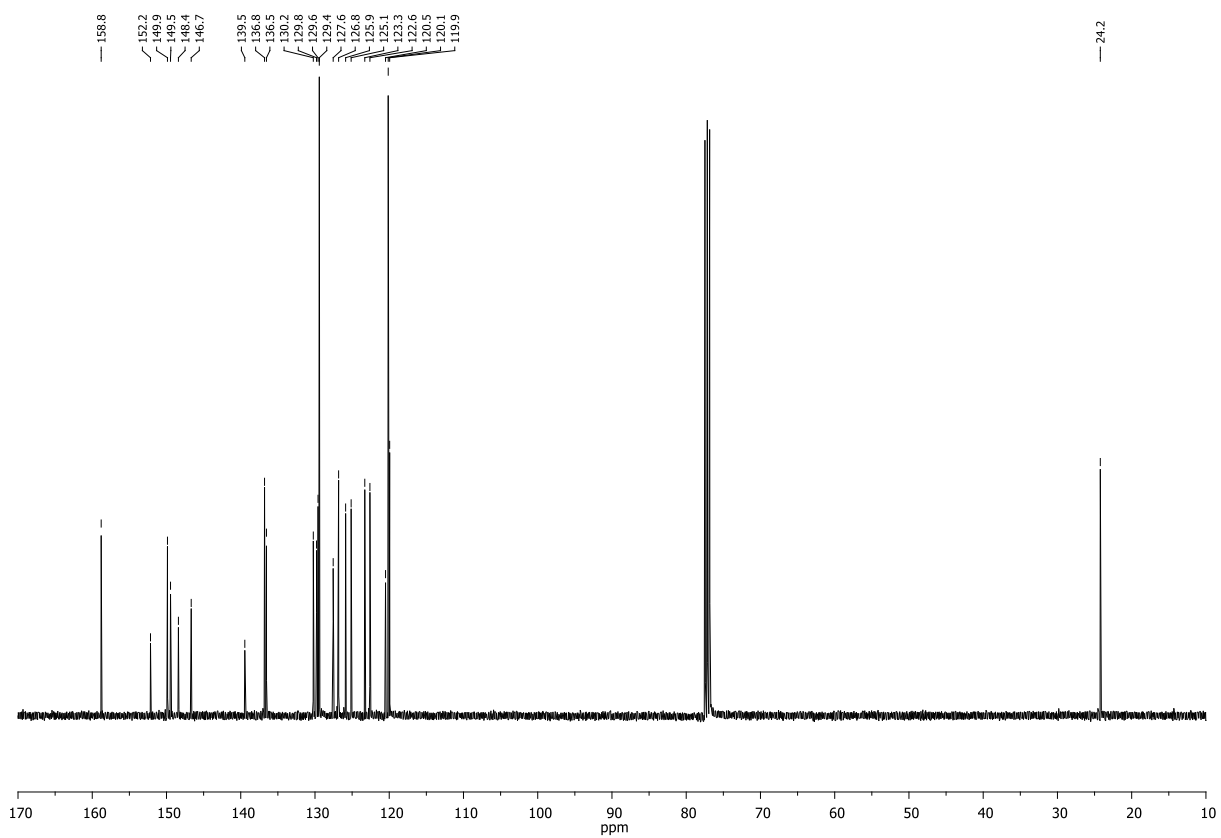
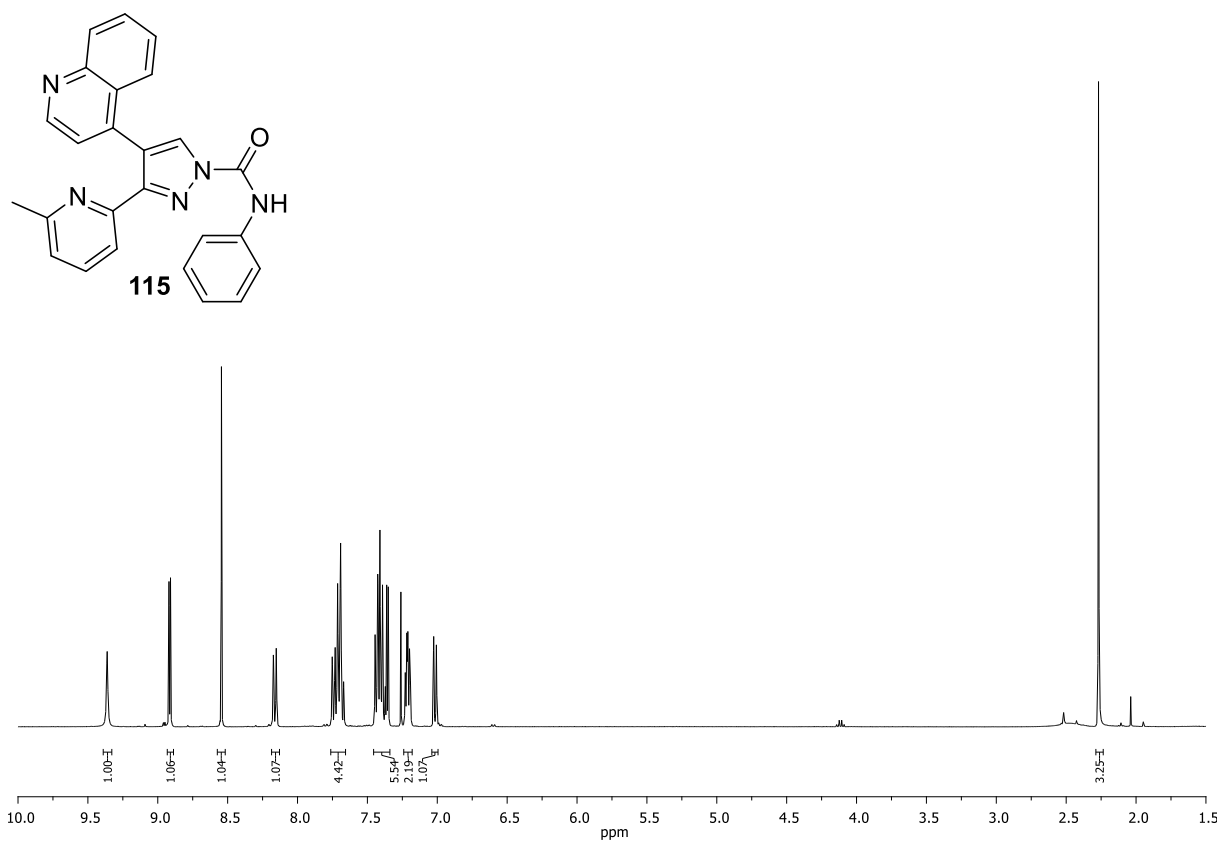


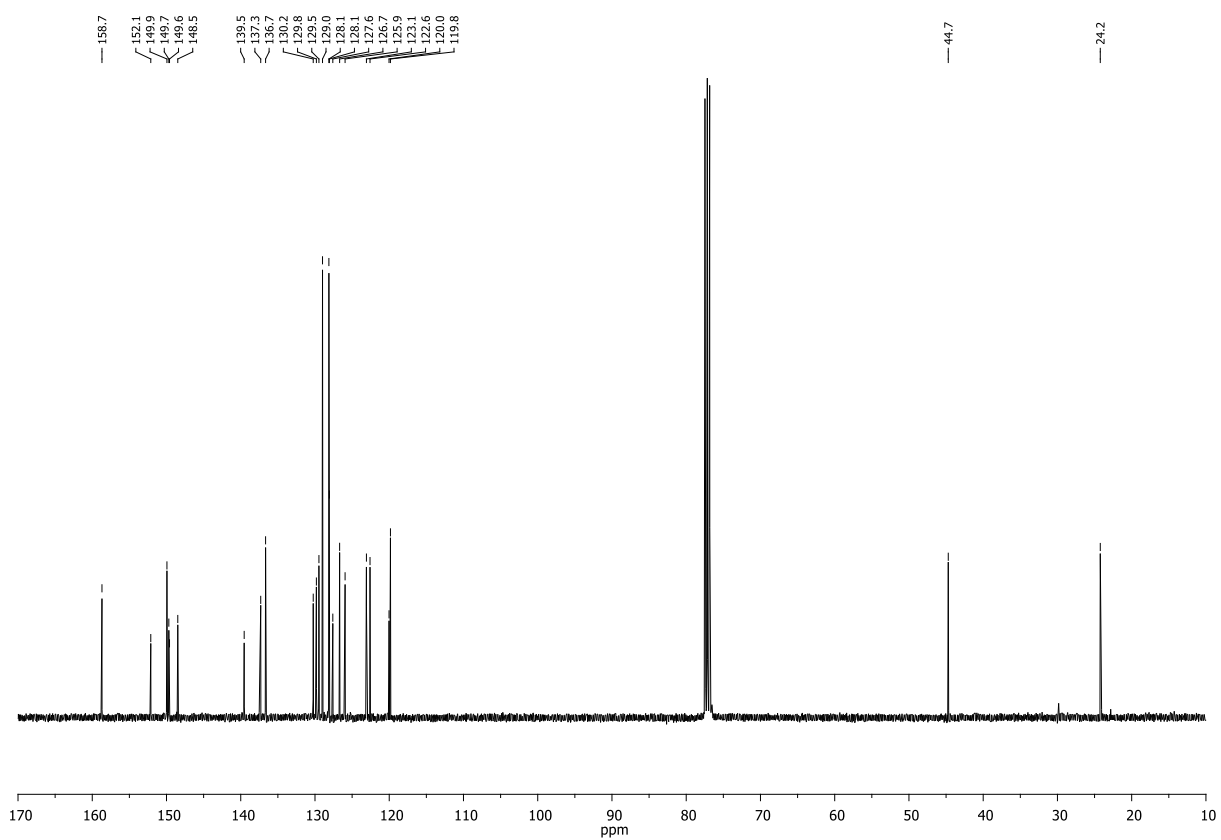
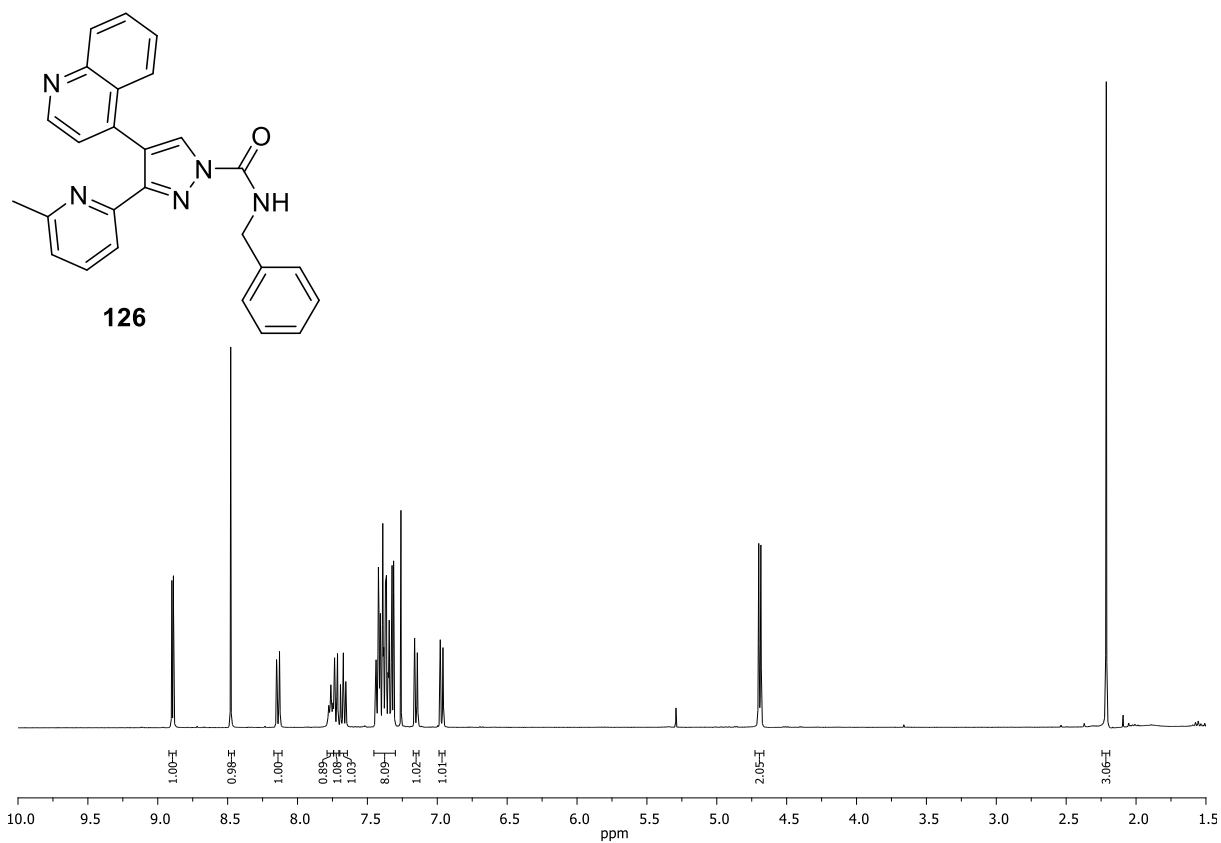


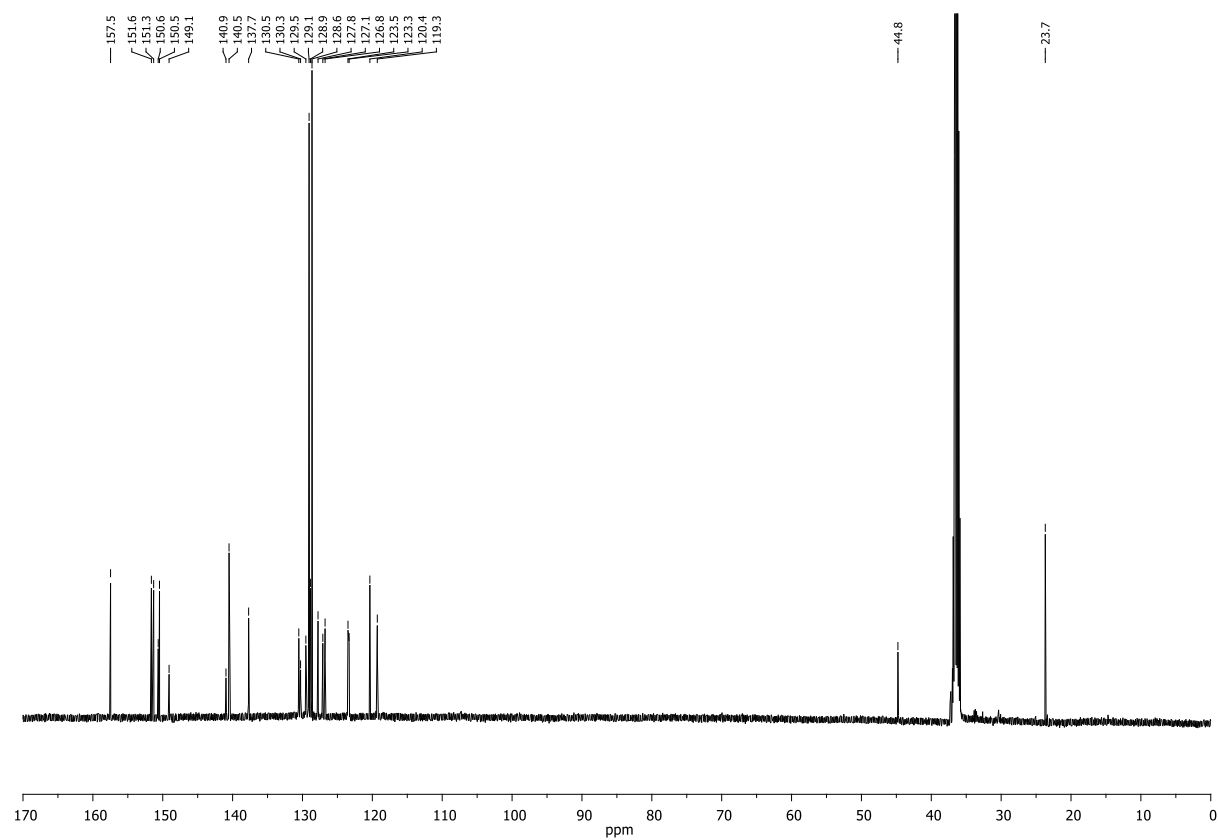
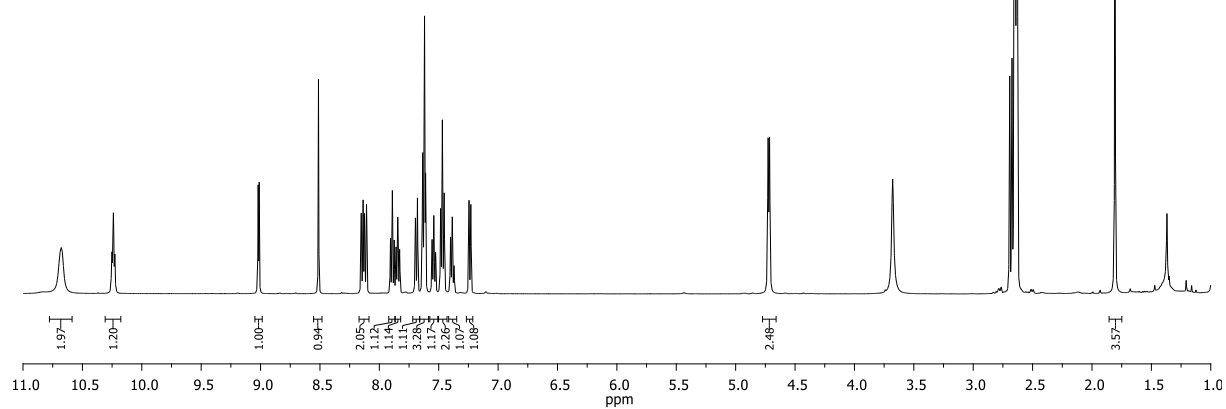
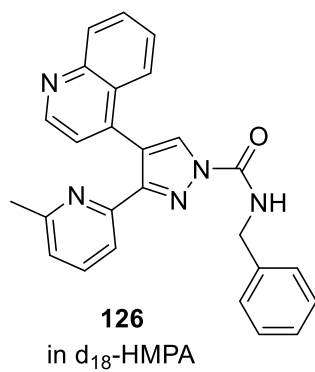


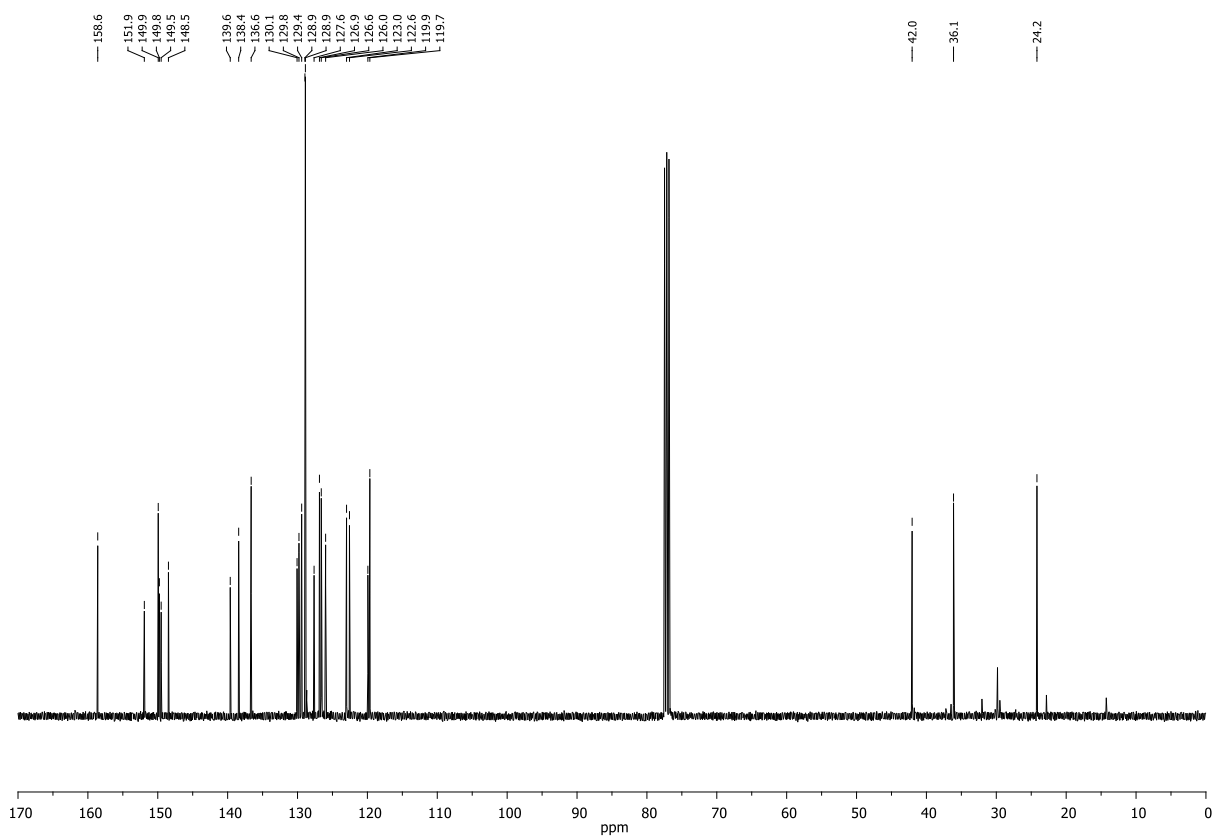
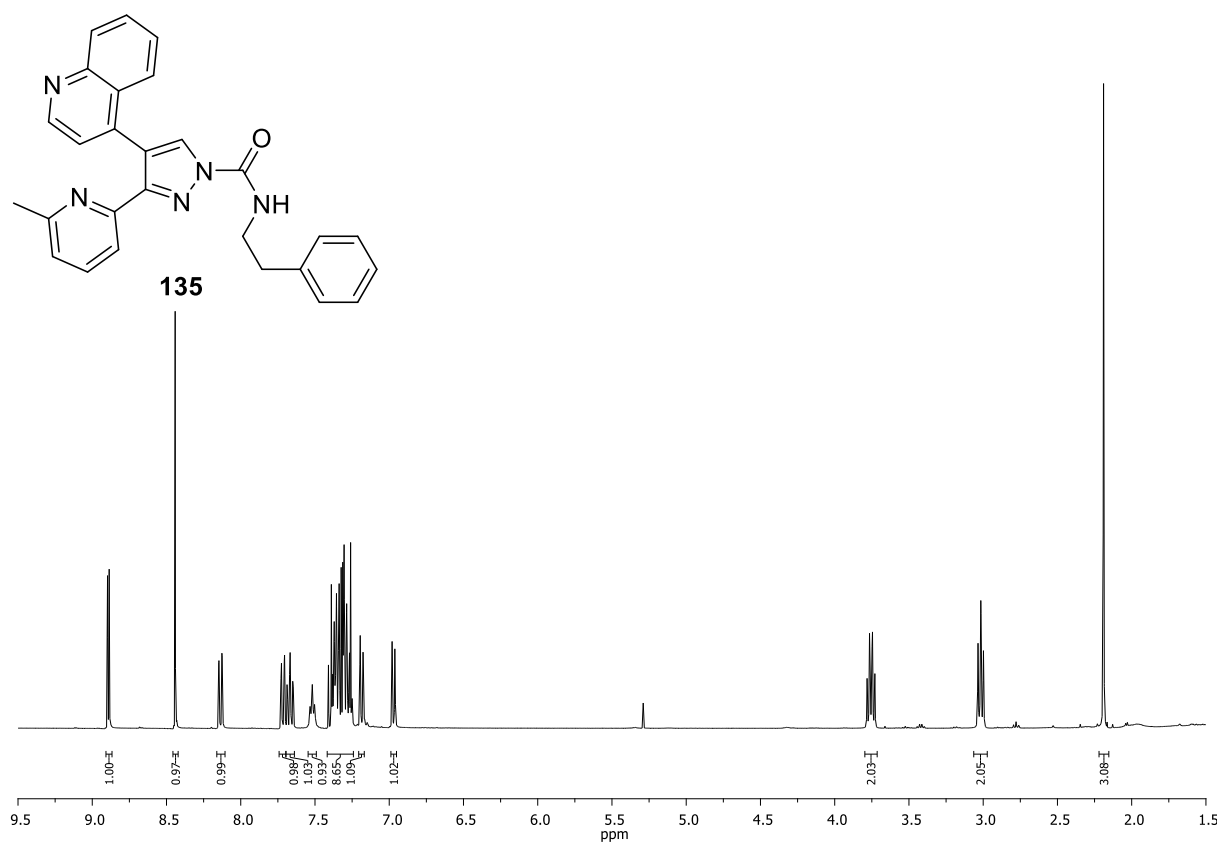


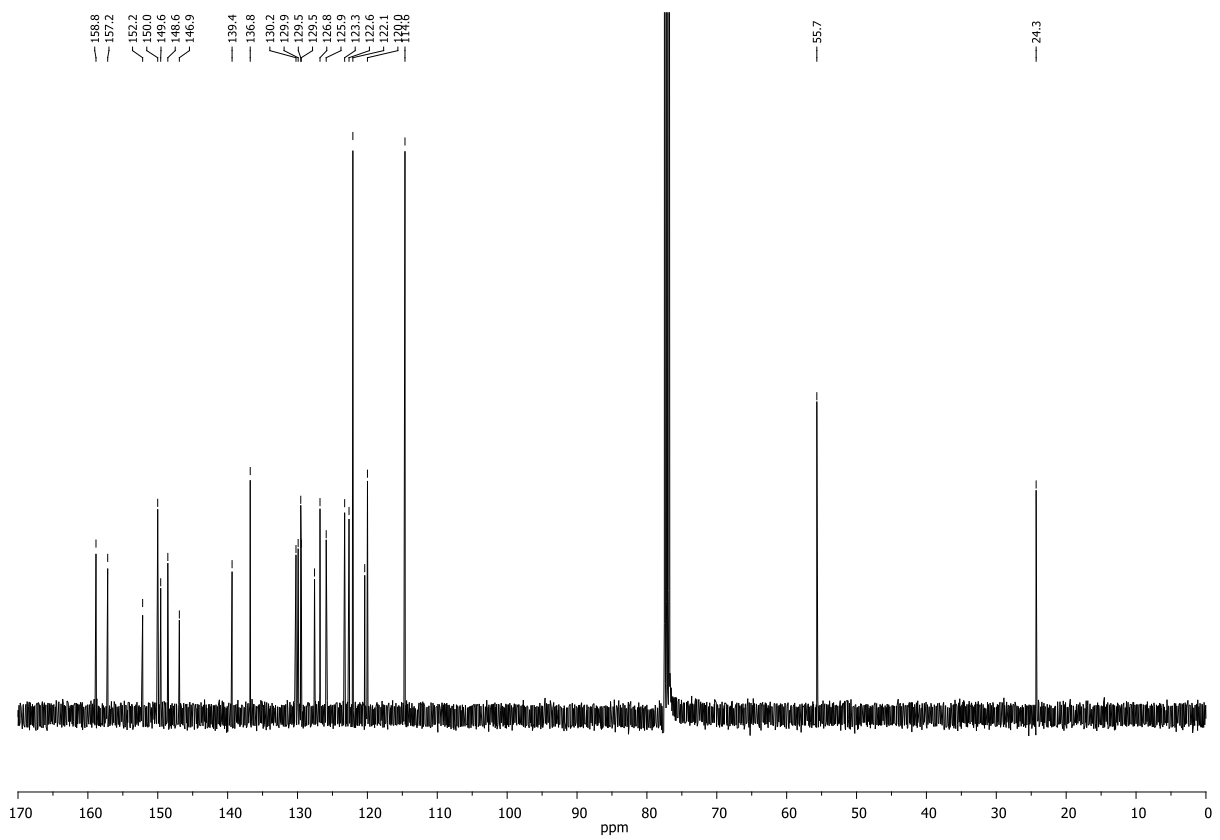
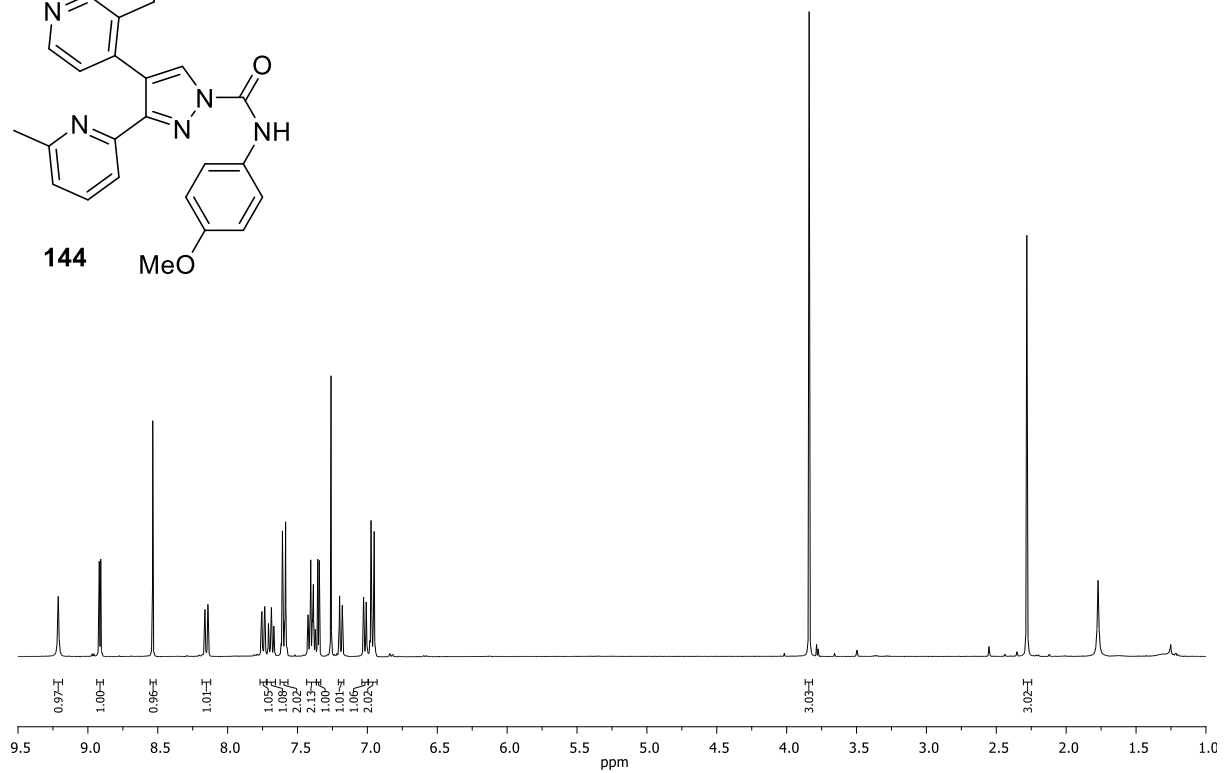
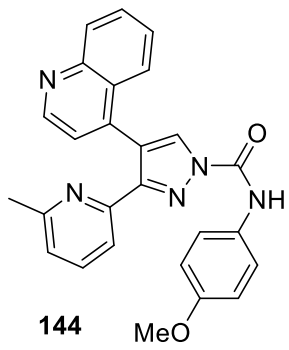


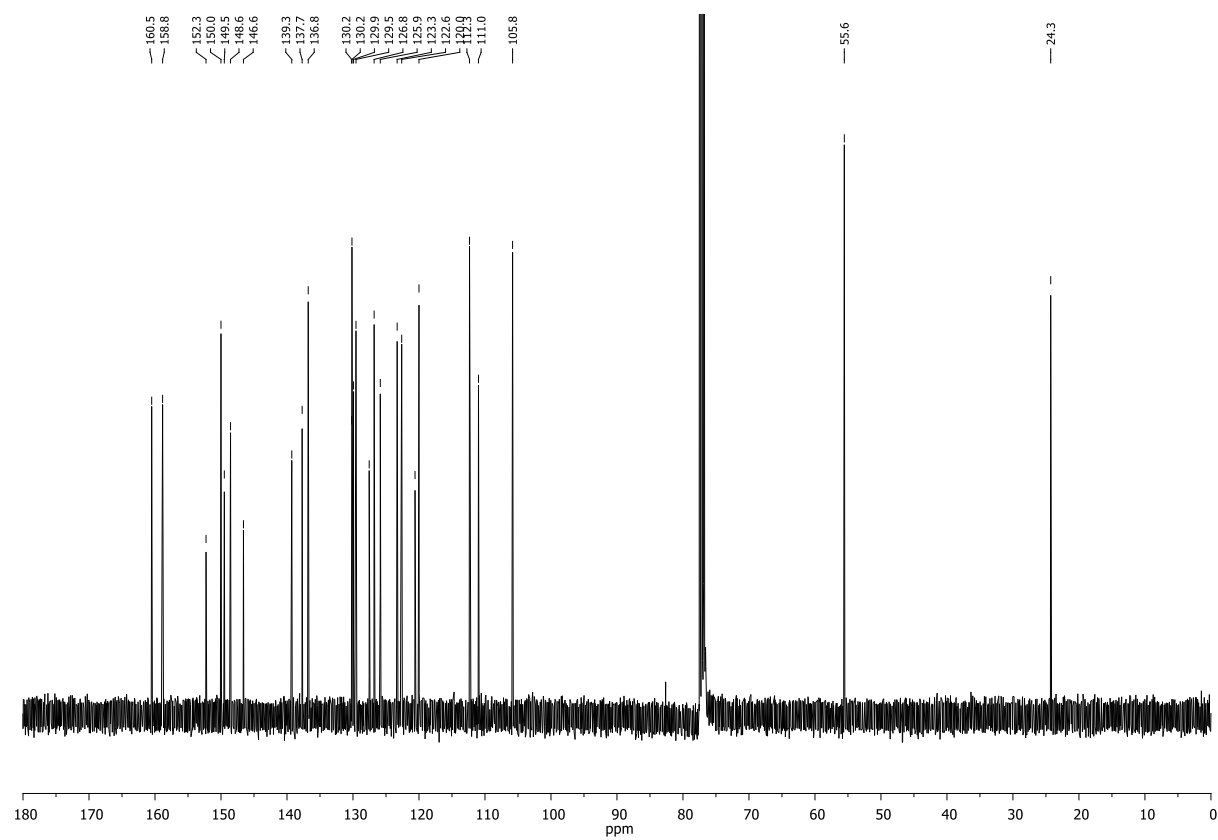
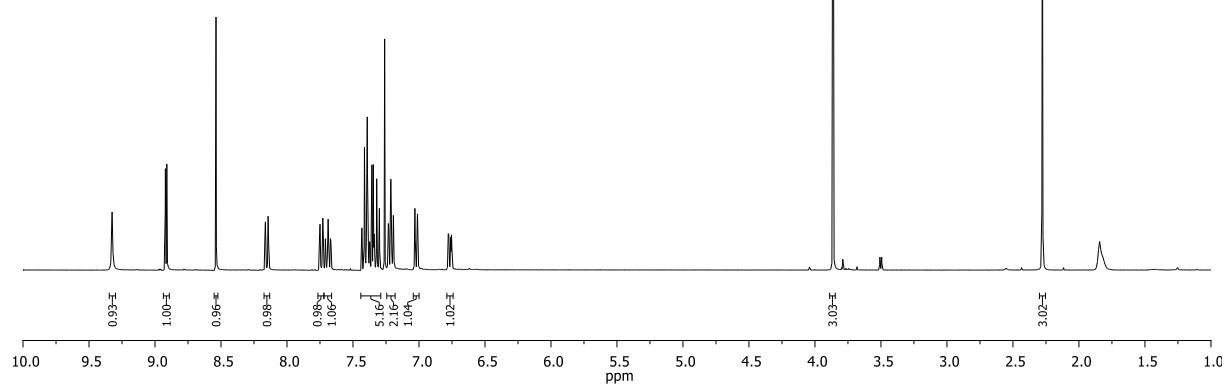
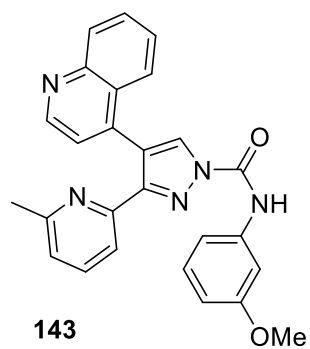


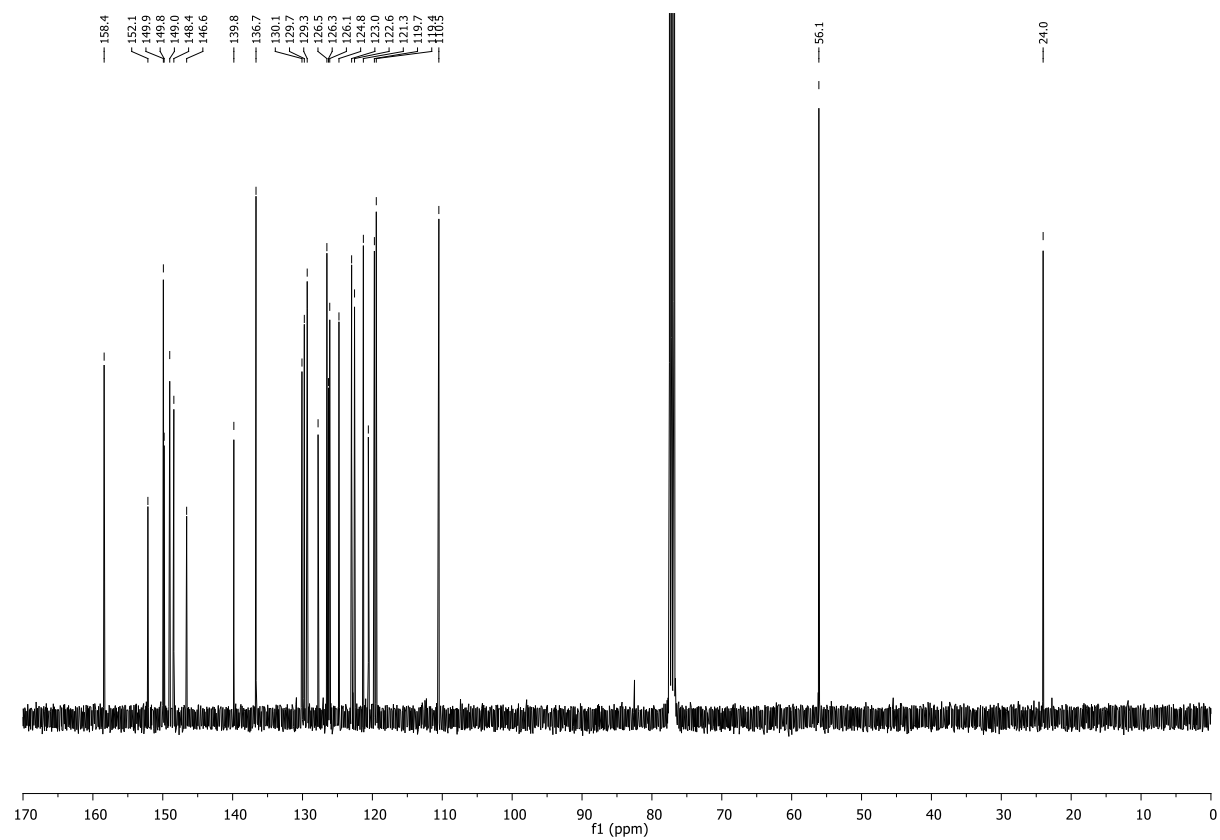
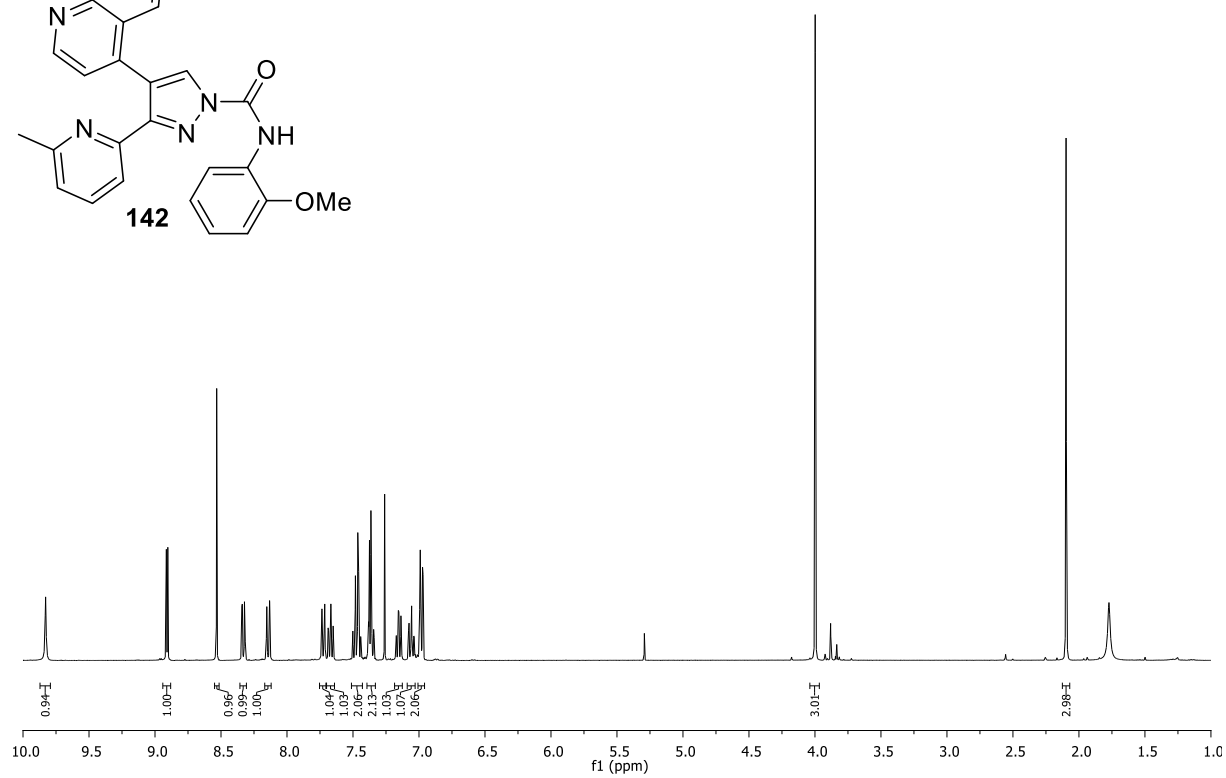
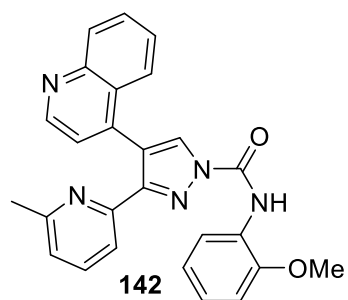


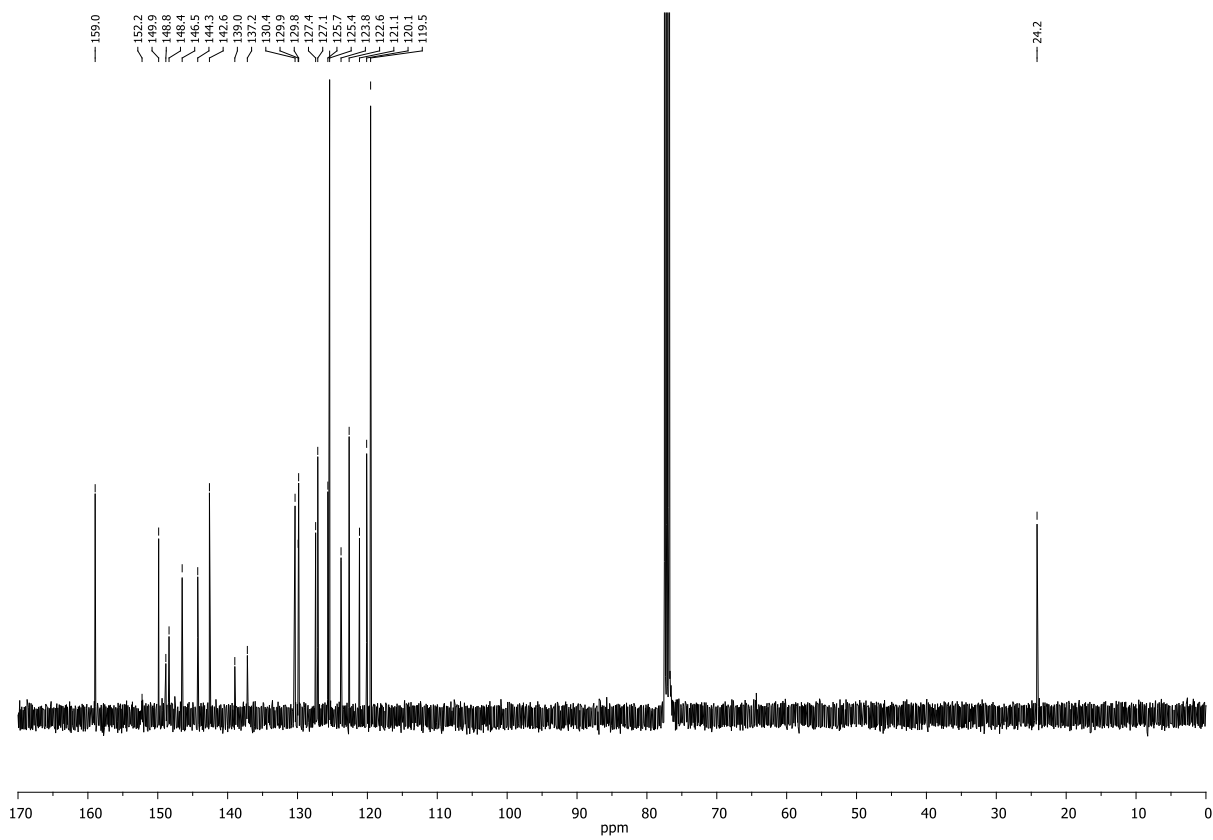
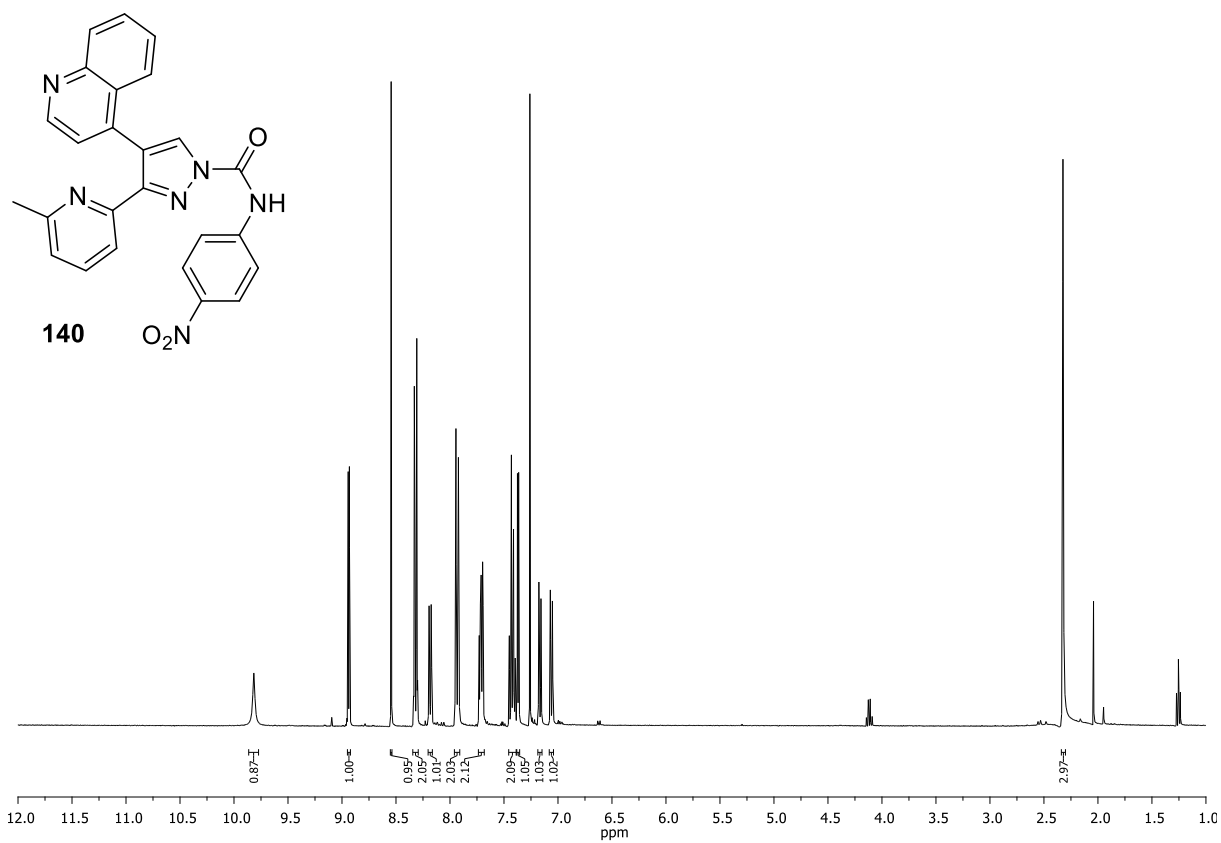


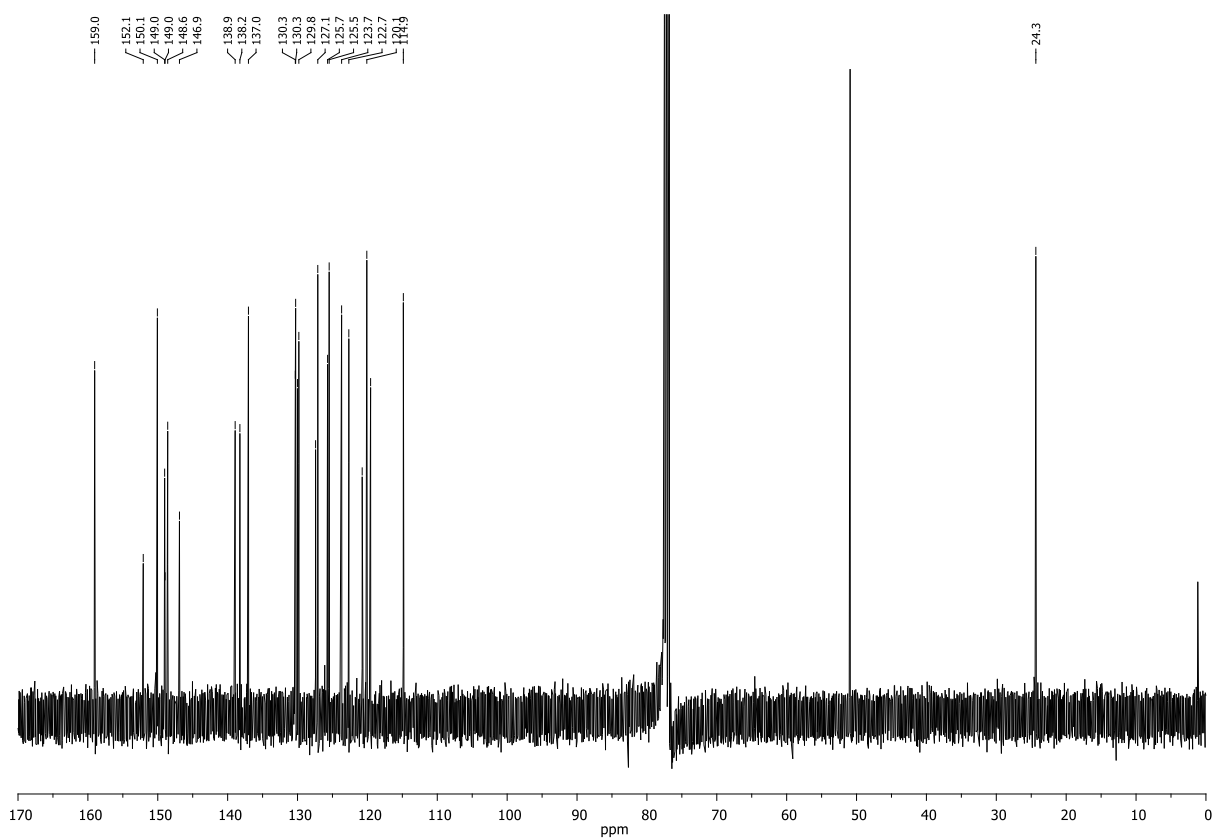
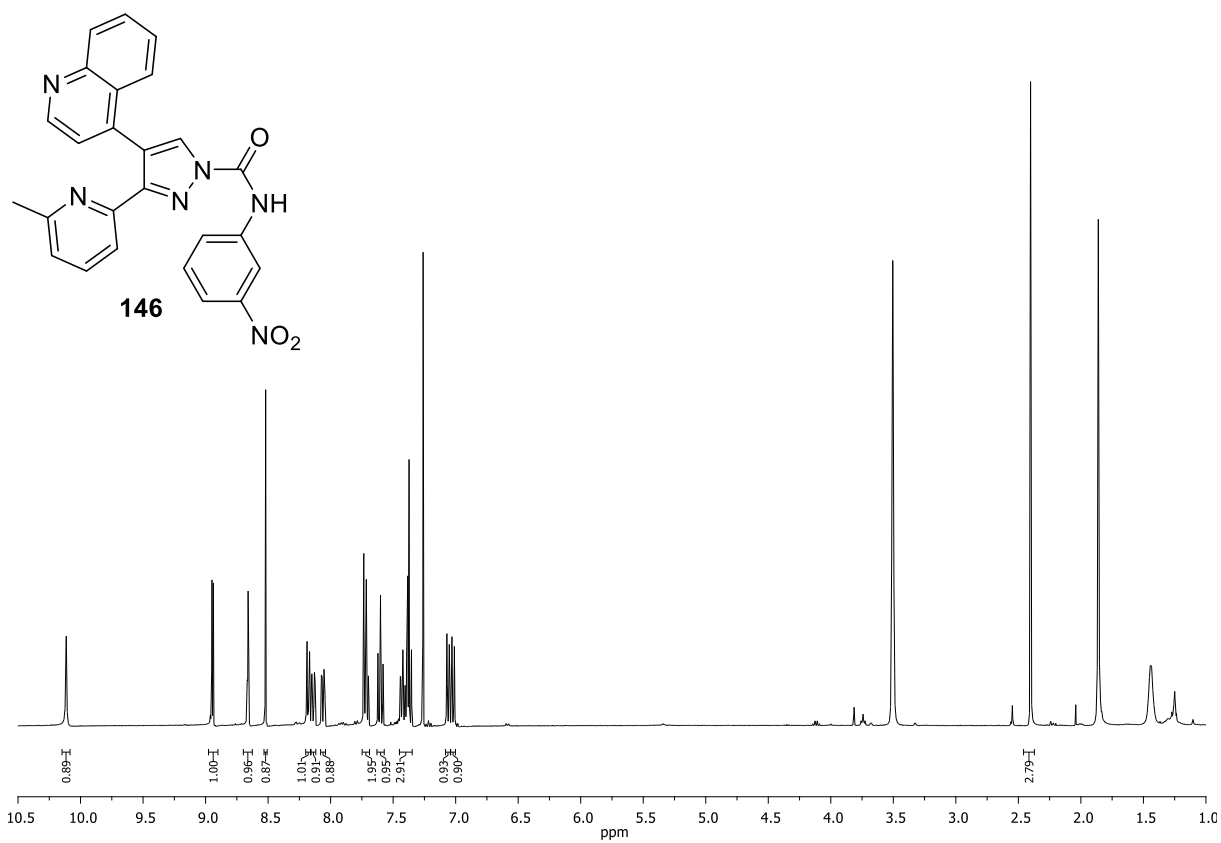


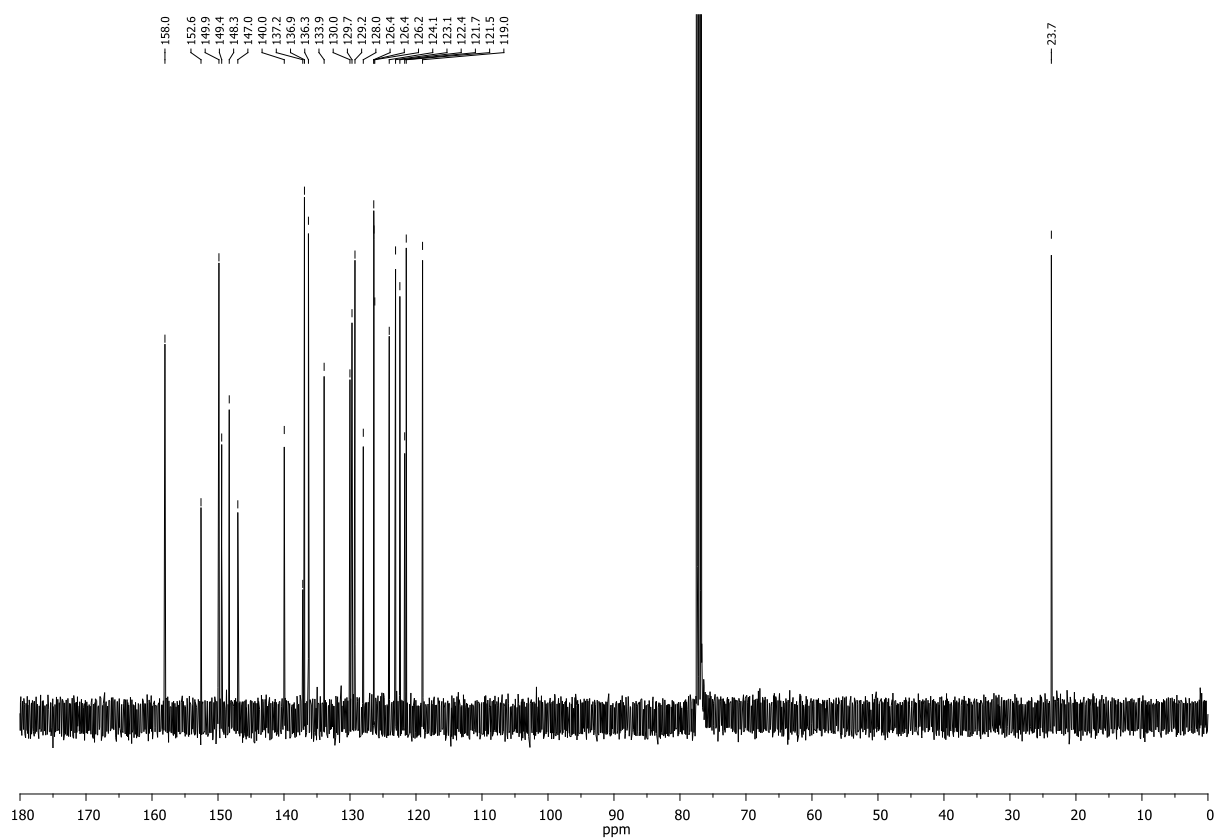
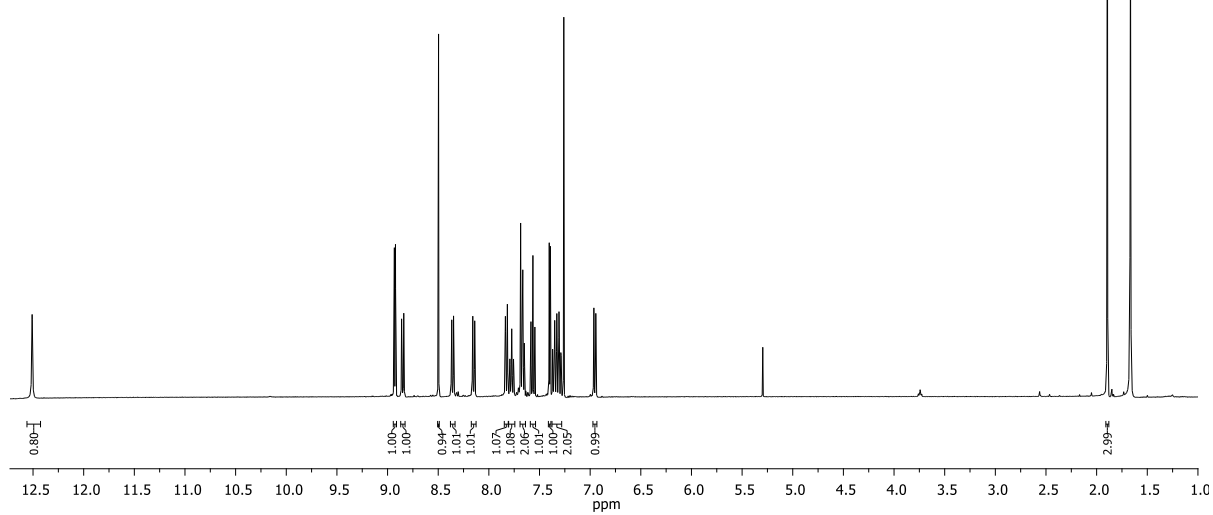
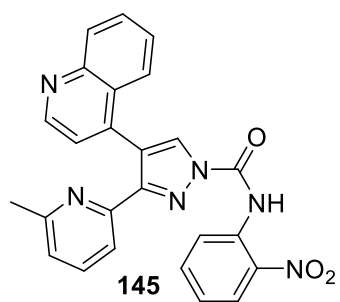


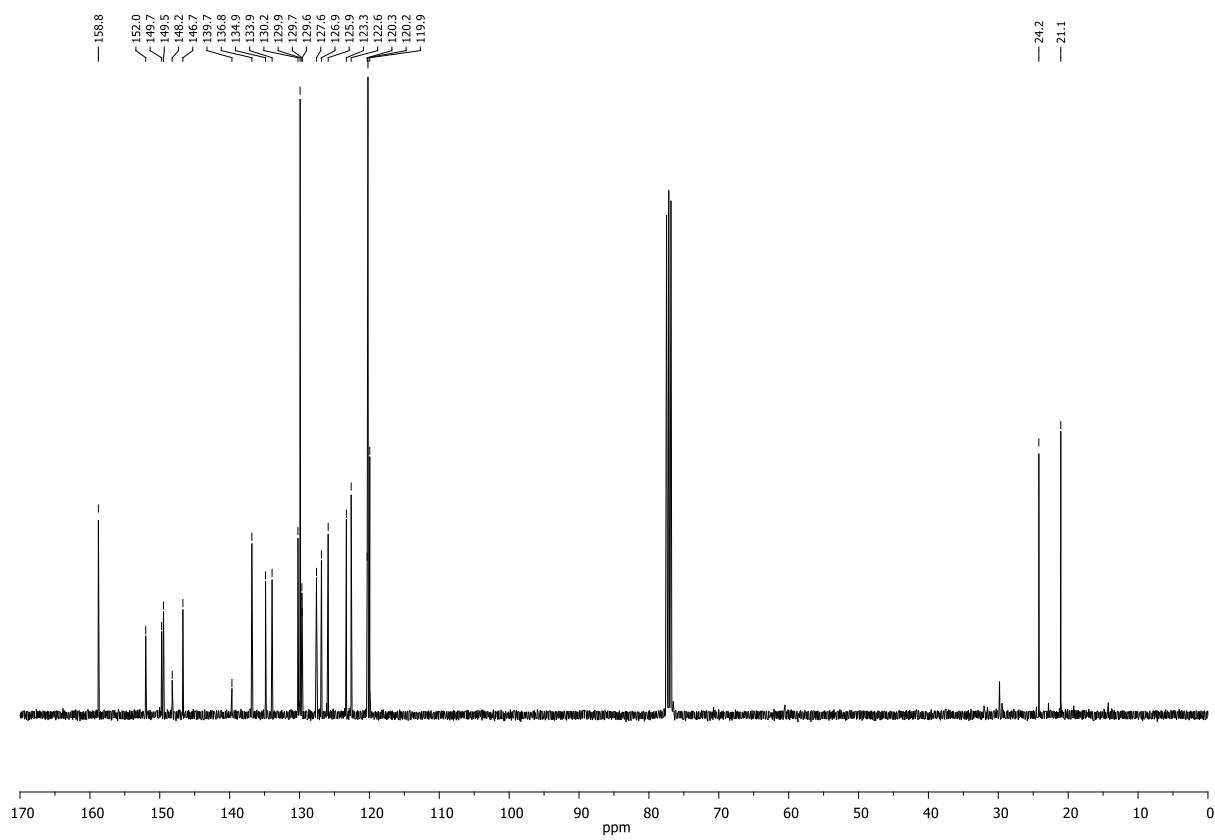
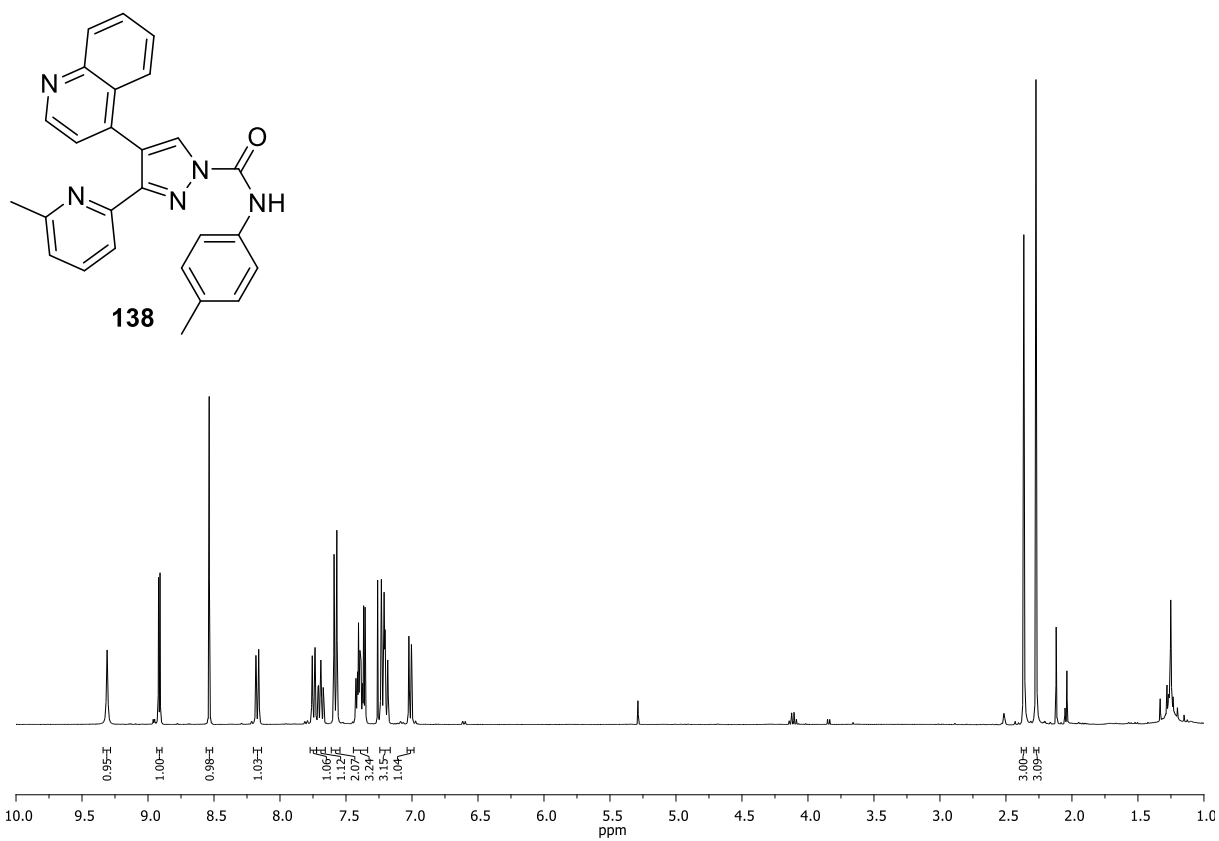


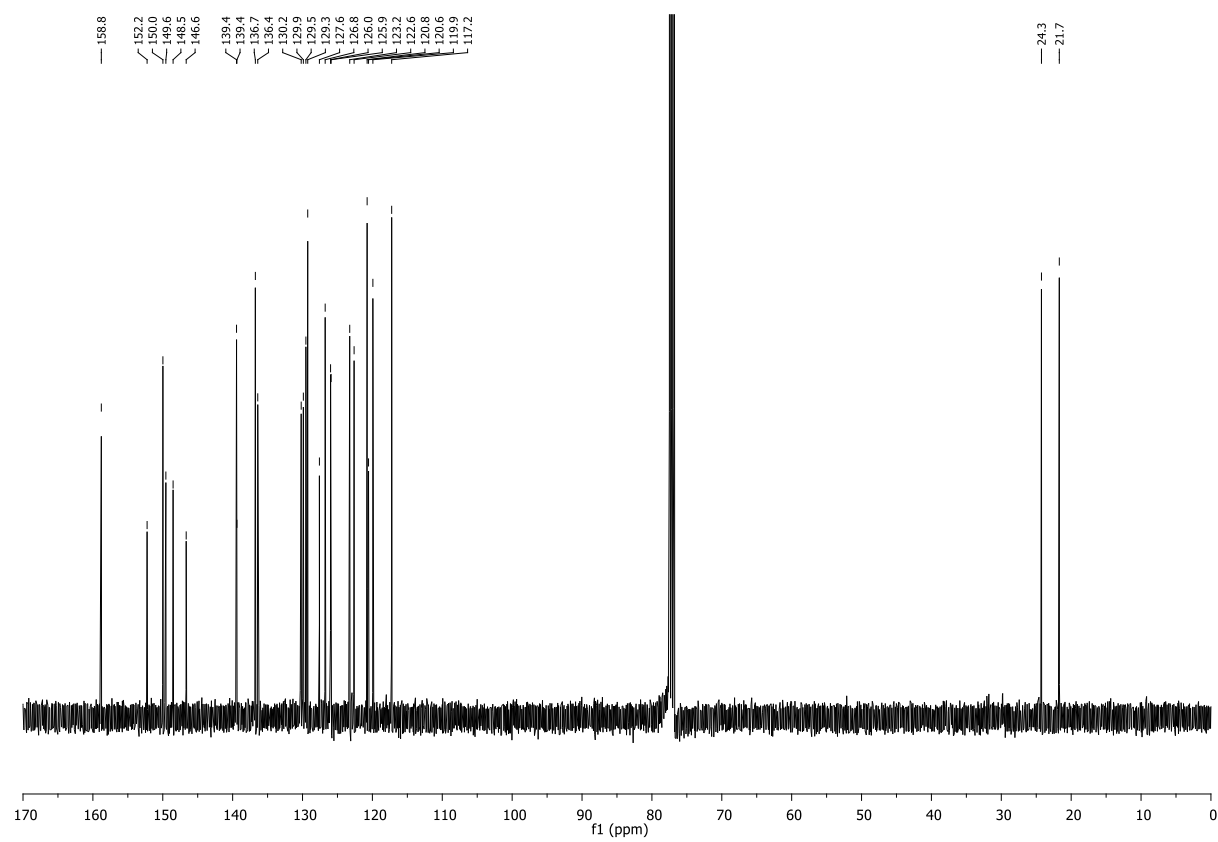
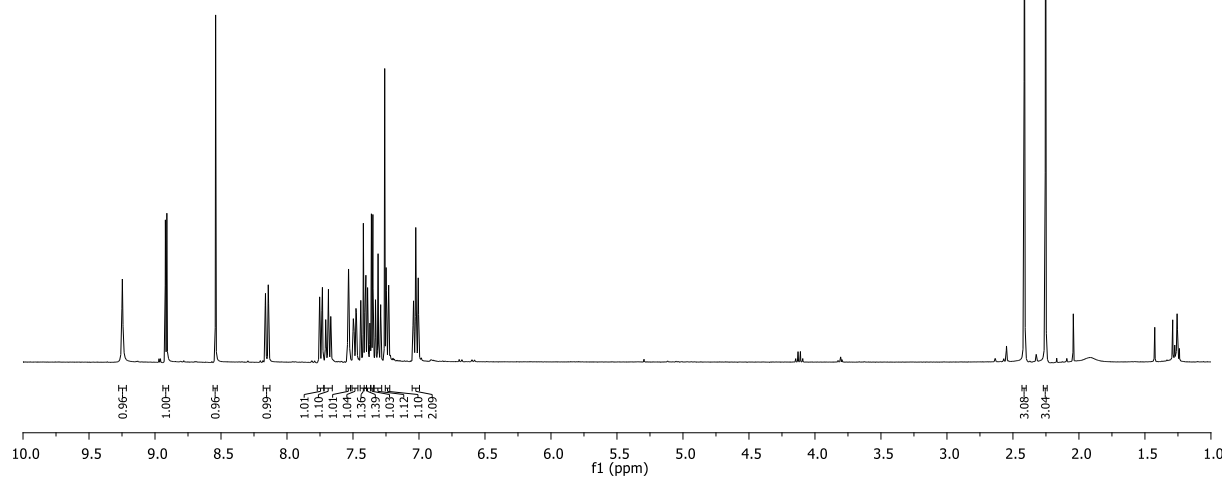
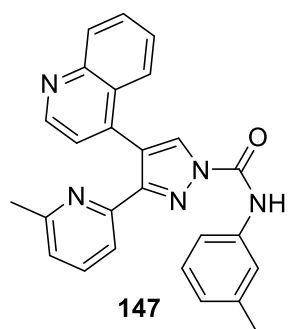


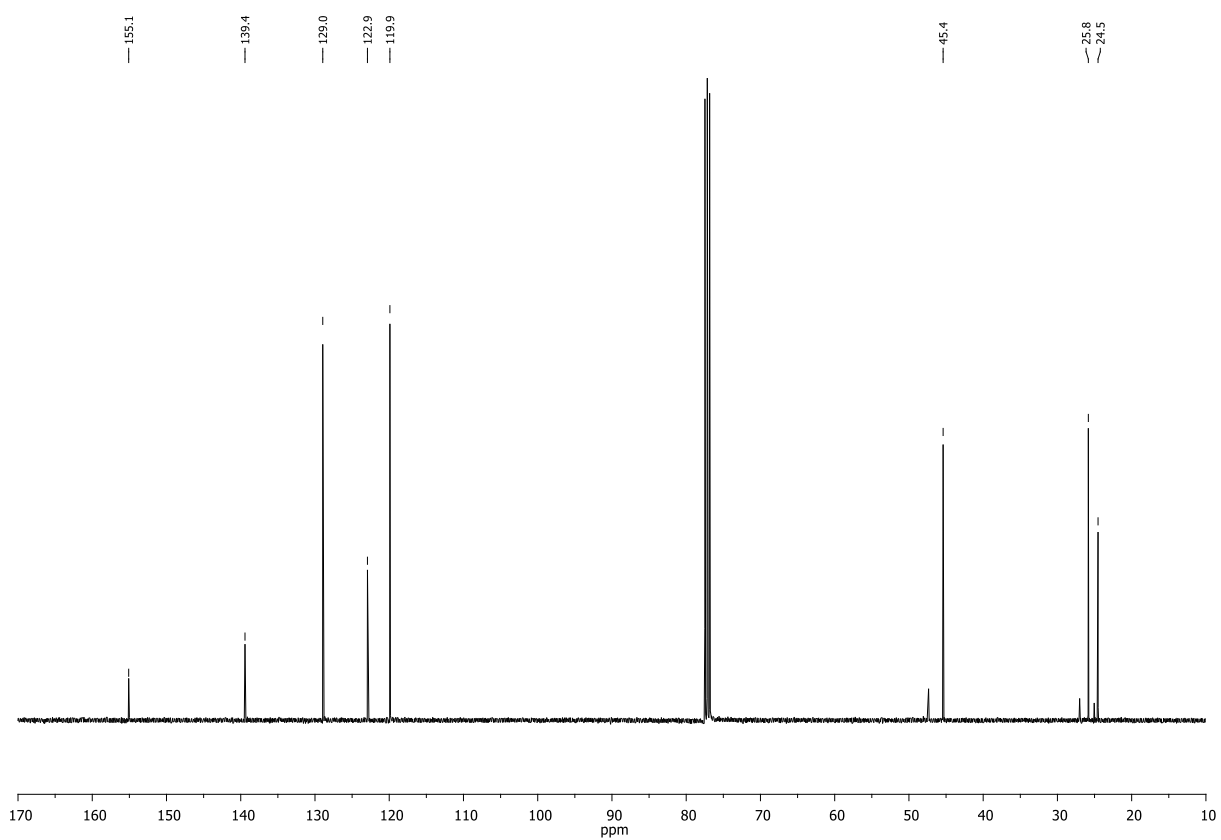
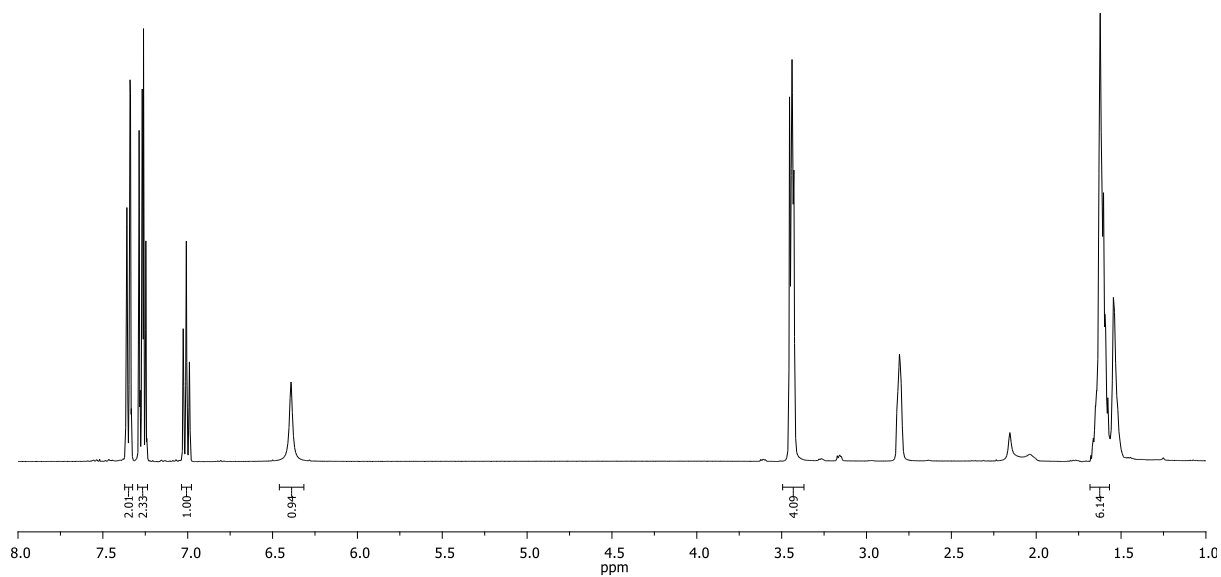
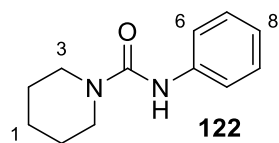


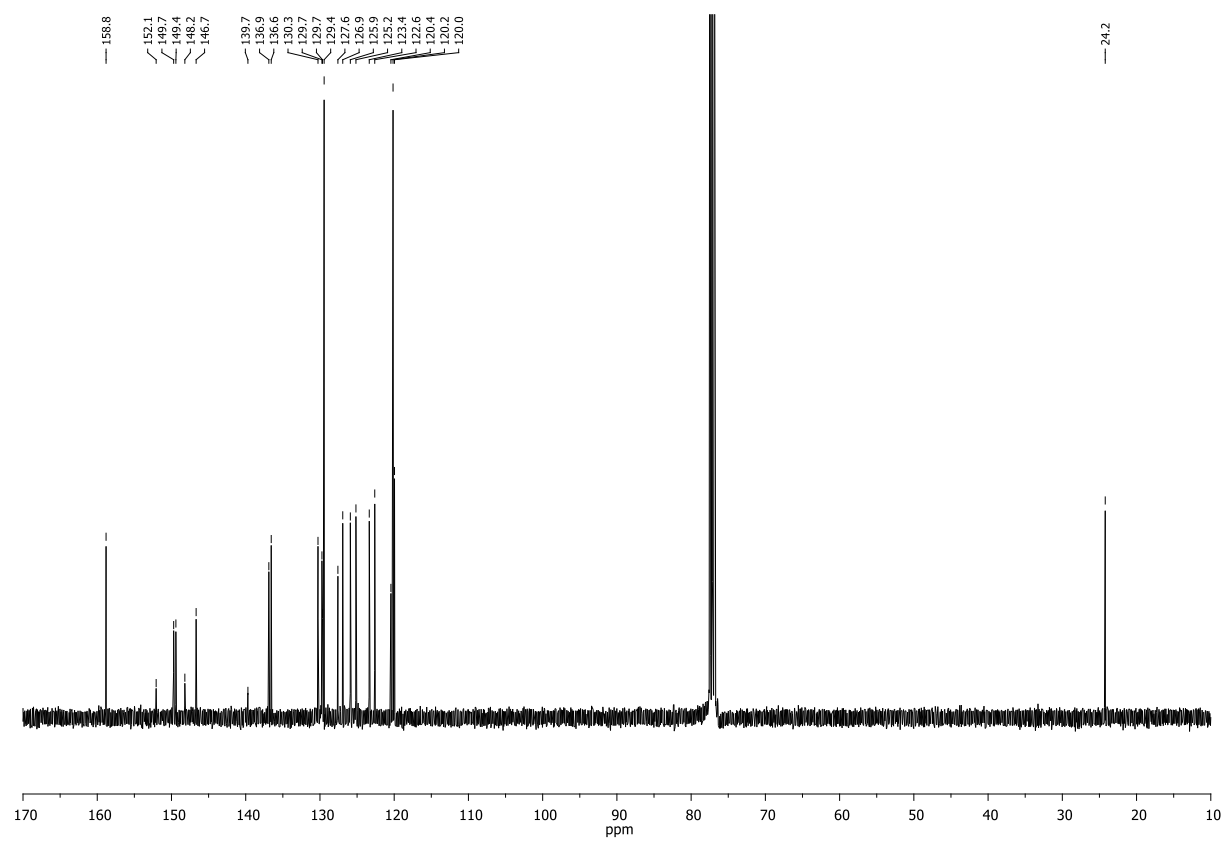
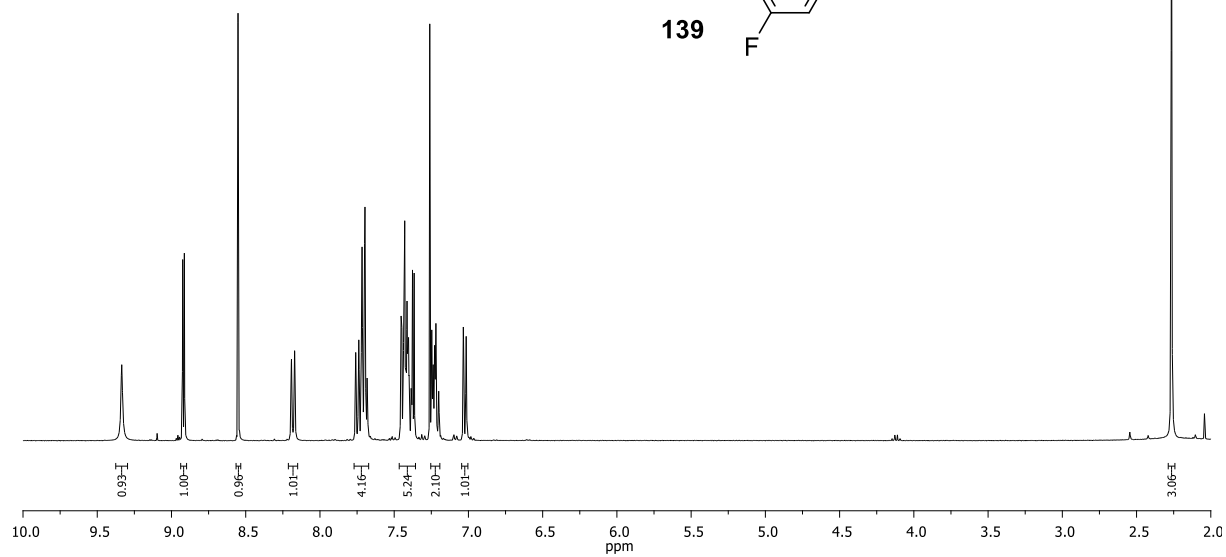
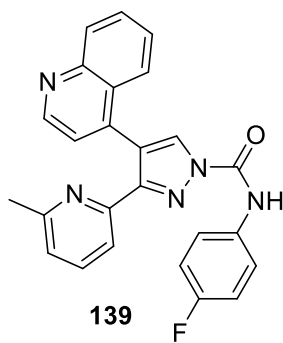


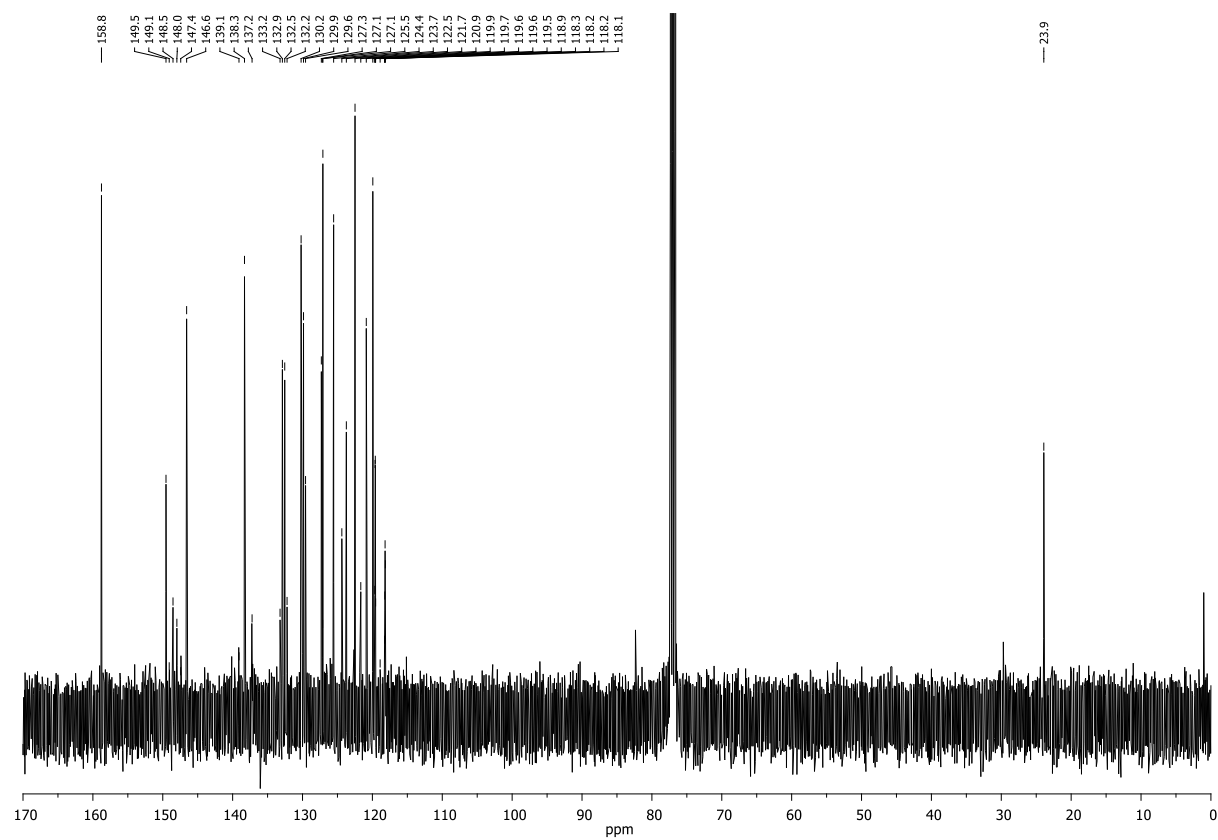
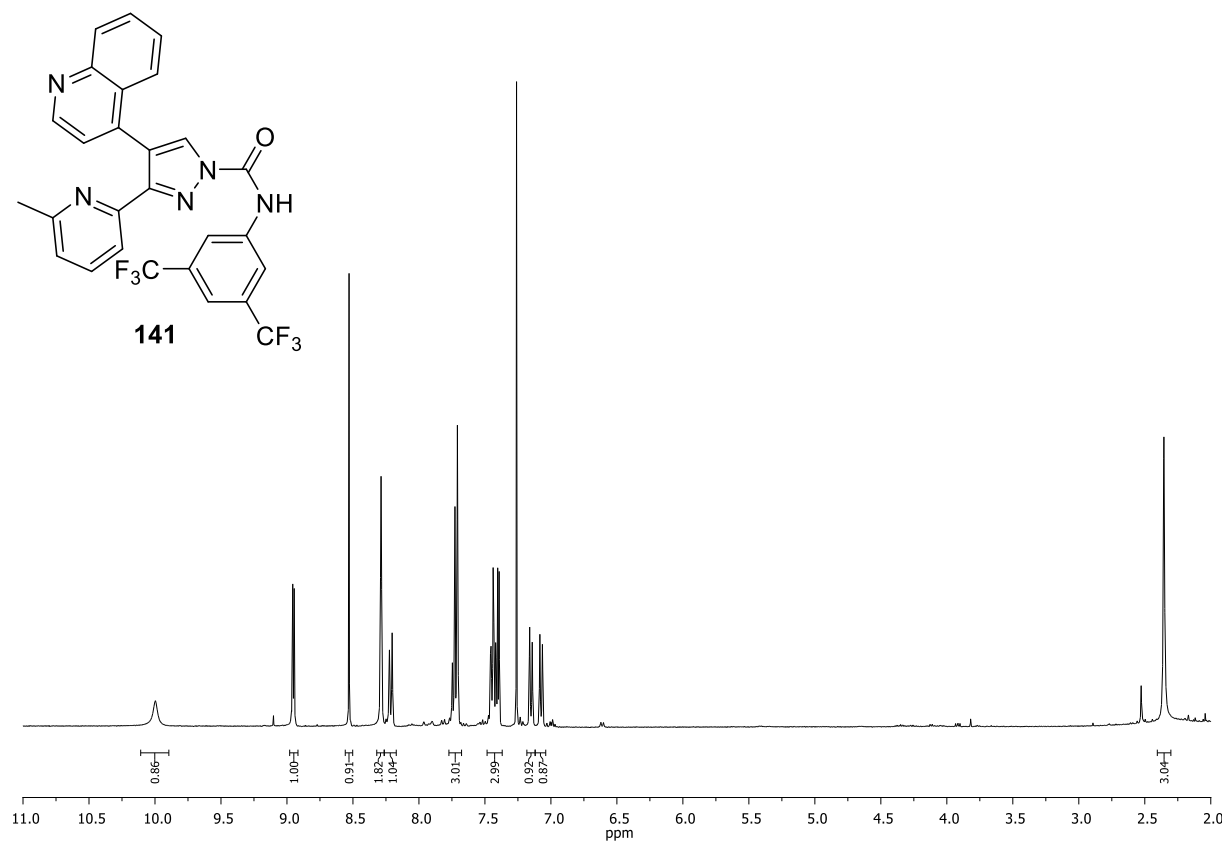


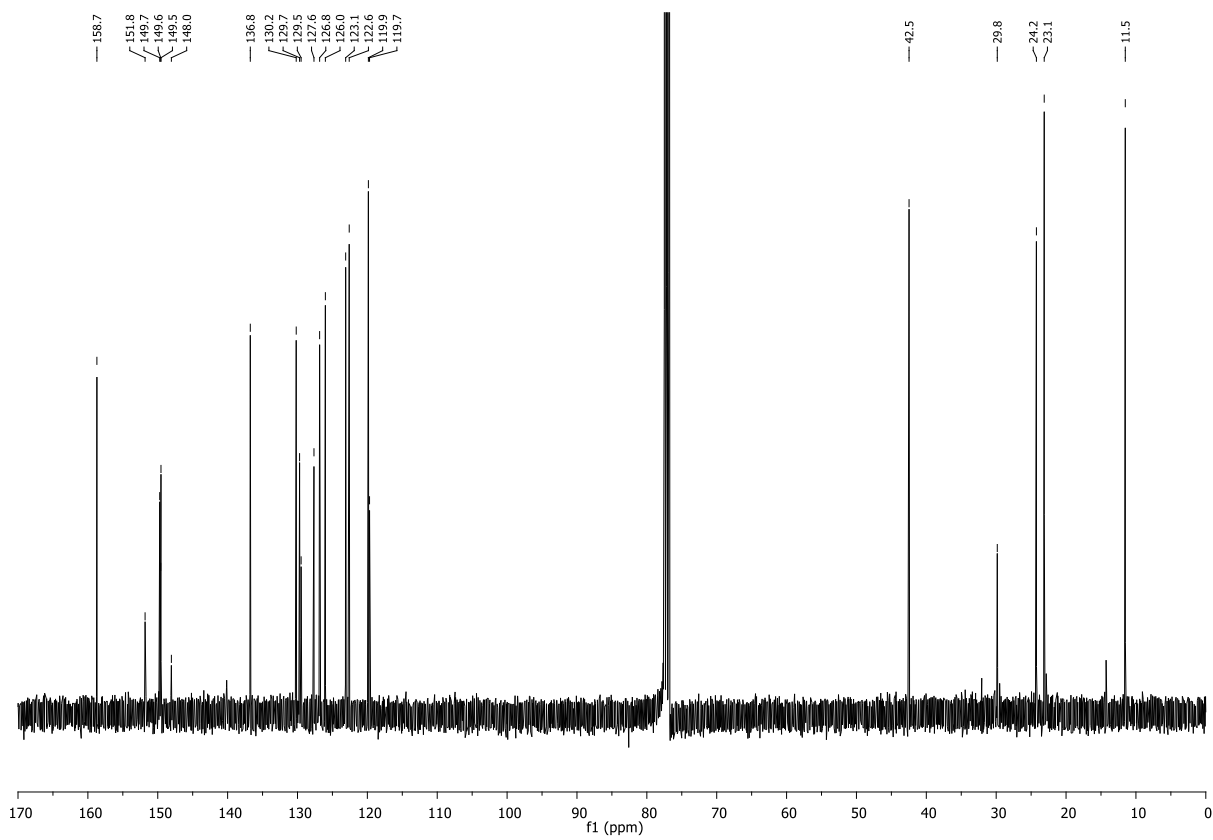
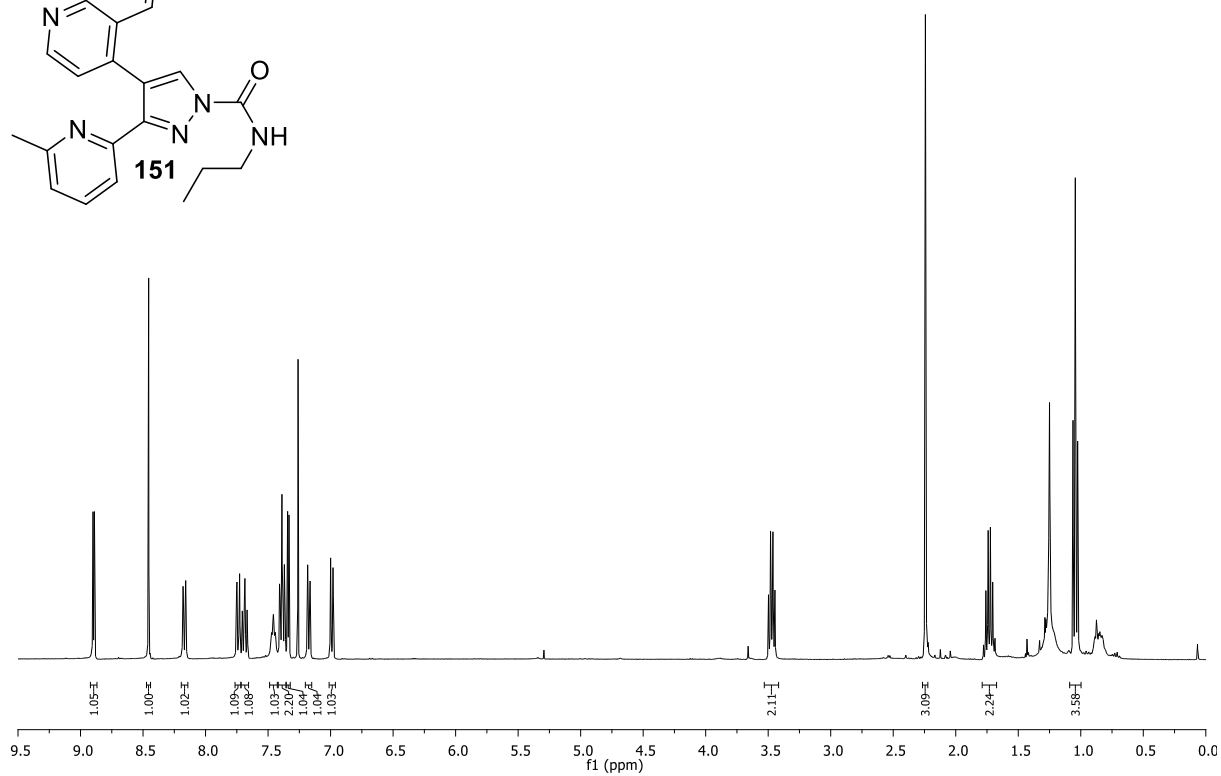
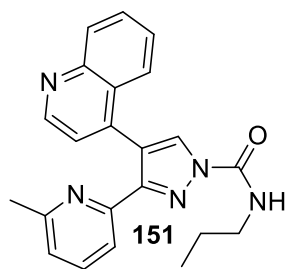


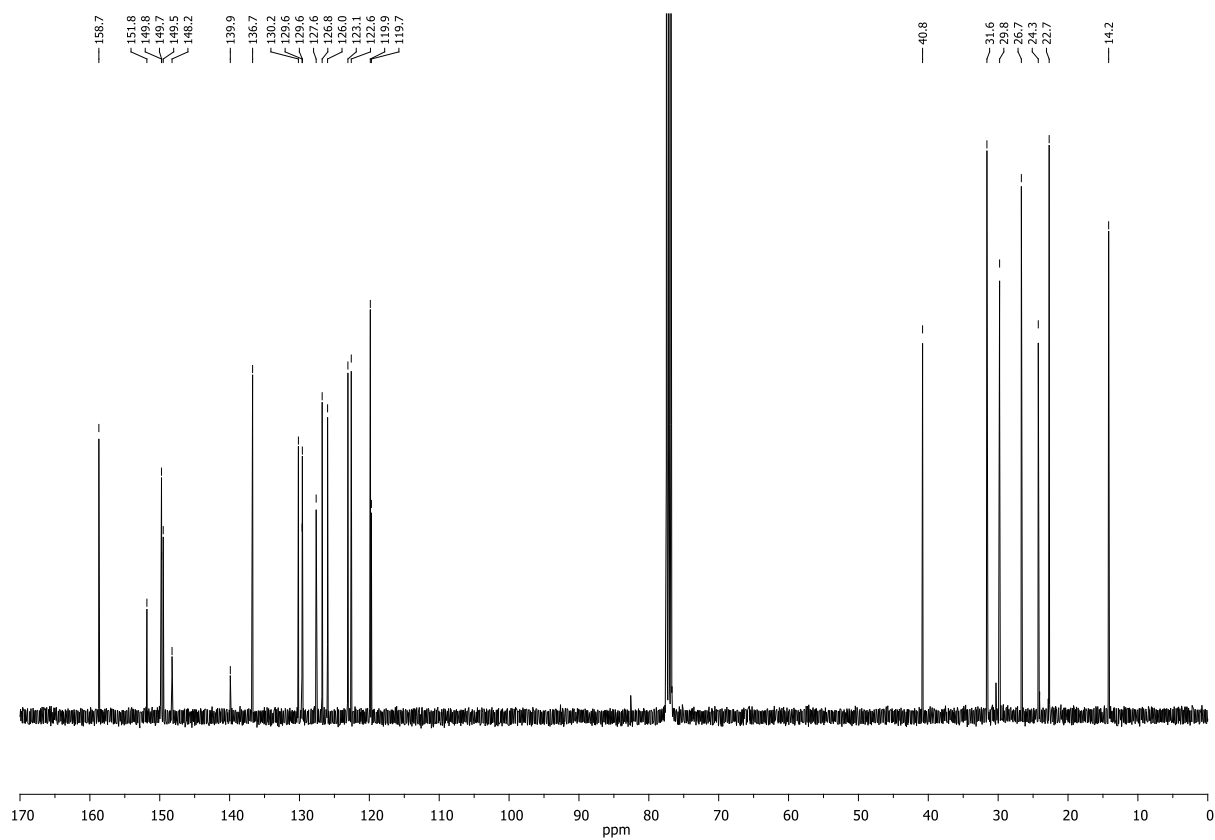
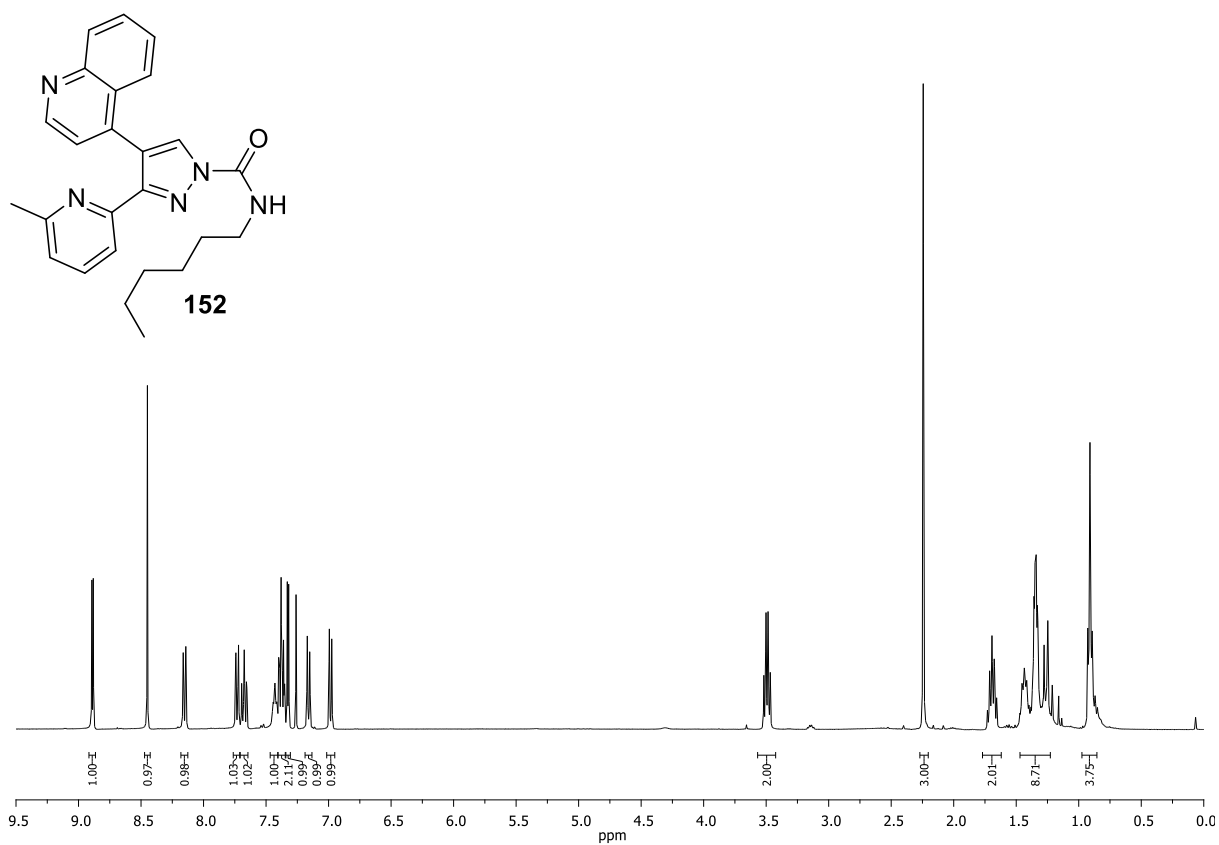


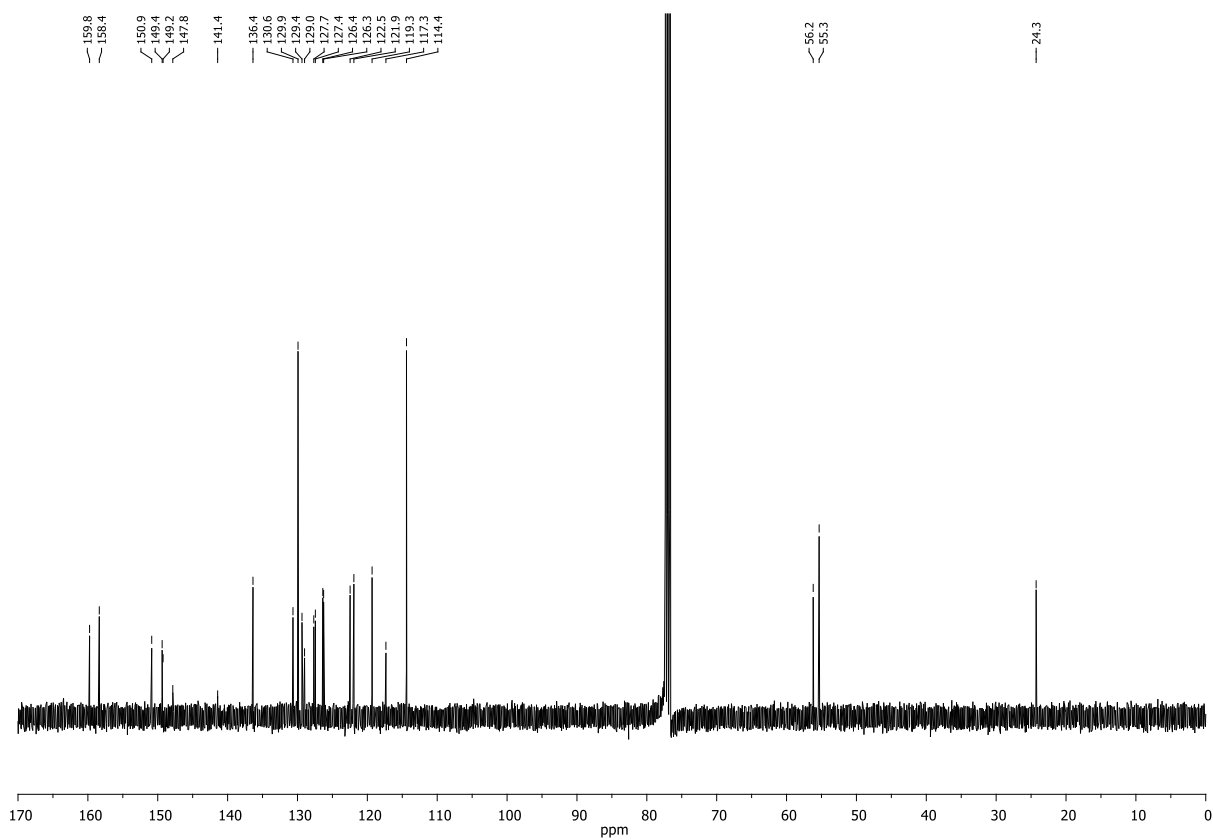
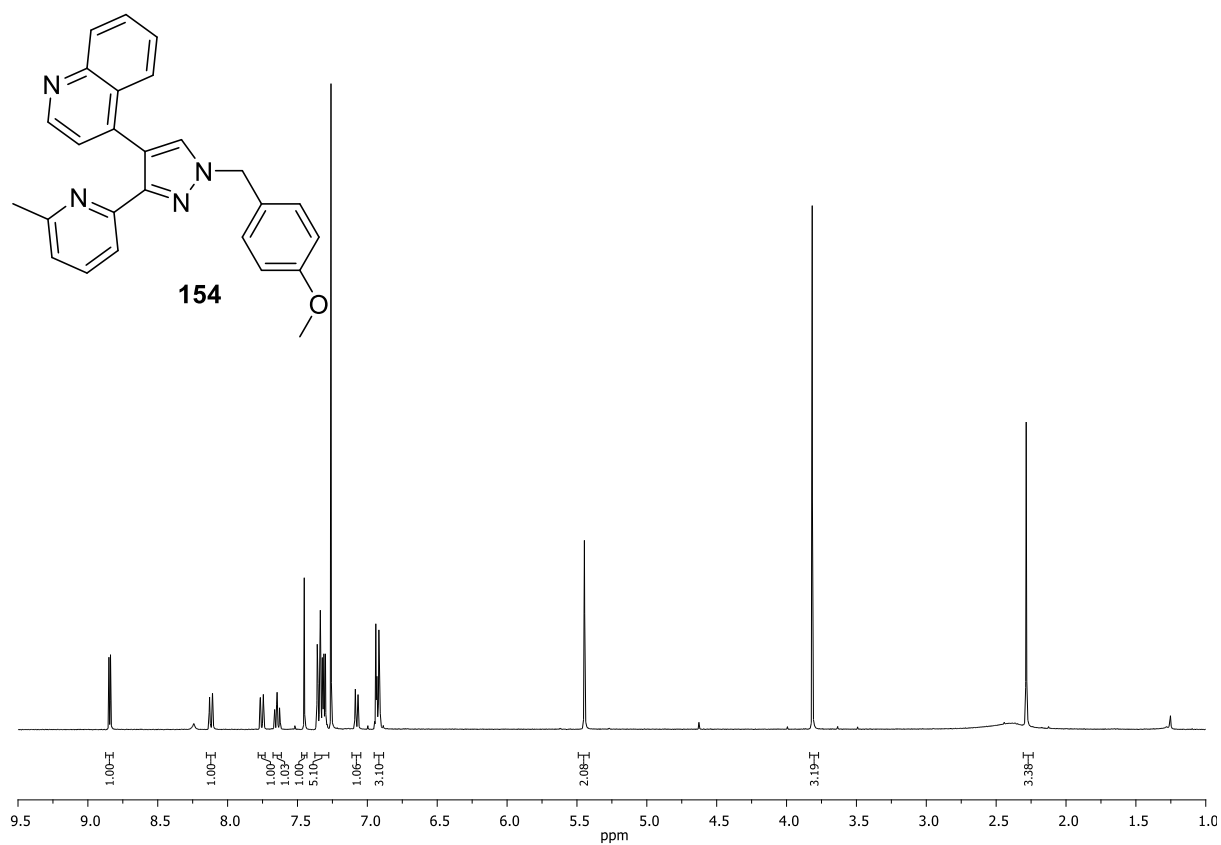


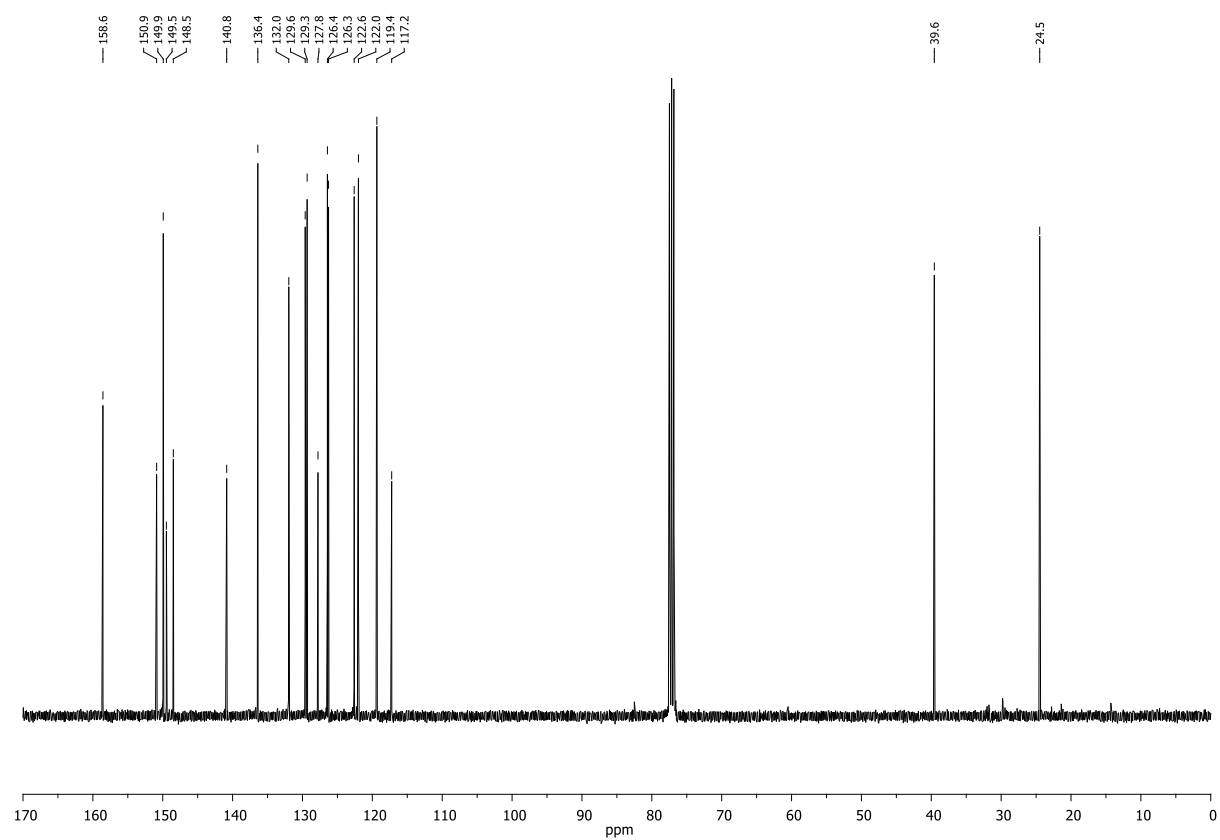
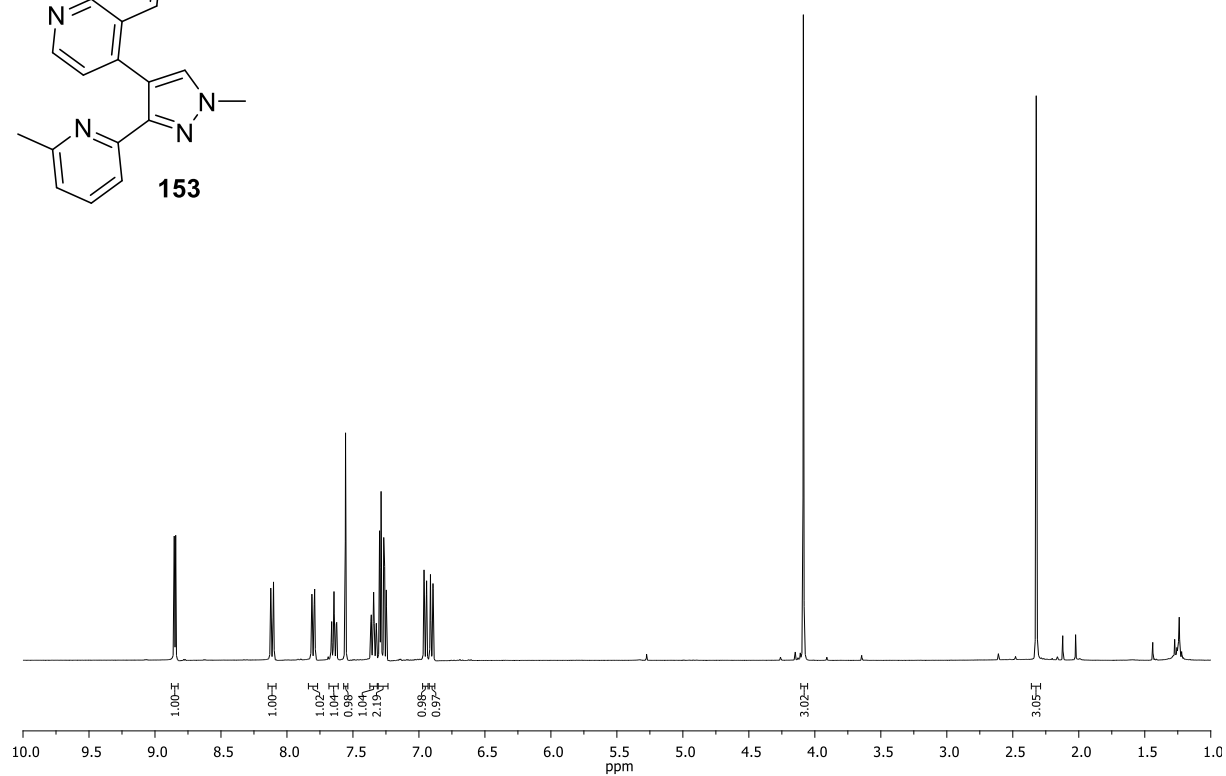
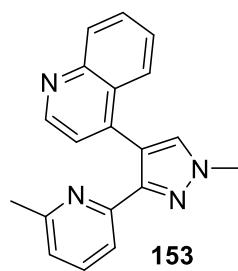


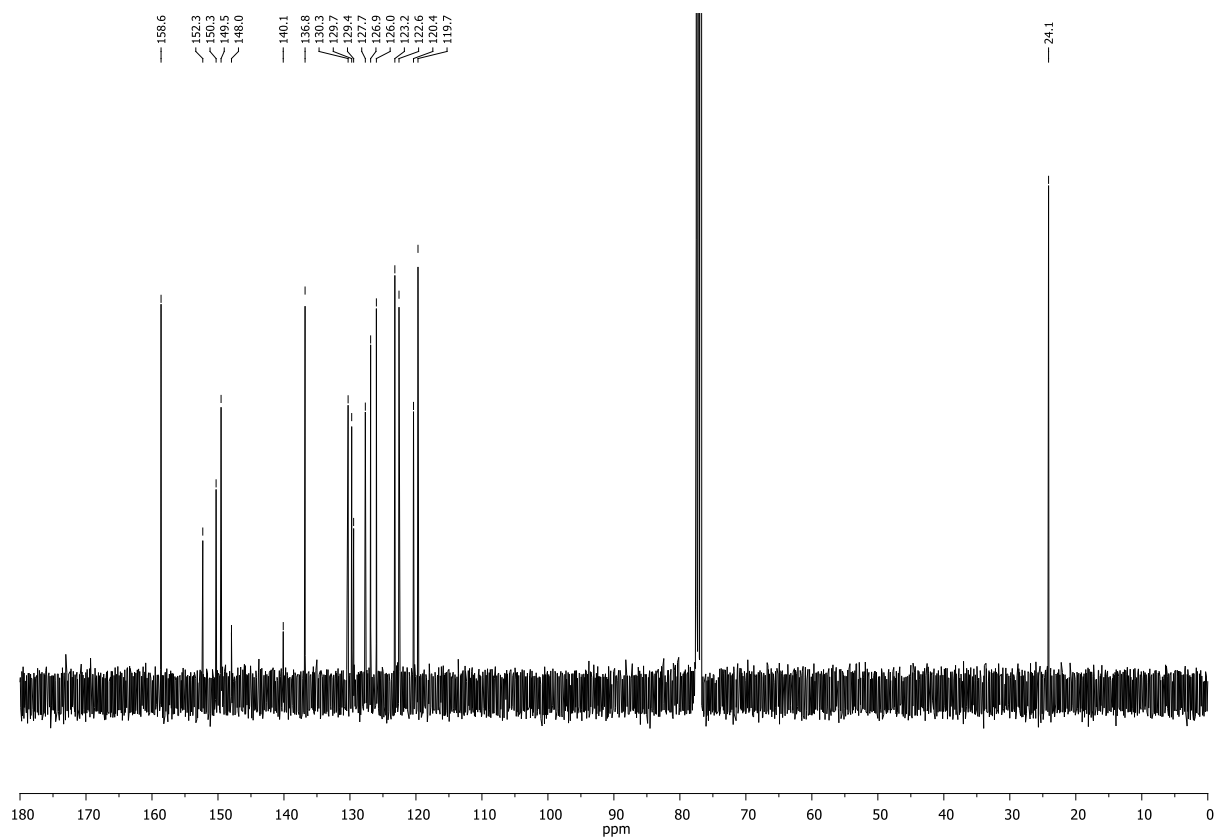
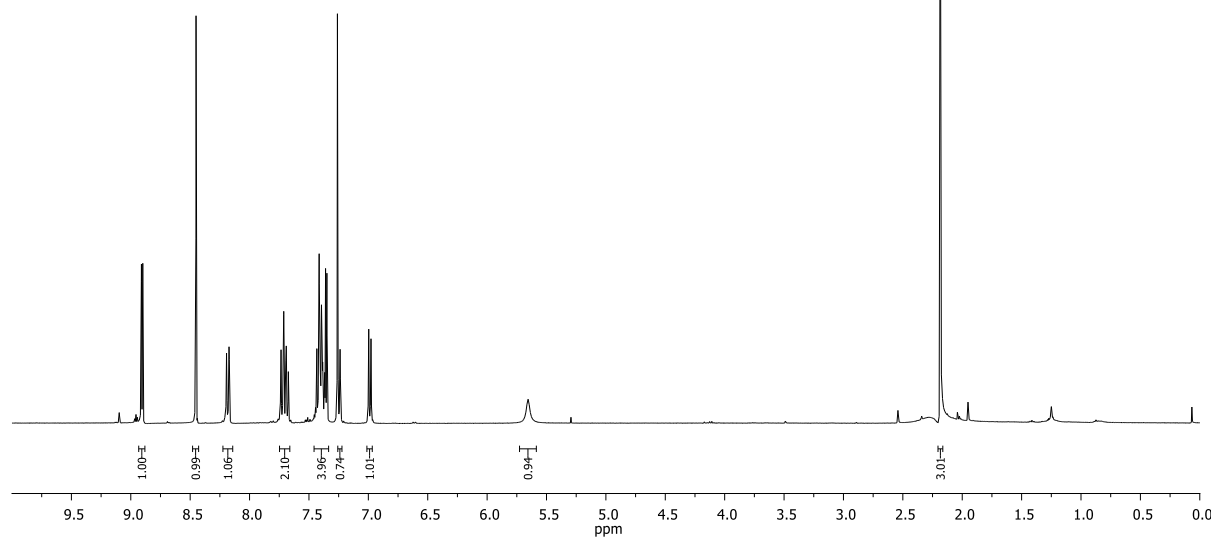
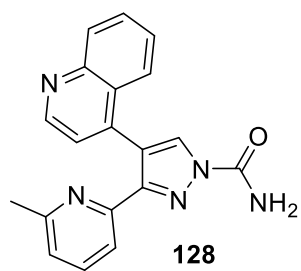


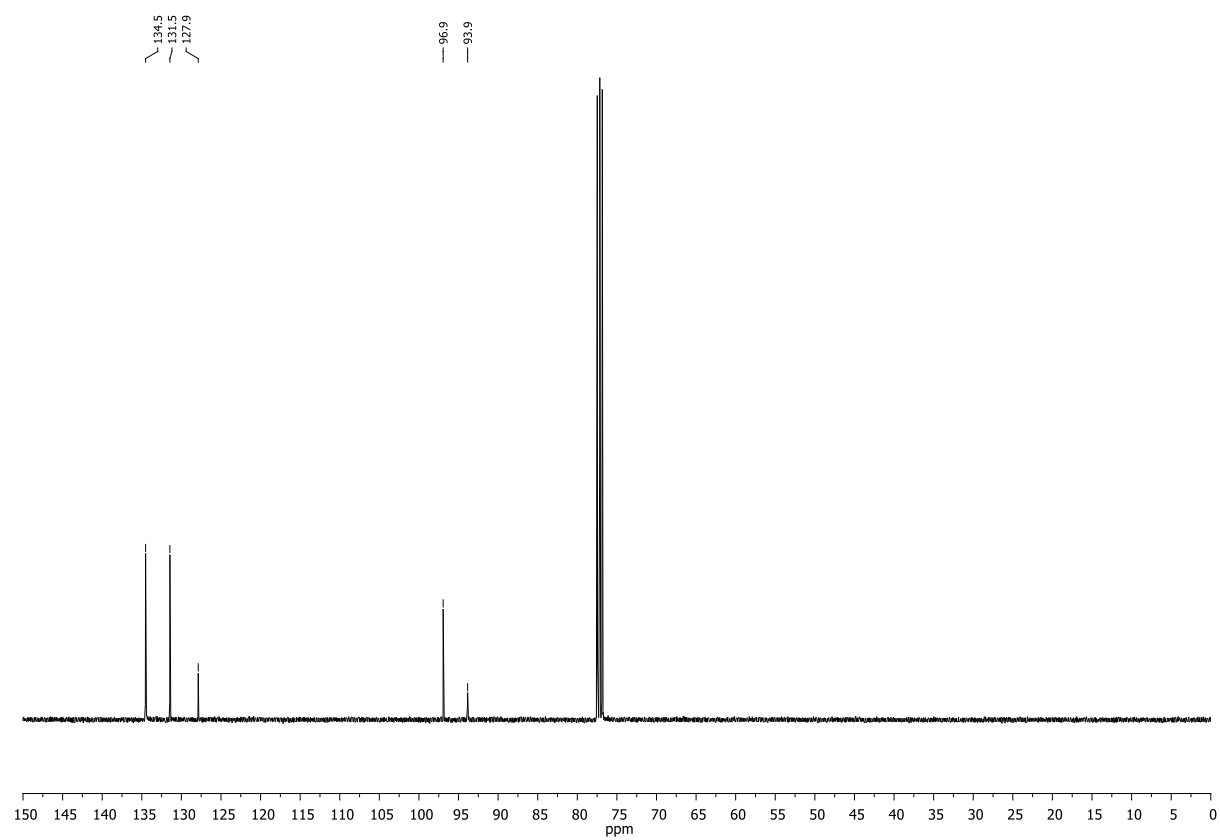
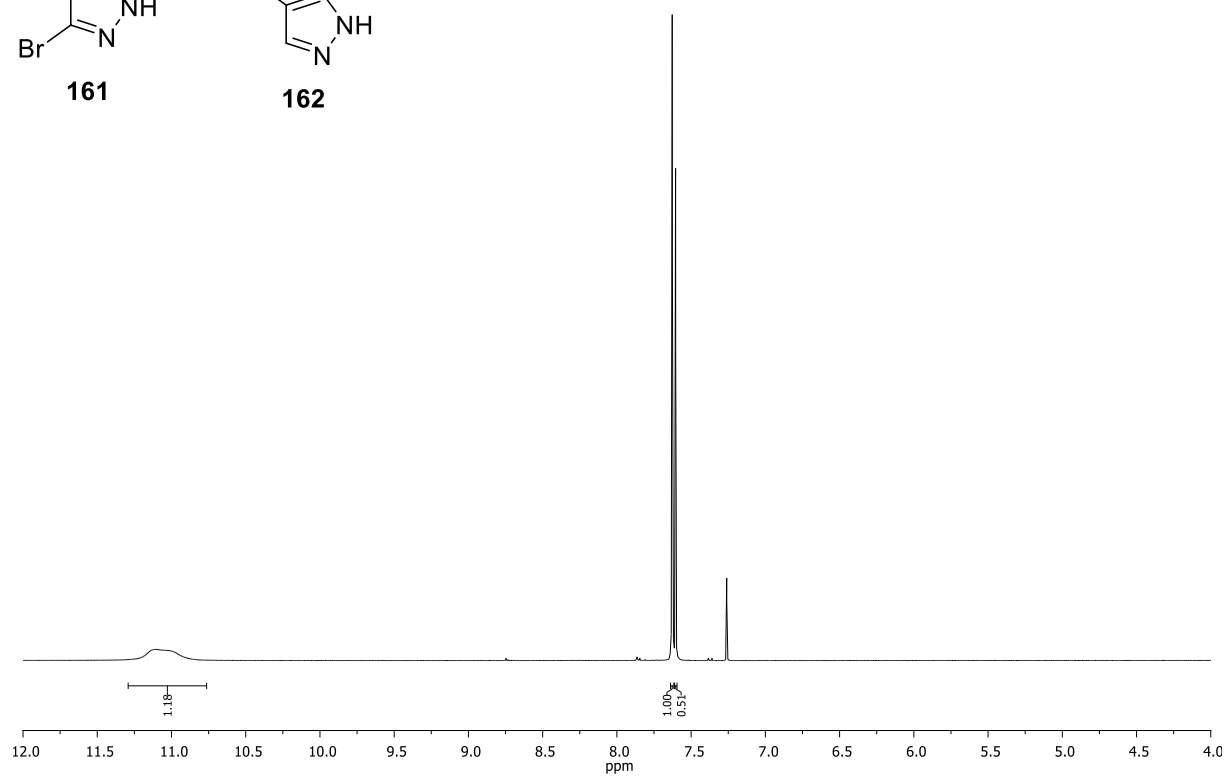
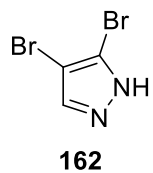
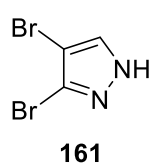


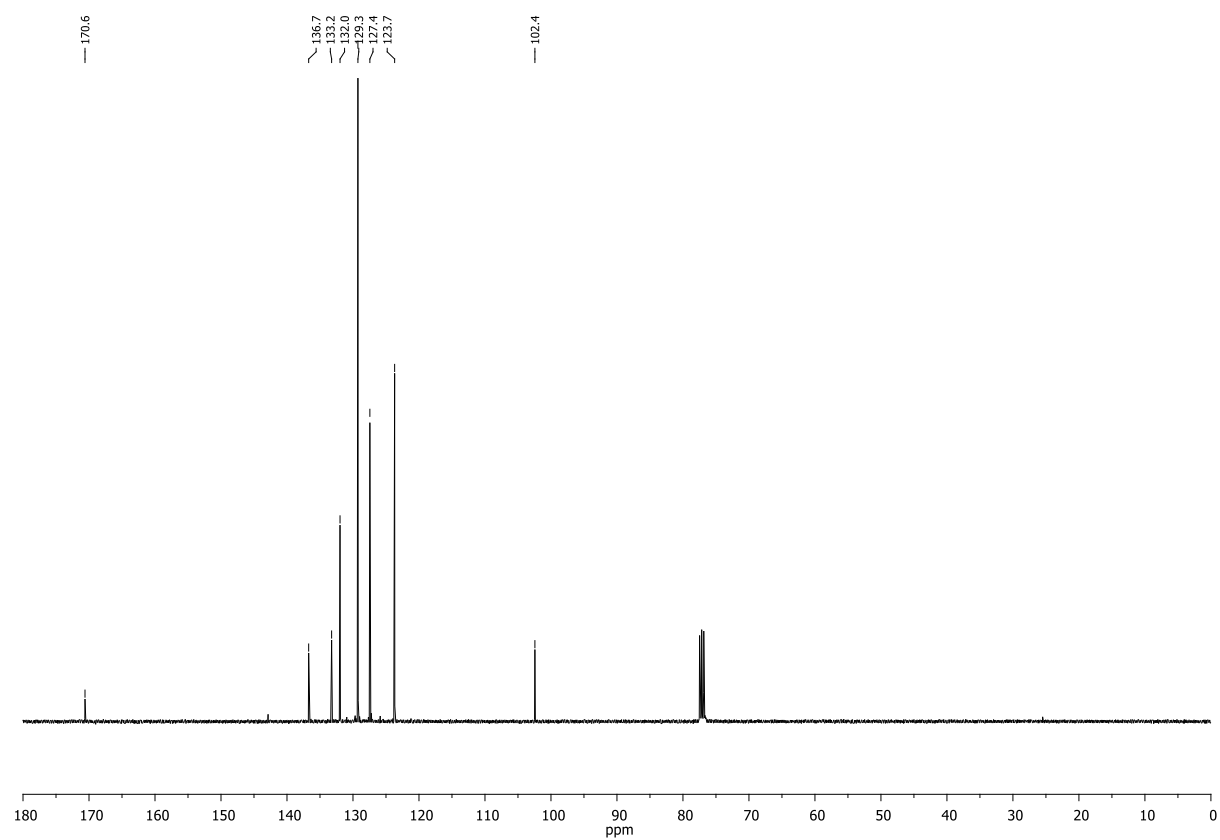
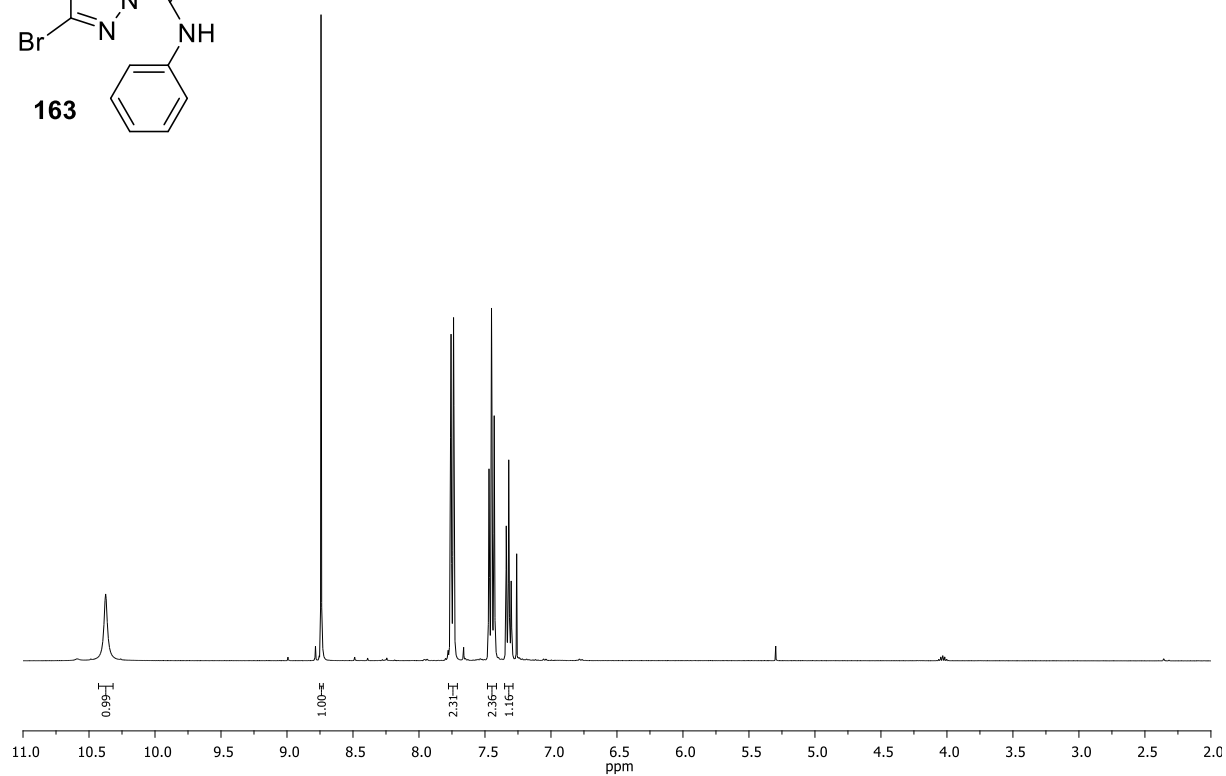
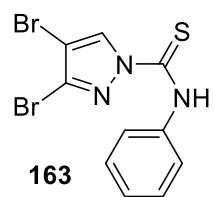


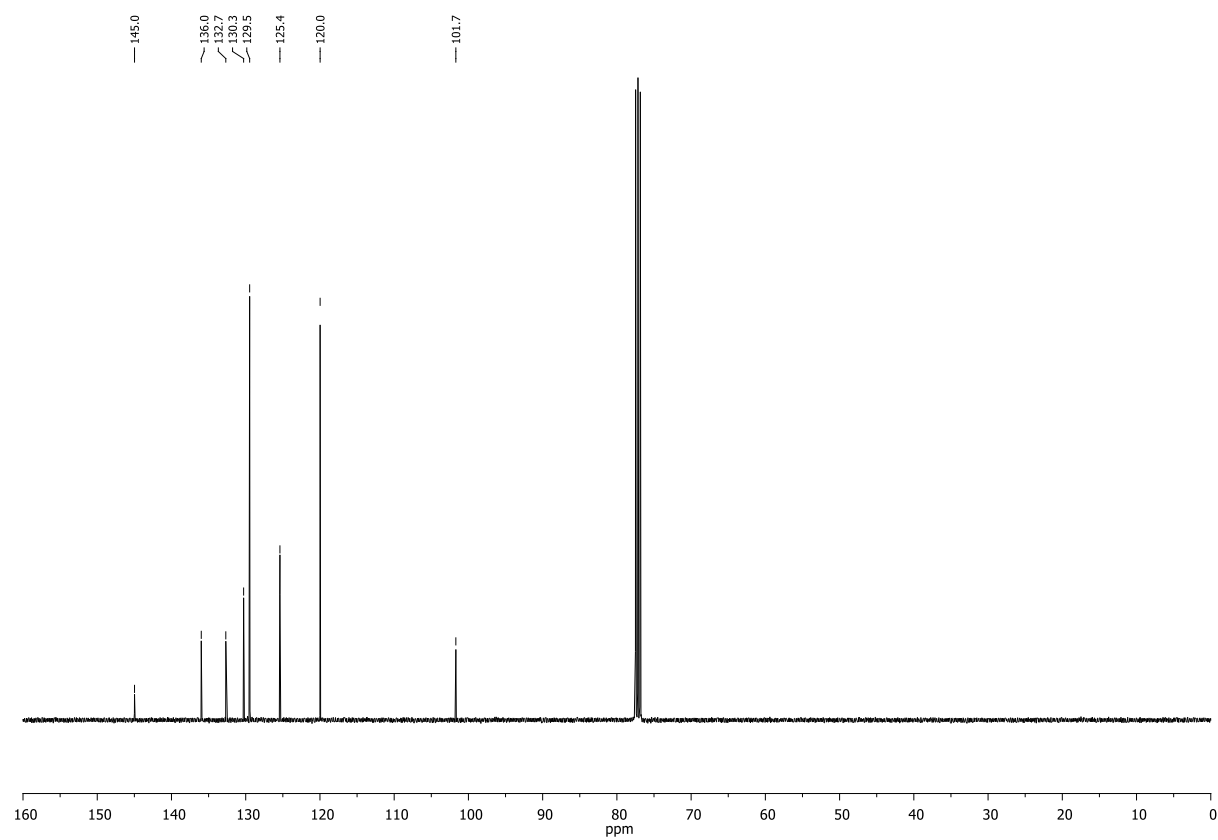
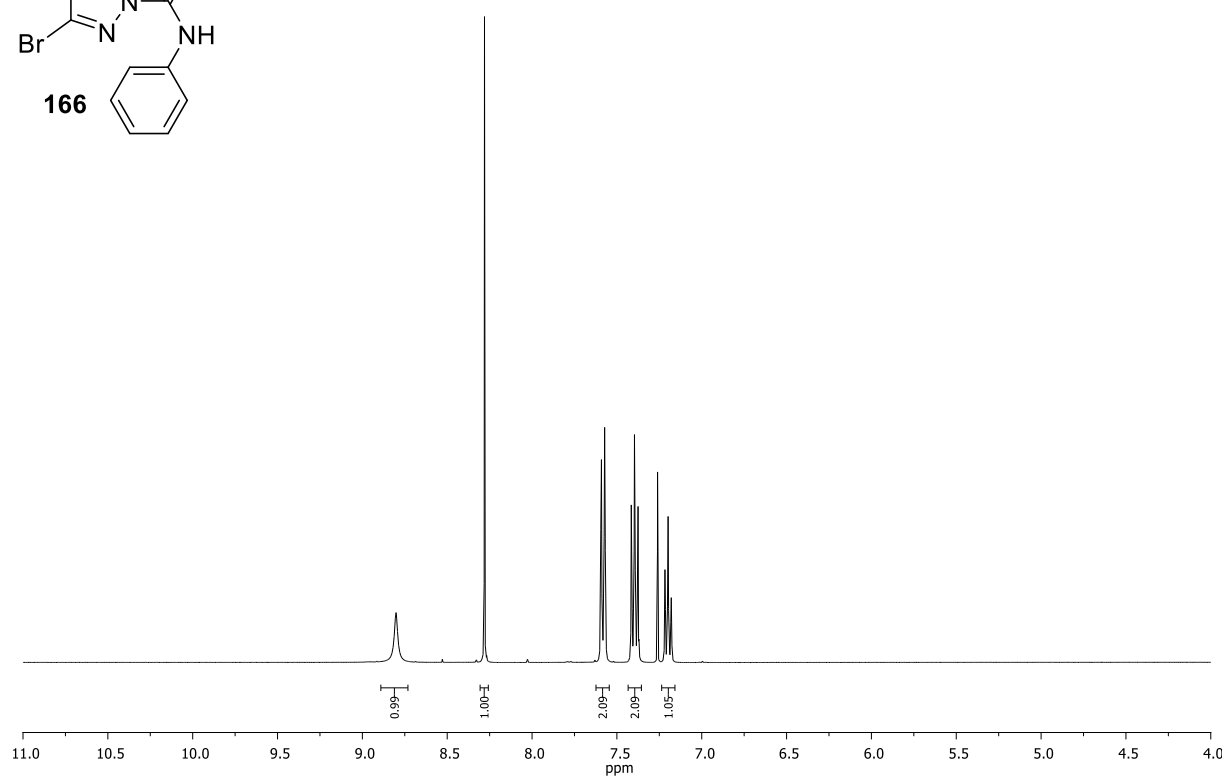
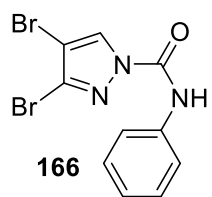


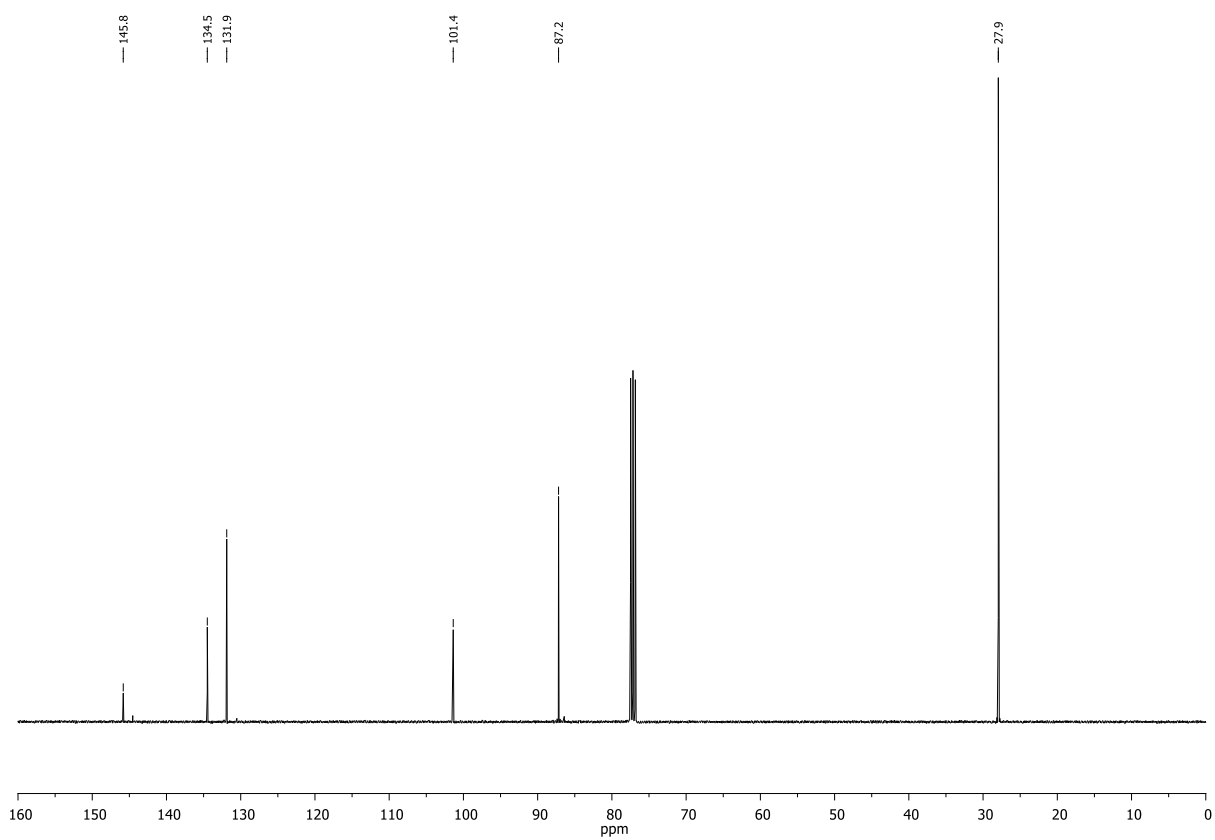
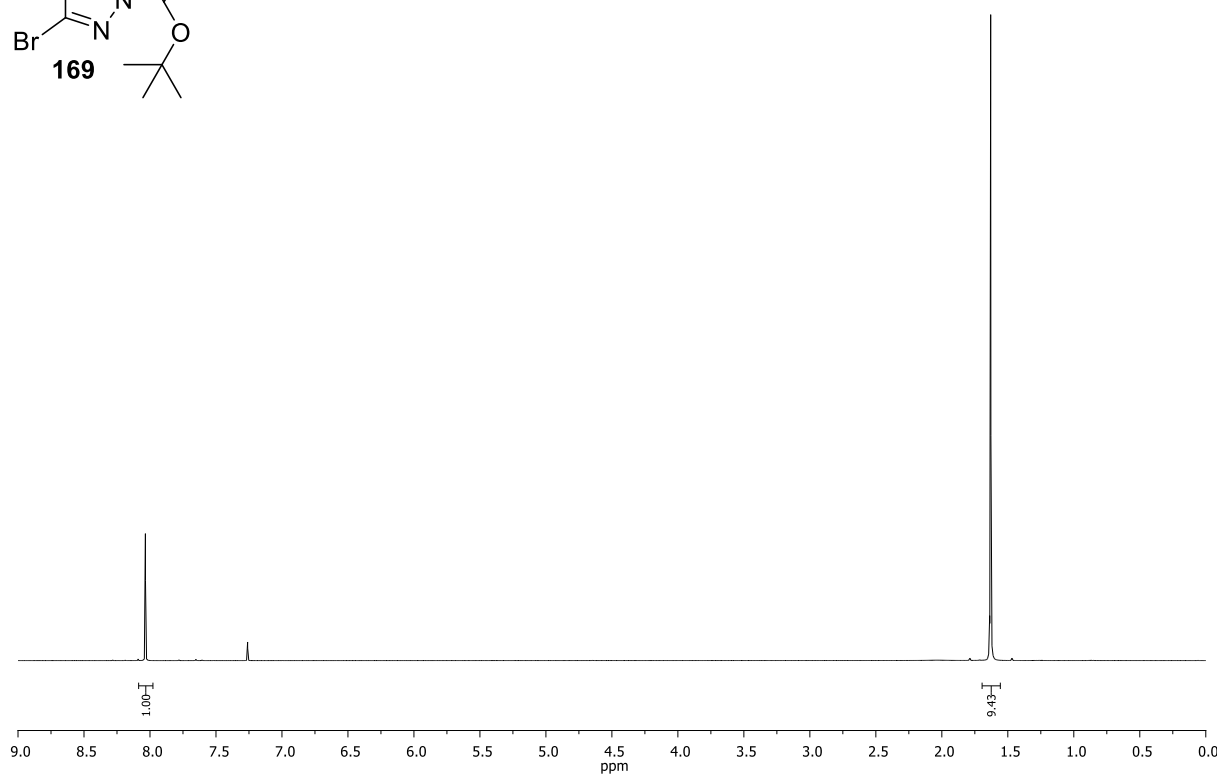
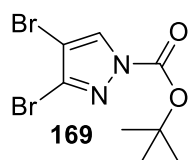


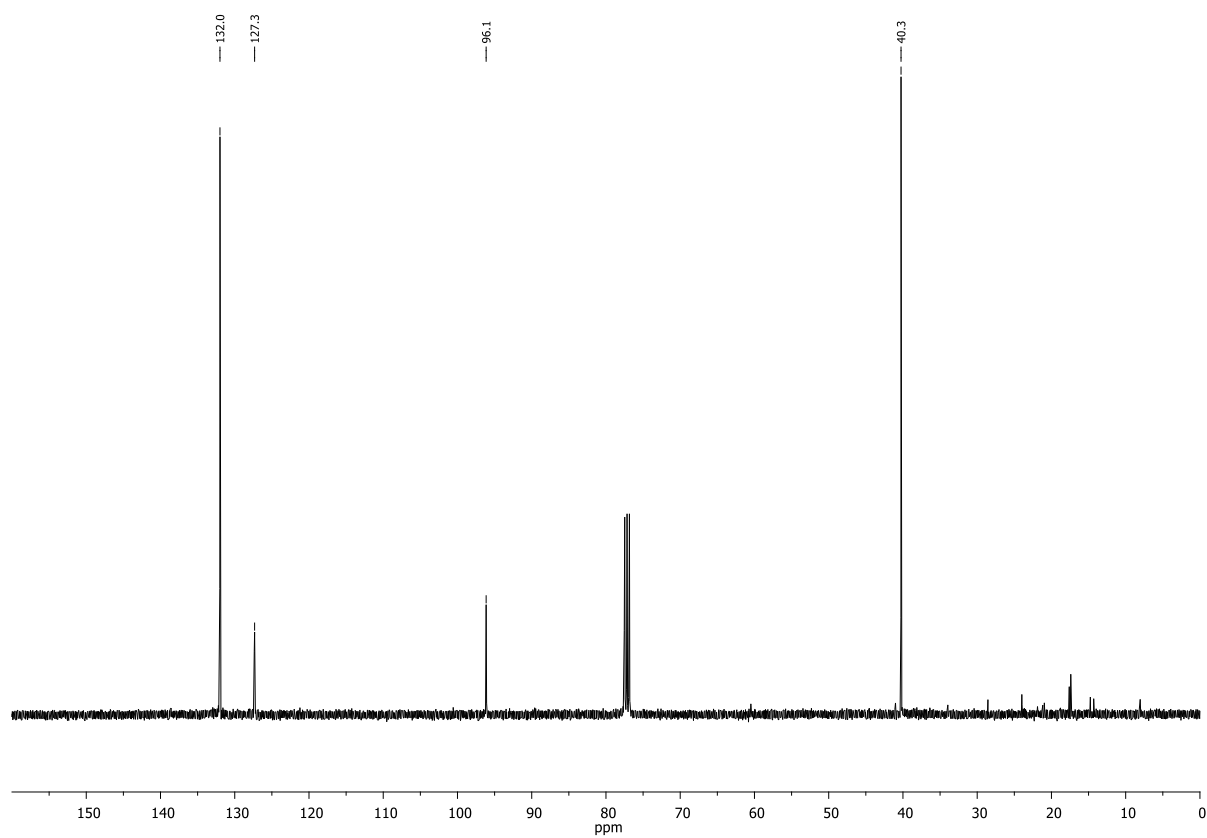
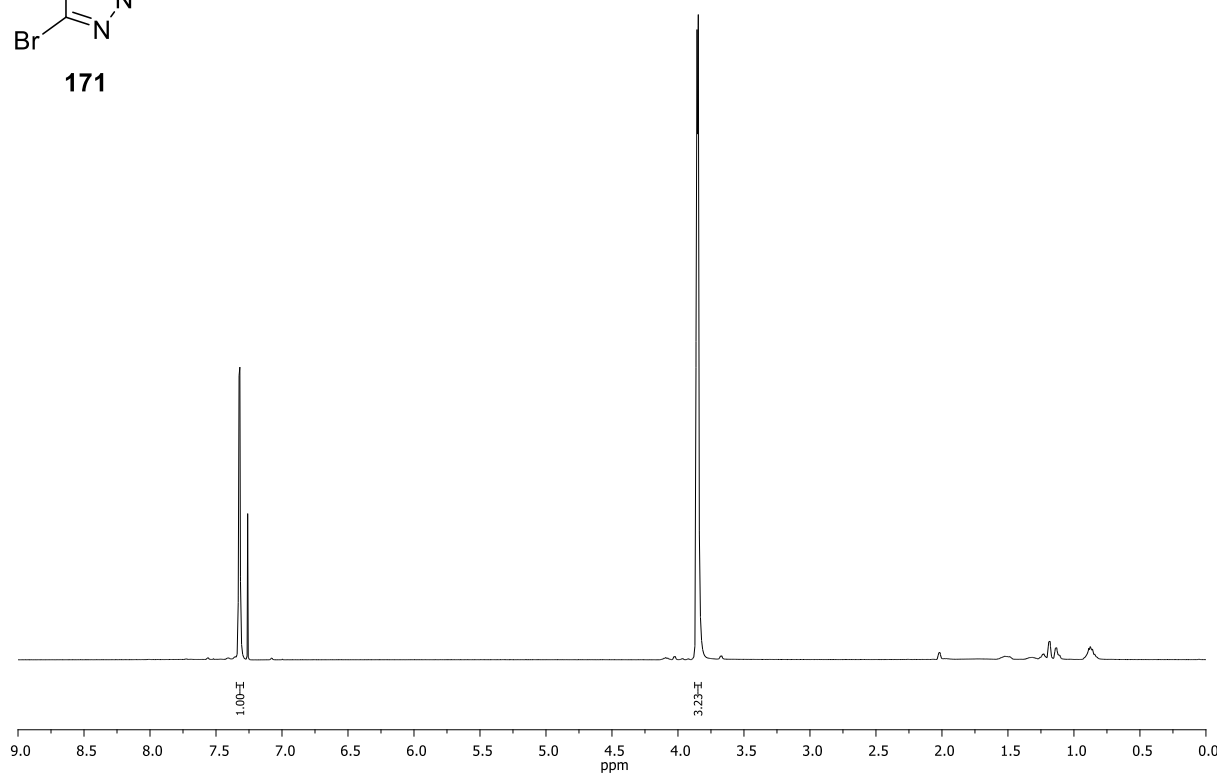
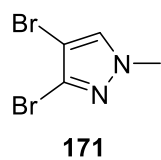


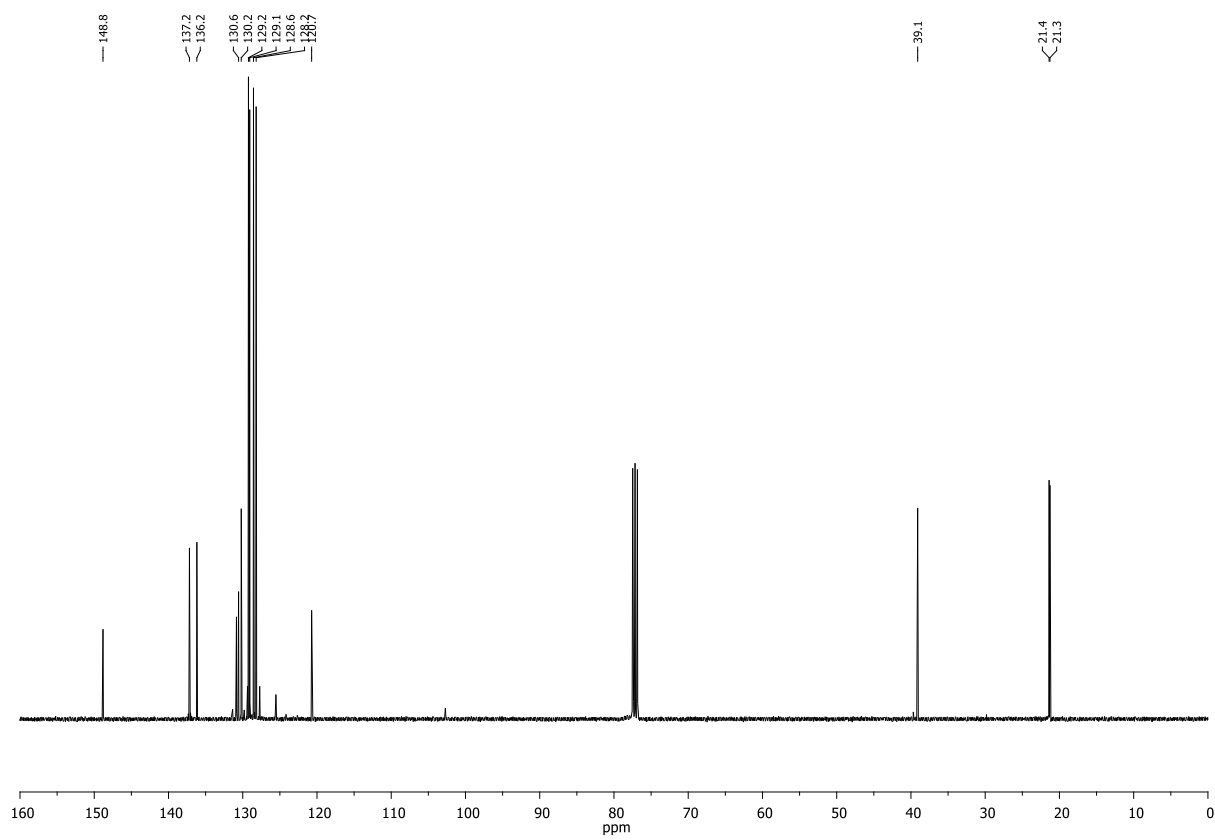
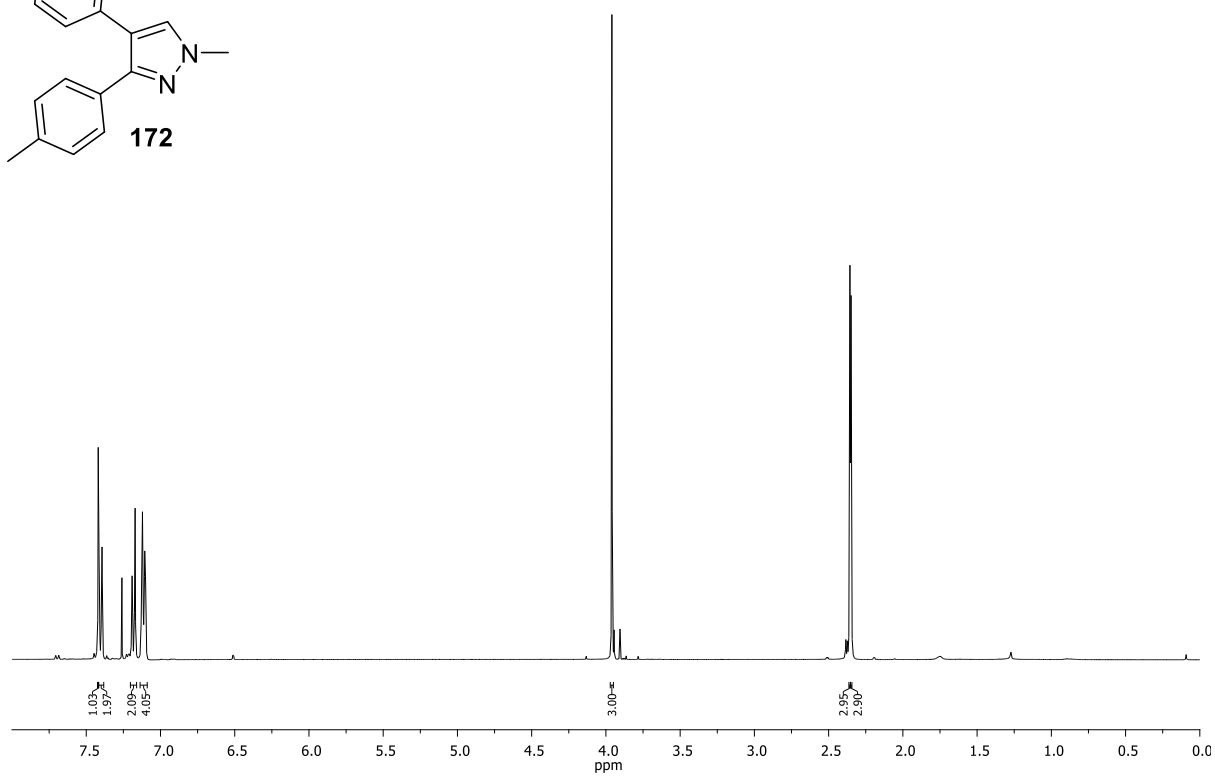
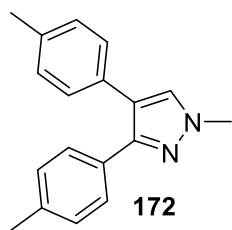


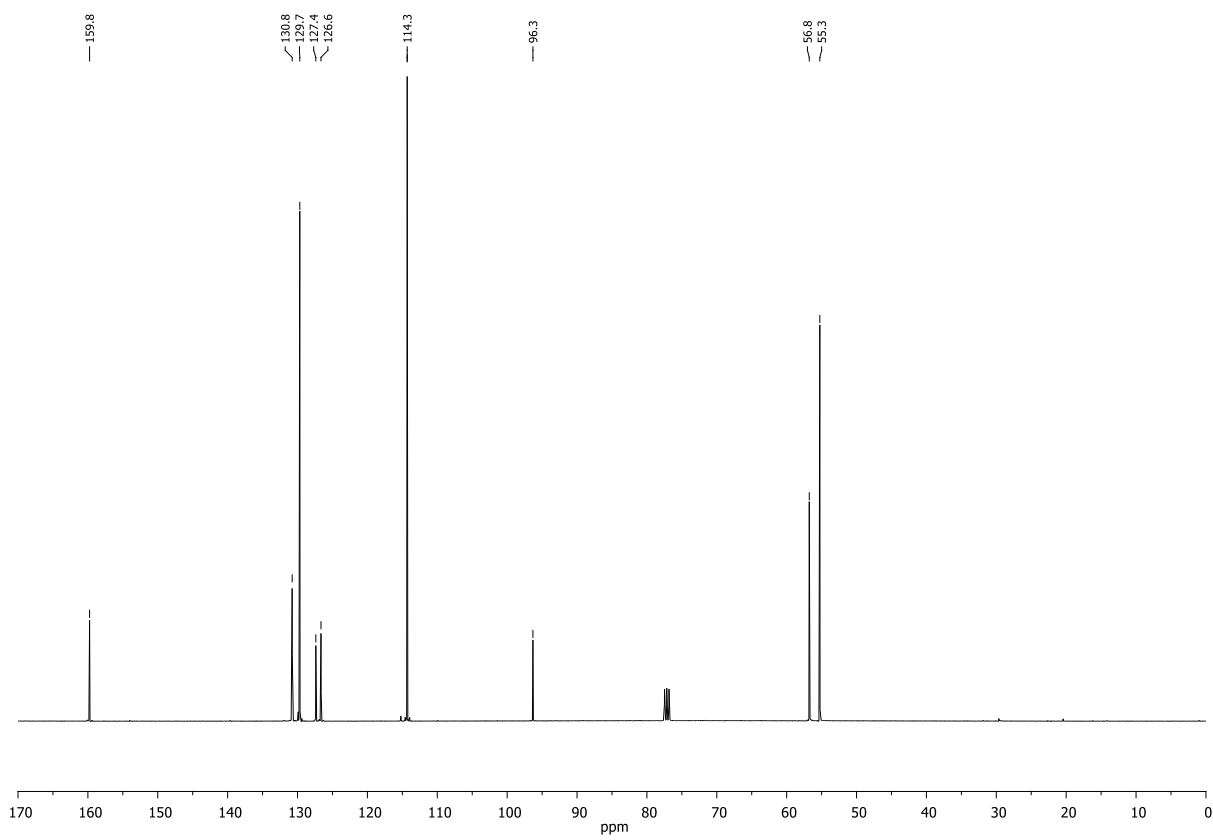
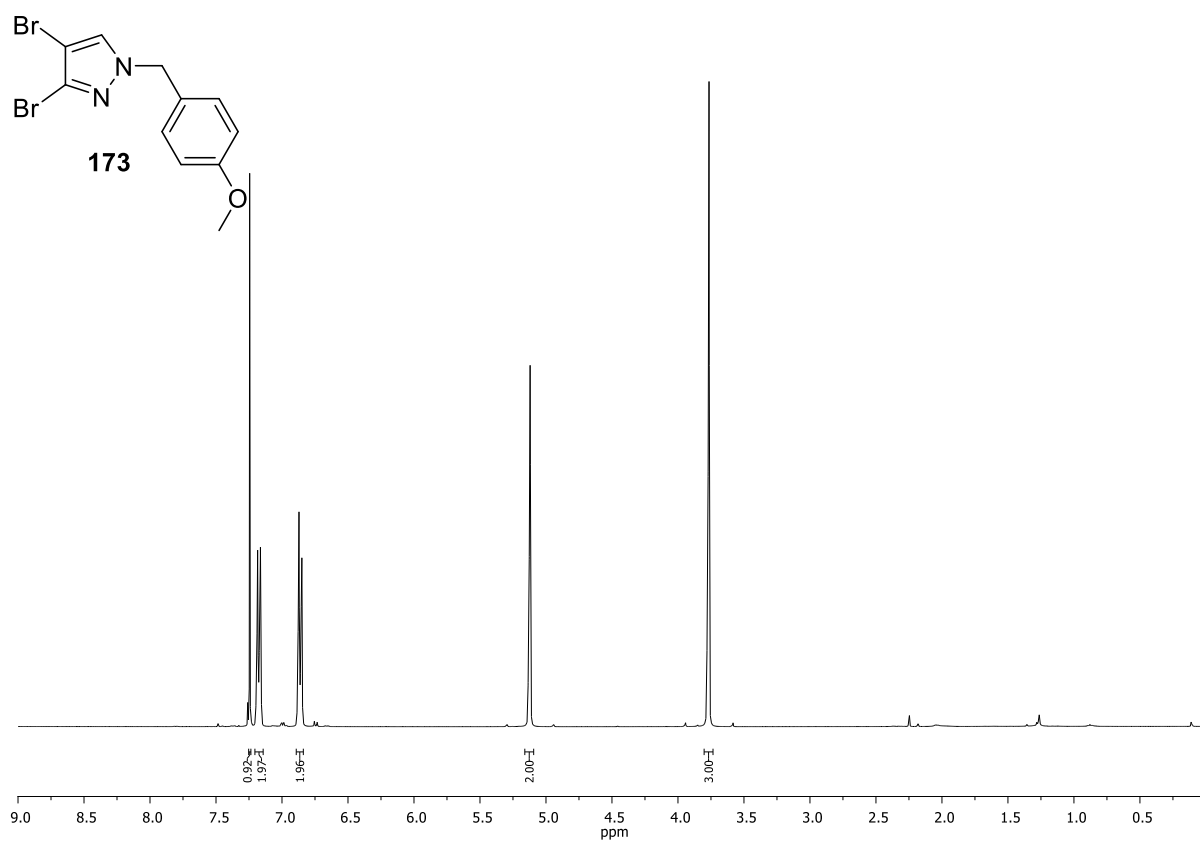


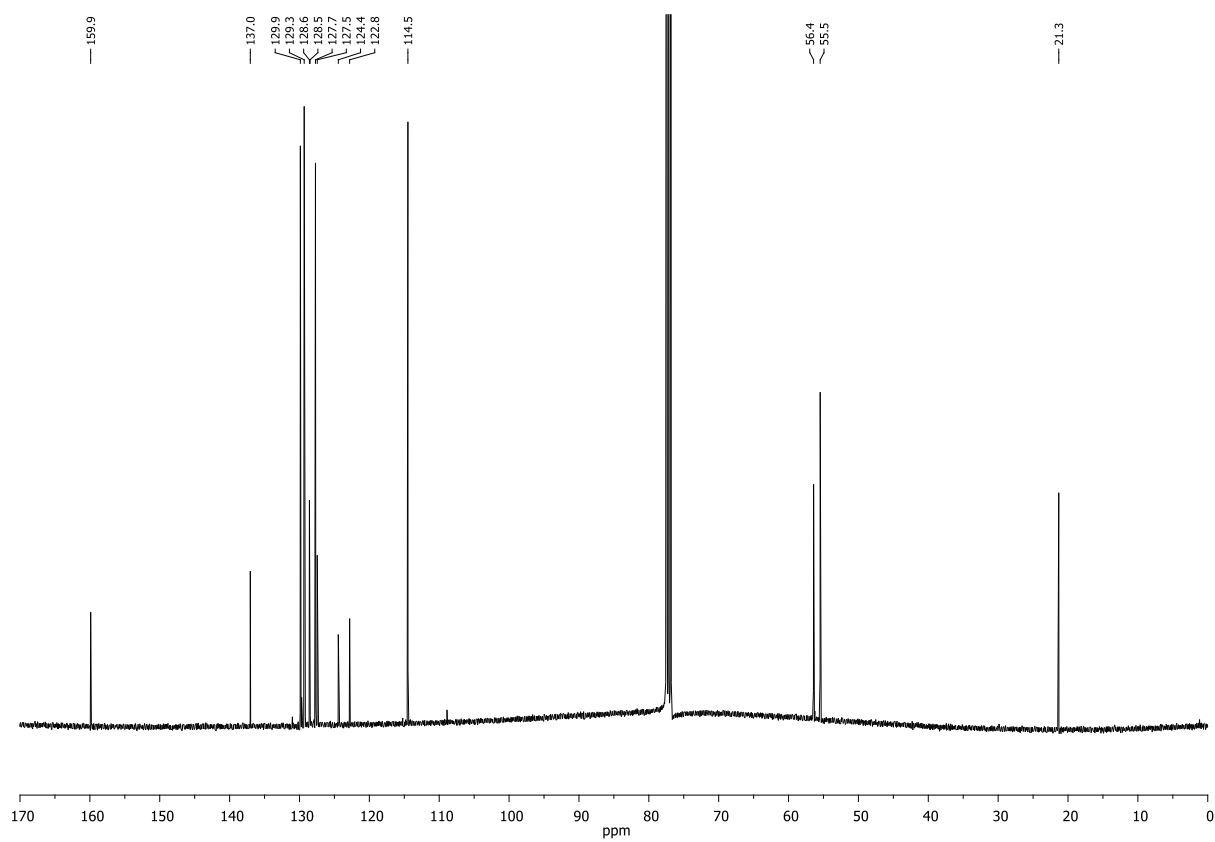
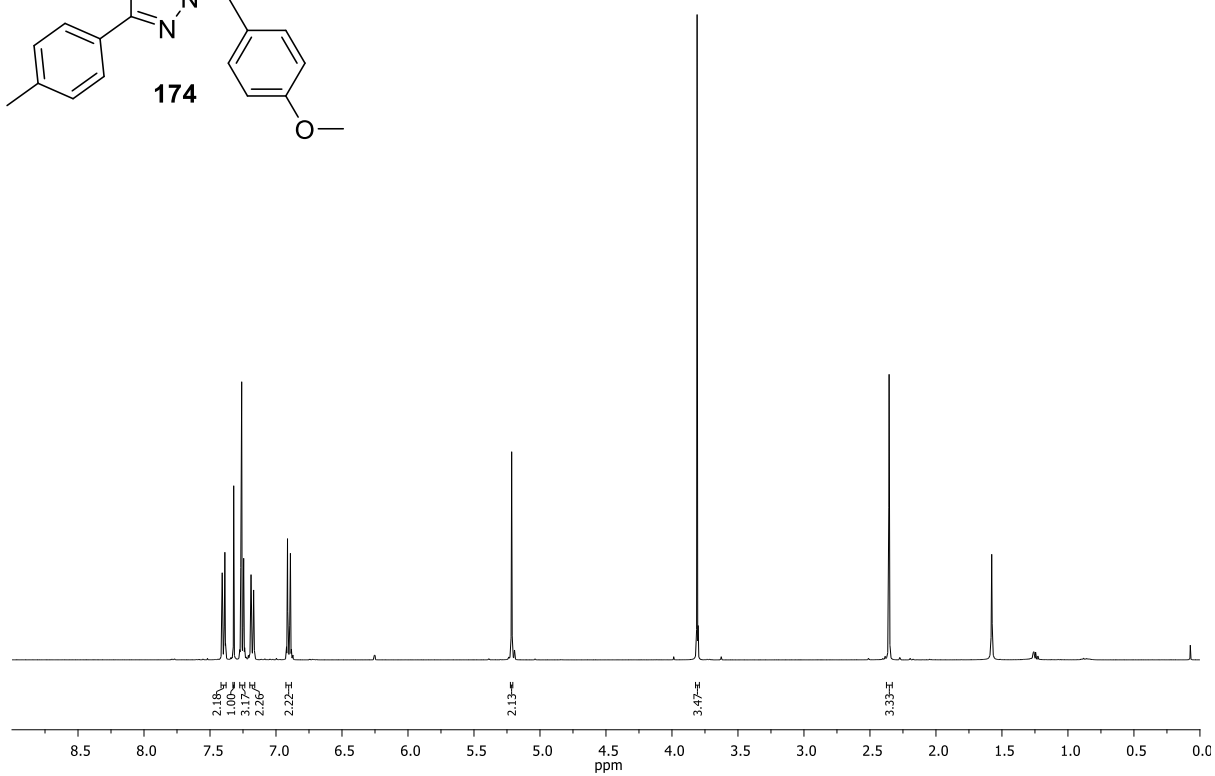
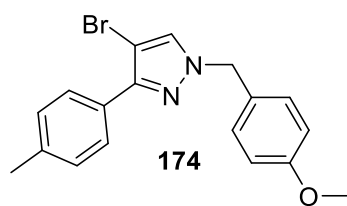


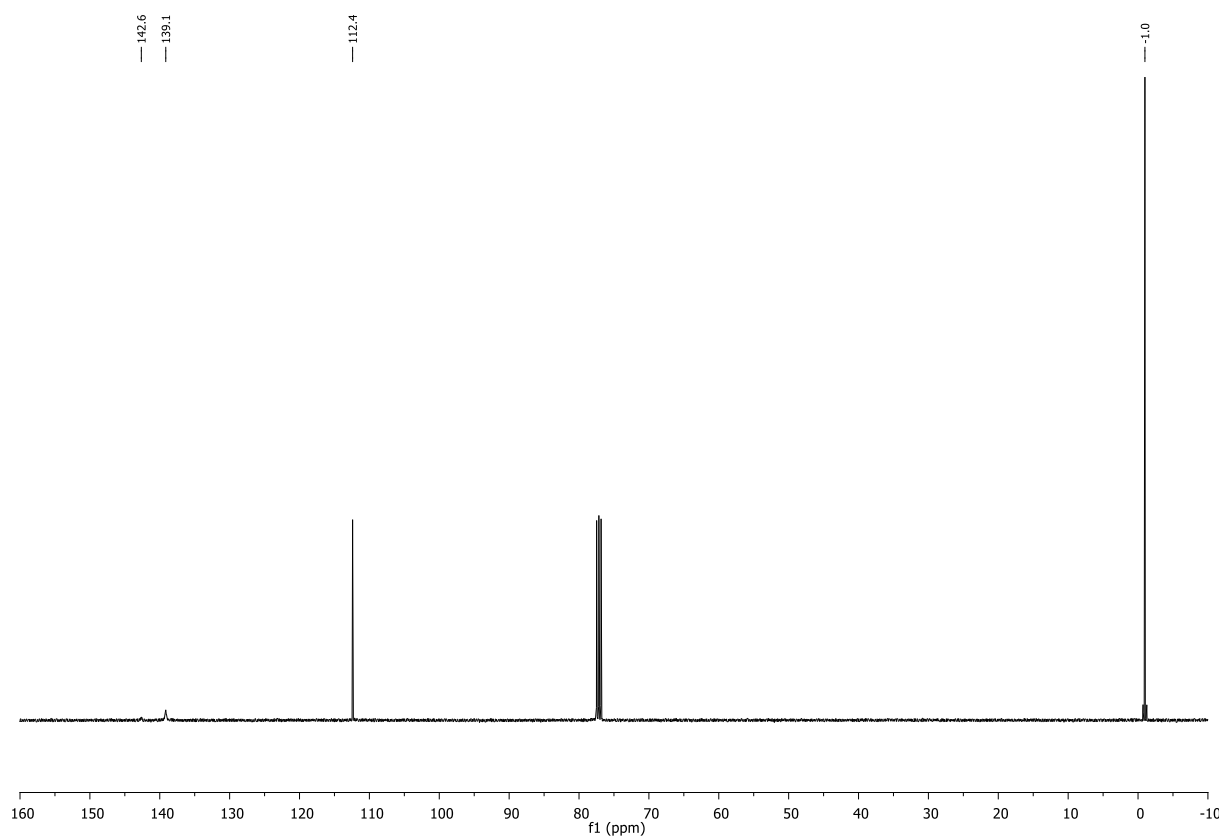
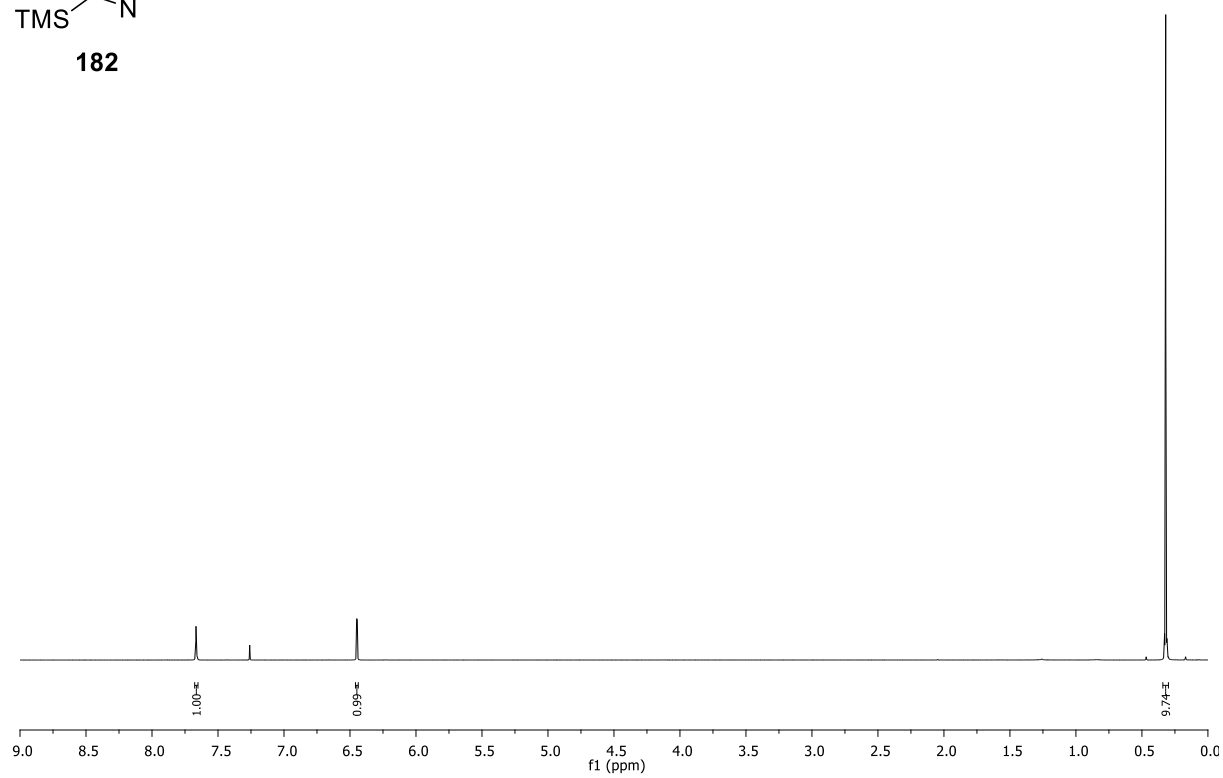
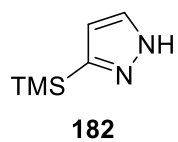


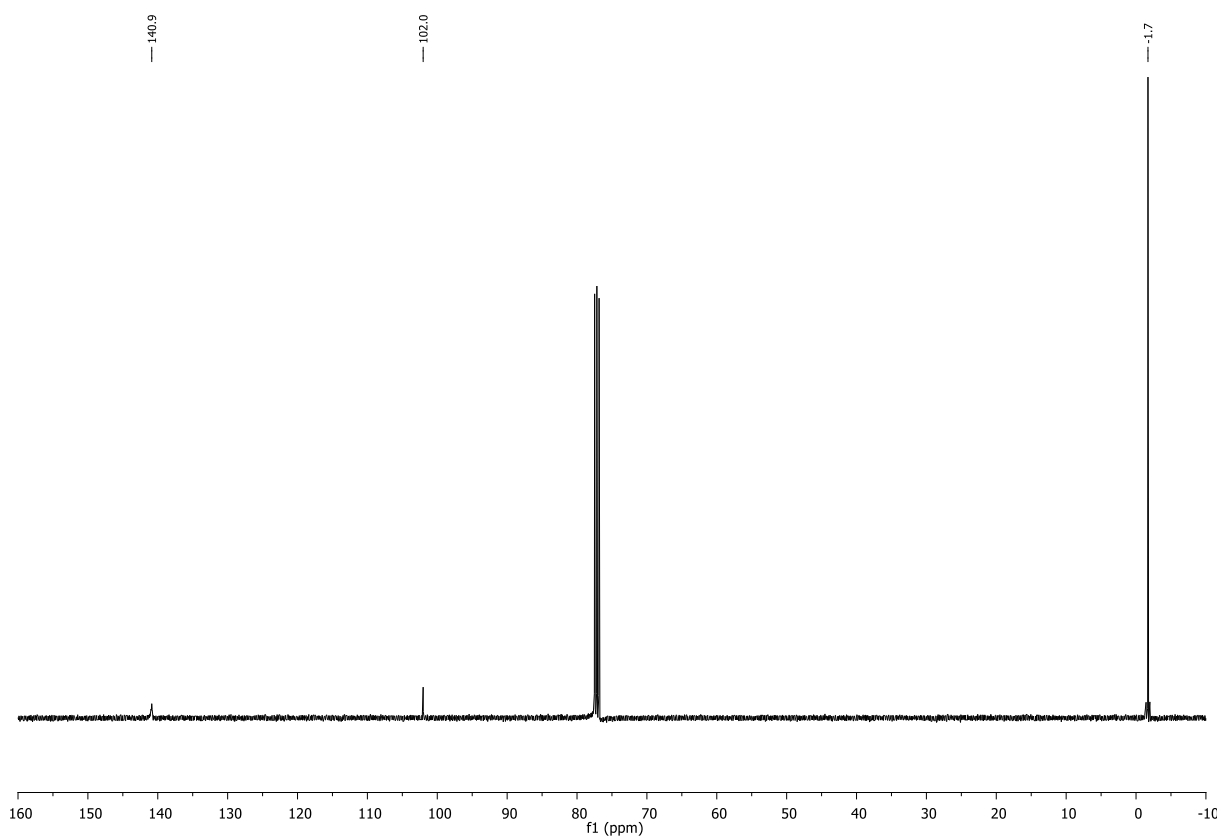
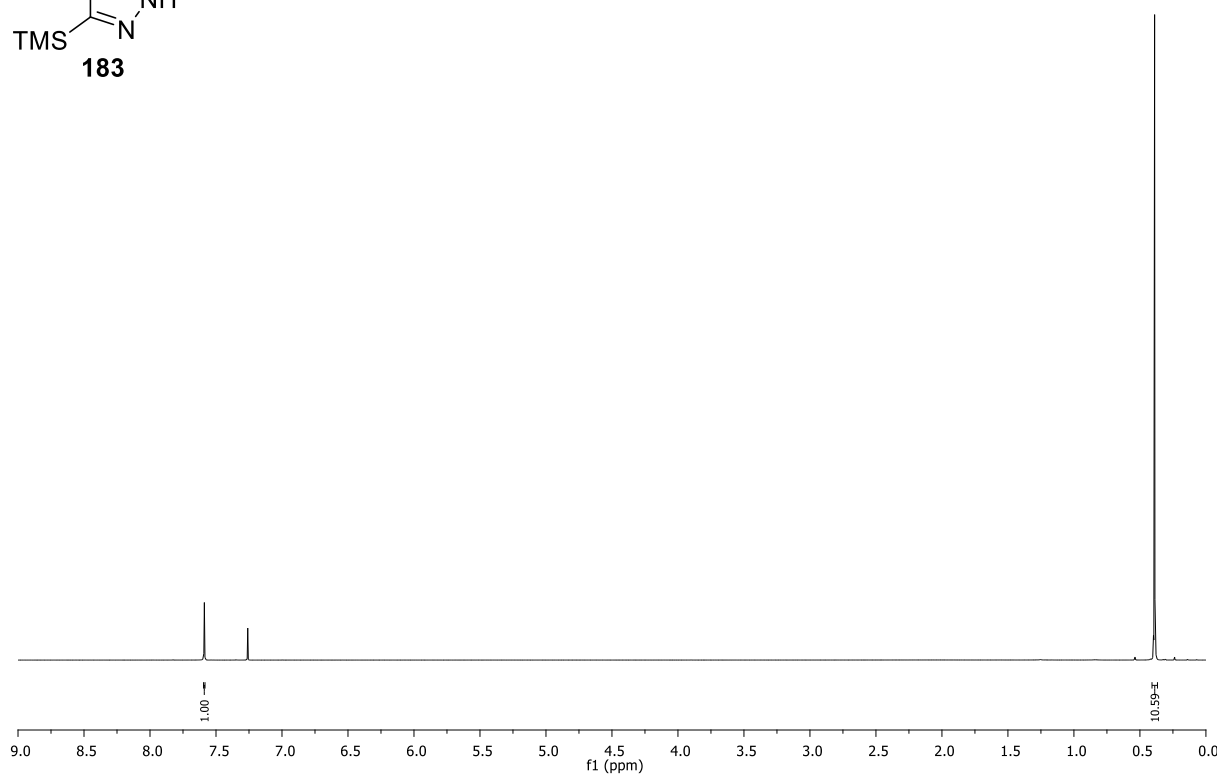
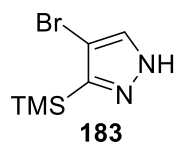


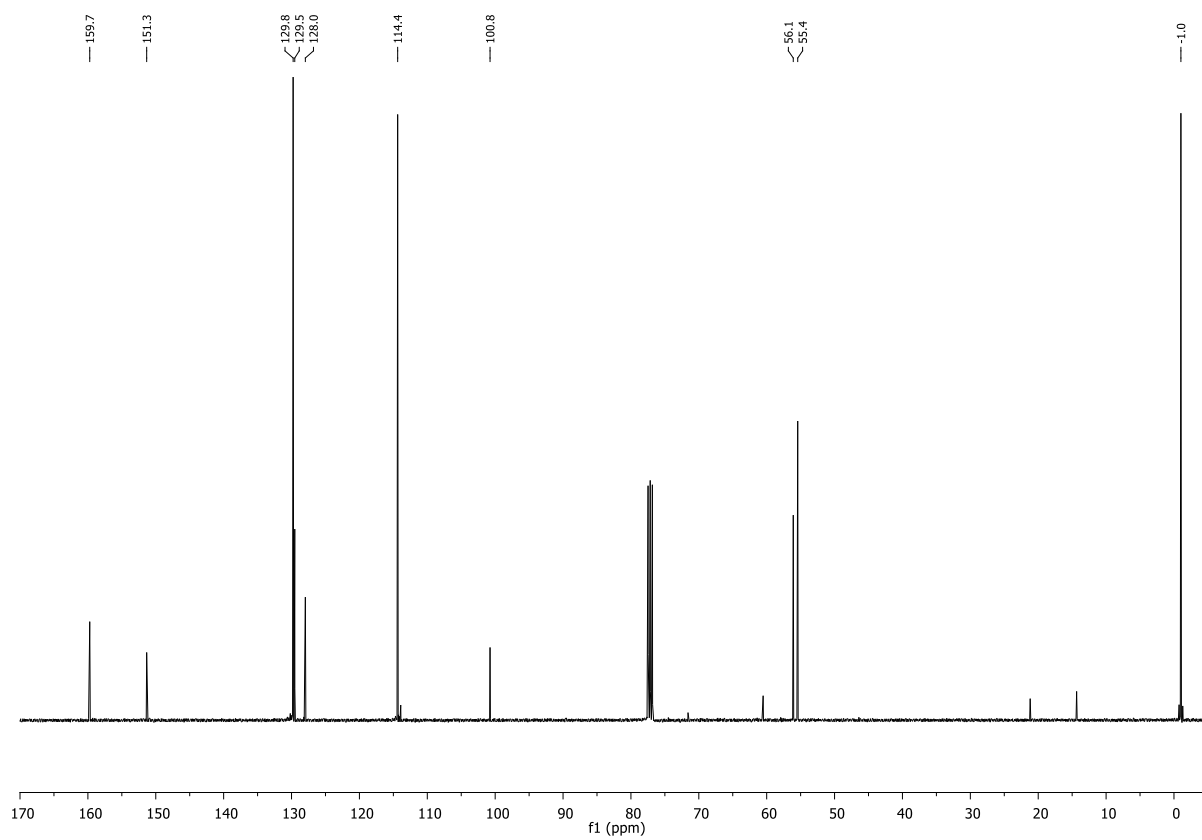
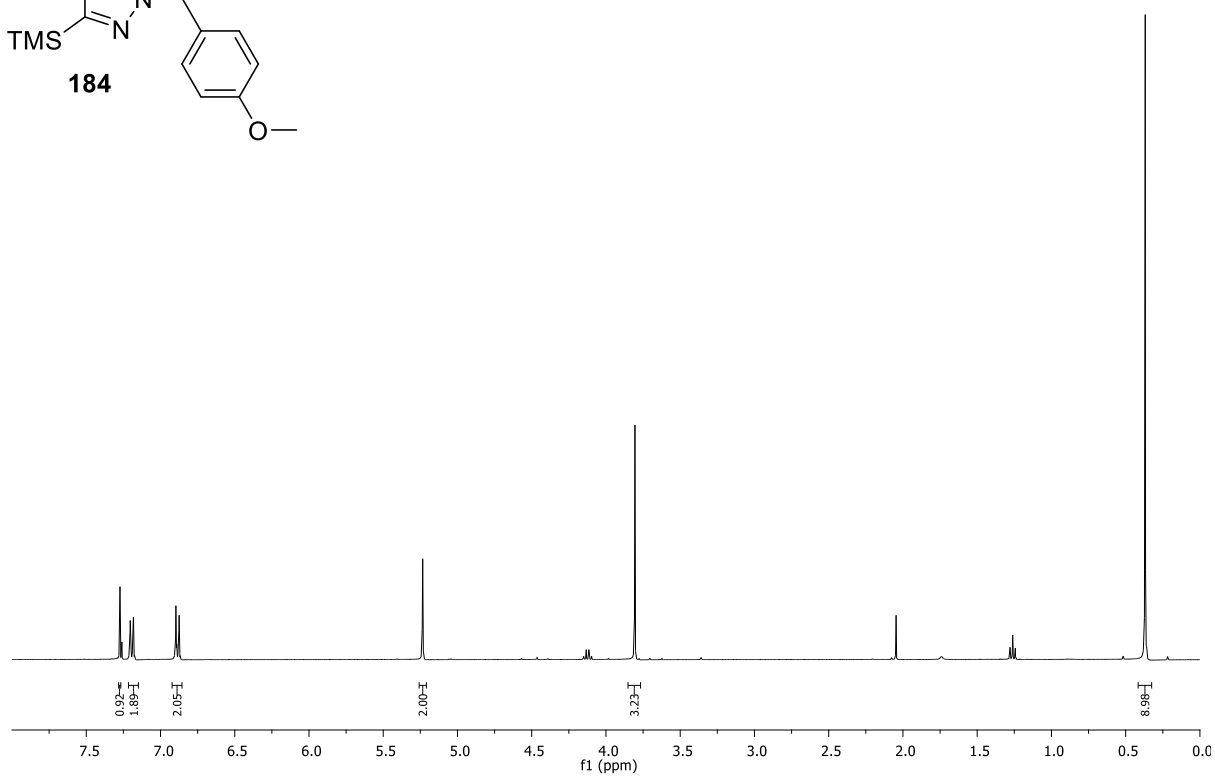
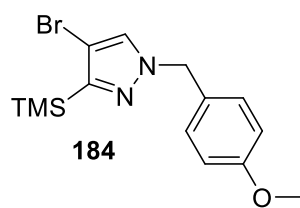


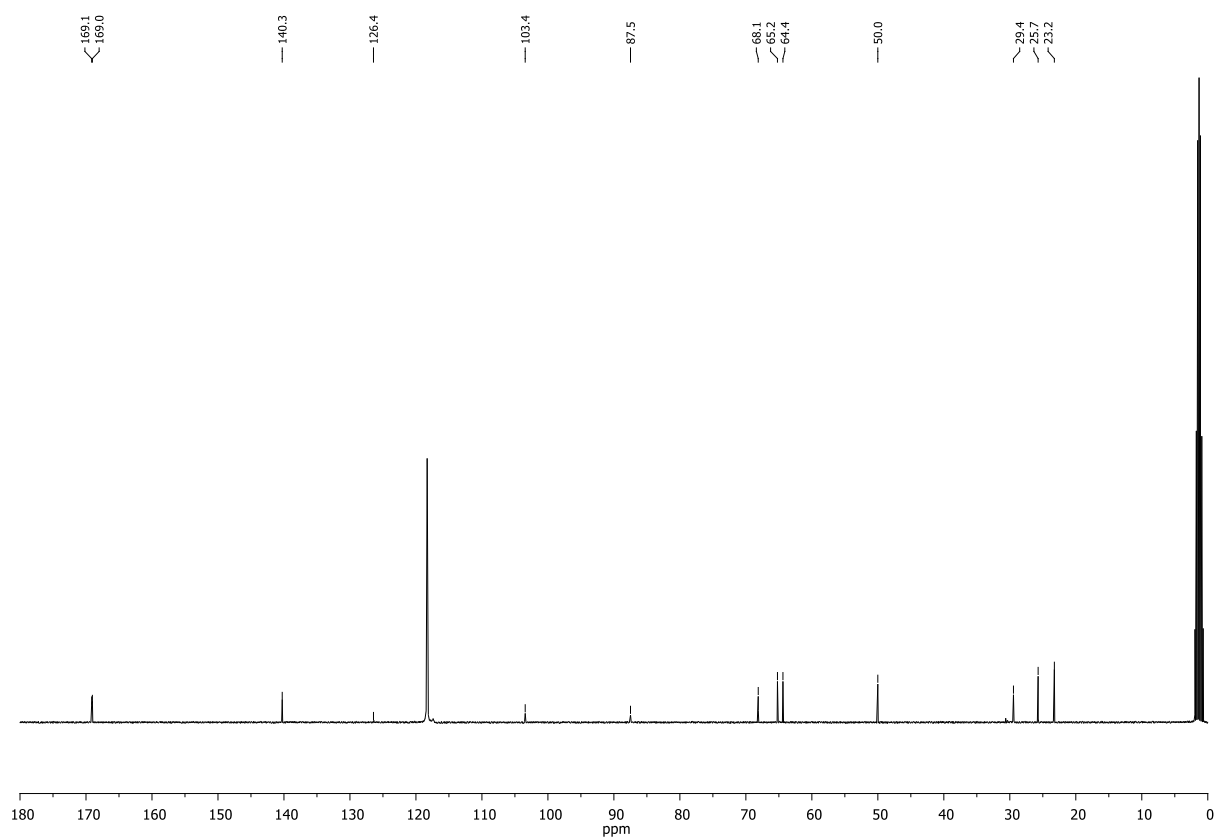
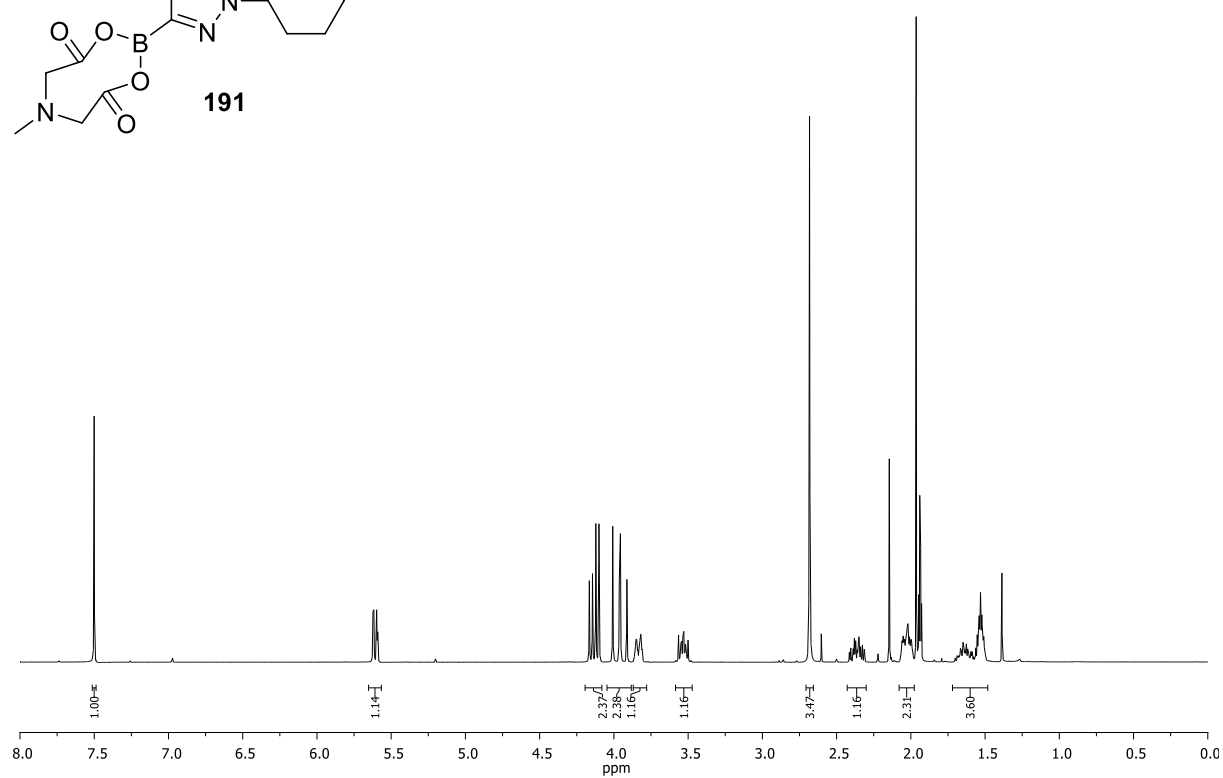
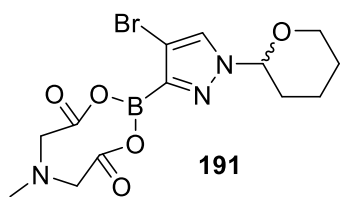


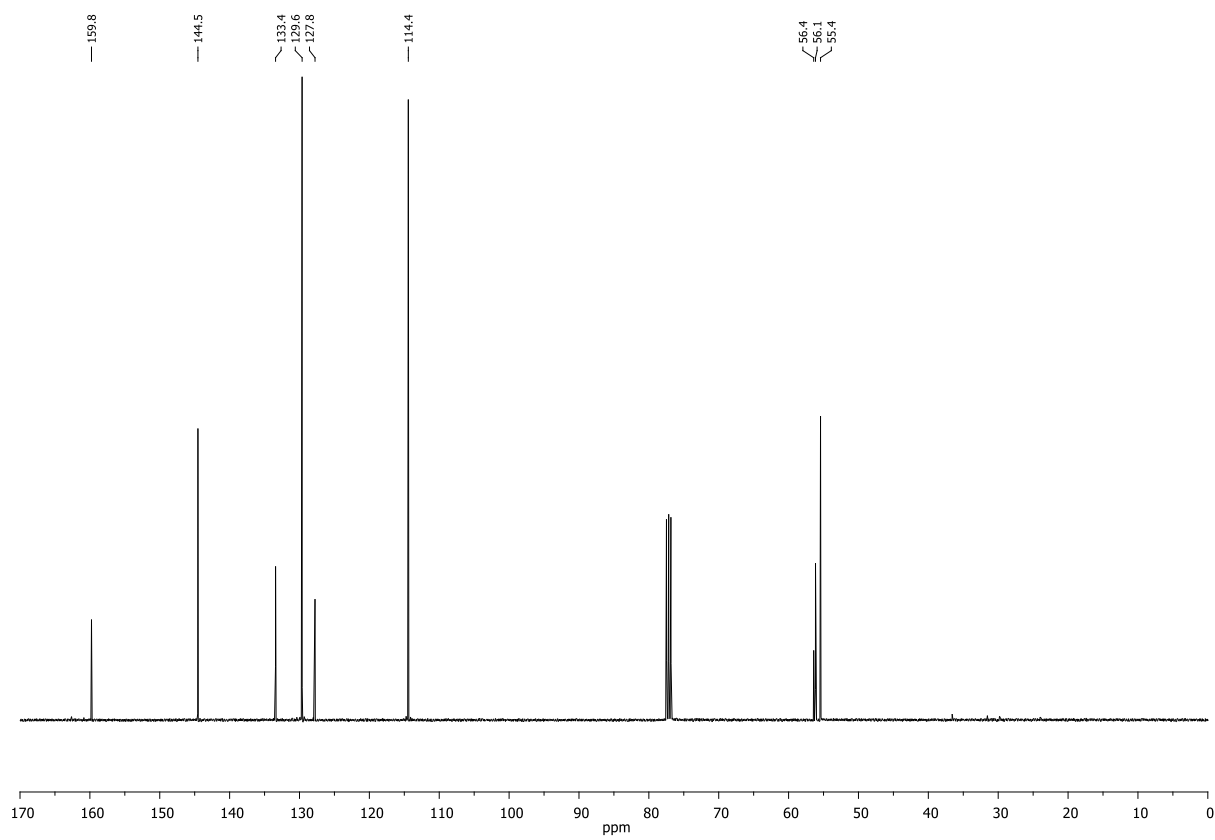
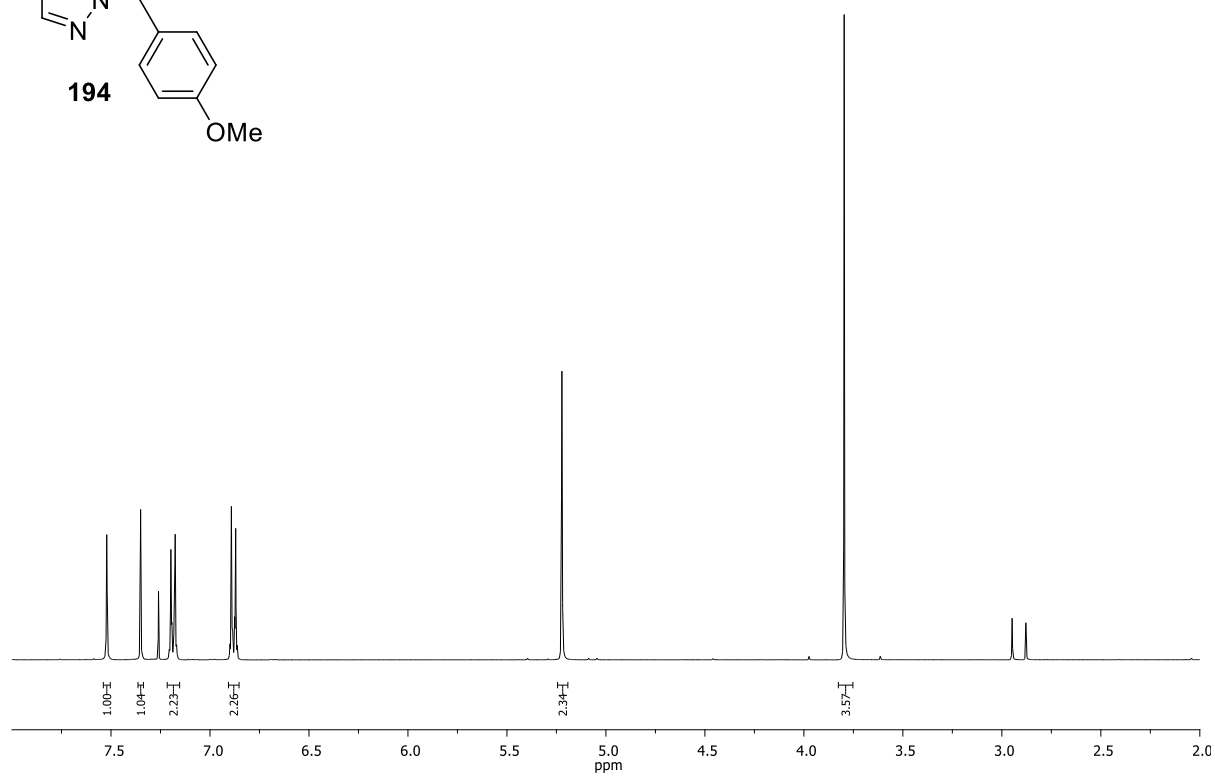
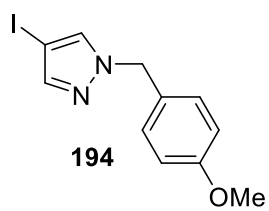


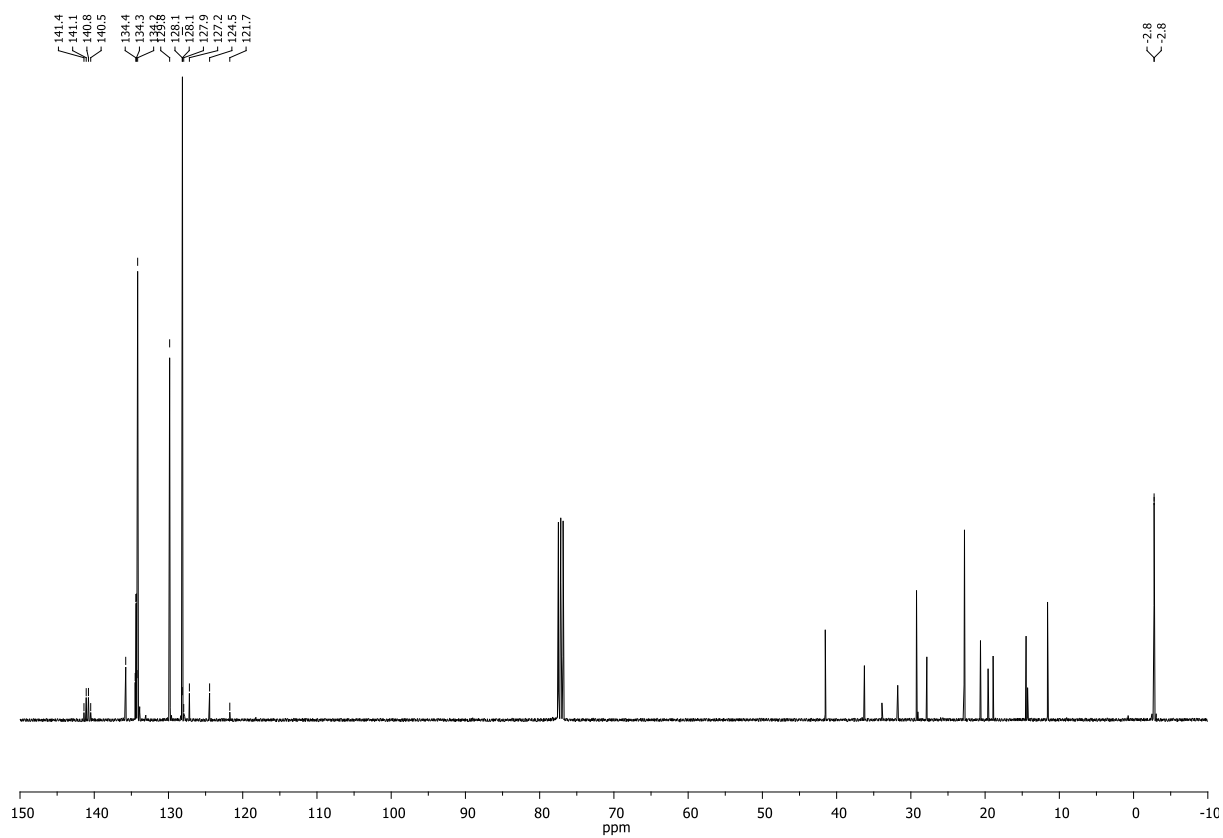
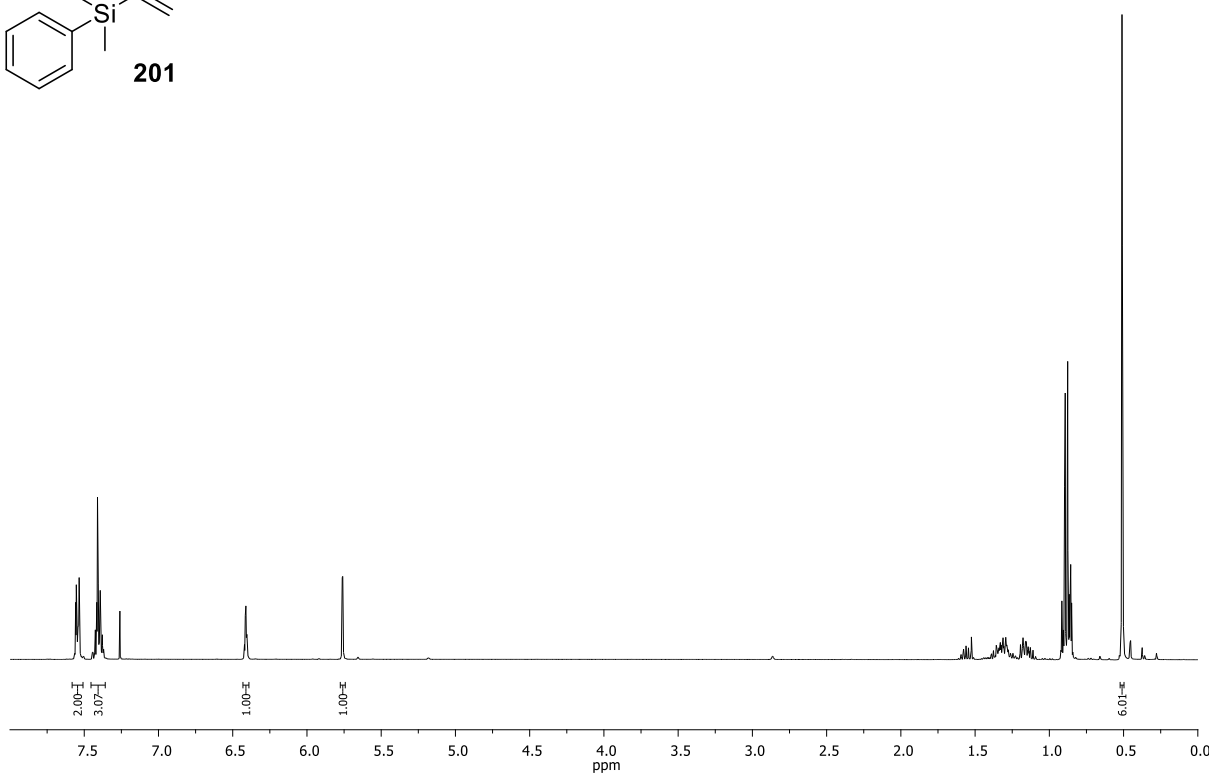
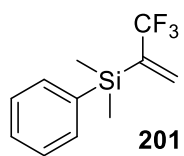


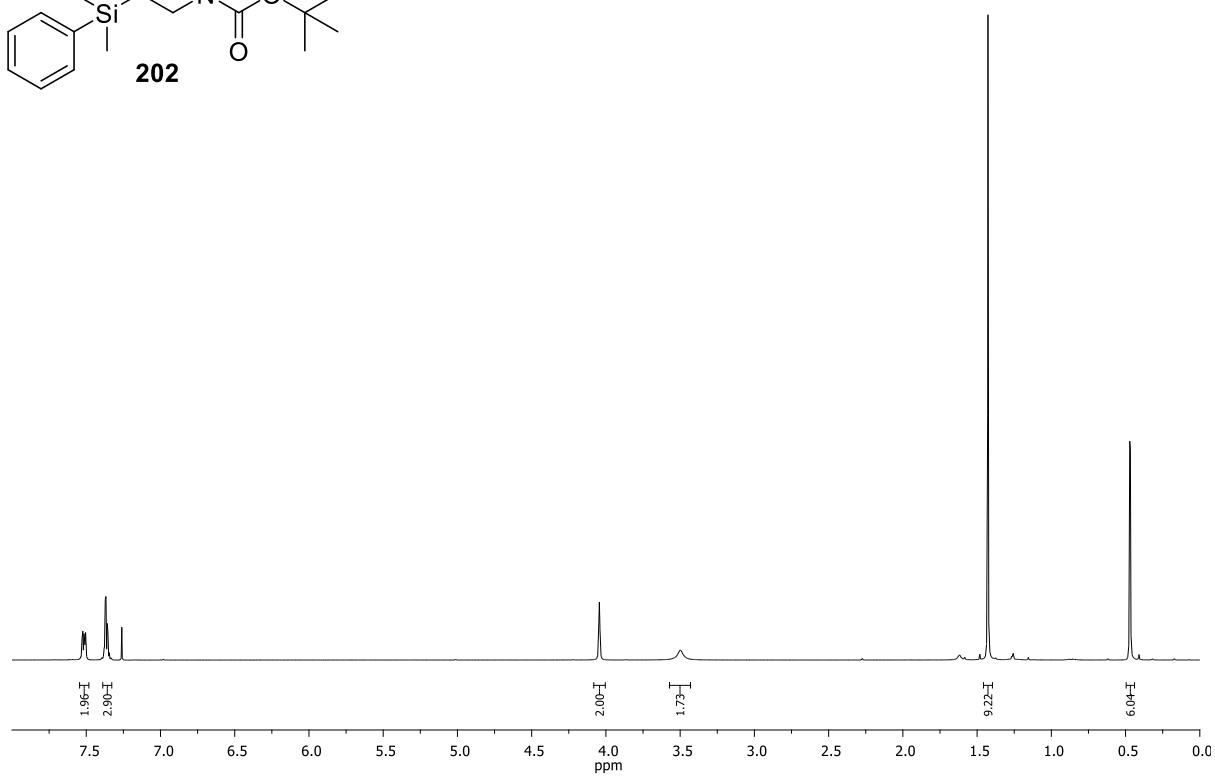
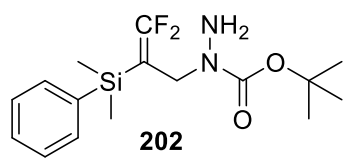
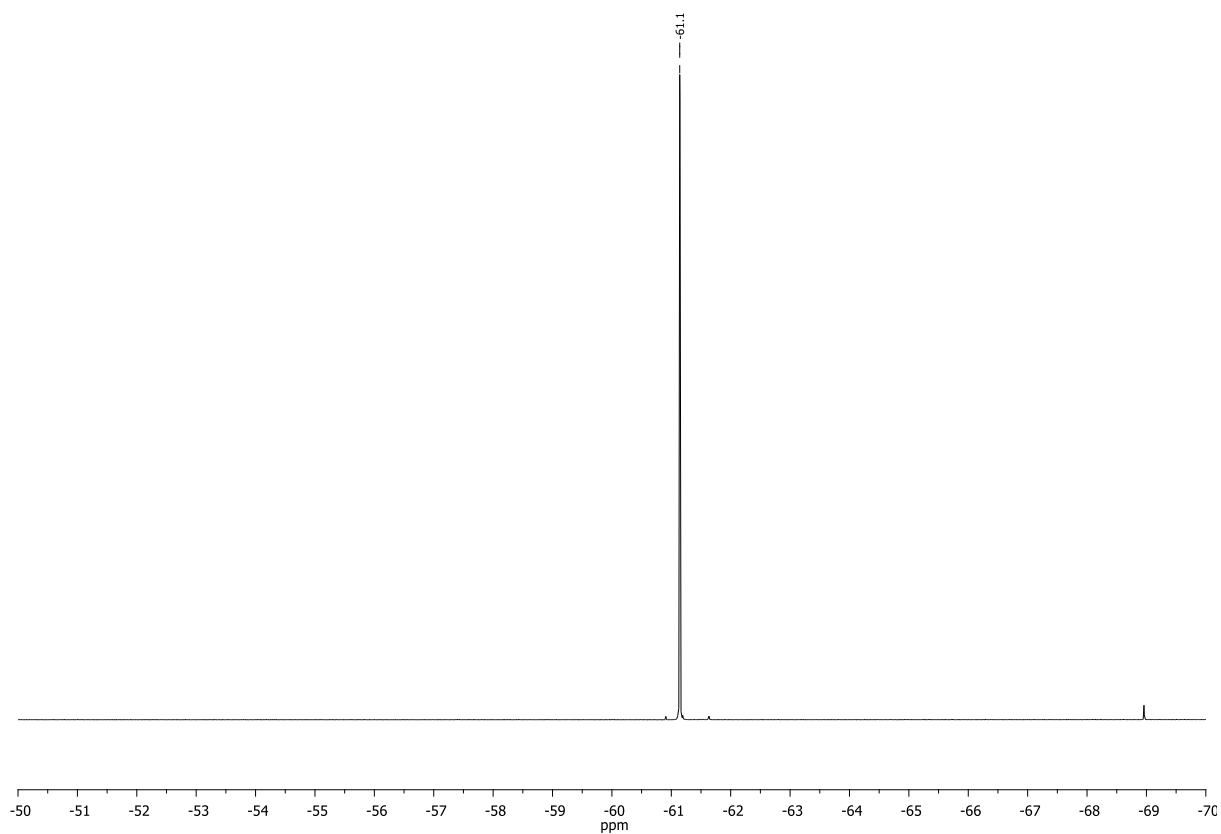


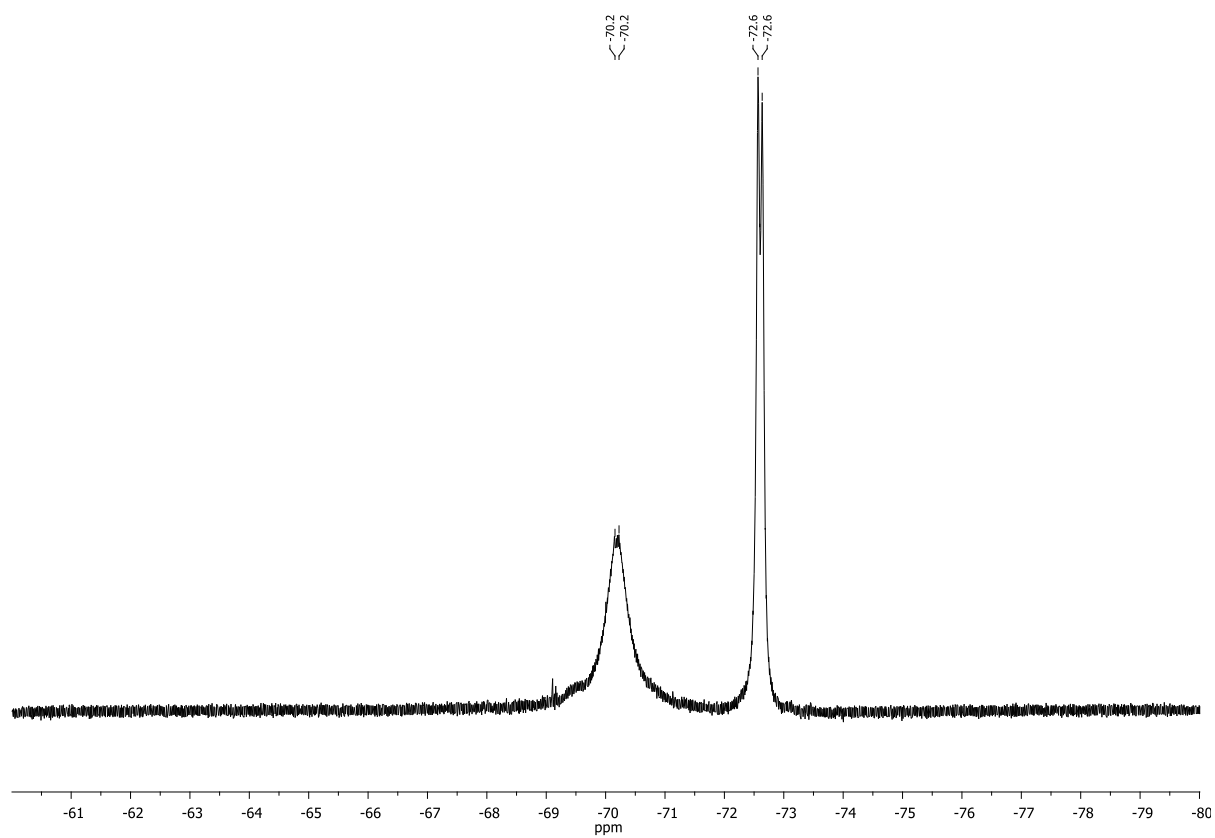
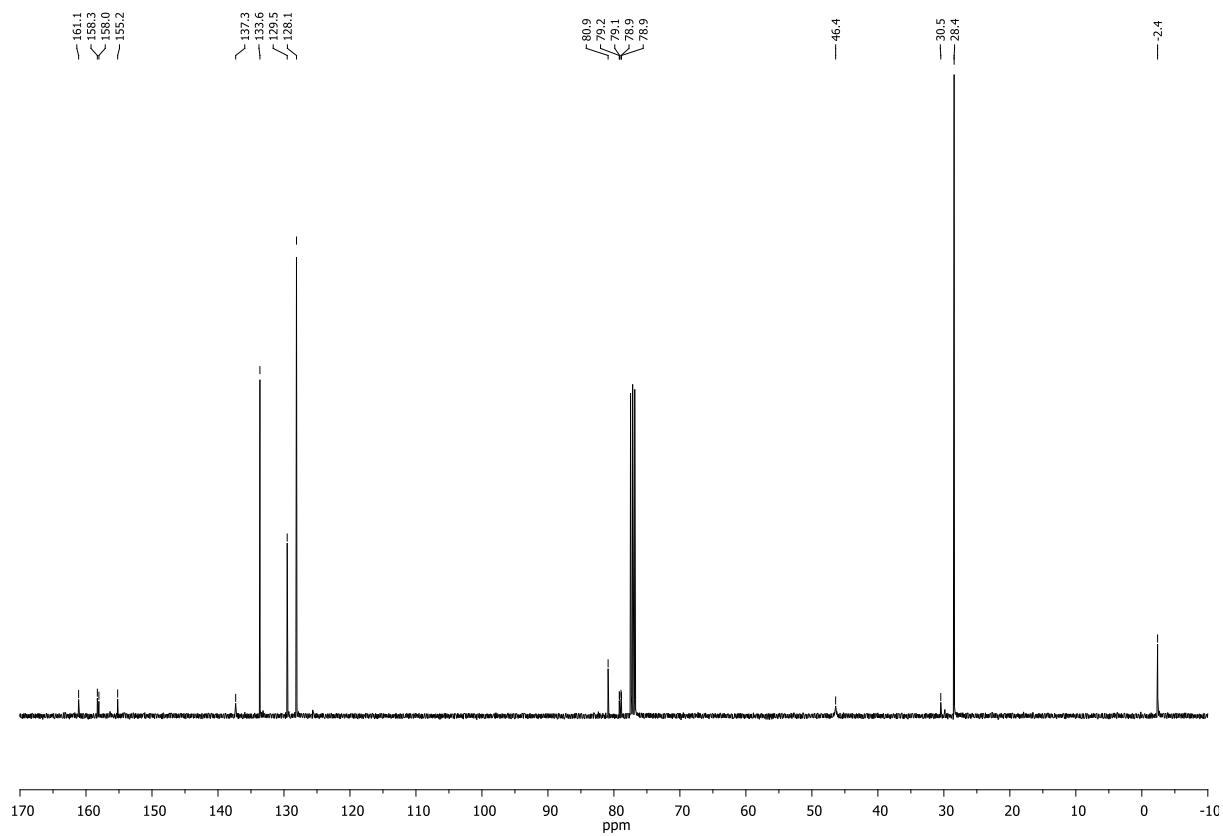


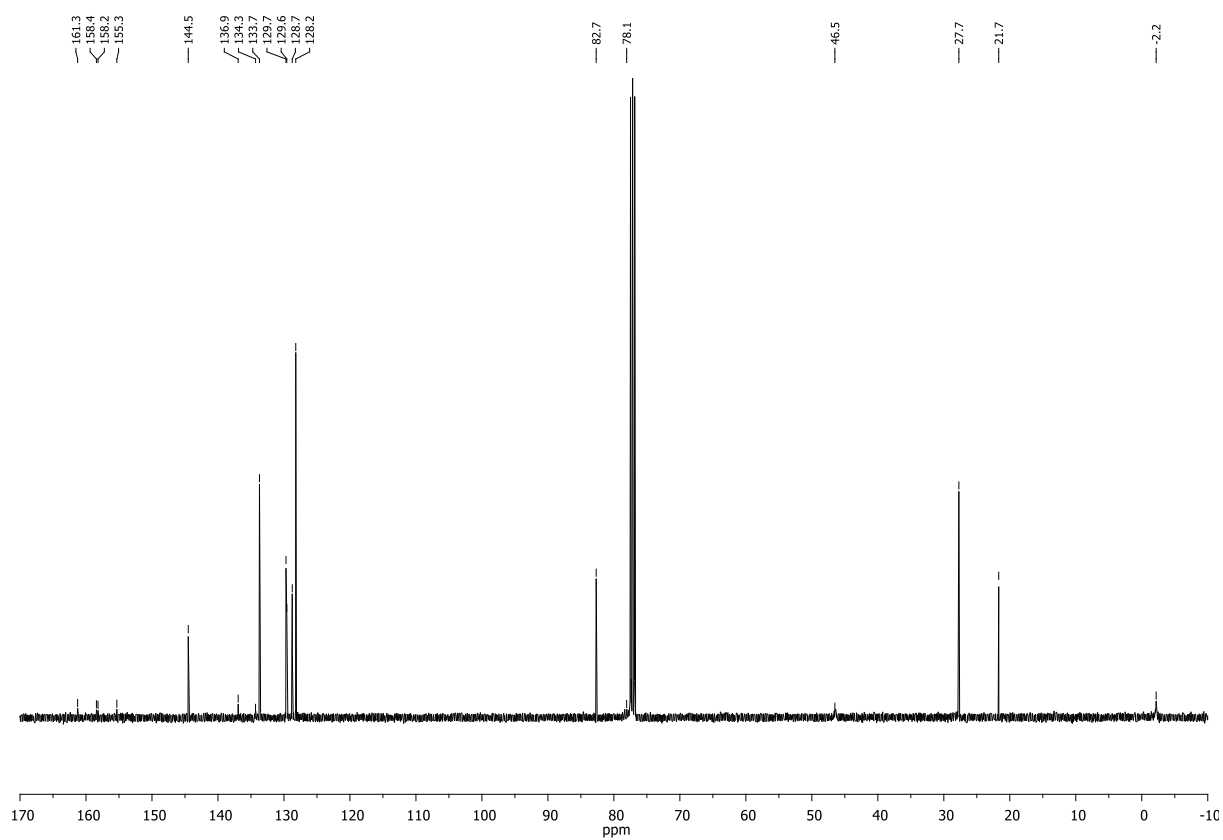
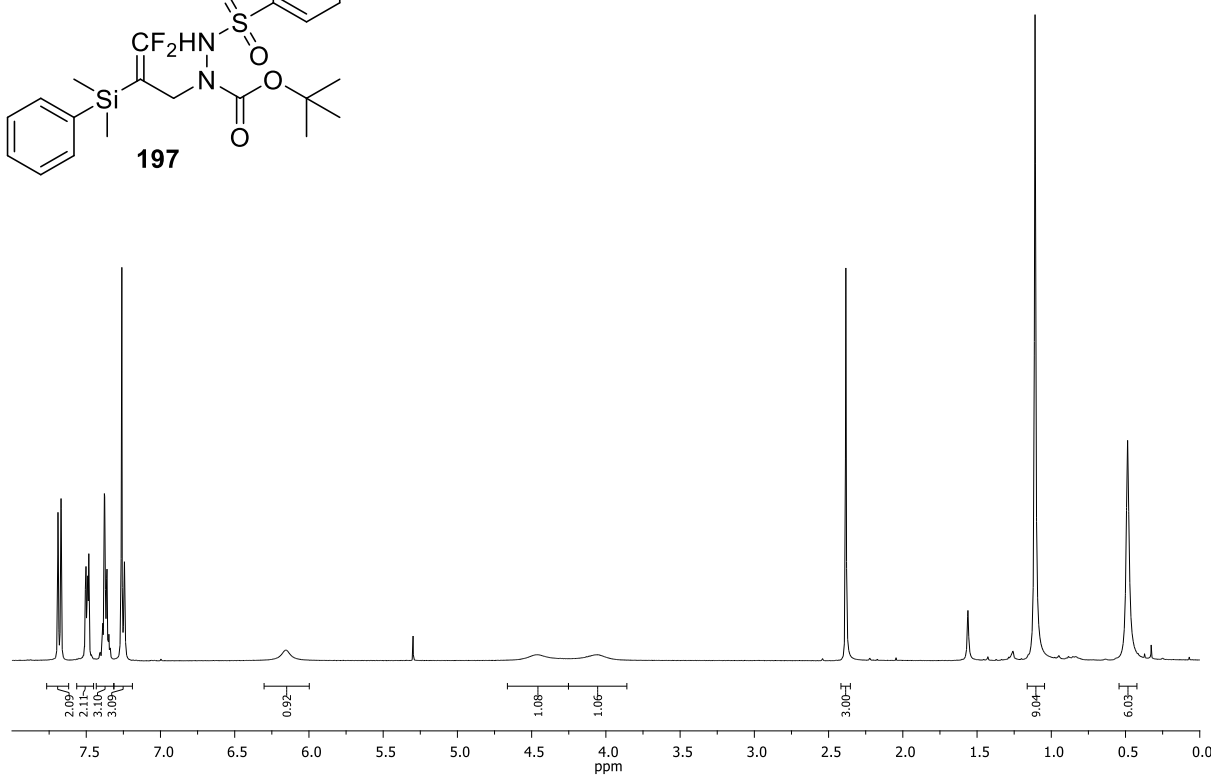
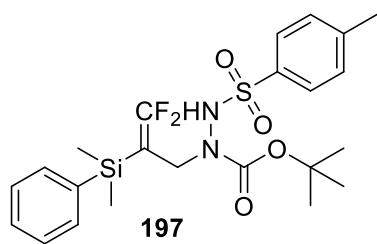


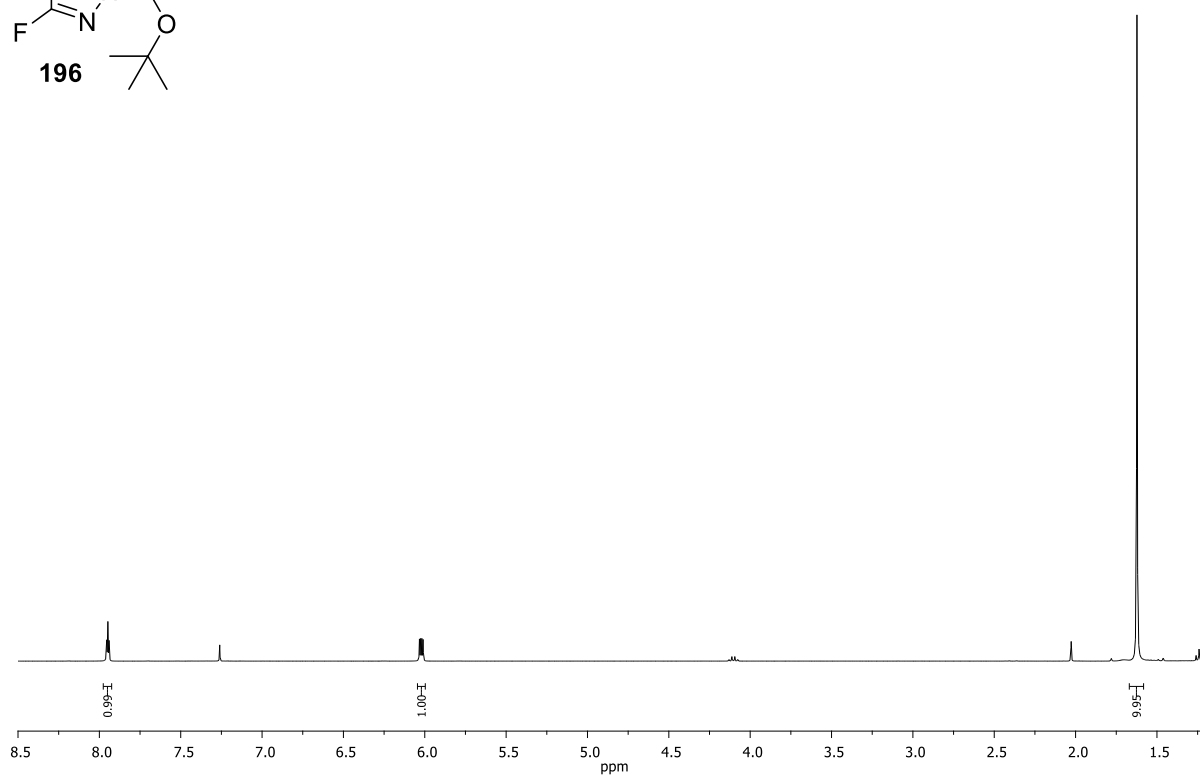
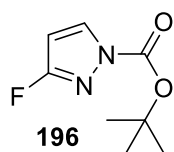
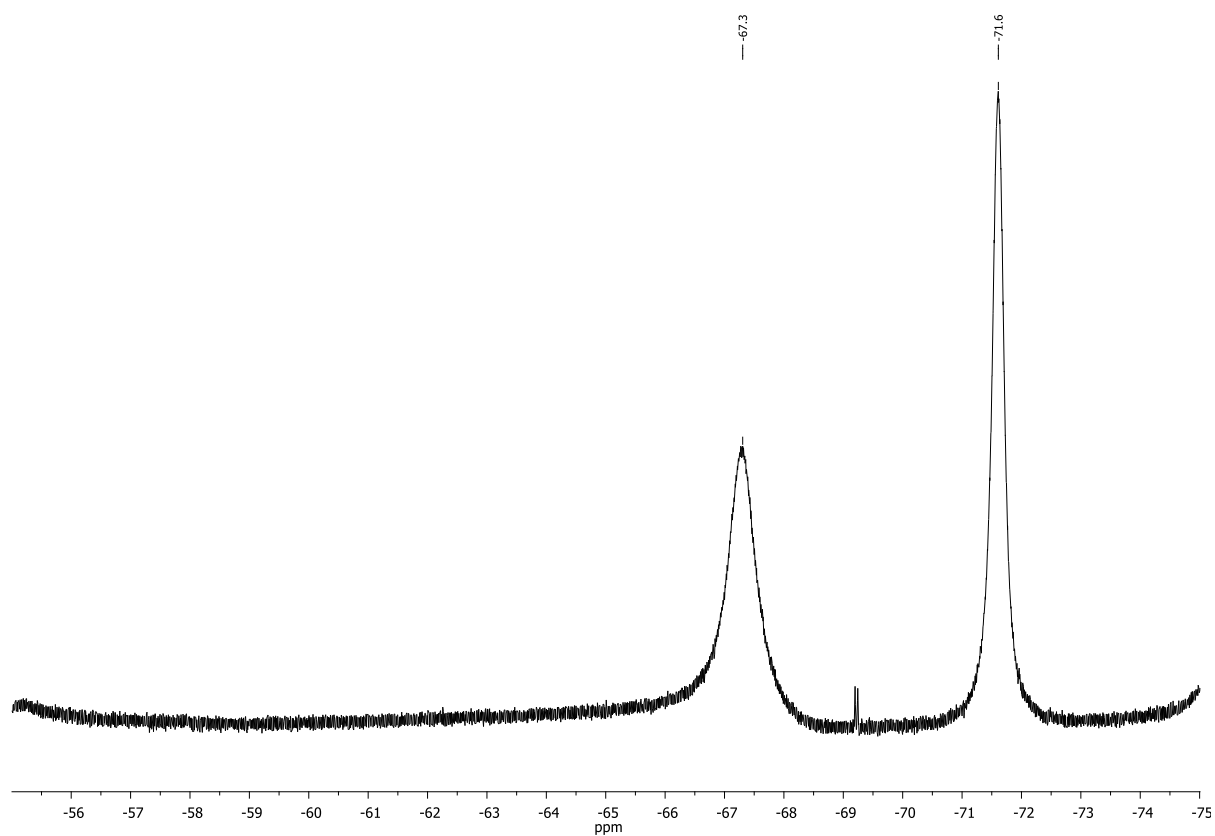


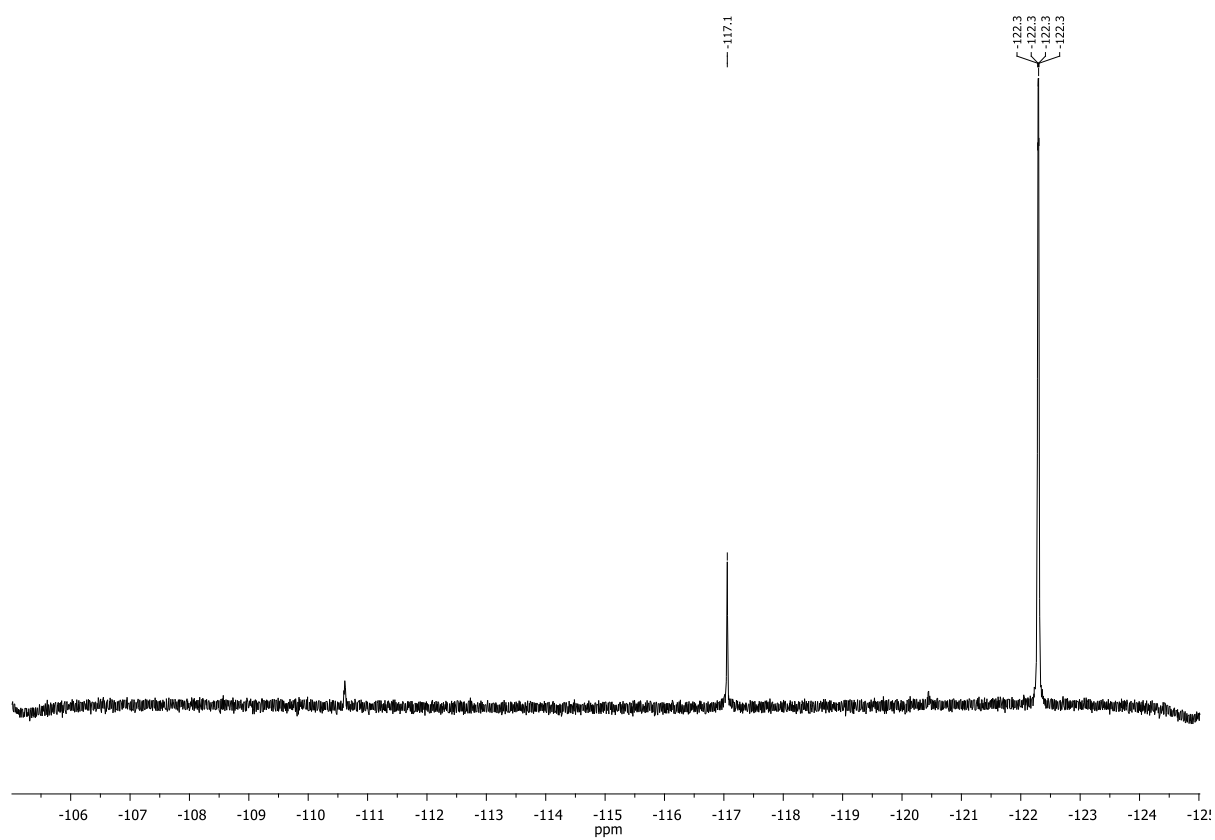
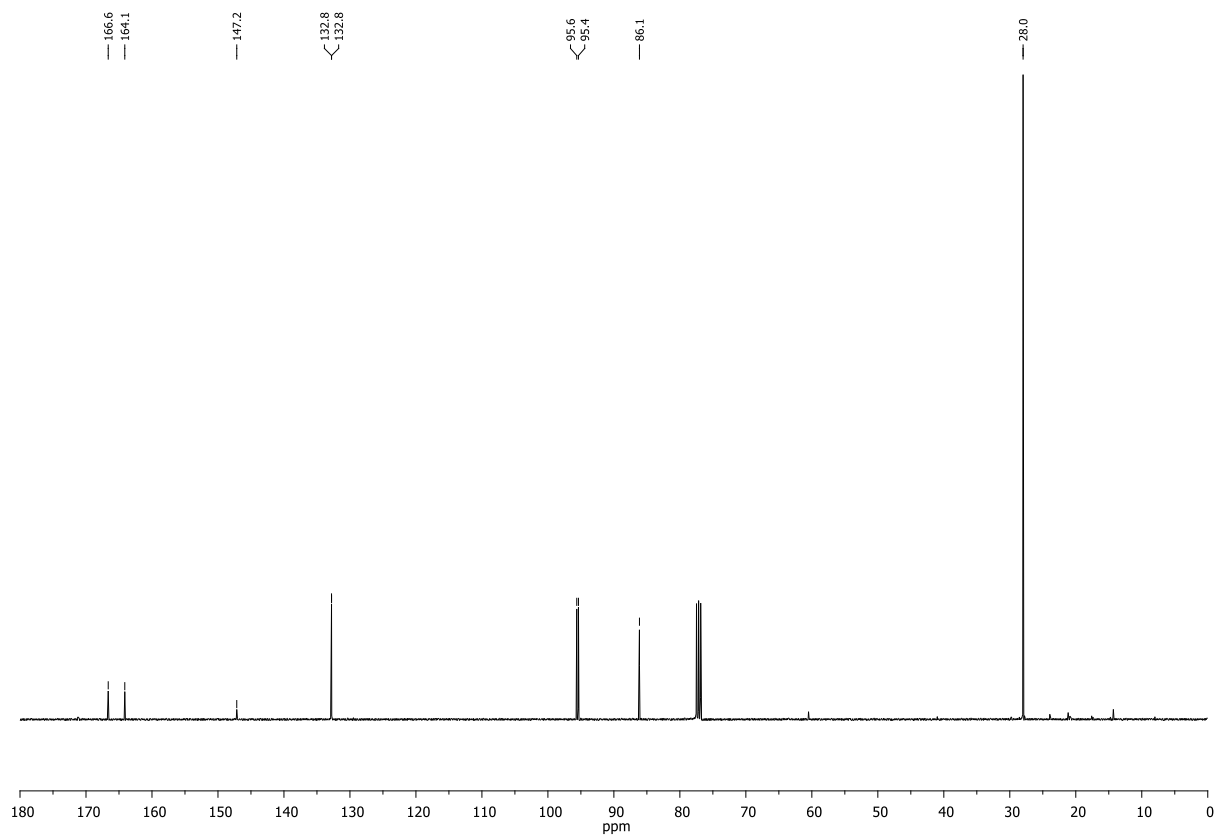


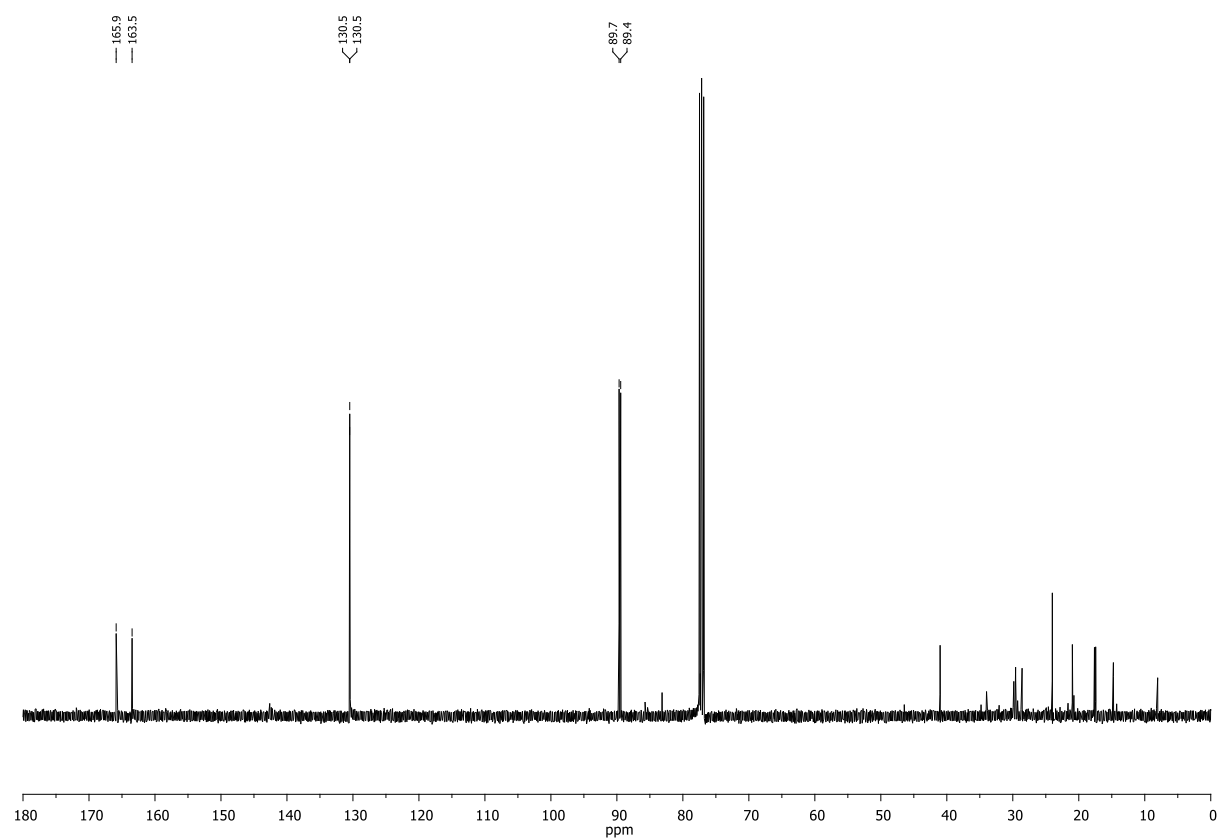
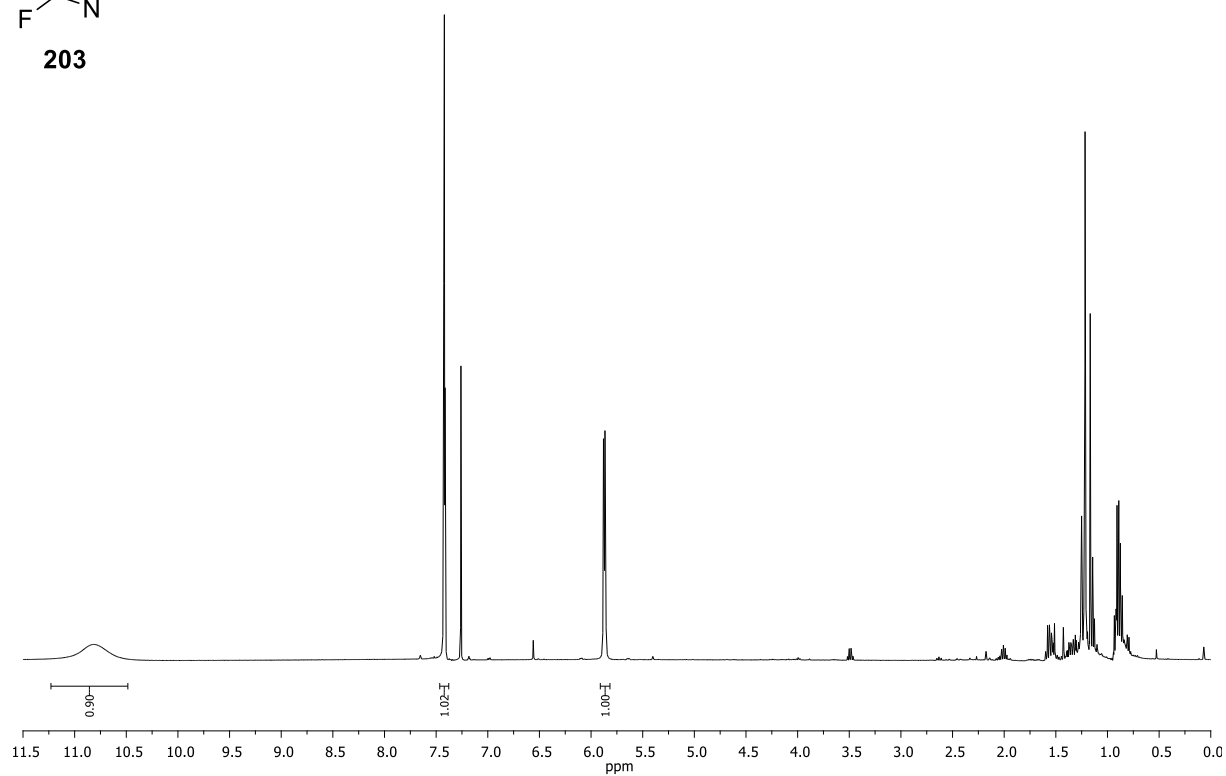
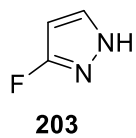


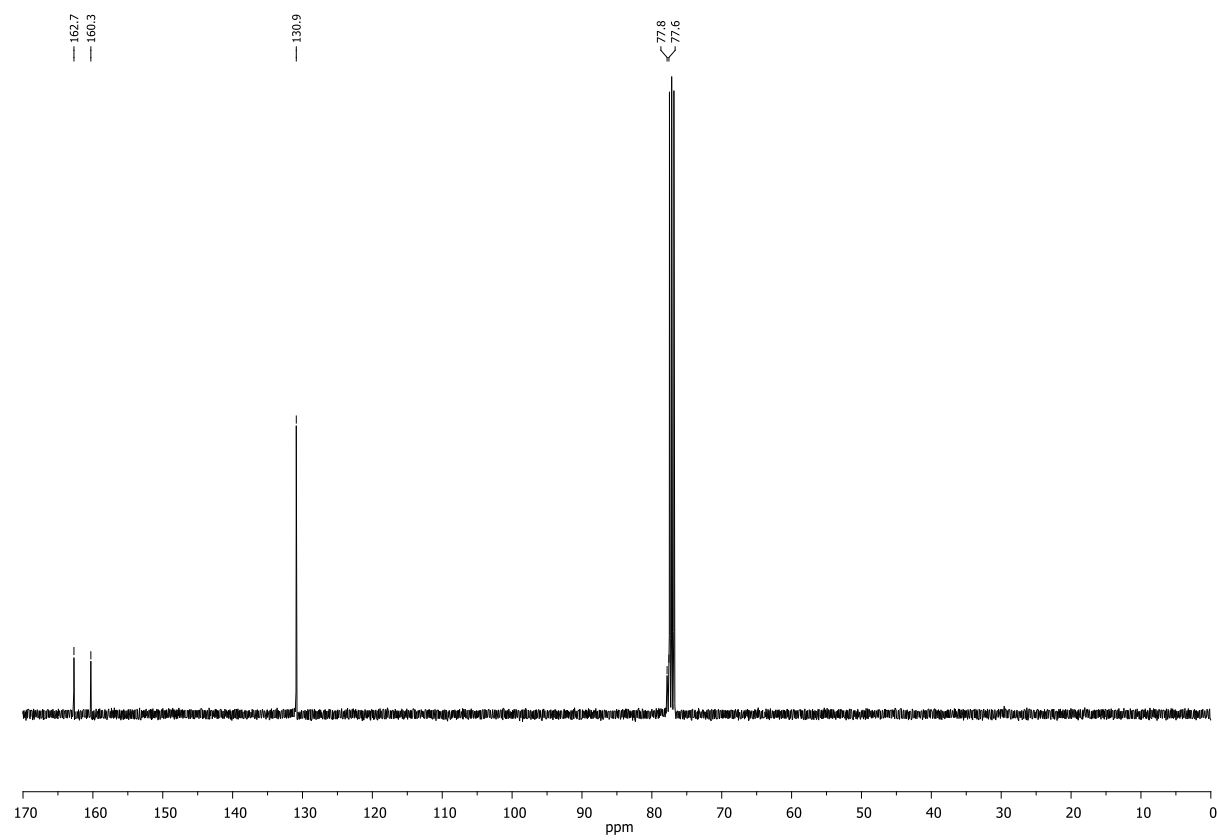
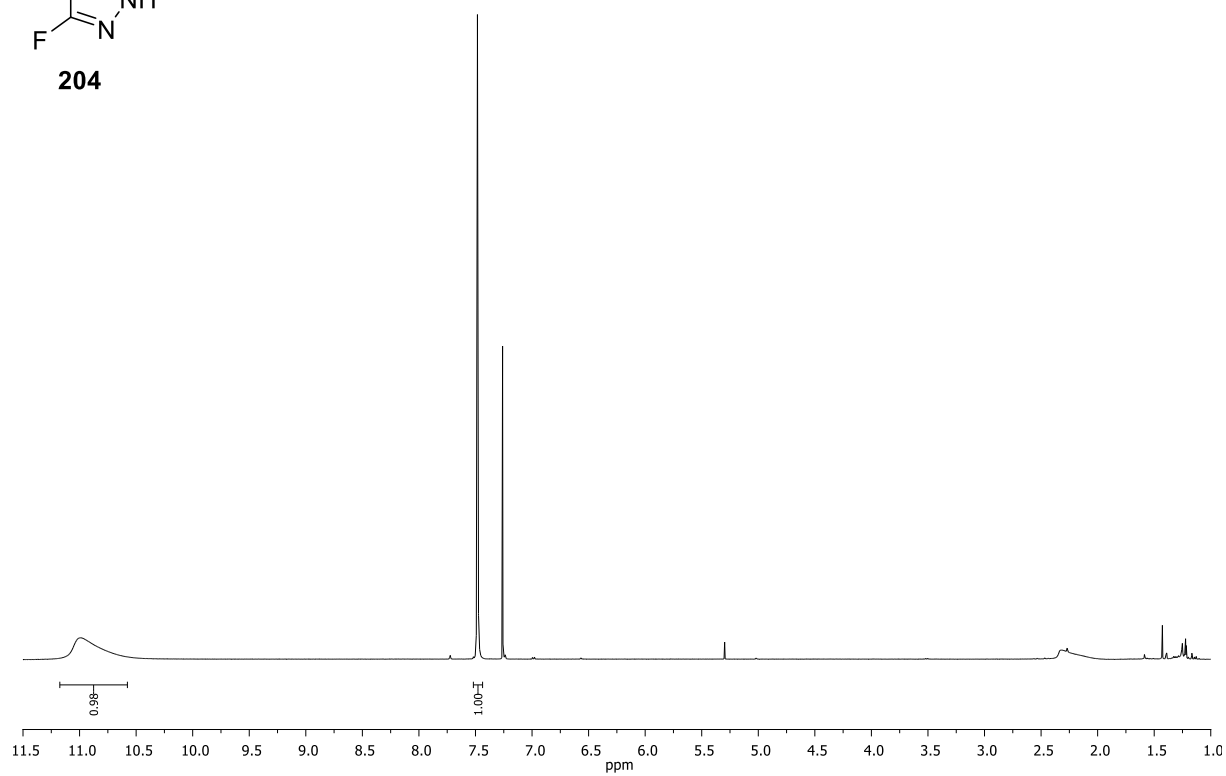


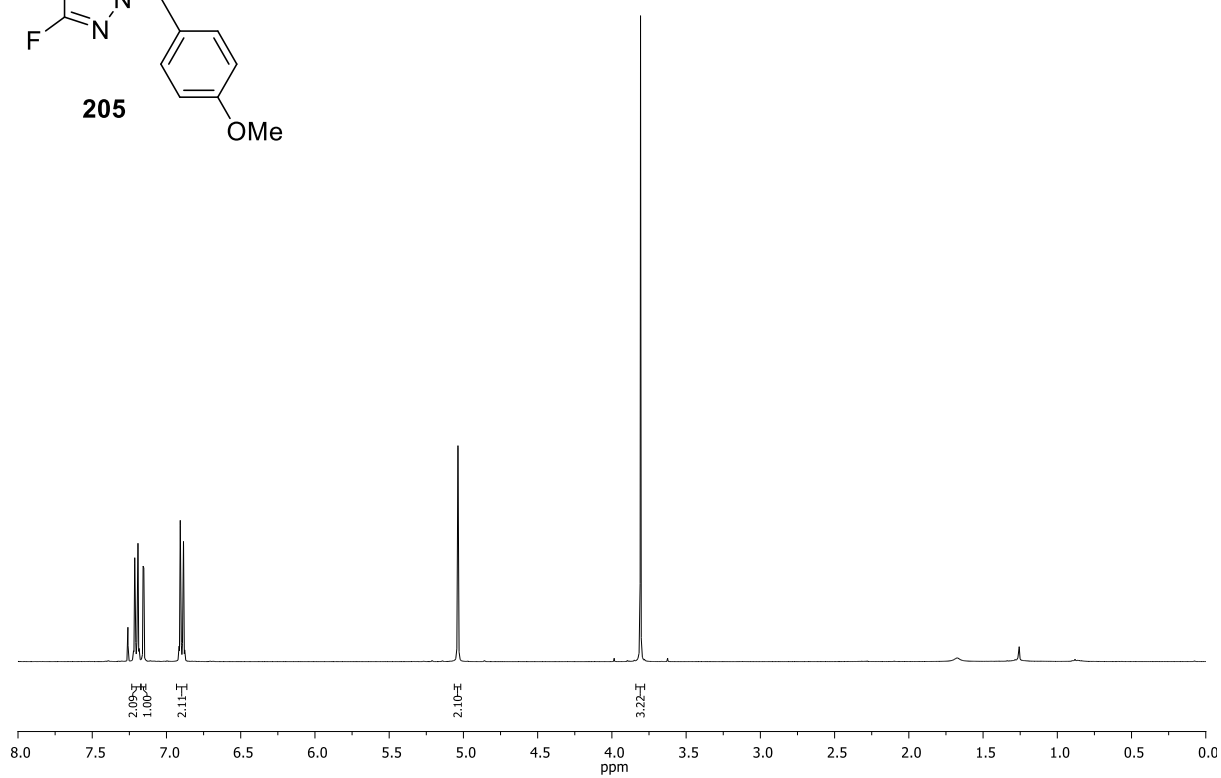
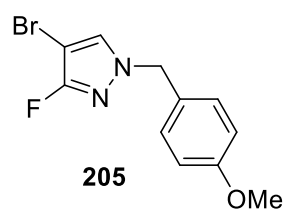
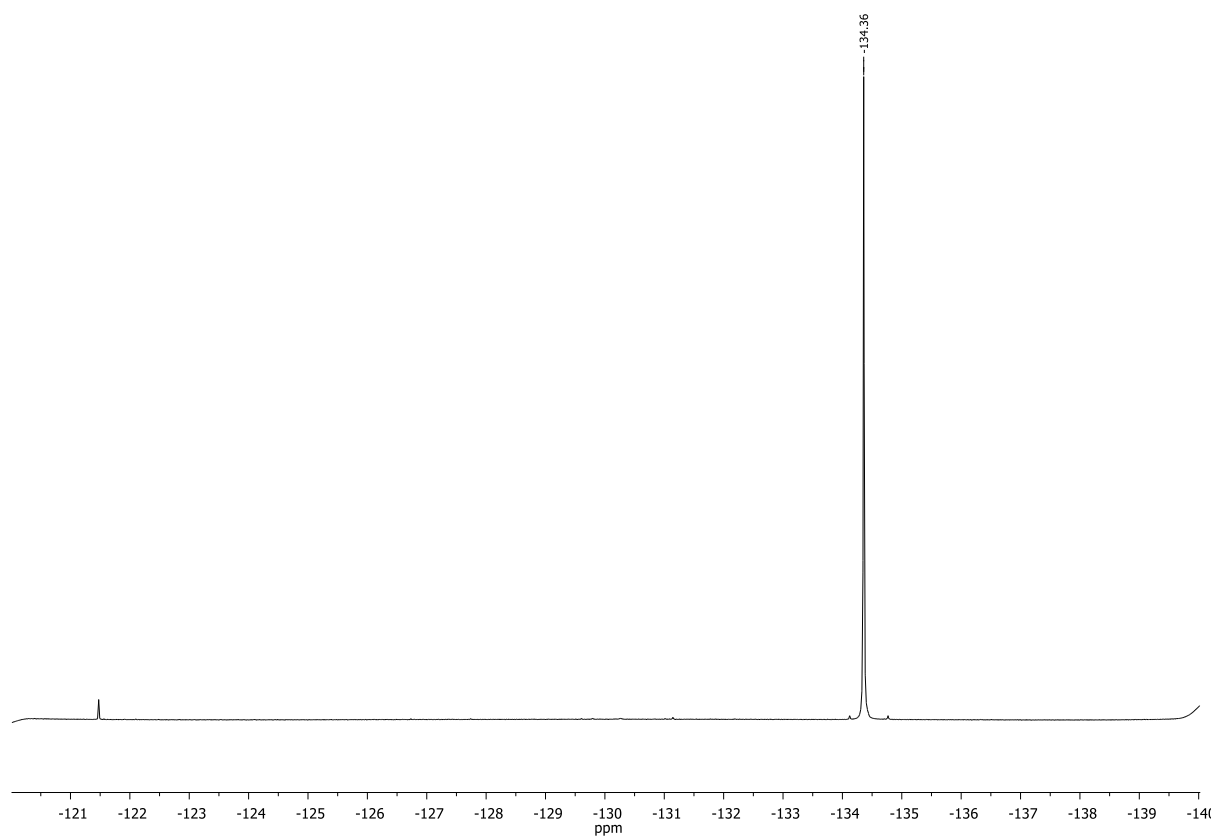


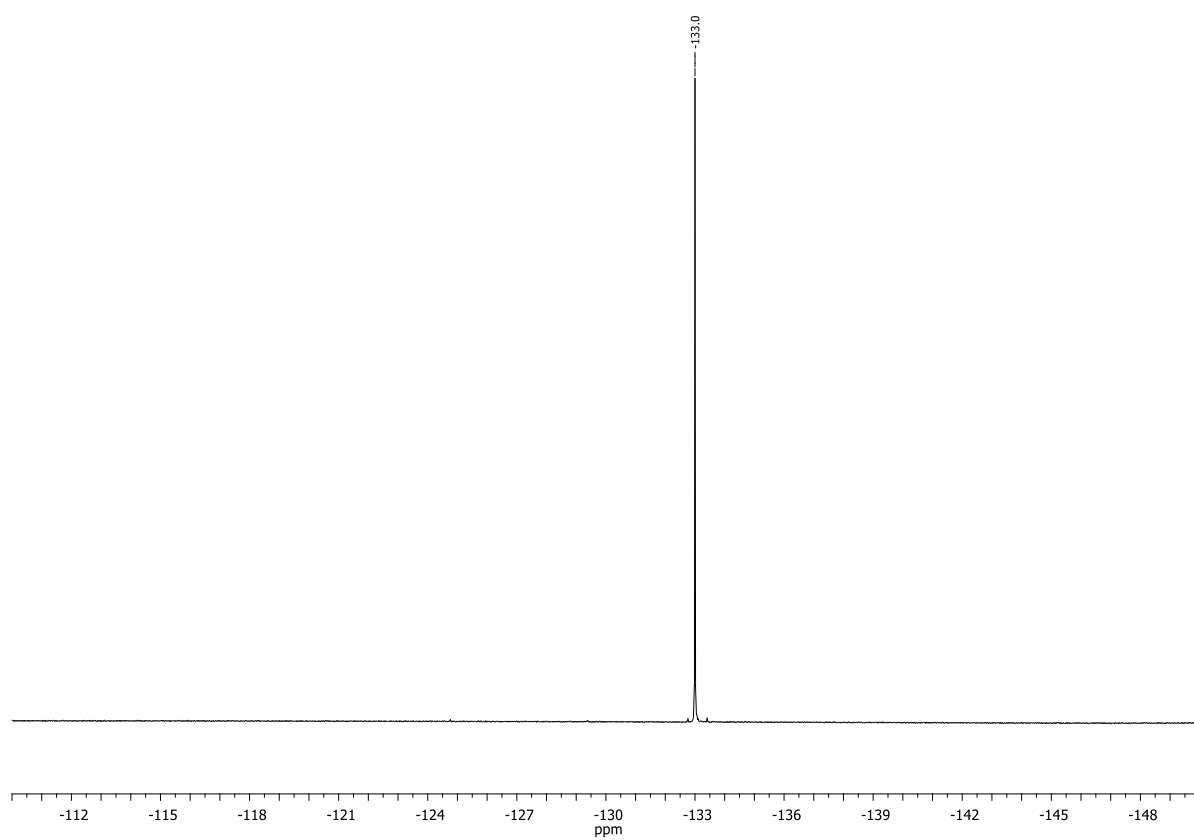
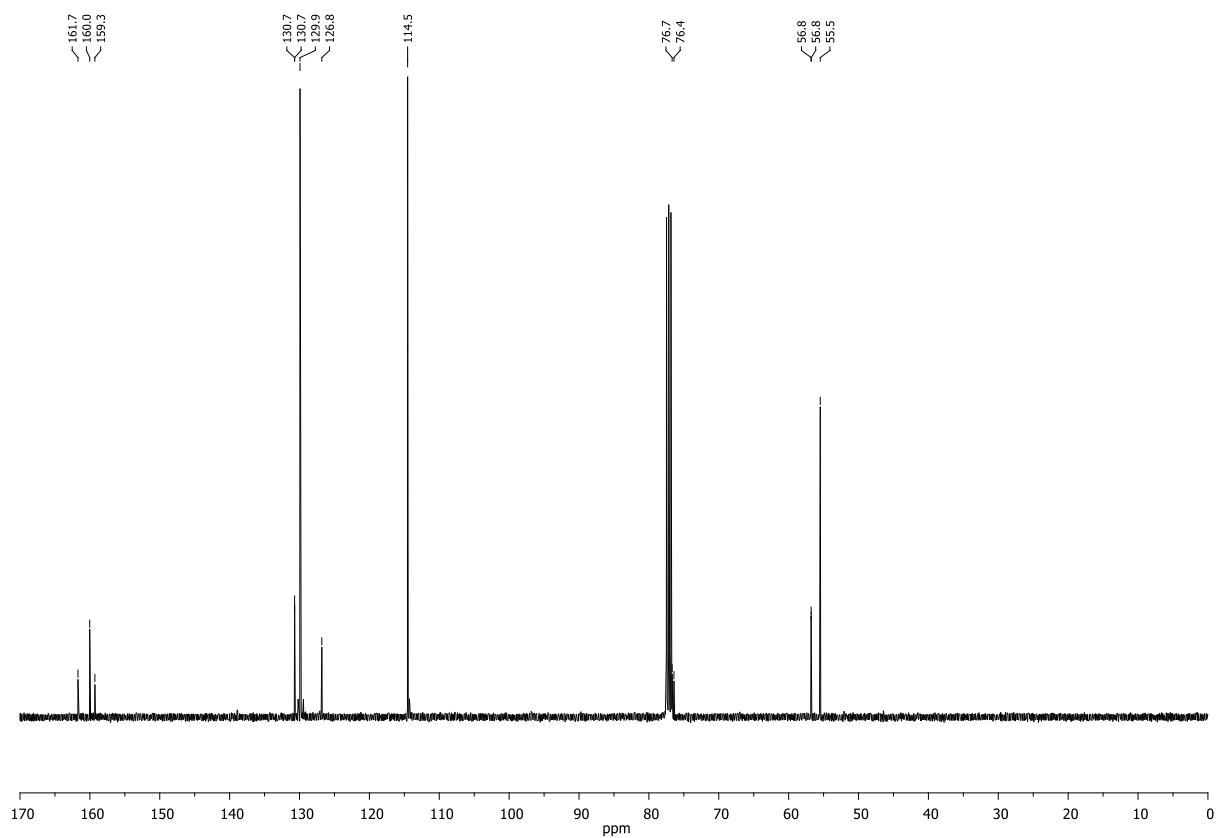


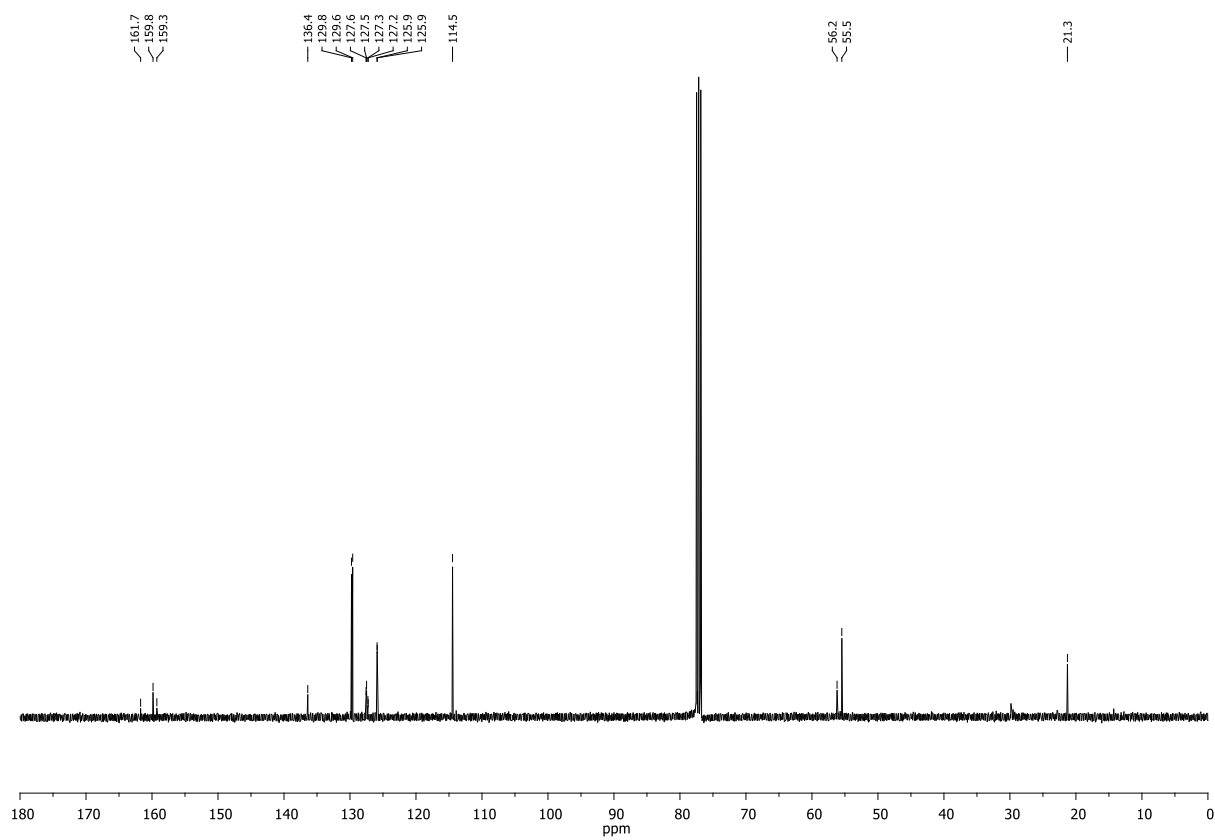
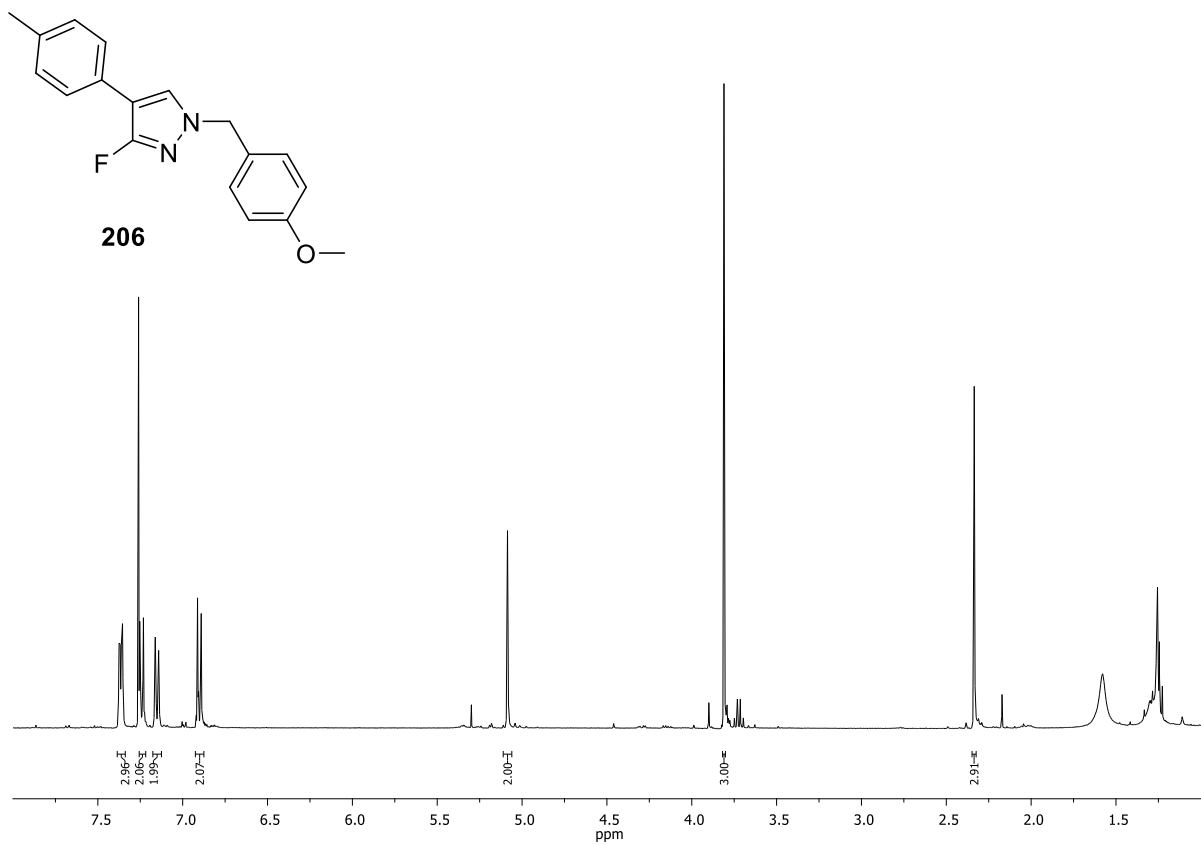


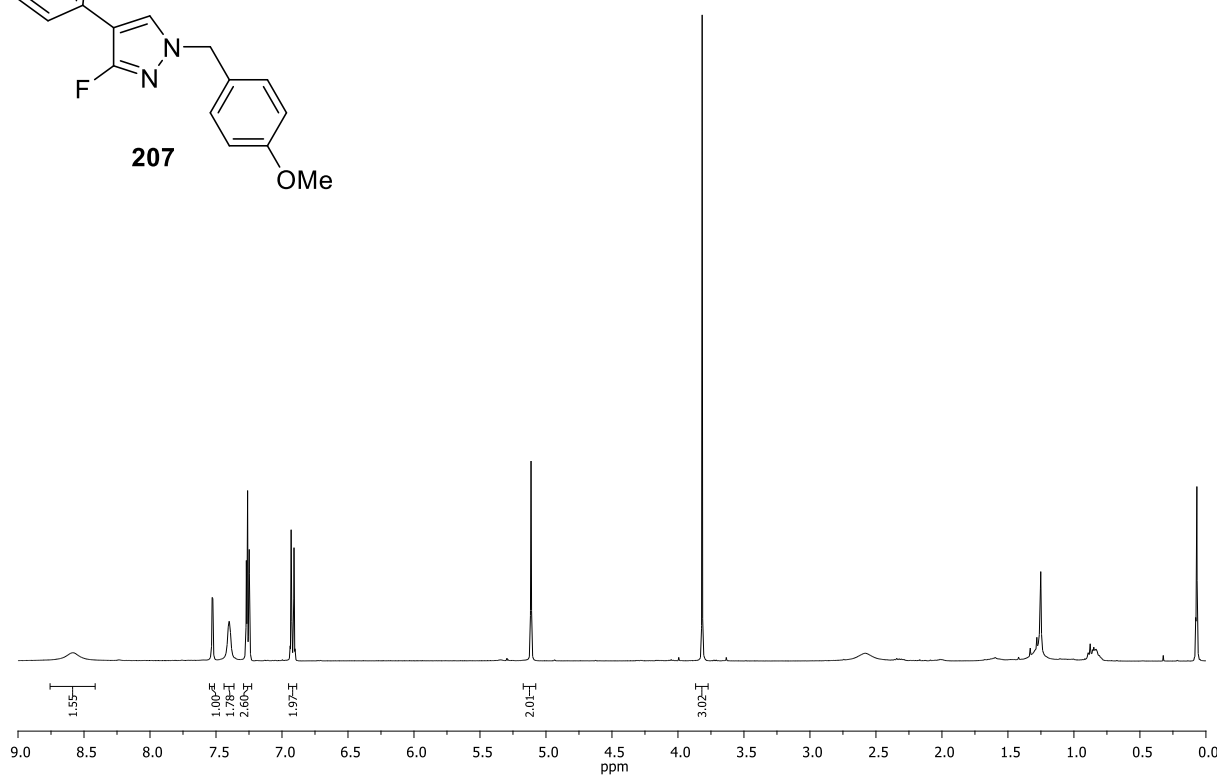
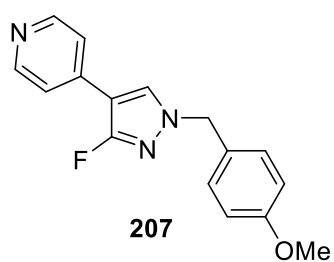
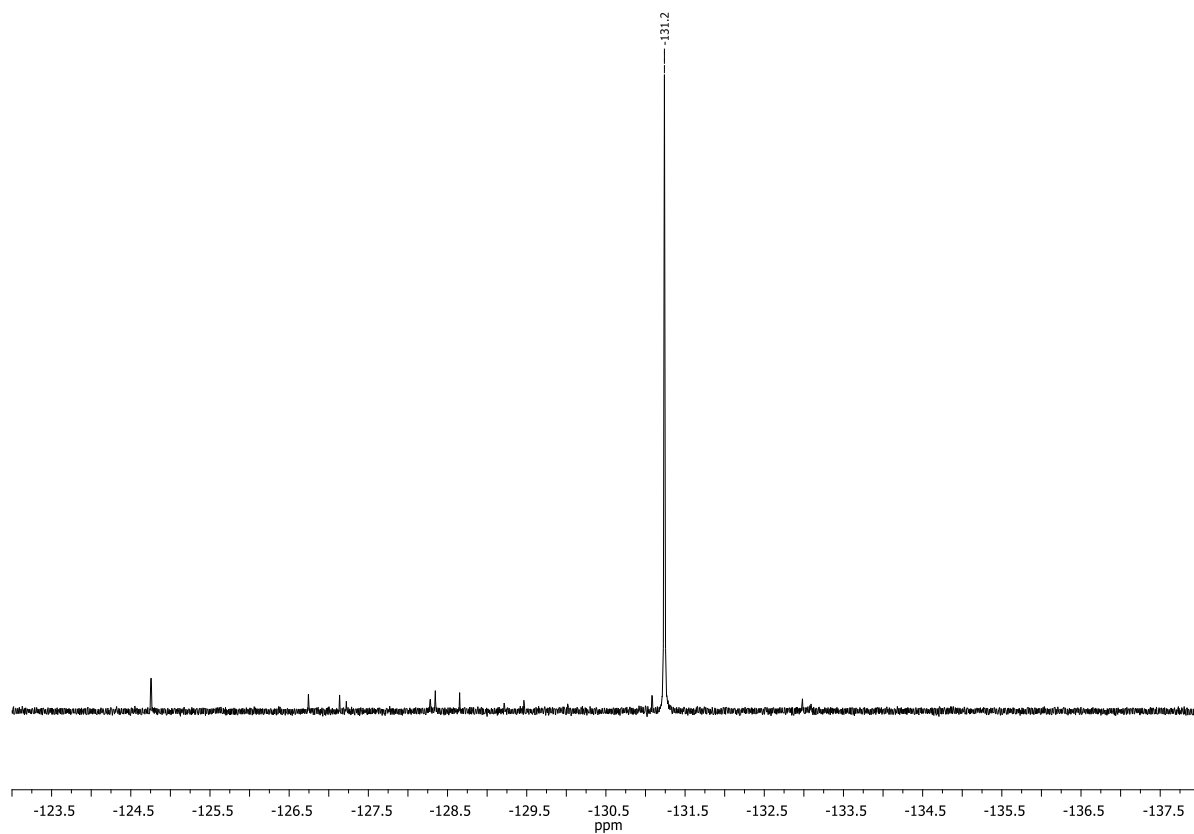


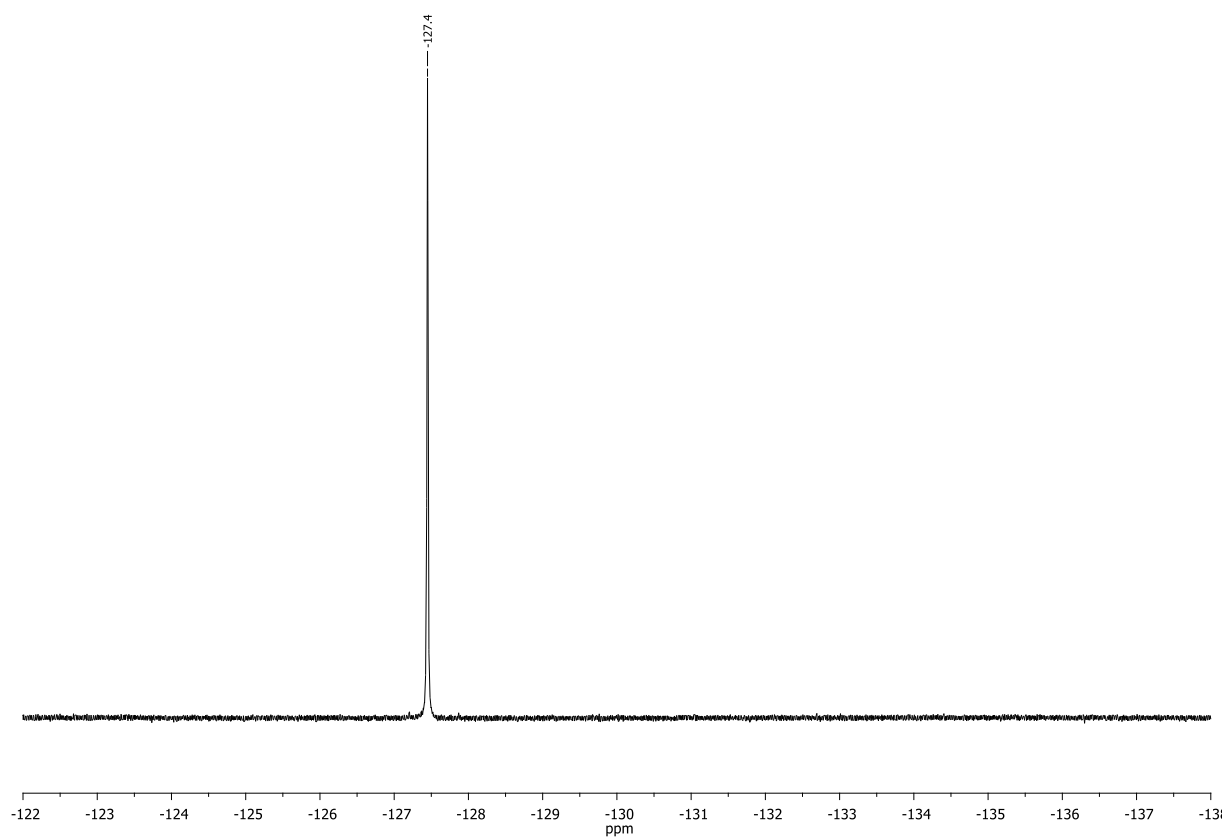
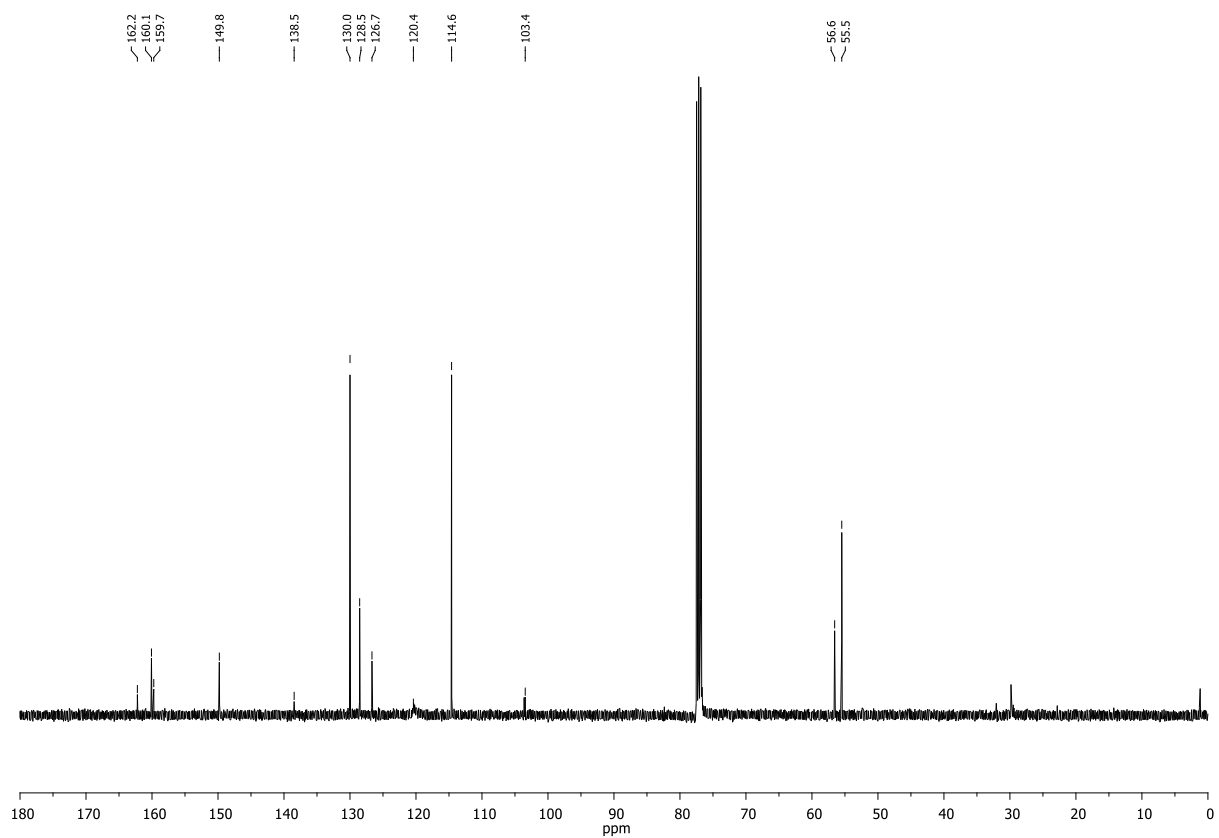


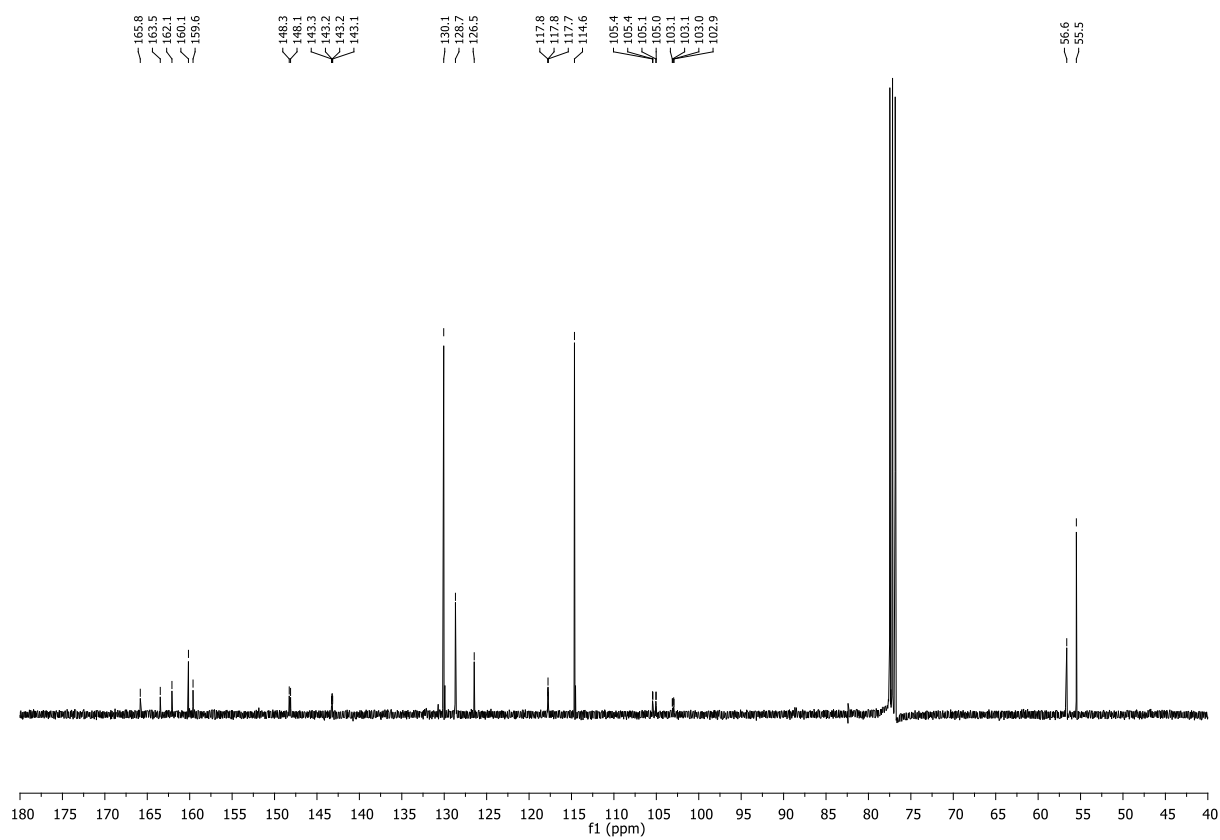
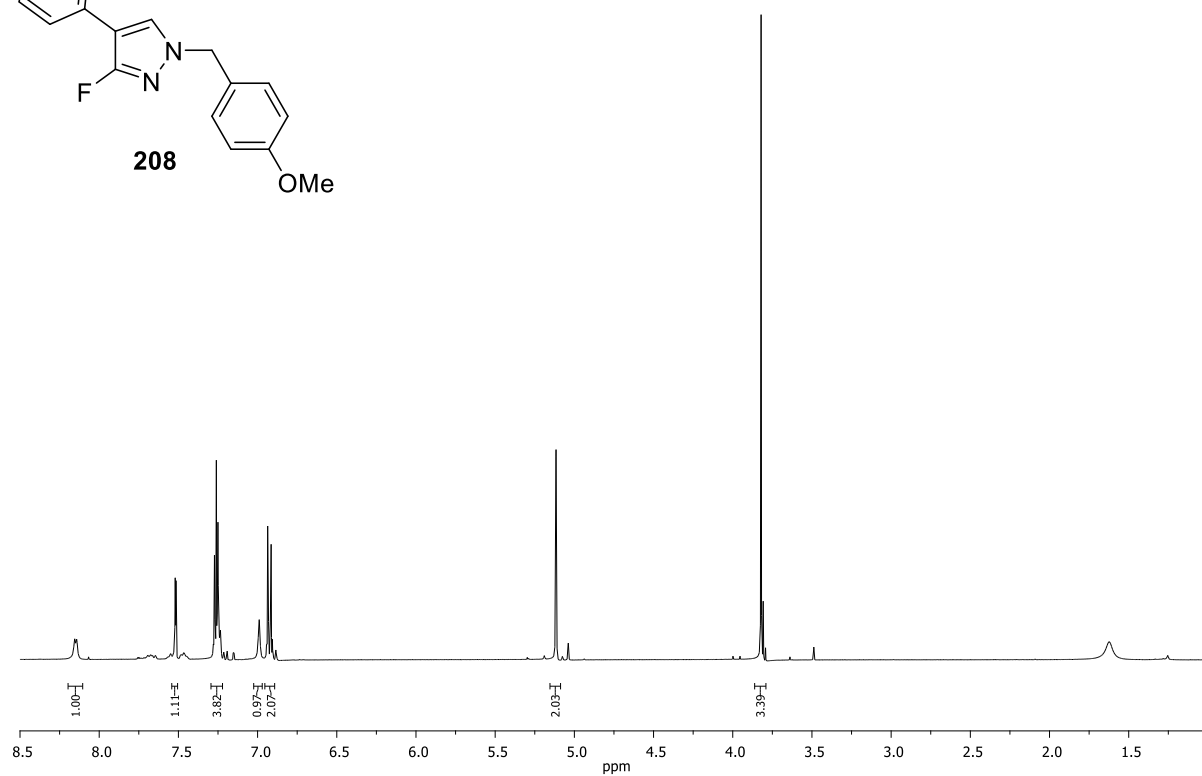
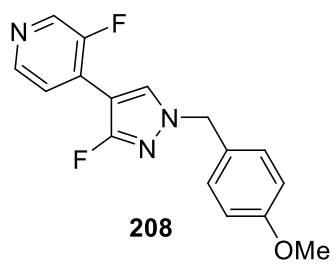


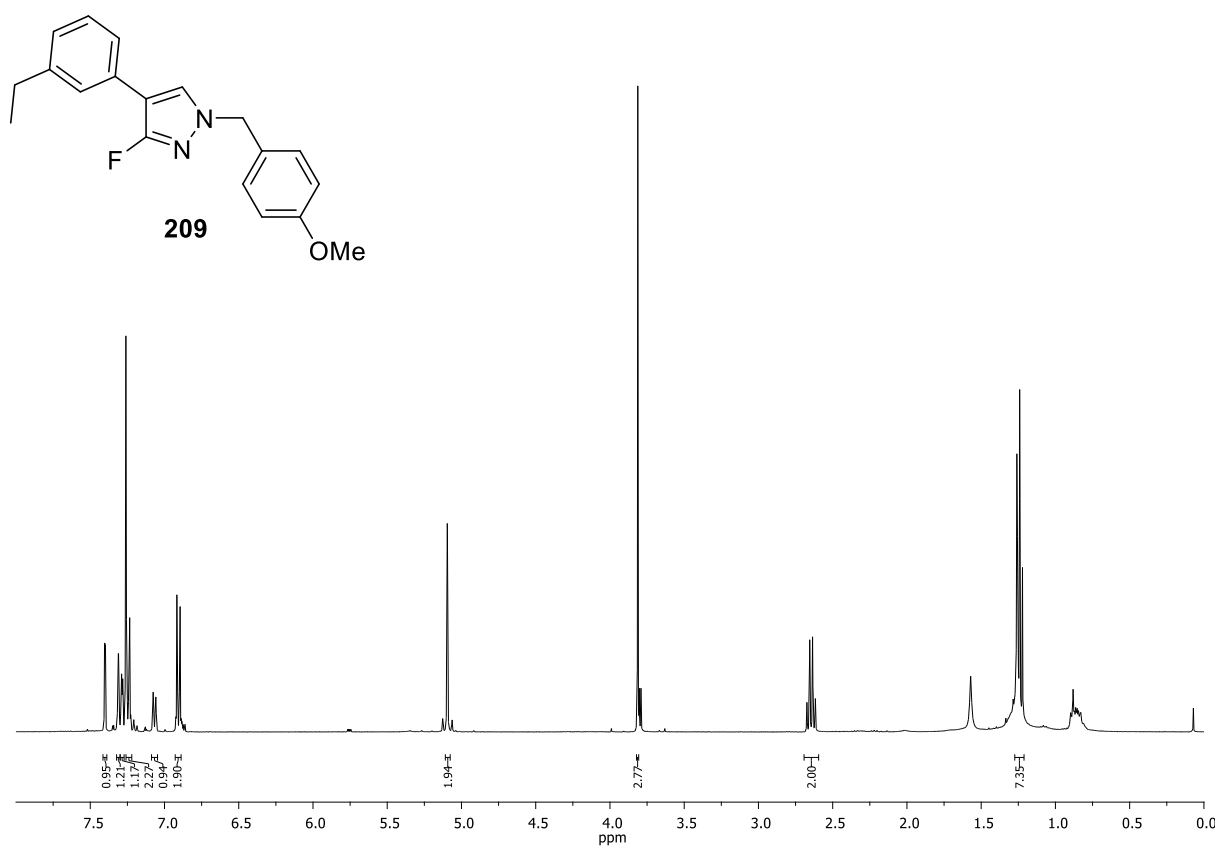
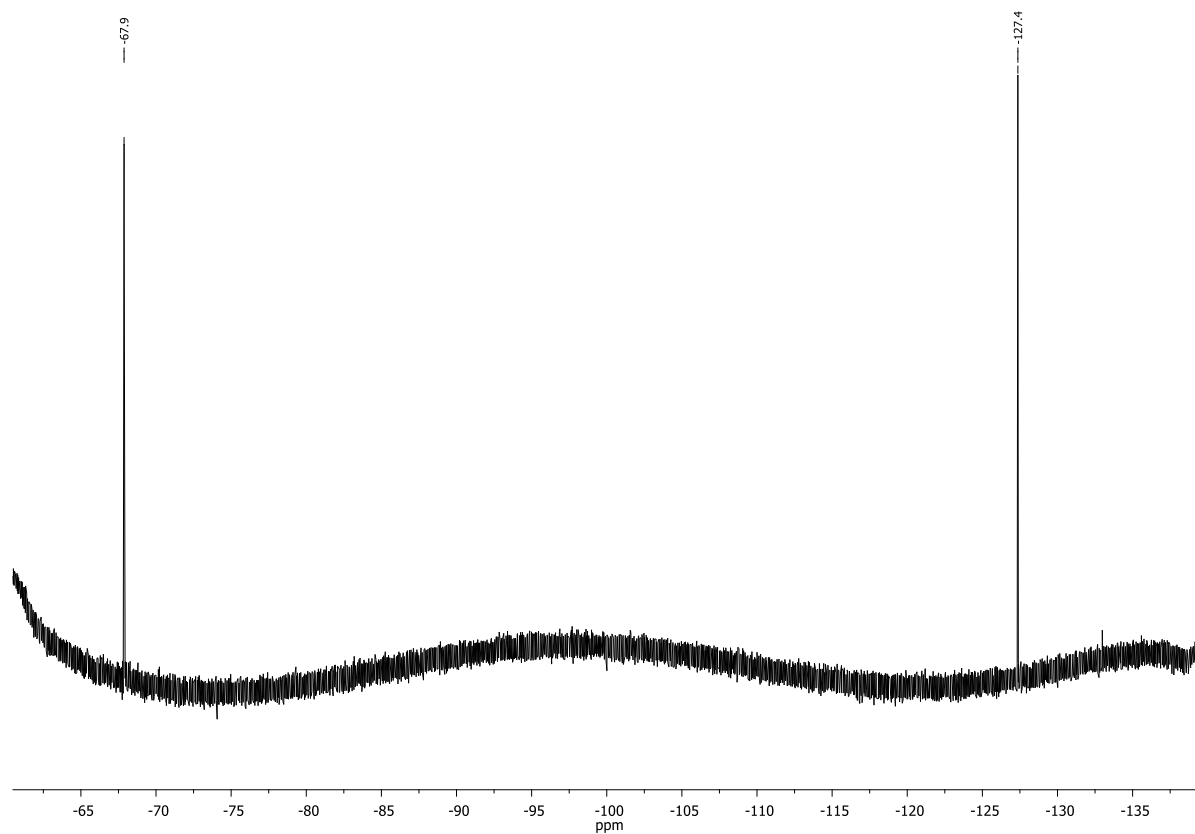


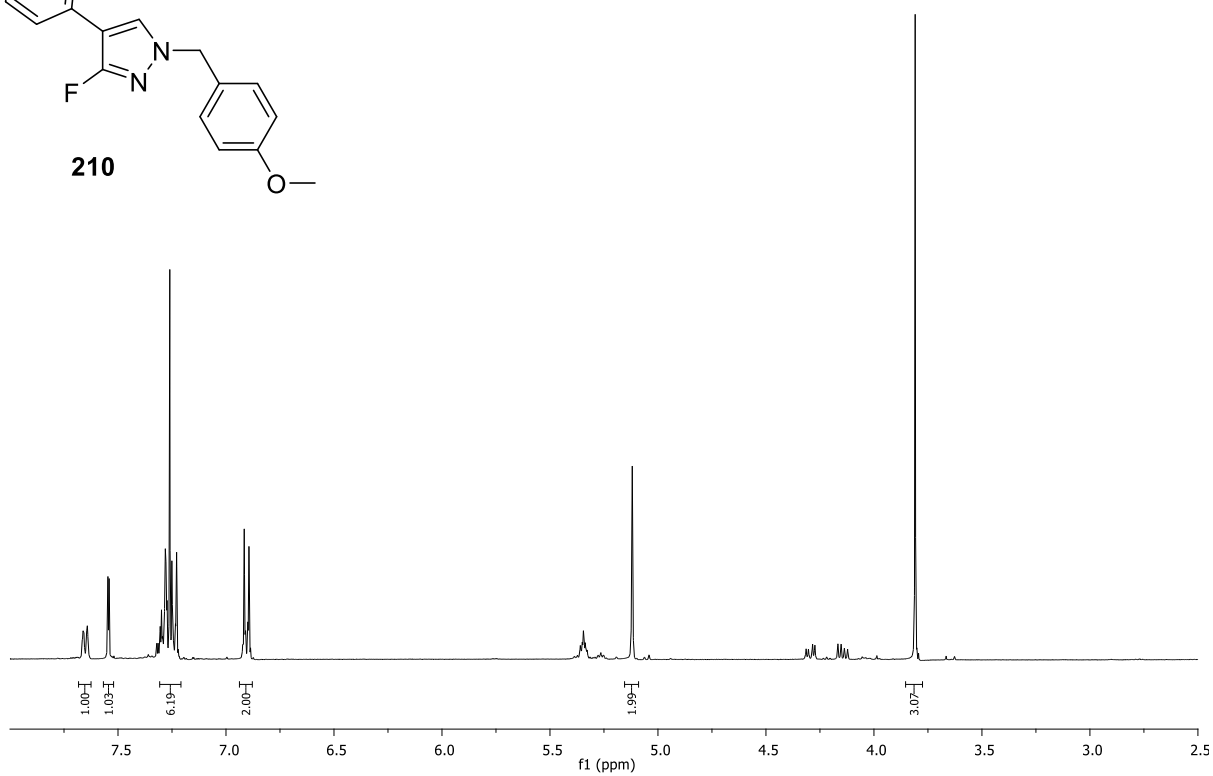
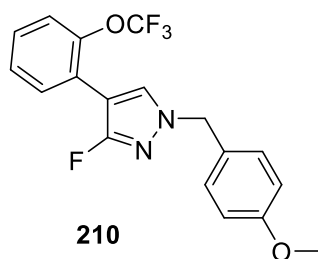
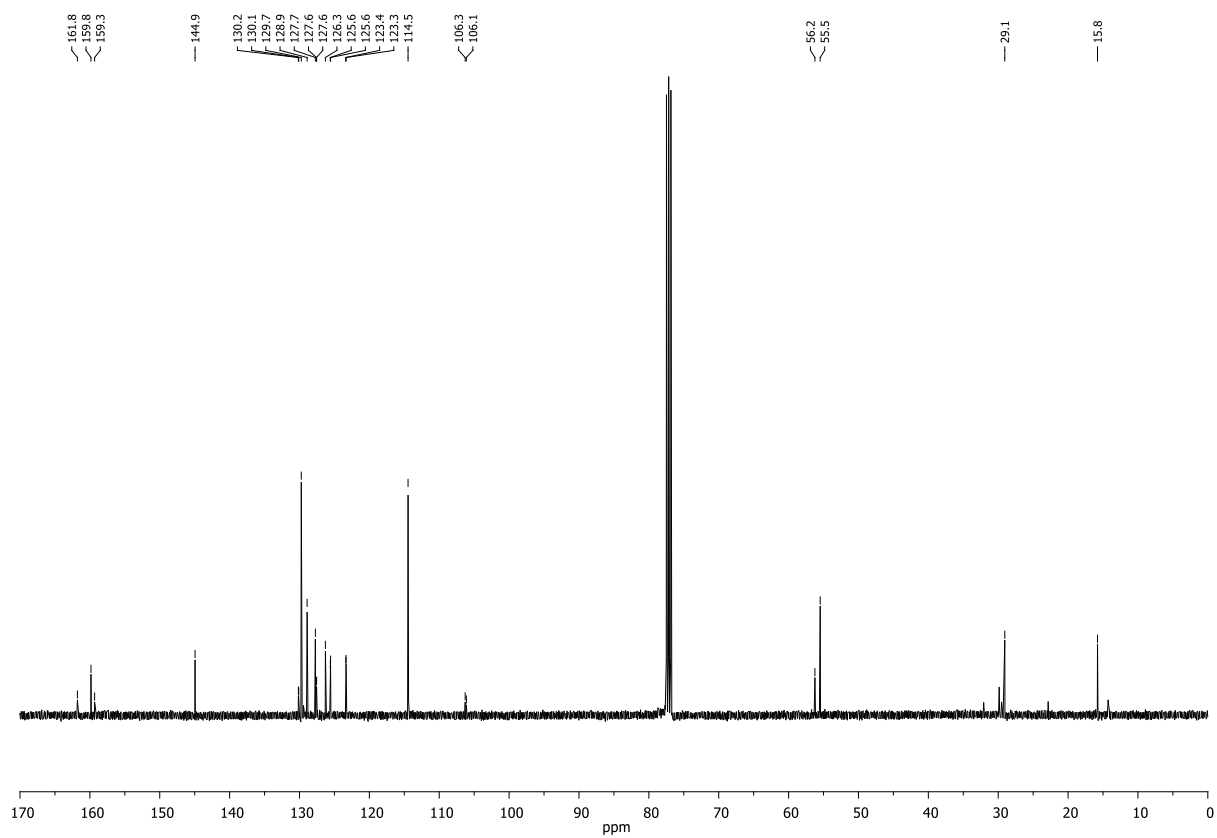


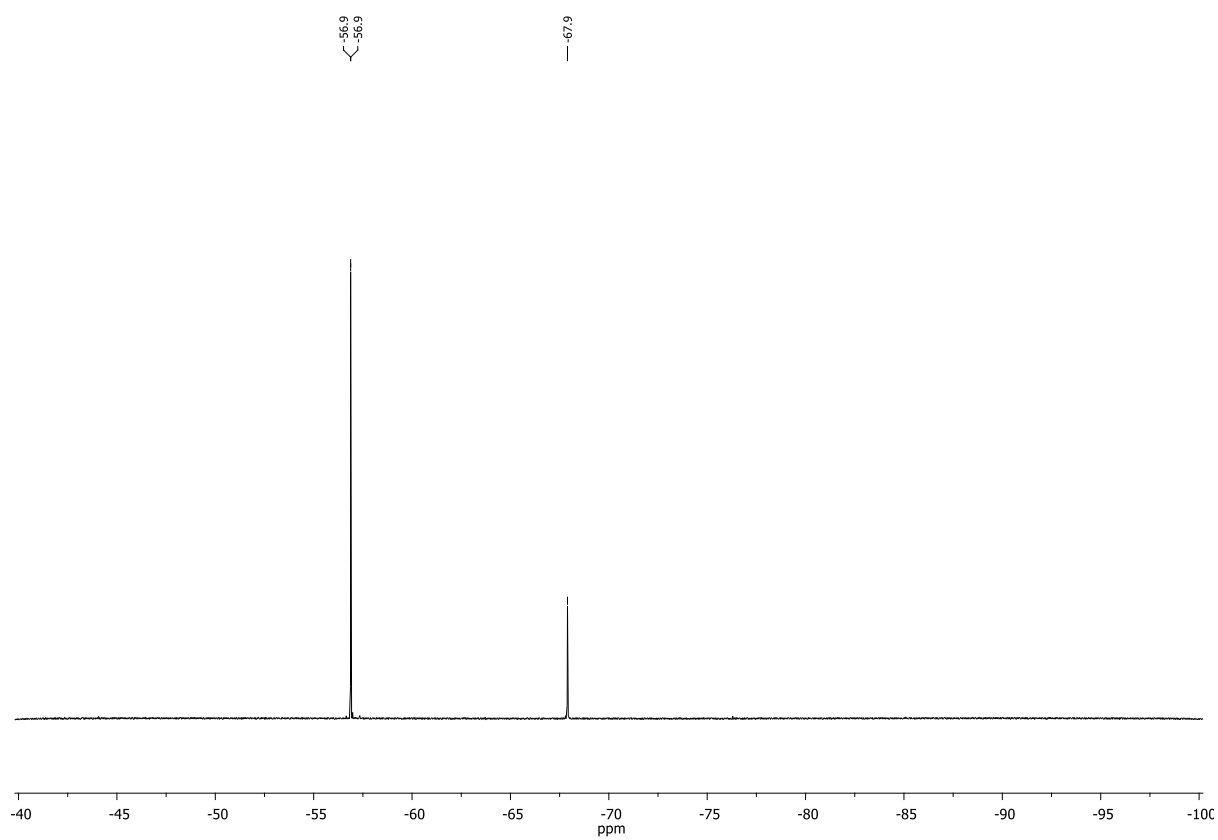
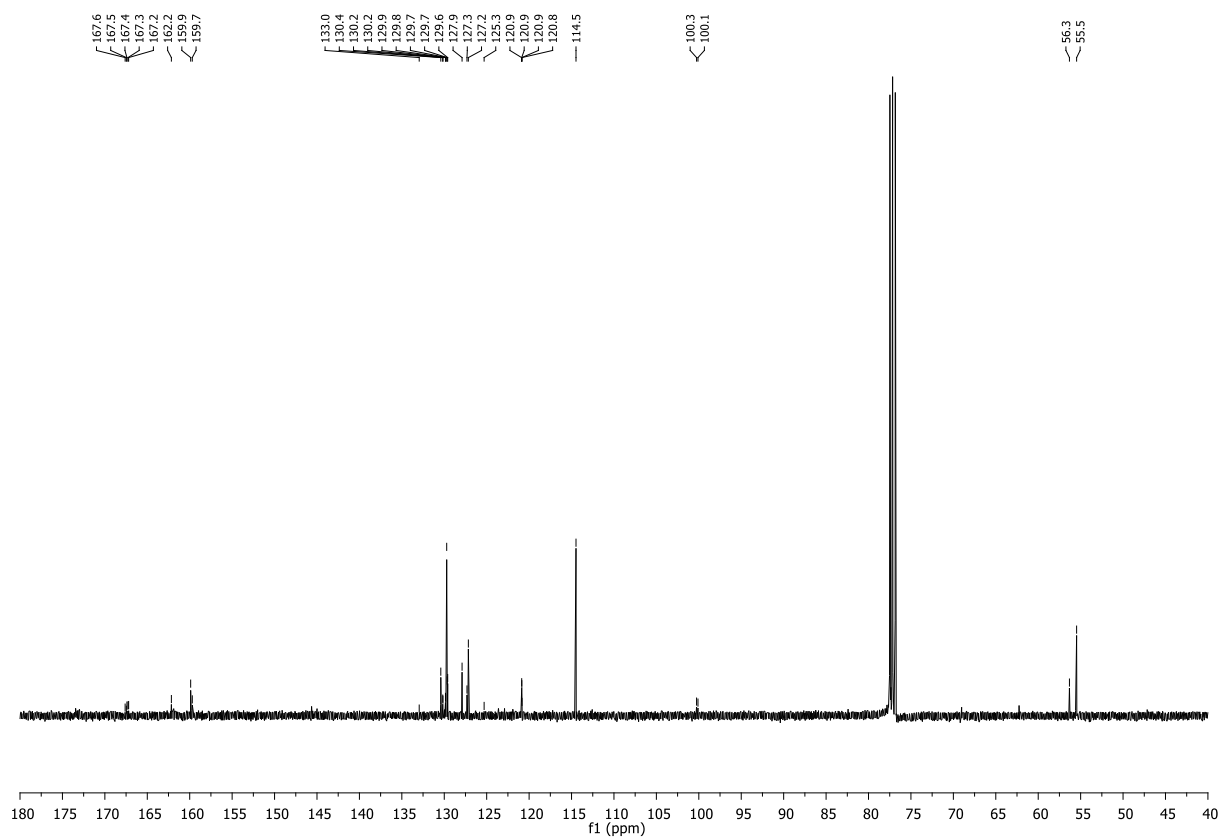


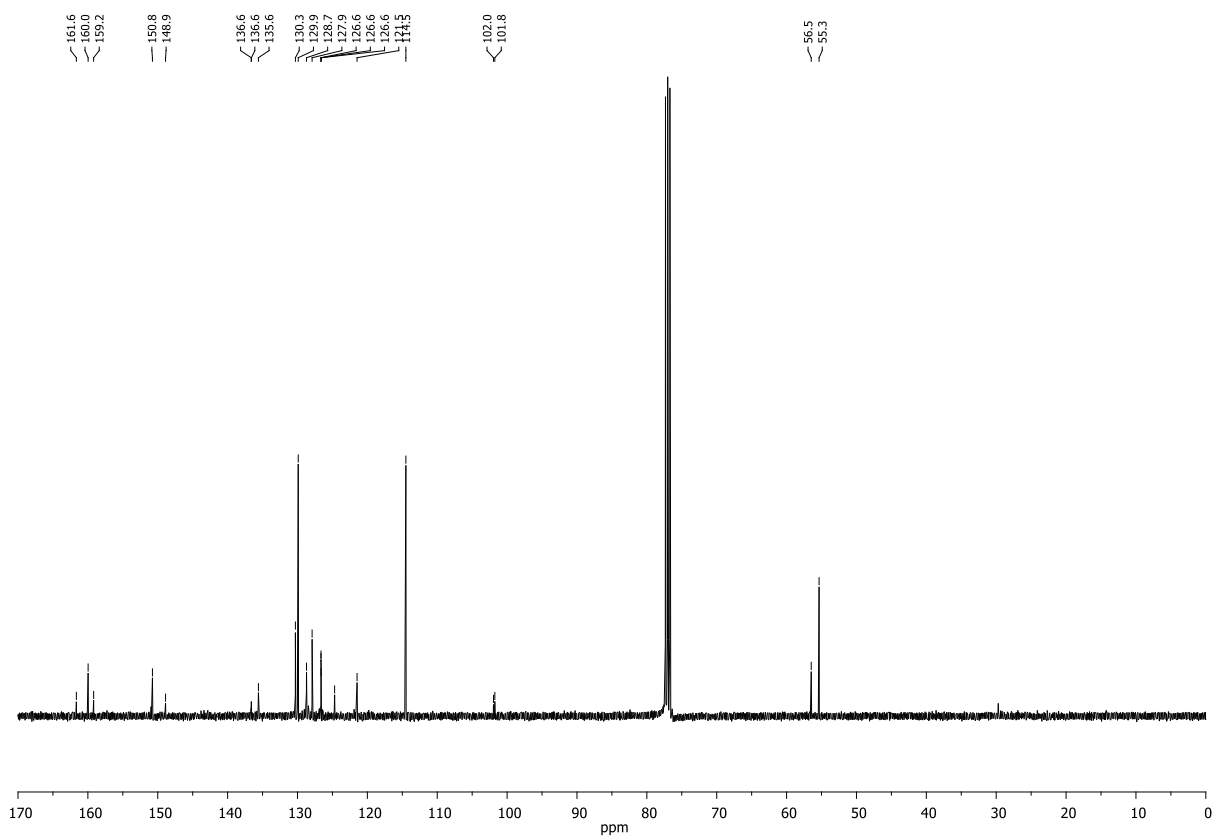
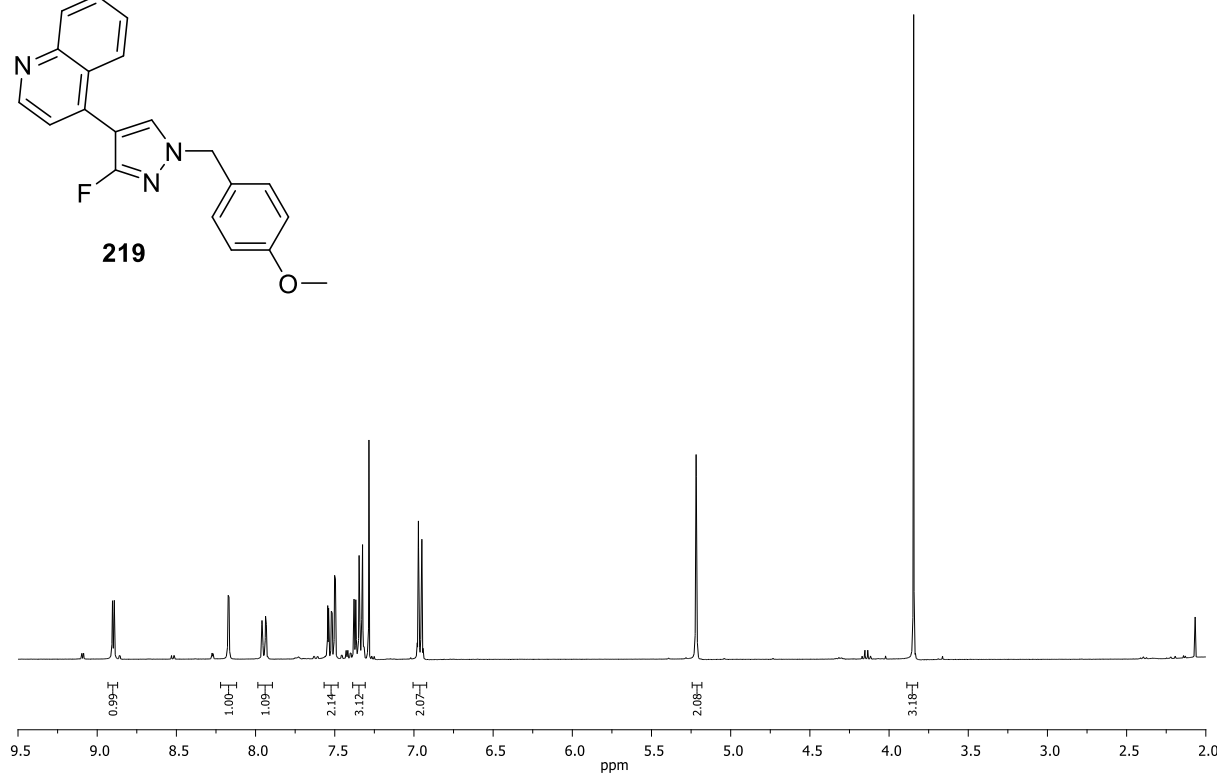
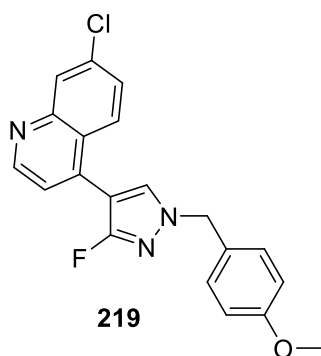


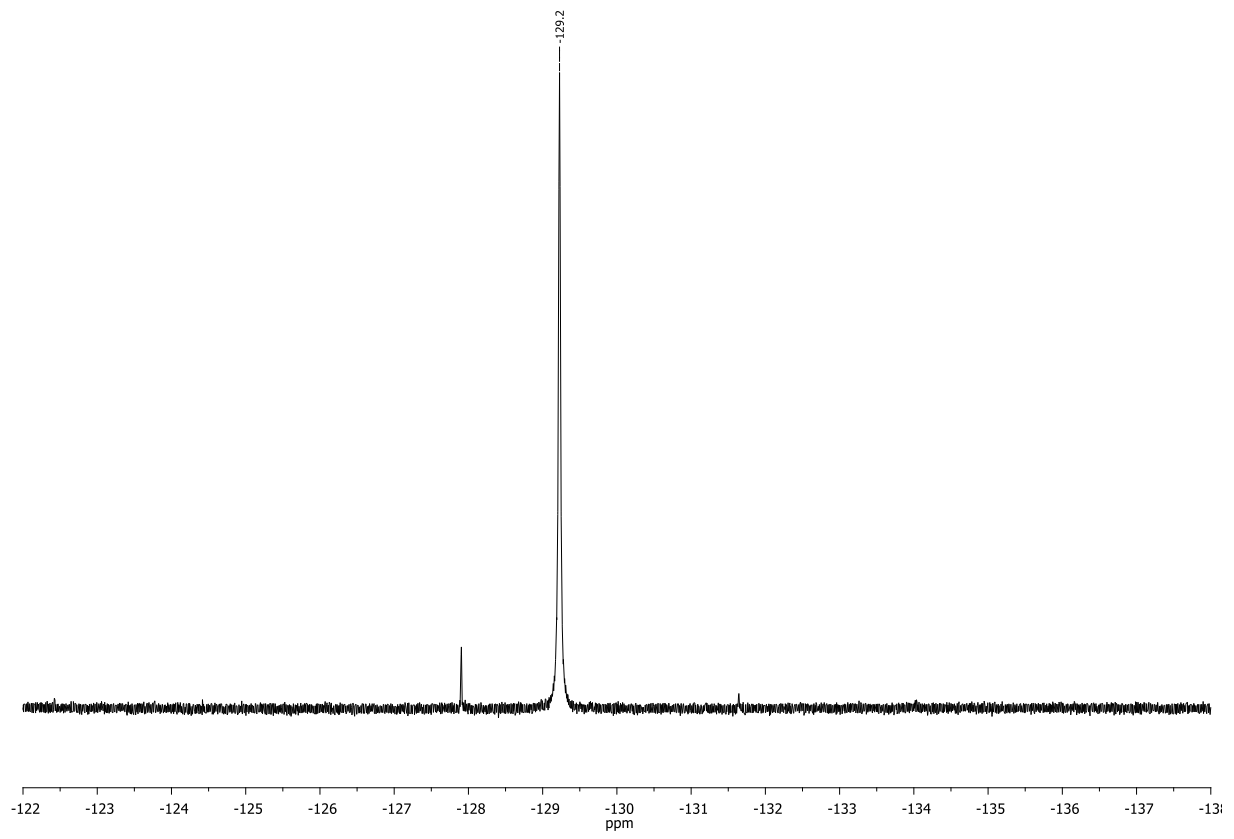












8.3 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. Kensah, A. Roa Lara, J. Dahlmann, R. Zweigerdt, K. Schwanke, J. Hegermann, D. Skvorc, A. Gawol, A. Azizian, S. Wagner, L. S. Maier, A. Krause, G. Dräger, M. Ochs, A. Haverich, I. Gruh, U. Martin, *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 1134–1146.
- [2] J. Viola, B. Lal, O. Grad, *The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field*, **2003**.
- [3] A. R. Herman, *J. Drugs Dermatol.* **2002**, *1*, 298–301.
- [4] F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 403–430.
- [5] J. G. Rheinwald, H. Green, *Cell* **1975**, *6*, 331–43.
- [6] G. Orlando, K. J. Wood, R. J. Stratta, J. J. Yoo, A. Atala, S. Soker, *Transplantation* **2011**, *91*, 1310–1317.
- [7] R. Katari, A. Peloso, G. Orlando, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *2*, 57.
- [8] A. Bongso, C. Y. Fong., S. C. Ng., S. S. Ratnam, *Theriogenology* **1994**, *41*, 167.
- [9] R. Papini, *BMJ* **2004**, *329*, 158–160.
- [10] R. Glaum, M. Wiedmann-Al-Ahmad, U. Huebner, R. Schmelzeisen, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *93A*, 704–715.
- [11] D. Karamichos, *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6*, 77–80.
- [12] L. Germain, P. Carrier, F. A. Auger, C. Salesse, S. L. Guérin, *Prog. Retin. Eye Res.* **2000**, *19*, 497–527.
- [13] K. M. Kulig, J. P. Vacanti, *Transpl. Immunol.* **2004**, *12*, 303–310.
- [14] J. W. Allen, S. N. Bhatia, *Tissue Eng.* **2002**, *8*, 725–737.
- [15] Y. Kubota, H. Noguchi, M. Seita, T. Yuasa, H. Sasamoto, S. Nakaji, T. Okitsu, T. Fujiwara, N. Kobayashi, *Cell Med.* **2013**, *6*, 15–23.
- [16] M. Figliuzzi, *World J. Stem Cells* **2014**, *6*, 163–172.
- [17] J. Sohler, L. Moroni, C. van Blitterswijk, K. de Groot, J. Bezemer, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 543–566.
- [18] A. Mahapatra, *Open Orthop. J.* **2011**, *5*, 239–241.
- [19] M. S. Sacks, F. J. Schoen, J. E. Mayer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 289–313.
- [20] S. Sekiya, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, *Biores. Open Access* **2013**, *2*, 12–19.
- [21] W. W. Minuth, L. Denk, *Clin. Transl. Med.* **2012**, *1*, 22.
- [22] G. Orive, E. Anitua, J. L. Pedraz, D. F. Emerich, *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 682–692.
- [23] B. J. Pfister, J. H. Huang, N. Kameswaran, E. L. Zager, D. H. Smith, *Neurosurgery* **2007**, *60*, 137–142.
- [24] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, *Science* **1998**, *282*, 1145–1147.
- [25] Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, C. A. Vacanti, *Plast. Reconstr. Surg.* **1997**, *100*, 297–304.
- [26] R. C. Dutta, A. K. Dutta, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 334–339.
- [27] C. Cha, W. B. Liechty, A. Khademhosseini, N. A. Peppas, *ACS Nano* **2012**, 9353–9358.
- [28] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200.
- [29] S.-H. Kim, J. Turnbull, S. Guimond, *J. Endocrinol.* **2011**, *209*, 139–151.
- [30] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [31] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [32] M. A. Wozniak, C. S. Chen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 34–43.
- [33] P. A. Janmey, R. T. Miller, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 9–18.
- [34] C. Castells-Sala, M. Alemany-Ribes, T. Fernández-Muiños, L. Recha-Sancho, P. López-Chicón, C. A.-Reverté, A. M.-G. Caballero-Camino, Javier, C. E. Semino, C. Sala, M. Ribes, T. Muiños, L. Sancho, P. Chicón, *J. Biochips Tissue Chips* **2015**, *s2*, DOI 10.4172/2153-0777.S2-004.
- [35] K. B. S. Pasumarthi, L. J. Field, *Circ. Res.* **2002**, *90*, 1044–1054.
- [36] Y. Sun, M. F. Kiani, A. E. Postlethwaite, K. T. Weber, *Basic Res. Cardiol.* **2002**, *97*, 343–347.
- [37] M. Nian, P. Lee, N. Khaper, P. Liu, *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1543–1553.
- [38] S. Minatoguchi, G. Takemura, X.-H. Chen, N. Wang, Y. Uno, M. Koda, M. Arai, Y. Misao, C. Lu,

- K. Suzuki, K. Goto, A. Komada, T. Takahashi, K. Kosai, T. Fujiwara, H. Fujiwara, *Circulation* **2004**, *109*, 2572–2580.
- [39] A. K. Gaharwar, N. A. Peppas, A. Khademhosseini, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 441–453.
- [40] D. Pasqui, M. De Cagna, R. Barbucci, *Polymers (Basel)*. **2012**, *4*, 1517–1534.
- [41] R. Barbucci, D. Pasqui, R. Favaloro, G. Panariello, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 3058–3065.
- [42] C. P. Bergmann, A. Stumpf, in *Top. Mining, Metall. Mater. Eng.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2013**, pp. 9–13.
- [43] D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, Liverpool, **2011**.
- [44] S. Mukherjee, S. Dhara, P. Saha, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **2015**, *76*, 5–15.
- [45] S. J. Kim, S. K. Hahn, M. J. Kim, D. H. Kim, Y. P. Lee, *J. Control. Release* **2005**, *104*, 323–335.
- [46] S. Benamer, M. Mahlous, A. Boukrif, B. Mansouri, S. L. Youcef, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2006**, *248*, 284–290.
- [47] R. M. Zohdi, Z. A. B. Zakaria, N. Yusof, N. M. Mustapha, M. N. H. Abdullah, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2011**, *98B*, 30–37.
- [48] K. Y. Cho, T. W. Chung, B. C. Kim, M. K. Kim, J. H. Lee, W. R. Wee, C. S. Cho, *Int. J. Pharm.* **2003**, *260*, 83–91.
- [49] A. Sosnik, D. Cohn, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2851–2858.
- [50] K. M. Galler, J. D. Hartgerink, A. C. Cavender, G. Schmalz, R. N. D'Souza, *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 176–184.
- [51] J. M. Rosiak, F. Yoshii, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **1999**, *151*, 56–64.
- [52] J. Venkatesan, I. Bhatnagar, P. Manivasagan, K.-H. Kang, S.-K. Kim, *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 269–281.
- [53] M. C. Hacker, A. G. Mikos, in *Princ. Regen. Med.*, Elsevier, **2011**, pp. 587–622.
- [54] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, G. O, in *Prog. Mol. Environ. Bioeng. - From Anal. Model. to Technol. Appl.*, InTech, **2011**.
- [55] T. Funami, M. Hiroe, S. Noda, I. Asai, S. Ikeda, K. Nishinari, *Food Hydrocoll.* **2007**, *21*, 617–629.
- [56] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 3–12.
- [57] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 13–36.
- [58] M. Takigami, A. Hiroki, N. Nagasawa, T. Kasahara, S. Takigami, M. Tamada, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **2009**, *34*, 391–394.
- [59] N. Popa, O. Novac, L. Profire, C. E. Lupusoru, M. I. Popa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 1241–1248.
- [60] P. Giannouli, E. R. Morris, *Food Hydrocoll.* **2003**, *17*, 495–501.
- [61] S. M. More, R. V. Kulkarni, B. Sa, N. V. Kayane, *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116*, 1732–1738.
- [62] W.-Y. Su, Y.-C. Chen, F.-H. Lin, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3044–3055.
- [63] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [64] M. C. Cortizo, M. Fernández Lorenzo de Mele, *Biol. Trace Elem. Res.* **2004**, *102*, 129–141.
- [65] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen, Z. Zhong, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4969–4985.
- [66] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.
- [67] J. Dahlmann, A. Krause, L. Möller, G. Kensah, M. Möwes, A. Diekmann, U. Martin, A. Kirschning, I. Gruh, G. Dräger, *Biomaterials* **2013**, *34*, 940–951.
- [68] A. Krause, *Polymer Design for Biomedical Applications*, **2012**.
- [69] J. Azike, *Rare Tumors* **2009**, *1*, 17.
- [70] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani, *CA. Cancer J. Clin.* **2005**, *55*, 74–108.
- [71] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray, *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386.
- [72] S. Paget, W. London, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *573*, 7–23.
- [73] L. Cohen, T. F. Hack, C. de Moor, J. Katz, P. E. Goss, *Ann. Surg. Oncol.* **2000**, *7*, 427–434.
- [74] B. Fisher, M. Bauer, R. Margolese, R. Poisson, Y. Pilch, C. Redmond, E. Fisher, N. Wolmark, M. Deutsch, E. Montague, E. Saffer, L. Wickerham, H. Lerner, A. Glass, H. Shibata, P. Deckers, A.

- Ketcham, R. Oishi, I. Russell, *N. Engl. J. Med.* **1985**, *312*, 665–673.
- [75] J. E. Fenn, R. Udelsman, *J. Am. Coll. Surg.* **2011**, *212*, 413–417.
- [76] E. P. Geiduschek, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, *47*, 950–955.
- [77] P. Brookes, P. D. Lawley, *Biochem. J.* **1961**, *80*, 496–503.
- [78] C. A. Zarate, J. B. Singh, P. J. Carlson, J. Quiroz, L. Jolkovsky, D. A. Luckenbaugh, H. K. Manji, *Bipolar Disord.* **2007**, *9*, 561–570.
- [79] R. T. Schimke, R. J. Kaufman, F. W. Alt, R. F. Kellems, *Science* **1978**, *202*, 1051–1055.
- [80] J. A. Schatz-Jakobsen, Y. Zhang, K. Johnson, A. Neill, D. Sheridan, G. R. Andersen, *J. Immunol.* **2016**, *197*, 337–344.
- [81] R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth, *Science (80-.)*. **2011**, *331*, 1565–1570.
- [82] E. M. V. Reiche, S. O. V. Nunes, H. K. Morimoto, *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 617–625.
- [83] J. C. Ameisen, *Science* **1996**, *272*, 1278–1279.
- [84] A. L. Szymczak-Workman, G. M. Delgoffe, D. R. Green, D. A. A. Vignali, *J. Immunol.* **2012**, *188*, 5204–5205.
- [85] I. Caminschi, C. Münz, *Front. Immunol.* **2013**, *4*, DOI 10.3389/fimmu.2013.00205.
- [86] J. Hitomi, D. E. Christofferson, A. Ng, J. Yao, A. Degterev, R. J. Xavier, J. Yuan, *Cell* **2008**, *135*, 1311–1323.
- [87] D. Hanahan, R. a Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [88] A. Arora, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 971–979.
- [89] T. Pawson, *Eur. J. Cancer* **2002**, *38 Suppl 5*, S3-10.
- [90] P. M. Siegel, J. Massagué, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 807–820.
- [91] C. Neuzillet, A. Tijeras-Raballand, R. Cohen, J. Cros, S. Faivre, E. Raymond, A. de Gramont, *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 22–31.
- [92] M. Tian, J. R. Neil, W. P. Schiemann, *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 951–962.
- [93] Y. Drabsch, P. ten Dijke, *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, *31*, 553–568.
- [94] M. K. Wendt, M. Tian, W. P. Schiemann, *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 85–101.
- [95] S. B. Jakowlew, *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 435–457.
- [96] J. M. López-Novoa, M. A. Nieto, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 303–314.
- [97] N. Diaz-Valdes, M. Basagoiti, J. Dotor, F. Aranda, I. Monreal, J. I. Riezu-Boj, F. Borrás-Cuesta, P. Sarobe, E. Feijoo, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 812–821.
- [98] R. J. Akhurst, A. Hata, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 790–811.
- [99] C. H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, *Nature* **1997**, *390*, 465–471.
- [100] A. Hartung, K. Bitton-Worms, M. M. Rechtman, V. Wenzel, J. H. Boergermann, S. Hassel, Y. I. Henis, P. Knaus, *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 7791–7805.
- [101] A. Nohe, E. Keating, P. Knaus, N. O. Petersen, *Cell. Signal.* **2004**, *16*, 291–299.
- [102] T. Zarubin, J. Han, *Cell Res.* **2005**, *15*, 11–18.
- [103] F. Jaschinski, T. Rothhammer, P. Jachimczak, C. Seitz, A. Schneider, K.-H. Schlingensiepen, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 2203–2213.
- [104] J. Nemunaitis, N. Murray, *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1*, 756–761.
- [105] L. Hwang, K. Ng, W. Wang, V. Trieu, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3742–3742.
- [106] C. Grutter, T. Wilkinson, R. Turner, S. Podichetty, D. Finch, M. McCourt, S. Loning, L. Jermutus, M. G. Grutter, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 20251–20256.
- [107] C. Carbone, A. Tamburrino, G. Piro, F. Boschi, I. Cataldo, M. Zanotto, M. M. Mina, S. Zanini, A. Sbarbati, A. Scarpa, G. Tortora, D. Melisi, *Anticancer. Drugs* **2016**, *27*, 29–40.
- [108] R. Derynck, Y. E. Zhang, *Nature* **2003**, *425*, 577–584.
- [109] A. Maier, A.-L. Peille, V. Vuaroqueaux, M. Lahn, *Cell. Oncol.* **2015**, *38*, 131–144.
- [110] H. Li, Y. Wang, C. R. Heap, C.-H. R. King, S. R. Mundla, M. Voss, D. K. Clawson, L. Yan, R. M. Campbell, B. D. Anderson, J. R. Wagner, K. Britt, K. X. Lu, W. T. McMillen, J. M. Yingling, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2138–2142.
- [111] M. Uhl, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7954–7961.
- [112] M. Tojo, Y. Hamashima, A. Hanyu, T. Kajimoto, M. Saitoh, K. Miyazono, M. Node, T. Imamura, *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 791–800.
- [113] I. Calone, S. Souchelnytskyi, *Exp. Oncol.* **2012**, *34*, 9–16.

- [114] S. Skalova, T. Svadlakova, W. Qureshi, K. Dev, J. Mokry, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 4043–4067.
- [115] D.-K. Kim, Y.-I. Lee, Y. W. Lee, P. M. Dewang, Y. Y. Sheen, Y. W. Kim, H.-J. Park, J. Yoo, H. S. Lee, Y.-K. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4459–4467.
- [116] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, E. J. Vandamme, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 845–860.
- [117] K. H. Eebert, G. Schenk, R. Scholz, *Clin. Chem. Lab. Med.* **1968**, *6*, 435–441.
- [118] S. R. Van Tomme, W. E. Hennink, *Expert Rev. Med. Devices* **2007**, *4*, 147–164.
- [119] Z. Chi, S. Zhao, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 206–211.
- [120] B. Li, N. Zhang, Q. Peng, T. Yin, F. Guan, G. Wang, Y. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 293–300.
- [121] J. C. Rankin, A. Jeanes, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4435–4441.
- [122] B. Sklarz, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1967**, *21*, 3.
- [123] J. Maia, R. A. Carvalho, J. F. J. J. Coelho, P. N. Simões, M. H. Gil, *Polymer* **2011**, *52*, 258–265.
- [124] J. M. Lázaro Martínez, P. N. Romasanta, A. K. Chattah, G. Y. Buldain, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3208–3213.
- [125] M. S. Quesenberry, Y. C. Lee, *Anal. Biochem.* **1996**, *234*, 50–55.
- [126] J. F. Robyt, W. J. Whelan, *Anal. Biochem.* **1972**, *45*, 510–516.
- [127] H. Zhao, N. D. Heindel, *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 400–402.
- [128] Y. Chau, F. E. Tan, R. Langer, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 931–941.
- [129] Željko Stojanović, K. Jeremić, S. Jovanović, M. D. Lechner, *STARCH - STÄRKE* **2005**, *57*, 79–83.
- [130] V. Ayala, A. P. Herrera, M. Latorre-Esteves, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, 1–24.
- [131] A. H. Haines, in *Tetrahedron*, **1976**, 11–109.
- [132] X.-Y. Qi, N. O. Keyhani, Y. C. Lee, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 139–144.
- [133] A. Gao, X. Yang, C. Zhang, G. Long, J. Pu, Y. Yuan, H. Liu, Y. Li, F. Liao, *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 142–151.
- [134] G. Gyarmati, *Express Polym. Lett.* **2014**, *9*, 154–164.
- [135] D. J. G. Ives, P. G. N. Moseley, *J. Chem. Soc. B Phys. Org.* **1966**, 757.
- [136] A. V. Demchenko, P. Pornsuriyasak, C. De Meo, *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 782–784.
- [137] E. I. Balmond, D. M. Coe, M. C. Galan, E. M. McGarrigle, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 9152–9155.
- [138] A. Jeanjean, M. Garcia, A. Leydet, J.-L. Montero, A. Morère, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3575–3582.
- [139] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, F. A. Morrison, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1063–1073.
- [140] J. Hao, R. A. Weiss, *Macromolecules* **2011**, *44*, 9390–9398.
- [141] N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, F. Dehghani, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16*, 371–383.
- [142] L. Möller, A. Krause, J. Dahlmann, I. Gruh, A. Kirschning, G. Dräger, *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 93–102.
- [143] J. Palecek, G. Dräger, A. Kirschning, *Synthesis* **2011**, 653–661.
- [144] A. Krause, A. Kirschning, G. Dräger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5547.
- [145] S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pingen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1805–1815.
- [146] S. S. Van Berkel, A. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. Van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508.
- [147] Y. Su, C. Kasper, A. Kirschning, G. Dräger, S. Berski, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 1028–1033.
- [148] N. B. Shelke, R. James, C. T. Laurencin, S. G. Kumbar, *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 448–460.
- [149] E. Khalikova, P. Susi, N. Usanov, T. Korpela, *J. Chromatogr. B* **2003**, *796*, 315–326.
- [150] K. F. Mahmoud, A. Y. Gibriel, A. A. Amin, M. N. Nessrien, N. M. Yassien, H. A. El Banna, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3*, 1095–1113.
- [151] E. J. Bourne, D. H. Hutson, H. Weigel, *Biochem. J.* **1962**, *85*, 158–163.
- [152] R. Meléndez, E. Meléndez-Hevia, E. I. Canela, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1327–32.

- [153] Y. Takata, K. Yamamoto, J. Kadokawa, *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216*, 1415–1420.
- [154] G. M. Sia, J. K. Candlish, *Phyther. Res.* **1999**, *13*, 133–137.
- [155] K. Ina, *World J. Clin. Oncol.* **2011**, *2*, 339.
- [156] K. Ina, R. Furuta, T. Kataoka, S. Kayukawa, H. Ina, M. Yoneda, *Med. Sci.* **2016**, *4*, 8.
- [157] W. L. Cunningham, D. J. Manners, *Biochem. J.* **1964**, *90*, 596–602.
- [158] A. S. Perlin, S. Suzuki, *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 50–56.
- [159] R. Hänsel, O. Sticher, *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, Springer-Verlag, **2010**.
- [160] T. Mang, G. Preiser, J. Dahm, *Sealing Material Which Swells When Treated With Water*, **2002**, US 6,358,580 B1.
- [161] M. T. Ale, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2106–2130.
- [162] J.-F. Deux, A. Meddahi-Pellé, A. F. Le Blanche, L. J. Feldman, S. Collic-Jouault, F. Brée, F. Boudghène, J.-B. Michel, D. Letourneur, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1604–1609.
- [163] Y. Aisa, Y. Miyakawa, T. Nakazato, H. Shibata, K. Saito, Y. Ikeda, M. Kizaki, *Am. J. Hematol.* **2005**, *78*, 7–14.
- [164] X. Z. Wu, D. Chen, *West Indian Med. J.* **2006**, *55*, 270–273.
- [165] L. L. Reys, S. S. Silva, D. Soares da Costa, N. M. Oliveira, J. F. Mano, R. L. Reis, T. H. Silva, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1151–1161.
- [166] N. Volpi, A. Mucci, L. Schenetti, *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 345–349.
- [167] F. Shahidi, J. Synowiecki, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1527–1532.
- [168] S. Lu, X. Song, D. Cao, Y. Chen, K. Yao, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 3497–3503.
- [169] M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632.
- [170] X. F. Liu, Y. L. Guan, D. Z. Yang, Z. Li, K. D. Yao, *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *79*, 1324–1335.
- [171] V. K. Mourya, N. N. Inamdar, *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 1013–1051.
- [172] X. G. Chen, H. J. Park, *Carbohydr. Polym.* **2003**, *53*, 355–359.
- [173] F. R. de Abreu, S. P. Campana-Filho, *Polímeros* **2005**, *15*, 79–83.
- [174] E. Ueda, Y. Yoshikawa, Y. Ishino, H. Sakurai, Y. Kojima, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 337–340.
- [175] F. J. McCarty, C. H. Tilford, M. G. Van Campen, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 472–480.
- [176] F. Gellibert, J. Woolven, M.-H. Fouchet, N. Mathews, H. Goodland, V. Lovegrove, A. Laroze, V.-L. Nguyen, S. Sautet, R. Wang, C. Janson, W. Smith, G. Krysa, V. Boullay, A.-C. De Gouville, S. Huet, D. Hartley, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4494–4506.
- [177] J. S. Sawyer, B. D. Anderson, D. W. Beight, R. M. Campbell, M. L. Jones, D. K. Herron, J. W. Lampe, J. R. McCowan, W. T. McMillen, N. Mort, S. Parsons, E. C. R. Smith, M. Vieth, L. C. Weir, L. Yan, F. Zhang, J. M. Yingling, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3953–3956.
- [178] C. A. Kingsbury, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3262–3270.
- [179] P. V. Bharatam, R. Moudgil, D. Kaur, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1627–1634.
- [180] G. Jakab, C. Tancon, Z. Zhang, K. M. Lippert, P. R. Schreiner, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1724–1727.
- [181] F. G. Bordwell, J. A. Harrelson, T. Y. Lynch, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3337–3341.
- [182] F. G. Bordwell, G. Z. Ji, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8398–8401.
- [183] G. Schroeder, B. Łęska, B. Brzezinski, *J. Mol. Struct.* **1998**, *446*, 235–239.
- [184] J. A. ZAPP, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1975**, *36*, 916–919.
- [185] A. E. Harman, J. M. Voigt, S. R. Frame, M. S. Bogdanffy, *Mutat. Res.* **1997**, *380*, 155–165.
- [186] J. Hennek, J. Alves, E. Yao, S. A. Goueli, H. Zegzouti, *Anal. Biochem.* **2016**, *495*, 9–20.
- [187] C. Tanega, M. Shen, B. T. Mott, C. J. Thomas, R. MacArthur, J. Inglese, D. S. Auld, *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, *7*, 606–614.
- [188] T. O. Baldwin, *Structure* **1996**, *4*, 223–228.
- [189] A. Chaikuad, I. Alfano, G. Kerr, C. E. Sanvitale, J. H. Boergermann, J. T. Triffitt, F. von Delft, S. Knapp, P. Knaus, A. N. Bullock, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36990–36998.
- [190] G. H. Su, R. Bansal, K. M. Murphy, E. Montgomery, C. J. Yeo, R. H. Hruban, S. E. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3254–3257.
- [191] P. E. Phelan, M. T. Mellon, C. H. Kim, *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 1057–1071.
- [192] E. A. Craig, M. V. Stevens, R. R. Vaillancourt, T. D. Camenisch, *Dev. Dyn.* **2008**, *237*, 3102–3114.
- [193] S. Huang, S. Yuan, L. Guo, Y. Yu, J. Li, T. Wu, T. Liu, M. Yang, K. Wu, H. Liu, J. Ge, Y. Yu, H. Huang, M. Dong, C. Yu, S. Chen, A. Xu, *Genome Res.* **2008**, *18*, 1112–1126.

- [194] H. Shinohara, T. Kurosaki, *Immunol. Rev.* **2009**, *232*, 300–318.
- [195] S. L. Lu, W. C. Zhang, Y. Akiyama, T. Nomizu, Y. Yuasa, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4595–8.
- [196] S. Mathea, K. R. Abdul Azeez, E. Salah, C. Tallant, F. Wolfreys, R. Konietzny, R. Fischer, H. J. Lou, P. E. Brennan, G. Schnapp, A. Pautsch, B. M. Kessler, B. E. Turk, S. Knapp, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 1595–1602.
- [197] R. P. Davis, E. S. Ng, M. Costa, A. K. Mossman, K. Sourris, A. G. Elefanty, E. G. Stanley, *Blood* **2008**, *111*, 1876–1884.
- [198] P. Gadue, T. L. Huber, P. J. Paddison, G. M. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 16806–16811.
- [199] A. Rehn, E. Moroni, B. K. Zierer, F. Toppel, G. Morra, C. John, K. Richter, G. Colombo, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2016**, DOI 10.1016/j.jmb.2016.09.014.
- [200] S. Chatterjee, S. Bhattacharya, M. A. Socinski, T. F. Burns, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2016**, *14*, 346–356.
- [201] C. Ahlbrecht, Masterarbeit **2016**.
- [202] M. Sano, *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 947–953.
- [203] W. Wen, W. Liu, Y. Shao, L. Chen, *Exp. Biol. Med.* **2014**, *239*, 638–645.
- [204] A. Suzuki, *Chem. Commun.* **2005**, 4759.
- [205] R. A. Khera, A. Ali, H. Rafique, M. Hussain, J. Tatar, A. Saeed, A. Villinger, P. Langer, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5244–5253.
- [206] J. P. H. Juffermanst, C. L. Habraken, **1986**, 4656–4660.
- [207] C. H. Jin, M. Krishnaiah, D. Sreenu, K. S. Rao, V. B. Subrahmanyam, C.-Y. Park, J.-Y. Son, Y. Y. Sheen, D.-K. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2633–40.
- [208] R. A. Henry, W. M. Dehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2297–2300.
- [209] H. Salman, Y. Abraham, S. Tal, S. Meltzman, M. Kapon, N. Tessler, S. Speiser, Y. Eichen, *European J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 2207–2212.
- [210] P. R. Mullens, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6783–6786.
- [211] I. Coldham, K. M. Crapnell, J.-C. Fernández, J. D. Moseley, R. Rabot, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6181–6187.
- [212] J. Pu, A. F. Kreft, S. H. Aschmies, K. P. Atchison, J. Berkowitz, T. J. Caggiano, M. Chlenov, G. Diamantidis, B. L. Harrison, Y. Hu, D. Huryn, J. Steven Jacobsen, M. Jin, K. Lipinski, P. Lu, R. L. Martone, K. Morris, J. Sonnenberg-Reines, D. R. Riddell, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4708–17.
- [213] R. A. Khera, A. Ali, M. Hussain, J. Tatar, A. Villinger, P. Langer, *Synlett* **2010**, 1923–1926.
- [214] M. K. Tse, Z. Zhou, T. C. W. Mak, K. S. Chan, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7779–7783.
- [215] E. Arbačiauskienė, G. Vilkauskaitė, G. A. Eller, W. Holzer, A. Šačkus, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7817–7824.
- [216] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chemistry* **1995**, *95*, 2457–2483.
- [217] C. Liu, W. Yang, *Chem. Commun.* **2009**, 6267.
- [218] M. Eckert-Maksic, I. Zrinski, M. Juribasic, *Heterocycles* **2006**, *68*, 1961–1967.
- [219] Z. Zhao, Z. Wang, *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 137–147.
- [220] S. T. Handy, D. Mayi, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8108–8110.
- [221] S. J. Lee, T. M. Anderson, M. D. Burke, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 8860–8863.
- [222] C. A. Traina, R. C. Bakus, G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12600–12607.
- [223] A. N. Cammidge, K. V. Crepy, M. Fugier, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 4159–4162.
- [224] E. P. Gillis, M. D. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6716–6717.
- [225] M. Catellani, E. Motti, N. Della Ca', *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1512–1522.
- [226] K. Fuchibe, M. Takahashi, J. Ichikawa, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 12059–12062.
- [227] J. Ichikawa, H. Fukui, Y. Ishibashi, *Synthesis (Stuttg.)* **2003**, *44*, 7800–7805.
- [228] S. R. Dandepally, A. L. Williams, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1071–1074.
- [229] J. J. Chen, W. Qian, K. Biswas, C. Yuan, A. Amegadzie, Q. Liu, T. Nixey, J. Zhu, M. Ncube, R. M. Rzas, F. Chavez, N. Chen, F. DeMorin, S. Rumfelt, C. M. Tegley, J. R. Allen, S. Hitchcock, R. Hungate, M. D. Bartberger, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6447–6454.
- [230] P. Wainwright, A. Maddaford, M. Simms, N. Forrest, R. Glen, J. Hart, X. Zhang, D. Pryde, P.

- Stephenson, D. Middleton, T. Guyot, S. Sutton, *Synlett* **2011**, 2011, 1900–1904.
- [231] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, *Biomaterials* **2003**, 24, 4833–4841.
- [232] R. Bertrand, M. Wagner, V. Derdau, O. Plettenburg, *Bioconjug. Chem.* **2016**, acs.bioconjchem.6b00461.
- [233] H. Saijo, H. Sakaguchi, M. Ohashi, S. Ogoshi, *Organometallics* **2014**, 33, 3669–3672.
- [234] M. Matwiejuk, J. Thiem, *European J. Org. Chem.* **2011**, 5860–5878.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Nick Dibbert
Geburtsdatum/-ort	02.02.1987 / Berlin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

AKADEMISCHER WERDEGANG

04/2013 - dato	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Kirschning mit dem Thema: „Darstellung neuer Hydrogele zur Anwendung im <i>tissue engineering</i> “ und „Studien zur Darstellung neuer Kinaseinhibitoren“
06/2012 - 01/2013	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Siegfried Blechert mit dem Thema: „Darstellung eines Maleimid-substituierten Styrol-Derivats und Aufbau eines Rutheniumkatalysators abgeleitet vom Hoveyda-Grubbs-Katalysator der zweiten Generation“ (Urteil: sehr gut)
10/2007 - 01/2013	Diplomstudium im Diplomstudiengang Chemie an der Technischen Universität Berlin (Urteil: sehr gut)
08/1999 - 07/2006	Abitur am Max-Reinhardt-Gymnasium Berlin (Urteil: 3.3)

KONFERENZEN / VORTRÄGE / POSTERPRÄSENTATIONEN

02/2016	Leibniz Symposium , Hannover, Deutschland, Posterpräsentation mit dem Thema „ <i>Potent TGF-β-Inhibitor Derivatives and Funktionalization of various Polysaccharides</i> “
03/2015	Advanced Functional Polymers for Medicine , Galway, Irland, Vortrag mit dem Thema: „ <i>Polysaccharides as Biodegradable Scaffolds with big Opportunities</i> “
02/2015	Leibniz Symposium , Hannover, Deutschland, Posterpräsentation mit dem Thema: „ <i>Smart Implants-Functionalization of (Bio)Materials for Regenerative Medicine</i> “

- 09/2014 **European Society for Biomaterials**, Liverpool, UK, Posterpräsentation mit dem Thema: „*Dextran as a Versatile Scaffold for Hydrogel Formation with Hyaluronic Acid*“
- 05/2014 **DZL Symposium: Lung Regeneration and Beyond-BREATH meets REBIRTH**, Hannover, Deutschland, Posterpräsentation mit dem Thema: „*New Biodegradable and In Situ Linkable Hydrogels Based on Hyaluronic Acid and Dextran*“
- 12/2013 **BSRT Symposium: Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies**, Berlin, Deutschland, Posterpräsentation mit dem Thema: „*New Biodegradable and In Situ Linkable Hydrogels Based on Alginate and Dextran*“

PUBLIKATIONEN

- [1] *“A synthetic toolbox for the in situ formation of functionalized homo- and heteropolysaccharide-based hydrogel libraries”* Nick Dibbert, Andreas Krause, Julio-Cesar Rios-Camacho, Ina Gru, Andreas Kirschning, Gerald Dräger, akzeptiert, *Chem. Eur. J.* **2016**.

PROMOTIONSBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

- 04/2013 - dato Betreuung von 4 Bachelorarbeiten, 5 Forschungs- und Vertiefungsarbeiten und einem dreimonatigen Forschungspraktikum eines Austauschstudenten
- zweiwöchiger Forschungs- und Weiterbildungsaufenthalt am Helmholtz-Zentrum Geesthacht dem Zentrum für Material- und Küstenforschung
- 11/2014 **„Die Nacht, die Wissen schafft“**, Organisation eines Rahmenprogramms, Ausarbeiten und Halten einer Experimentalvorlesung für Wissenschaftsinteressierte

Danksagung

Beginnend möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kirschning für sein Vertrauen und seine Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand am OCI und BMWZ bedanken. Im speziellen für die überlassenen Freiheiten das gegebene Forschungsthema durch eigene Ideen frei entwickelt und ausgebaut haben zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Plettenburg für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Zweitprüferschaft bedanken. Außerdem für die anregenden und fruchtbaren fachlichen Diskussionen, die uneingeschränkte Unterstützung und Beratung in jeglichen Situationen und Problemstellung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Gerald Dräger für seine Unterstützung und der Leitung der „Untergruppe REBIRTH“. Außerdem für die fachlichen und fachfremden Gesprächen mit dir, Gerald, und Jutta. Sie hat mir immer gut getan. Außerdem für die herzliche Aufnahme in besagte Untergruppe mit allen Grillabenden und Extrakt-Bieren.

Ebenfalls ganz besonders danke ich Dr. David Candito, auch wenn er es vermutlich nicht lesen kann, für den Beginn einer wunderbaren Freundschaft zeitgleich mit meinem ersten Arbeitstag im OCI. Natürlich ist in diesem Zusammenhang auch Dr. Maria Moreno zu danken. Bei dir gilt dasselbe wie für Dave. Ihr beide habt mir den Start in Hannover vereinfacht und seid mir wie Geschwister gewesen.

Steffen, dir natürlich auch vielen Dank für alles. Du bist mir ebenfalls von Anfang an ein sehr guter Freund gewesen. Und an dieser Stelle möchte ich mich bei dir nochmals dafür bedanken den Platz neben dir als dein Trauzeuge besetzt haben zu dürfen. Und natürlich für die nicht allzu sportlichen, aber dafür umso spaßigeren Besuche im Fitnessstudio. Es war mir ein Fest.

Außerdem gilt mein Dank meinen lieben Laborkollegen Bastian Dieter und für kurze Zeit auch Katja Seidel im Raum 028. Weiterhin möchte ich Mona Oltmanns gesondert danken. Kopf hoch Moni...den vollen Namen kennst du ja.

Für eine gute Zusammenarbeit möchte ich Jonas Ammermann, Benjamin Schröder, Alexandra Seemann, Peijun Li, Therese Planke, Dr. Liangliang Wang, Michael Wolling, Maik Siebke, Ilona Bulyszko, Anja Heutling, Franziska Gille, Adele Gabba, Nazar Pidlypnyi, Lukas-Kuppi-Kupracz, Jana Franke, Gerrit-UNGLAUBLICH-Jürjens danken. Und natürlich auch Monika Griese und Ines-Britta Roloff für freundliche Beratung und Socken. Außerdem danke ich der gesamten Gruppe von Prof. Kalesse, im speziellen Lisa Gerstmann, Bettina Werner und Paloma Engel Garcia. Weiterhin möchte ich Mike Boysen und seinem Arbeitskreis danken. Auf das wir uns weiterhin zufällig treffen Mike. Hier gilt mein Dank besonders Wojciech Dziechciejewski und Oliver Sowada. Es war immer lustig mit euch beiden. Außerdem danke ich dem AK Hahn für die freundliche Zusammenarbeit. Hier sind im speziellen Franziska Hemmerling, Nadine Kandziora und Marius Schröder zu nennen. Ihr seid mir immer gute Kollegen und Freunde gewesen. Den Mitstreitern im BMWZ danke ich ebenfalls. Hier sind im speziellen Katja Körner geb. Kräling und Francesco Trenti zu nennen. Zum einen weil Katja einfach unverzichtbar für das OCI ist und zum anderen weil nichts schöner ist als abends die Klänge einer Klarinette auf dem Flur zu vernehmen. Auch dem AK

Preller bin ich sehr dankbar für die gemeinsamen Forschungsbemühungen. Vielen Dank Matthias und Dima. Ich wünschte mir die Kinasen wären uns wohl gesonnen gewesen. In diesem Zusammenhang danke ich auch dem AK Zeilinger. Carsten und Christin haben durch ihren bereitwilligen Einsatz meinen Kinasen einen weiteren Sinn gegeben. Vielen Dank dafür. Ein weiterer Dank geht an die NMR-Abteilung. Für alle schweißtreibenden Messungen der Polysaccharide und die schiere Flut an NMR-Röhrchen die stets nach bestem Wissen und Gewissen vermessen wurden. Vielen Dank Jörg, Monika und Dagmar. Ihr seid mir immer eine große Hilfe gewesen. Auch Frau Bartetzko und die unermüdliche Elementaranalyse verdient hier besonderen Dank.

Außerdem möchte ich noch dem Arbeitskreis von Oliver Plettenburg danken. Isabel, Wiebke, Omar, Anna, UNGLAUBLICH, vielen Dank euch allen für die wunderbaren Fachgespräche, Kaffee- und Mittagspausen und auch sonst. Es ist wirklich schade nicht mehr zwei Labore neben euch zu sein.

Samhita und Sibel. Euch beiden vielen Dank für die schöne Zeit im Labor und außerhalb. Ich möchte an dieser Stelle nur sagen „Wir sind Wolfgang“. Vielen Dank.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Ihr standet immer und bedingungslos hinter jeder meiner Entscheidungen. Ihr habt immer zu mir gehalten und mir, auch wenn es euch vielleicht nicht bewusst ist, immer Kraft für den nächsten Schritt gegeben. Mutti, Noni, Oppa, Omma, Antje, Franki, Jill, Elly, ich verdanke euch alles. Der letzte Dank soll an meine Freundin Caro für ihre Zuversicht und ihre Unterstützung gehen.