

Entwicklung neuartiger 1,4-Dihydropyridine und deren Potential in der Wirksamkeit bei Tuberkulose

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Fabian Georg Goswin Lentz
geb. am 28.10.1990 in Gerolstein

verteidigt am

10.September 2018

Gutachter 1:

Prof. Dr. Andreas Hilgeroth

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

Gutachter 2:

Prof. Dr. Andreas Langner

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

Gutachter 3:

PD Dr. Norbert Reiling

Forschungszentrum Borstel, Parkallee 1-40, 23845 Borstel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
2. Grundlagen.....	3
2.1. Tuberkulose – Ein Überblick.....	3
2.1.1. Bakterielle Erreger und das Krankheitsbild der Tuberkulose.....	3
2.1.2. Gegenwärtige diagnostische und therapeutische Maßnahmen.....	9
2.1.3. Medikamentöse Behandlung.....	12
2.1.3.a. Isoniazid.....	12
2.1.3.b. Rifampicin.....	14
2.1.3.c. Ethambutol.....	15
2.1.3.d. Pyrazinamid.....	16
2.1.3.e. Zweitrang- oder Reservemedikamente, Nicht-Standardtherapie.....	16
2.2. Resistenzmechanismen und der Einfluss von Effluxpumpen.....	19
2.2.1. Transporter Familien.....	20
2.2.1.a. ATP-binding cassette (ABC).....	20
2.2.1.b. Major facilitator superfamily (MFS).....	23
2.2.1.c. Small multidrug resistance (SMR) family.....	27
2.2.1.d. Resistance-nodulation-division (RND) family.....	28
2.2.2. Abschließende Betrachtung und Zusammenfassung.....	29
2.3. Inhibitoren von Effluxpumpen und deren Entwicklungsstand.....	31
2.3.1. Ansätze der Effluxpumpen-Hemmung und der Einsatz von Inhibitoren.....	31
2.3.2. Der Einsatz von Dihydropyridinen (DHP).....	34
2.4. Zielstellung der Arbeit.....	39
3. Synthese und Strukturaufklärung der Verbindungen.....	40

3.1. Darstellung der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine	40
3.1.1. Diskussion zum Mechanismus der Synthese.....	40
3.1.2. Synthese der Zielverbindungen, Problemstellungen und Lösungen	44
3.2. Darstellung der 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine.....	47
3.2.1. Diskussion zum Mechanismus der Synthese.....	47
3.2.2. Synthese der Zielverbindungen, Problemstellungen und Lösungen	52
3.3. Strukturaufklärung der synthetisierten 1,4-Dihydropyridine und deren Eigenschaften	57
3.3.1. Identifizierung der Grundstruktur mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	57
3.3.2. Strukturelle und stereochemische Eigenschaften	59
3.3.3. Fluoreszenzeigenschaften	62
3.3.4. Reaktivität der 3,5-Diethylester-Funktion.....	63
4. Ergebnisse und Diskussion der bioanalytischen Essays.....	65
4.1. P-GP Hemmwirkung am Zellmodell des murinen T-Lymphoms (L5178Y).....	65
4.1.1. Methodenbeschreibung.....	65
4.1.2. Der P-GP Essay	66
4.1.2.a. Ergebnisse der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine	66
4.1.2.b. Ergebnisse der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine	68
4.1.2.c. Vergleich beider Reihen und Bezug zum Target	70
4.1.2.d. Bezug zur Effluxpumpen-Affinität bei <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
4.2. GFP-H37Rv Aktivitätsbestimmungen	77
4.2.1. Methodenbeschreibung.....	77
4.2.2. Der GFP-H37Rv-Wachstums-Essay	77
4.2.2.a. Ergebnisse der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine	77
4.2.2.b. Ergebnisse der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine	81
4.2.2.c. Vergleich beider Dihydropyridin Reihen	83
4.2.2.d. Mögliche Targets der aktiven Verbindungen am Erreger <i>M. tuberculosis</i>	84
4.2.3. Der GFP-H37Rv-Inhibitions-Essay	85

4.2.3.a. Effluxpumpen-modulierende Effekte des 2,6-unsubstituierten Dihydropyridins Nr 13	86
4.2.3.a. Effluxpumpen-modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine	87
4.2.4. Zusammenfassung und Diskussion des GFP-H37Rv-Inhibitions-Essays.....	92
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	95
6. Experimenteller Teil.....	99
6.1. Synthese und Charakterisierung der Verbindungen.....	99
6.1.1. Material und Methoden	99
6.1.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	102
6.1.3. Synthese der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine	103
6.1.3.a. Derivate mit Benzaldehyd als Aldehydkomponente.....	103
6.1.3.b. Derivate mit 3-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	107
6.1.3.c. Derivate mit 4-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	111
6.1.3.d. Derivate mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	115
6.1.3.e. Synthese des 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd	119
6.1.3.f. Derivate mit 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd als Aldehydkomponente.....	120
6.1.3.g. Derivate mit 3-Benzoyloxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	124
6.1.4. Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine	128
6.1.4.a. Derivate mit Benzaldehyd als Aldehydkomponente.....	128
6.1.4.b. Derivate mit 3-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	133
6.1.4.c. Derivate mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente	138
6.1.4.d. Derivate mit 3-Nitrobenzaldehyd als Aldehydkomponente.....	143
6.1.4.e. Derivate mit 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd als Aldehydkomponente.....	147
6.2. Bioanalytische Methoden	153
6.2.1. Statistische Herangehensweise an die Auswertung der Messwerte	153
6.2.2. Fluoreszenz-Aktivitäts-Essay zur Ermittlung inhibitorischer Eigenschaften an P-GP	154
6.2.2.a. Methodenbeschreibung	154
6.2.2.b. Tabellarische Übersicht der getesteten Verbindungen und deren Messwerte	155
6.2.3. Messung der antituberkulotischen Aktivität und Inhibitions-Essay.....	156

6.2.3.a. Methodenbeschreibung	156
6.2.3.b. Übersicht Messwerte der 2,6-unsubstituierten Verbindungen.....	157
6.2.3.c. Übersicht Messwerte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen.....	159
7. Literatur	163
Eigenständigkeitserklärung	IX
Lebenslauf und Publikationen	X
Anhang	XI

Abkürzungsverzeichnis

AAV <i>Allgemeine Arbeitsvorschrift</i>	Manp <i>Mannose (Pyranose)</i>
ABC <i>ATP-binding cassette</i>	MATE <i>Multidrug toxic compound extrusion</i>
ADP <i>Adenosindiphosphat</i>	MDR-TB <i>multi-drug-resistant Tuberculosis</i>
AG <i>Arabinogalaktan</i>	MeOH <i>Methanol</i>
Araf <i>Arabinose (Furanose)</i>	MFS <i>Major facilitator superfamily</i>
ATP <i>Adenosintriphosphat</i>	MHK <i>minimale Hemmkonzentration</i>
BCG <i>Bacille Calmette-Guérin</i>	MOTT <i>mycobacteria other than tuberculosis</i>
BLP <i>Bindelipoprotein</i>	NAD <i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid</i>
BP <i>Bindeprotein</i>	NADP <i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
CCCP <i>Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon</i>	NAT <i>Nukleinsäure-Amplifikations-Test</i>
CYP-III A4 <i>Cytochrom P450 IIIA4</i>	NBD <i>Nukleotid-bindende Domäne</i>
DC <i>Dünnschichtchromatographie</i>	NMR <i>Kernresonanzspektroskopie</i>
DHP <i>Dihydropyridin</i>	PAS <i>Paraaminosalicylsäure</i>
DTH <i>delayed-type hypersensitivity</i>	PCR <i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
EMB <i>Ethambutol</i>	PG <i>Peptidoglykan</i>
EPI <i>Efflux-Pumpen-Inhibitor</i>	P-GP <i>Permeabilitäts-Glykoprotein; ABCB1</i>
ESI <i>Elektronenspray Ionisation</i>	PMF <i>proton-motive-force</i>
FAR <i>fluorescence-activity-ratio</i>	PPD <i>purified protein derivative</i>
FAS I <i>Fettsäuresynthase I</i>	RKI <i>Robert-Koch-Institut</i>
FID <i>free induction decay</i>	RMP <i>Rifampicin</i>
GFP <i>green-fluorescent-protein</i>	RND <i>Resistance-nodulation-division</i>
HIV <i>humanes Immundefizienz-Virus</i>	SC <i>Säulenchromatographie</i>
HPLC <i>high-pressure-liquid-chromatography</i>	SD <i>standard-deviation</i>
IfSG <i>Infektionsschutzgesetz</i>	SMR <i>Small multidrug resistance</i>
IGRA <i>Interferon-Gamma Release Assay</i>	STIKO <i>Ständige Impfkommision</i>
INH <i>Isoniacid</i>	TB <i>Tuberkulose</i>
KatG <i>Katalase-Peroxidase</i>	TFA <i>Trifluoressigsäure</i>
LTT <i>Lymphozytentransformationstest</i>	TMD <i>Transmembranäre Domäne</i>
<i>M. Mycobacterium</i>	TMS <i>transmembranäre Segmente</i>
Man-caps <i>Mannose-Caps</i>	WHO <i>Welt-Gesundheits-Organisation</i>
ManLAM <i>Lipoarabinomannan mit Mannose-Caps</i>	XDR-TB <i>extensively-drug-resistant Tuberculosis</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte Tuberkulose Inzidenzrate 2015	1
Abbildung 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Längsschnitt. Transmissions- Elektronenmikroskopie, Ultradünnschnitt. Maßstab = 500 nm.....	4
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Zellhülle von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Abbildung 4: Infektionszyklus der Tuberkulose	7
Abbildung 5: Angriffspunkte der antituberkulösen Medikamente an <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Abbildung 6: Schematischer Wirkungsmechanismus von Isoniazid.....	13

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rifamycine	14
Abbildung 8: Rifampicin in konformer Darstellung zu Abbildung 7	14
Abbildung 9: Ethambutol	15
Abbildung 10: Struktureller Vergleich von Isoniazid (INH) und Pyrazinamid (PZA)	16
Abbildung 11: Schematische Darstellung der verschiedenen ABC-Transporter Typen.....	21
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Antiporter, Symporter und Uniporter.....	24
Abbildung 13: Schematischer Ablauf des Rocker-Switch Mechanismus.....	25
Abbildung 14: Schematischer Ablauf des <i>Clamp-and-Switch</i> Mechanismus.....	25
Abbildung 15: Ansatzpunkte inhibitorischer Substanzen an bakteriellen Transportern.....	31
Abbildung 16: Diskutierte Inhibitoren Verapamil, Thioridazin und Reserpin	32
Abbildung 17: Nifedipin mit Hervorhebung der markanten 1,4-DHP Grundstruktur	34
Abbildung 18: Nitrendipin und Amlodipin als Vertreter der 2. und 3. Generation.....	36
Abbildung 19: Beschriebene Dihydropyridine mit antituberkulotischem Potential	38
Abbildung 20: Zielverbindungen der vorliegenden Arbeit	39
Abbildung 21: Möglicher Reaktionsweg zur Synthese der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine	40
Abbildung 22: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Aminoacrylat A	41
Abbildung 23: Reaktionsmechanismus der Reaktion von Enamin A mit Benzaldehyd zu Verbindung B	41
Abbildung 24: Reaktion von Enamin A mit B zu Verbindung C.....	42
Abbildung 25: Zwischenstufe des Imin.....	42
Abbildung 26: Ringschluss zu Verbindung D und Eliminierung des Arylamins zum 1,4-Dihydropyridin	43
Abbildung 27: Mögliche Struktur eines der Chinoline	44
Abbildung 28: Möglicher Reaktionsweg zur Ausbildung des Chinolins.....	45
Abbildung 29: Mesomere Effekte am Imin und Möglichkeiten der Ausbildung der Chinoline.....	46
Abbildung 30: Möglicher Reaktionsweg zur Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine	47
Abbildung 31: Intermediäre Halbaminalstruktur und Bildung von Enamin A	48
Abbildung 32: Bildung des Imins C.....	48
Abbildung 33: Reaktion von Imin C über Verbindung D zu Chalkon B	49
Abbildung 34: Reaktion von Verbindung A mit Verbindung B zum ringoffenem Produkt F.....	50
Abbildung 35: Ringschluss über erneute Halbaminalstruktur mit Wassereliminierung zum 1,4-Dihydropyridin	50
Abbildung 36: Verbindung 45a in <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Form.....	53
Abbildung 37: ¹ H-NMR der Verbindung 45a mit Angabe der Integrale zum Verständnis der <i>cis-trans</i> -Isomerie	54
Abbildung 38: Vergleich des Singulett mit (rechts) und ohne (links) Modifikation des FIDs	54
Abbildung 39: Verbindung 45 und 47	55
Abbildung 40: ¹ H-NMR-Spektrum der Verbindung 34, reduziert auf die relevanten Bereiche	58
Abbildung 41: Mesomere Grenzstrukturen des 3-Methoxyphenyl-Rests.....	59

Abbildung 42: Übersicht über die Verbindungen 17-20 und 44-48	60
Abbildung 43: Vergleich der ¹ H-NMR Signale der Methylengruppen der Verbindungen 34 und 46 (Ausschnitt)	61
Abbildung 44: Hervorhebung des vinylogenen Strukturelements.....	63
Abbildung 45: Flexibilität des DHP-Grundkörpers und mögliche Wasserstoff-Brücken.....	75
Abbildung 46: Wirkungssteigerung unter Berücksichtigung der eingesetzten MHK von Isoniazid.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkstoffe in der Therapie einer multiresistenten Tuberkulose nach neuer WHO-Einteilung (2016).....	17
Tabelle 2: Auflistung bekannter Resistenzvermittelnder Gene ausgewählter Wirkstoffe bei <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ohne Anspruch an Vollständigkeit	19
Tabelle 3: Beispiele für zusammengesetzte ABC-Transporter nach BRAIBANT et al. ^[79]	22
Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung beschriebener und weiterer Effluxpumpen	30
Tabelle 5: Synthetisierte 2,6-unsubstituierte 1,4-Dihydropyridine.....	43
Tabelle 6: Vergleich der Aniline (2,6-unsubstituiert, Synthese).....	44
Tabelle 7: Synthetisierte 2,6-dimethylsubstituierte 1,4-Dihydropyridine.....	51
Tabelle 8: Vergleich Aniline (2,6-dimethylsubstituiert, Synthese)	52
Tabelle 9: Vergleich Aldehyde (2,6-dimethylsubstituiert, Synthese)	52
Tabelle 10: Verbindung 45a mit ¹ H-NMR-Daten.....	53
Tabelle 11: Verbindung 34 und deren ¹ H-NMR-Daten.....	57
Tabelle 12: Verbindungen 6,10 und 14	62
Tabelle 13: Überblick der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine im P-GP-Essay (n = 3)	67
Tabelle 14: Überblick der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine im P-GP-Essay (n = 3)	68
Tabelle 15: Vergleich der P-GP-Hemmwerte von Verbindung 5 und 30	71
Tabelle 16: Effekt der <i>N</i> -Phenyl-Substitutionsmuster beider Reihen (P-GP, n = 3)	72
Tabelle 17: Effekt der 4-Phenyl-Substitutionsmuster beider Reihen (P-GP, n = 3).....	73
Tabelle 18: Effekt der 4-Phenyl-Substitutionsmuster auf die Wachstumshemmung (bei 1 µg/ml, n = 3).....	78
Tabelle 19: Effekt der <i>N</i> -Phenyl-Substitutionsmuster auf die Wachstumshemmung (bei 1 µg/ml, n = 3).....	80
Tabelle 20: Abstufung der Struktur-Wirkungsbeziehungen (Bezug der Reste auf Tabelle 18/20).....	81
Tabelle 21: Antimykobakterielle Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen (bei 10 µg/ml)	82
Tabelle 22: Vergleich der antimykobakteriellen Effekte beider Dihydropyridin-Reihen.....	83
Tabelle 23: Struktureller Vergleich der DHP's zwischen Sonali et al., Manvar et al. und den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen 25 - 28.....	84
Tabelle 24: Struktureller Vergleich der DHP's zwischen Desai et al., Manvar et al. und den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen 1 - 24.....	85

Tabelle 25: Antimykobakterielle Effekte unter verschiedenen Konzentrationen (Nr 13, n = 3)	86
Tabelle 26: Effluxpumpen-modulierende Effekte von Nr 13 (n = 3)	87
Tabelle 27: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Rifampicin (RIFA) (n = 3)	88
Tabelle 28: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Isoniazid (INH) (n = 3)	89
Tabelle 29: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Ethambutol (EMB) (n = 3)	90
Tabelle 30: Getestete 2,6-dimethylsubstituierte Verbindungen im GFP-H37Rv-Inhibitions- Essay (Übersicht).....	91
Tabelle 31: Übersicht in Frage kommender ABC-Transporter <i>M. tuberculosis</i> (Nr 13).....	92
Tabelle 32: Blast-Ergebnisse des Vergleichs der Proteinsequenzen von P-GP (<i>Homo sapiens</i>) mit den Proteinen von <i>M. tuberculosis</i> ^[172]	93
Tabelle 33: Übersicht in Frage kommender Transporter <i>M. tuberculosis</i> (Nr 25 - 48).....	94
Tabelle 34: FAR- und Effektivwerte 2,6-unsubstituierter Derivate (n = 3)	155
Tabelle 35: FAR- und Effektivwerte 2,6-dimethylsubstituierter Derivate (n = 3).....	155
Tabelle 36: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 1 (n = 3)	157
Tabelle 37: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 2 (n = 3)	157
Tabelle 38: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 3 (n = 3)	158
Tabelle 39: Effluxpumpen Essay der Verbindung 13 (n = 3)	158
Tabelle 40: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Rifampicin (RIFA) (n = 3).....	159
Tabelle 41: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Isoniazid (INH) (n = 3).....	160
Tabelle 42: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Ethambutol (EMB) (n = 3).....	161
Tabelle 43: Gemittelte antimykobakterielle Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) aus den einzelnen Reihen	161

1. Einleitung

Es ist nun über 70 Jahre her, dass Streptomycin (1946) als erstes Mittel seit Entdeckung der Tuberkulose 1882 durch den Bakteriologen Robert Koch gegen die bakterielle Erkrankung eingesetzt wird ^[1, 2]. Trotz der Einführung weiterer Substanzen und Verbesserungen von Diagnose und Therapie ist es nicht gelungen, die Infektionsraten zurückzudrängen. Tuberkulose findet sich im Jahr 2015 noch immer auf der Liste der häufigsten Todesursachen in allen Altersklassen weltweit. Reduziert man die Todesfälle auf übertragbare Krankheiten, so befindet sie sich in dem genannten Jahr weltweit auf Rang 3, nur Lungenentzündungen und die Folgen von Durchfallerkrankungen fordern jährlich mehr Opfer ^[3]. Alleine im Jahr 2015 gab es 10,4 Millionen Neuinfektionen mit Tuberkulose, davon starben etwa 1,8 Millionen Menschen. Gerade für Patienten mit einem geschwächten Immunsystem wie z.B. ältere Personen oder Patienten, die mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind stellt Tuberkulose eine größere Gefahr dar. Schätzungen der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) zufolge, sind weltweit etwa ein Drittel aller Menschen mit Tuberkuloseerregern infiziert ^[4], wobei die Erkrankung im europäischen Raum und hierzulande immer noch vergleichsweise selten anzutreffen ist (Abbildung 1).

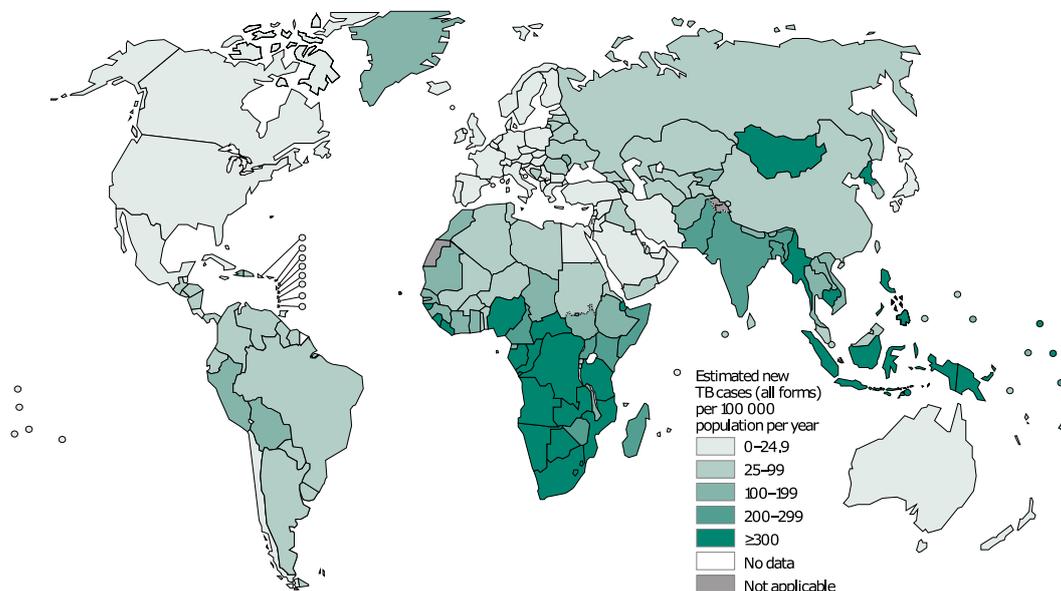


Abbildung 1: Geschätzte Tuberkulose Inzidenzrate 2015

Quelle: WHO, global tuberculosis report (2016), S. 27 ^[4]

Die Zahlen des Robert-Koch-Institutes (RKI) der letzten Jahre belegen jedoch, dass auch in Deutschland immer mehr Fälle auftreten. Erreichte die Inzidenzrate in den Jahren 2008 bis 2012 von 5,5 bis 5,2 pro 100 000 Einwohnern einen Tiefpunkt, so stieg die Neuerkrankungsrate im Jahr 2015 schon auf 7,3 pro 100 000 Einwohnern. Diese Entwicklung wird insbesondere durch die aktuellen Migrationsbewegungen beeinflusst. Während die Fallzahlen für in Deutschland geborene Personen weiter sinken,

steigen sie auf die gesamte deutsche Bevölkerung betrachtet an. Dies lässt sich auf die Tatsache zurückführen, dass viele Asylsuchende und Flüchtlinge aus Ländern mit hohen Tuberkuloseinzidenzen stammen ^[5]. Von den 5865 an Tuberkulose Neuerkrankten in Deutschland (Jahr 2015) wurden 77,3 % Fälle einer pulmonaler Ausprägung registriert, was die Lunge zu dem am häufigsten betroffenen Organ macht ^[5-7]. Problematisch ist die zunehmende Resistenzsituation, so wurden im selben Jahr weltweit 480 000 multiresistente Tuberkulosen (MDR-TB) gesichtet, welche sich gegen die prominenten beiden antituberkulösen Mittel Isoniazid und Rifampicin richten ^[4]. Neben der intensiveren und langwierigeren Therapie der MDR-TB von mindestens 18 Monaten im Vergleich zur Standardtherapie von ca. 6 Monaten, gibt es auch Formen, die zusätzlich gegen weitere Medikamente Resistenzen ausbilden. Eine solche nicht mehr seltene „*extensively-drug-resistant*“-Tuberkulose (XDR-TB) ist nicht aussichtslos, erfordert jedoch aufgrund des Einsatzes einer Vielzahl von Substanzen und den damit nicht unerheblichen Nebenwirkungen eine strenge Überwachung in einer Facheinrichtung. Neben der finanziellen Belastung des Gesundheitssystems speziell dieser antituberkulösen Therapie, muss auch berücksichtigt werden, dass die Patienten aufgrund ihrer Isolation mehrere Monate nicht am sozialen Leben ihrer Umwelt teilhaben können. So ist es verständlich, dass sich im Rahmen der Nebenwirkungen auch psychische Veränderungen bis hin zur Depression und suizidalen Absichten entwickeln können ^[8]. Durch die einerseits steigende Resistenzlage des Erregers gegen gängige Antibiotika mit Hinderung eines schnellen Therapieerfolgs und die andererseits oftmals fehlende Langzeitmotivation des Patienten mit folgendem Therapieabbruch, muss es ein dringendes Anliegen sein, neue Mittel und Wege in der Behandlung der Tuberkulose zu finden, um die Effizienz zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit sollen bekannte Strategien in der Bekämpfung der Tuberkulose zunächst diskutiert werden, um neue Optionen aufzuzeigen. In nachfolgenden Abschnitten soll ein Überblick über die Auslöser der Tuberkulose, das allgemeine Krankheitsbild und den gegenwärtigen Stand der diagnostischen und therapeutischen Entwicklungen gegeben werden. Anschließend werden neue, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Substanzen vorgestellt und charakterisiert, die vielversprechende Ansatzpunkte liefern, bekannte therapeutische Behandlungsschemata insbesondere im Bereich der resistenten Bakterienstämme zu erweitern.

2. Grundlagen

2.1. Tuberkulose – Ein Überblick

2.1.1. Bakterielle Erreger und das Krankheitsbild der Tuberkulose

Robert Koch war der Erste, der das *Mycobacterium (M.) tuberculosis* als Krankheitserreger der Tuberkulose (TB) beschrieb. In einem Zeitungsausschnitt der *Berliner klinischen Wochenschrift* (1882) beschreibt er eine zu jener Zeit neue Nachweismethode, mit der es ihm gelang, den Erreger nachzuweisen ^[9]. In der Familie der Mykobakterien ist das *M. tuberculosis* nur einer der Auslöser schwerwiegender Krankheitsbilder. Als weitere Beispiele seien hier die Arten *M. leprae* und *M. ulcerans* genannt. Bei Lepra, welche durch *M. leprae* hervorgerufen wird, sorgt unter anderem der Befall und das resultierende Absterben von Nervenzellen für oftmals unbemerkte Verletzungen bei den Betroffenen. Bei ausbleibender Behandlung und damit Ausbreitung des Erregers im Organismus können zusätzlich opportunistische Infektionen zu einem folgeschweren Krankheitsbild führen ^[10]. *M. ulcerans* bedingt nekrotische Hautveränderungen und kann zu teils irreversiblen Behinderungen führen. Verbreitet ist die Erkrankung insbesondere in bestimmten Teilen Afrikas, wobei fast die Hälfte der betroffenen Personen Kinder unter 15 Jahren sind ^[11]. Daneben gibt es noch weitere, hier nicht aufgeführte Arten, die hauptsächlich als Auslöser opportunistischer Erkrankungen zu betrachten sind. Die zum Krankheitsbild der Tuberkulose führenden Bakterien werden unter dem Begriff des *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* zusammengefasst. Dazu zählen nach gegenwärtigem Kenntnisstand der Hauptvertreter *M. tuberculosis*, daneben *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* und *M. pinnipedii*. Der Impfstoff aus *M. bovis*, *Bacille Calmette-Guérin* (BCG), der beginnend 1908 als erster Ansatz einer Präventivmaßnahme entwickelt wurde, wird auch dazugerechnet, verursacht jedoch keine Tuberkulose ^[12]. Nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) besteht für den feststellenden Arzt die Pflicht, die Erkrankung als auch den Tod an Tuberkulose zu melden ^[13]. Im Folgenden soll nur auf den statistisch häufigsten Erreger der Tuberkulose *M. tuberculosis* eingegangen werden.

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis ist ein aerob wachsendes, stäbchenförmiges (Abbildung 2), grampositives Bakterium. Es ist unbeweglich, säureresistent und nicht wie anfangs angenommen zur Sporenbildung befähigt ^[15]. Ebenso ist entgegen der früheren Meinung der natürliche Wirt des *M. tuberculosis* der Mensch. Andere Arten des *Tuberkulose-Komplexes* haben sich sukzessive aus dem humanen Strang entwickelt, wie jüngste genomische Sequenzierungen zeigen ^[15, 16]. Die in besonderer Weise ausgeprägte lipophile Zellwand bedingt natürliche Resistenzen gegen die meisten Umwelteinflüsse. Dies sorgt unter anderem für eine verlangsamte Aufnahme von Nährstoffen, verminderte Anfälligkeit gegen Desinfektionsmittel und gängige antimikrobielle Chemotherapeutika. Detaillierteres zur Zellwand und den damit verbundenen Eigenschaften folgt im nächsten Abschnitt. Ebenso verknüpft sind die langen

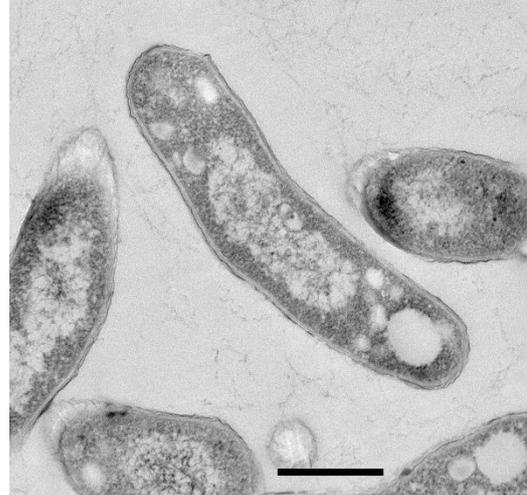


Abbildung 2: *Mycobacterium tuberculosis*. Längsschnitt. Transmissions-Elektronenmikroskopie, Ultradünnschnitt. Maßstab = 500 nm

Quelle: Muhsin Özel, Gudrun Holland/RKI ^[14]

Generationszeiten, d.h. die Zeit, in der sich die Bakterienkultur verdoppelt. Bei *M. tuberculosis* sind es 15 - 20 Stunden, während eine Verdopplung bei *Escherichia coli* im Vergleich ca. 20 Minuten dauert ^{[15], [17-19]}. Auch diese Tatsache erschwert die Entwicklung von antituberkulösen Medikamenten und bedingt die langen Therapiezeiten. Aufgrund der verlangsamten Stoffwechselvorgänge in den Mykobakterien sind konstante Arzneistoffspiegel in Form einer regelmäßigen und ausreichenden Arzneimittelgabe über den Zeitraum der Behandlung essentiell. Ein günstiges Nebenwirkungsprofil der eingesetzten Wirkstoffe hat in diesem Fall hohe Priorität, wird jedoch oft gerade bei ungünstiger Resistenzlage und dem damit erfolgenden Einsatz mehrerer Arzneimittel nicht erreicht.

Aufbau der Zellwand

Eine Genom-Sequenzierung zeigte, dass ca. 250 Gene für Enzyme kodieren, die im Lipid-Stoffwechsel tätig sind, und damit maßgeblich am Aufbau der Zellhülle beteiligt sind. Bei *Escherichia coli* sind es im Vergleich ca. 50 Gene ^[16]. Allein diese Tatsache betont die besonderen Eigenschaften der Zellwand bei *Mycobacterium tuberculosis*. Das grundsätzliche Unterscheidungsmerkmal verschiedener Bakterien-Arten wird mit der Gramfärbung bestimmt. Mykobakterien lassen sich jedoch mit den üblichen Färbemethoden nicht anfärben, sodass eine alternative Methode, die *Ziehl-Neelsen-Färbung*, entwickelt wurde. Durch Erhitzen des Präparats kann der Farbstoff Fuchsin aufgenommen werden, und wird auch durch Säurebehandlung nicht wieder abgegeben. Aufgrund dieses Verhaltens werden

in Zellwänden ist bei *M. tuberculosis* durch den kovalenten Bindungsmodus der Mykolsäuren über das Arabinogalaktan bis in die Zellmembran hin stark eingeschränkt. Die verminderte Fluidität und die verzweigten lipophilen Ketten erschweren das Eindringen hydrophiler Stoffe und bedingen die natürlichen Umweltresistenzen, aber auch den verlangsamten Stoffwechsel und die damit verbundenen langen Generationszeiten ^{[15], [17], [20, 21]}. Im Rechten Teil der Abbildung ist eine Struktur dargestellt, die als Lipoarabinomannan (LAM) bezeichnet wird. Es ist bekannt, dass er über einen Phosphatidyl-Inositol-Anker in der Zellmembran, als auch in der äußeren Zellwand verankert sein kann ^{[20], [22]}. Die Polysaccharide bestehen aus Mannose in der Pyranose-Form (Man_p), daran kovalent gebundenen Arabinose-Ketten, die bei *M. tuberculosis* in endständige sogenannte Mannose-Caps (Man-caps) auslaufen. Daher bezeichnet man die Lipoarabinomannane dieser Bakterienart auch als ManLAM. Die freien Mykolsäuren, insbesondere der „Cord-Faktor“ (Trehalose 6,6'-Dimykolat) und das zuletzt genannte Polysaccharid sind unter anderem für die Pathogenität des Bakteriums essentiell, wie im nächsten Abschnitt klar werden soll ^{[15-17], [20-22]}. So führten isolierte ManLAM und Mykolsäuren in-vitro zu immunologischen Reaktionen der Wirts-Zellen, entsprechend dem Krankheitsbild der Tuberkulose ^[20]. Kürzlich wurden weitere potentiell pathogene Protein-Strukturen benannt, die zur sogenannten PE und PPE Familie gehören. Die Expression der unter anderem in der Zellwand auftretenden Proteine scheint durch wechselndes Mikromilieu im Wirtsorganismus beeinflusst zu werden ^{[16], [23]}.

Pathophysiologie und klinisches Bild der Tuberkulose

Die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* geschieht in der Regel über das Einatmen erregerehaltiger Aerosole von Patienten mit einer offenen, infektiösen Lungentuberkulose, seltener durch extrapulmonale Tuberkulosen ^[13]. Von einer offenen Tuberkulose wird gesprochen, wenn die Mykobakterien aus dem Wirtsorganismus an die Umwelt abgegeben werden können ^[15]. Eine Übertragung durch nicht pasteurisierte Milch von erkrankten Rindern oder Wildtieren ist grundsätzlich möglich, in Mitteleuropa jedoch nicht mehr von Bedeutung, da der Rinderbestand weitgehend tuberkulosefrei ist ^[24]. Insbesondere bei Lungentuberkulose besteht die Gefahr, dass die Infektionsherde Anschluss an die Luftwege erhalten haben und dann durch Husten, Niesen aber auch Singen und Sprechen freigesetzt werden können ^[25, 26] (Abbildung 4, Folgeseite).

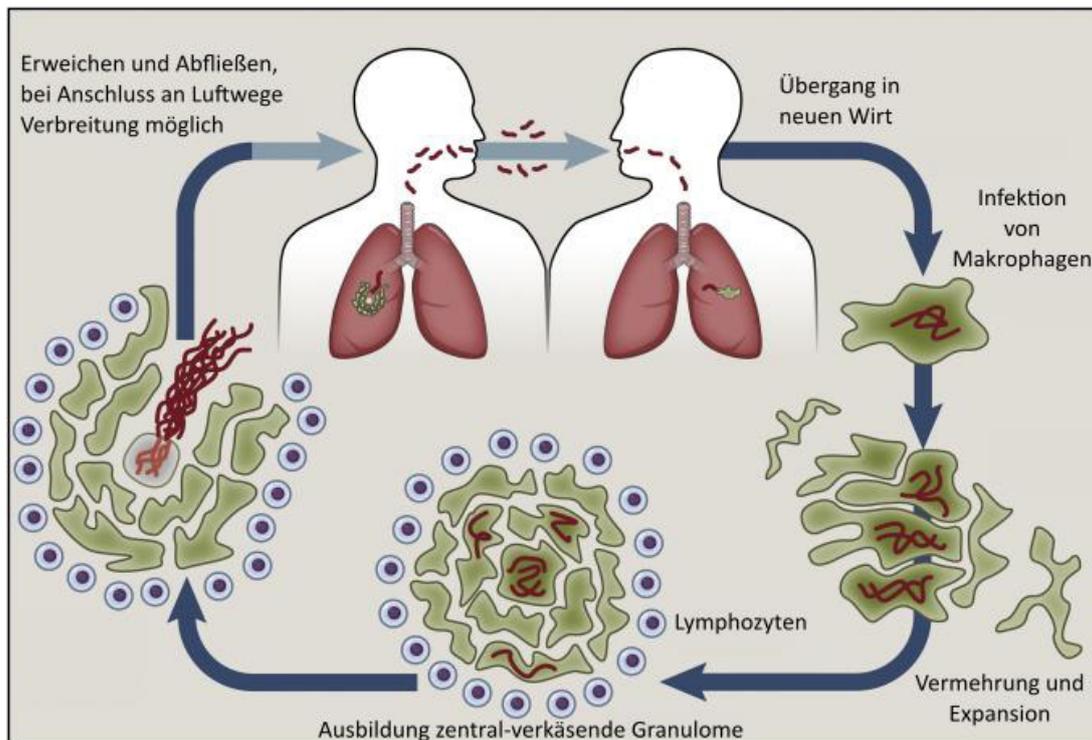


Abbildung 4: Infektionszyklus der Tuberkulose

Beschreibung siehe Abschnitt.

In Anlehnung an: CAMBIER et al., Cell, 159 (7), 2014, S. 1499 [26]

Die Größe eines infektiösen Tropfens ist hierbei unter $5\ \mu\text{m}$, oft zwischen $1\text{-}3\ \mu\text{m}$ und enthält zwischen 1-3 Bakterien. Dabei ist bekannt, dass schon diese wenigen Erreger eine Infektion verursachen können [27]. Je nach Partikelgröße gelangen sie über die Atemwege bis in die Alveolen, wo sie von lokalen Alveolarmakrophagen aufgenommen werden können. Unter normalen Bedingungen würden die Makrophagen bei Phagozytose von beschädigtem Gewebe oder fremden Organismen die Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom einleiten. Dadurch würden die Bestandteile durch den niedrigen pH-Wert und proto- und lipolytische Enzyme abgebaut und unschädlich gemacht werden. Bei einer Infektion mit Tuberkulose-Bakterien wird die Fusion der zwei Kompartimente jedoch gehemmt [28, 29]. Hierfür wird die charakteristische lipidreiche Zellwand, unter anderem die enthaltenen Mykolsäuren und mykolsäurehaltigen Glykolipide, darunter der „Cordfaktor“, verantwortlich gemacht [17]. Weiterhin schützt sich das Bakterium durch die Katalase-Peroxidase (katG) vor dem in den Phagozyten gebildeten Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Der sogenannte „Makrophagen-Kolonisations-Faktor“ (mce) ermöglicht es ihm in die Wirtszelle einzudringen und mit Hilfe zahlreicher Enzyme die Zell- und Vakuolenmembranen zu zerstören [16, 17], [28], [30]. Eine nachgewiesene Hemmung der lipolytischen Aktivität lässt Lipide in den Makrophagen kumulieren, welche das Bakterium wiederum als Ressourcen für seinen Stoffwechsel beziehen kann [28]. Der Erreger kann sich vermehren bis die Wirts-Zellen schließlich daran zugrunde gehen und die Mykobakterien freisetzen. Vom Entzündungsgeschehen angezogen, können sie von weiteren Makrophagen und undifferenzierten

Monozyten phagozytiert und in tiefere Organregionen getragen werden ^{[15], [25]}. Diese scheitern ebenfalls in der Bekämpfung des Erregers und verteilen ihn dadurch in den ersten Wochen der Infektion in beliebige Körperregionen. Bei Streuung des Primäraffektes zu den regionalen Lymphknoten wird dann von einem Primär- oder Ghon-Komplex gesprochen. Bei hämatogener Ausbreitung in eine oder beide Lungenflügel, bezeichnet man die dort entstehenden Herde als Simon-Spitzenherde ^[25]. Nach ca. drei Wochen kann das Immunsystem die ungehemmte Vermehrung eindämmen. An den Infektionsherden entstehen aufgrund der zellvermittelten Immunantwort durch Lymphozyten zentral verkäsende nekrotische Granulome, die den Erreger einkapseln. Durch die lokale Hemmung der Lipolyse durch die Mykobakterien wird unter anderem ein Substrat geschaffen, das sie über Jahre am Leben hält und ernährt ^[28]. Die Granulome sind als Folge einer primären, oft symptomlos verlaufenden Tuberkulose im Röntgenbild des Patienten erkennbar ^[15]. Je nach Fortschreiten der Krankheit und der individuellen Abwehrlage sind dann auch sog. Kavernen sichtbar. Sie bilden sich als Hohlräume aus den Granulomen aufgrund des Zelluntergangs, Erweichens und Abfließens des käsigen Materials und bieten optimale Wachstumsbedingungen für die Bakterien. Nur ca. 10 % der Betroffenen erkranken nach der primären Infektion an dem eigentlichen Krankheitsbild der Tuberkulose, dies betrifft insbesondere Kinder und immungeschwächte Personen wie HIV-Patienten oder ältere Menschen. Weitere Risikofaktoren im geringeren Maße sind Diabetes, Kopf- und Halskrebs, Dialyse-abhängige chronische Nierenerkrankung und erheblicher Gewichtsverlust ^{[12], [25]}. Immunsuppressiva, wie sie z.B. nach Organtransplantationen nötig sind, begünstigen ebenso die Entwicklung. In diesen Fällen kann die primäre Tuberkulose auch direkt in eine postprimäre Tuberkulose übergehen. Bei 90 % der Infizierten können die Granulome die Bakterien jahrzehntelang konservieren (latente Tuberkulose) oder in wenigen Fällen (< 10 %) je nach individueller Abwehrlage ausheilen und durch Kalzium Ablagerungen verkalken ^{[12, 13], [25]}. Als postprimäre oder sekundäre Tuberkulose werden alle Erkrankungen der Tuberkulose bezeichnet, die in Folge der Streuung der Bakterien über Lymphsystem oder Blutbahn in verschiedene Organe auftreten ^{[12], [25]}. Sie kann unmittelbar aus einer primären Tuberkulose entstehen, nach Reaktivierung persistierender, latenter Bakterien (endogen) oder nach einer Neuinfektion (exogen). Die häufigste Form ist die eingangs erwähnte Lungentuberkulose, grundsätzlich kann aber jedes Organ betroffen sein. So kann es auch die Lymphknoten, Knochen und Gelenke, Haut, den Urogenitaltrakt und die Meningen treffen. Infektion letzterer kann unbehandelt schnell tödlich enden. Ist der ganze Organismus massenhaft betroffen, so spricht man von einer Miliartuberkulose ^[15]. Die latente Tuberkulose verläuft ohne spezifische Symptomatik. Die postprimäre Erkrankung gestaltet sich vielseitig, da sie alle Körperregionen befallen kann, sodass es keine charakteristischen Beschwerden gibt. Dennoch können Leitsymptome ausgemacht werden, insbesondere da häufig die Lunge betroffen ist. So können lang andauerndes Husten, Brustschmerzen und Atemnot, sowie vermehrtes nächtliches Schwitzen, Gewichtsabnahme

und allgemeine Schwäche Anzeichen für eine Infektion sein. Kinder sind überdies in über der Hälfte der Fälle asymptomatisch oder zeigen lediglich eine verzögerte Entwicklung ^{[13], [15], [25]}.

2.1.2. Gegenwärtige diagnostische und therapeutische Maßnahmen

Für eine erfolgreiche Behandlung der Erkrankung ist eine frühe Entdeckung erkrankter und infektiöser Personen essentiell, daher sind auch effiziente diagnostische Methoden immer wieder Gegenstand der Forschung ^[12]. Insbesondere die Empfindlichkeitsprüfung der Erreger in Bezug auf die Resistenzlage gegen gängige antituberkulotische Mittel ist entscheidend für eine zielgerechte Therapie ^[17]. Die Impfung mit dem momentan einzigen Impfstoff BCG wird aufgrund der geringen Tuberkulose-Inzidenz und der relativen Häufigkeit der damit zusammenhängenden Komplikationen von der ständigen Impfkommision (STIKO) in Deutschland seit 1998 nicht mehr empfohlen. Sie wird in Ländern mit einer hohen Inzidenz jedoch immer noch durchgeführt ^[12]. Zum Repertoire der diagnostischen Methoden zählen bildgebende, mikrobiologische und immunologische Verfahren, wobei ein einzelnes Ergebnis in der Regel nicht ausreicht, um eine Infektion zu bestätigen oder den Erreger genügend zu charakterisieren ^[17]. Die nachfolgende Auflistung erfüllt keinen Anspruch an Vollständigkeit und soll lediglich einen Überblick über gängige Verfahren bieten.

Diagnostische Methoden

Durch Röntgenaufnahmen kann bei Routineuntersuchungen oder bei Auftreten charakteristischer Symptome der Verdacht auf eine Infektion mit Tuberkulose-Erregern erhoben werden, insbesondere wenn verkalkte Primäraffekte, Narben oder je nach Fortschreiten der Krankheit auch Kavernen sichtbar werden ^{[15], [17], [25]}. Wenn sich die Gefahr einer Infektion andeutet, können weitere Tests veranlasst werden. Zu den klassischen immunologischen Verfahren zählt der Tuberkulin-Test, dabei unterscheidet man in den heute nicht mehr angewendeten *Tine*-Test und den relevanteren Test nach *Mendel-Mantoux* ^{[12], [17], [18]}. Mittels einer feinen Nadel werden standardisierte Proteinmengen (PPD: purified protein derivative) aus der Zellwand von *M. tuberculosis* intradermal injiziert ^{[15], [17], [25]}. Dabei findet eine allergische Hautreaktion vom verzögerten, zellvermittelten Typ IV statt (DTH: delayed-type hypersensitivity), dessen Ergebnis zwischen 48 und 72 Stunden abgelesen wird. Hat eine Infektion mit Mykobakterien stattgefunden, reagiert das Immunsystem mit der Ausbildung von tastbaren, geröteten Hautverdickungen. Die Bestimmung der Morphologie der Bakterien kann nicht erfolgen und eine Kreuzreaktion mit BCG-Geimpften ist grundsätzlich möglich, sodass der Test allein eine geringe Aussagekraft hat. Bei negativen Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass eine positive Reaktion nach Erstinfektion aufgrund der späten Immunreaktion des Wirtes bis zu 12 Wochen dauern kann ^{[12], [15], [17]}. Einen schnelleren Hinweis auf eine Infektion bieten sogenannte Lymphozytentransformationstests (LTT) oder auch *Interferon-Gamma Release Assays* (IGRA), hier sind unter anderem weniger

Kreuzreaktionen zu erwarten. Aus dem Venenblut der Patienten gewonnene sensibilisierte Lymphozyten werden *in-vitro* mit spezifischen Antigenen des Erregers versetzt. Die stimulierte Interferon- γ -Freisetzung wird nach etwa 24 Stunden abgelesen. Solche Tests sind unter dem Namen Quantiferon®- oder T-Spot-TB-Test erhältlich ^{[15], [17], [25]}. Zu den mikrobiologischen Verfahren zählen unter anderem die mikroskopische Untersuchung, die Anlegung einer Kultur sowie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Verfahren. Die Mikroskopie von z.B. Sputum oder Bronchialsekret des Patienten kann lichtmikroskopisch mittels Ziehl-Neelsen- und Auramin-Färbung oder fluoreszenzmikroskopisch mit Fluorochrom stattfinden ^{[17], [25]}. Da der Nachweis auf der Säurebeständigkeit des Erregers beruht, ist auch hier die Aussagekraft auf „säureresistente Stäbchen“ begrenzt und lässt nicht direkt auf ein Bakterium aus dem *Mycobacterium-tuberculosis-Komplex* schließen. Die Anzahl der Erreger lässt jedoch Rückschlüsse ziehen, ob es sich um einen potentiell infektiösen Patient handelt ^{[15], [17]}. Das umfangreichste, aber auch langwierigste Verfahren bildet die Kultivierung der aus dem Untersuchungsmaterial erhaltenen Erregern. Zur Anzucht werden Nährmedien wie z.B. Glycerol-Eier-Agar nach *Löwenstein-Jensen* verwendet, aber sie gelingt auch in flüssigen Medien. Eine Analyse der Kulturmorphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und Resistenzbestimmung kann bis zu 3 Monate in Anspruch nehmen ^{[12], [15], [25]}. Damit bei Verdacht auf eine Infektion auch frühzeitig eine therapiegerechte Behandlung eingeleitet werden kann, gibt es nicht zuletzt die Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NAT). Zur Durchführung ist eine hohe Erregerdichte im Untersuchungsmaterial erforderlich, frühe Aussagen zur Resistenzlage bei gängigen antituberkulösen Medikamenten sind jedoch zu treffen und können die beginnende Therapie bestimmen ^{[12], [15], [17], [25]}.

Therapeutische Maßnahmen

Die Überwachung und Begleitung des Patienten bei seiner Behandlung über den kompletten Zeitraum ist von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg ^{[2], [7], [12]}. Dies soll in Form von regelmäßiger Beratung, Diagnostik des Heilungsverlaufes und Abklären von Nebenwirkungen zur Motivation des Patienten beitragen. Das subjektive Empfinden einer frühzeitigen Genesung aufgrund der anschlagenden Medikamente kann zu Therapieabbrüchen führen und ist unter anderem einer der Hauptgründe für das Entstehen resistenter Keime, die eine erneute Behandlung nötig machen und erschweren. ^{[2], [6], [12], [15]}. Die Therapie kann ambulant erfolgen, erfordert jedoch besonders zu Beginn und bei anderen Faktoren wie multiresistente Erreger, schwerwiegende Begleiterkrankungen und einem noch nicht bestätigtem Verdacht der Infektion einen verlängerten stationären Aufenthalt. Dabei werden vor Beginn jeder Behandlung routinemäßig Laborwerte wie z.B. Blutbild, Nieren- und Leberfunktionswerte erhoben, welche in regelmäßigen Abständen überprüft werden. Diese Werte sind wichtig für die Beurteilung des Ansprechens der Erreger auf die Therapie, Abklärung eventueller Nebenwirkungen und für die Bewertung, ob eine ambulante Weiterbehandlung aufgrund des

Infektionsrisikos möglich ist ^{[6, 7], [12]}. In der Regel können bei einer effizienten Therapie nach ca. 3-4 Wochen keine lebensfähigen Erreger mehr im Auswurf gefunden werden ^{[2], [7]}. Die medikamentöse Behandlung der Tuberkulose erfolgt immer als Kombinationstherapie, um die Selektion spontan resistenter Mutanten zu verhindern. Weiterhin sind aufgrund der Verteilung des Erregers in unterschiedlichen biochemischen Milieus des Wirts-Organismus mehrere Angriffspunkte für die Eradikation nötig. Sie unterteilt sich grundsätzlich in 2 Phasen, wobei in eine Initial- und eine Kontinuitätsphase unterteilt wird. Die einleitende Initialphase wird bei sensiblen Bakterienstämmen in der Regel mit den vier Wirkstoffen Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol über 2 Monate durchgeführt. Diese sogenannten Erstrangmedikamente oder Standardtherapie ist in Bezug auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit in randomisierten, placebo-kontrollierten Studien im Therapieschema langjährig etabliert. Daran anschließend erfolgt die viermonatige Kontinuitätsphase, wobei die zwei letztgenannten Wirkstoffe weggelassen werden und lediglich mit Isoniazid und Rifampicin therapiert wird ^{[2], [6, 7], [31]}. Die Dosierung erfolgt nach Körpergewicht, bei Kindern beruht sie auf der Messung der Körperoberfläche. Es sei darauf hingewiesen, dass das Behandlungsschema bei Unverträglichkeiten oder z.B. bei Vorerkrankungen wie Niereninsuffizienz, Leberfunktionsstörungen, eine stattgefundene Organtransplantation oder Krankheiten, die eine verminderte enterale Resorption bedingen, angepasst werden muss ^[6, 7]. Bei Einhaltung der Therapie ist die Tuberkulose eine langwierige, aber dennoch heilbare Krankheit. In Deutschland konnten 76,7 % der an Tuberkulose erkrankten Patienten im Jahr 2014 erfolgreich behandelt werden ^[5]. Die Standardtherapie soll an dieser Stelle bezüglich ihres Wirkmechanismus kurz vorgestellt werden, eine allgemeinere Übersicht soll Abbildung 5 (Folgeseite) geben ^[32]. Die komplexere, längere Therapie der resistenten Formen der Tuberkulose soll hier lediglich erwähnt bleiben, aber nicht im Detail besprochen werden. Dabei werden eine Vielzahl an etablierten, aber auch neuen Medikamenten verwendet, welche je nach Fachliteratur oder Leitlinie als Zweit- oder Reservemedikamente oder neuer als Nicht-Standardtherapie bezeichnet werden ^{[12], [31]}.

Wirkprinzipien von Tuberkulose-Medikamenten

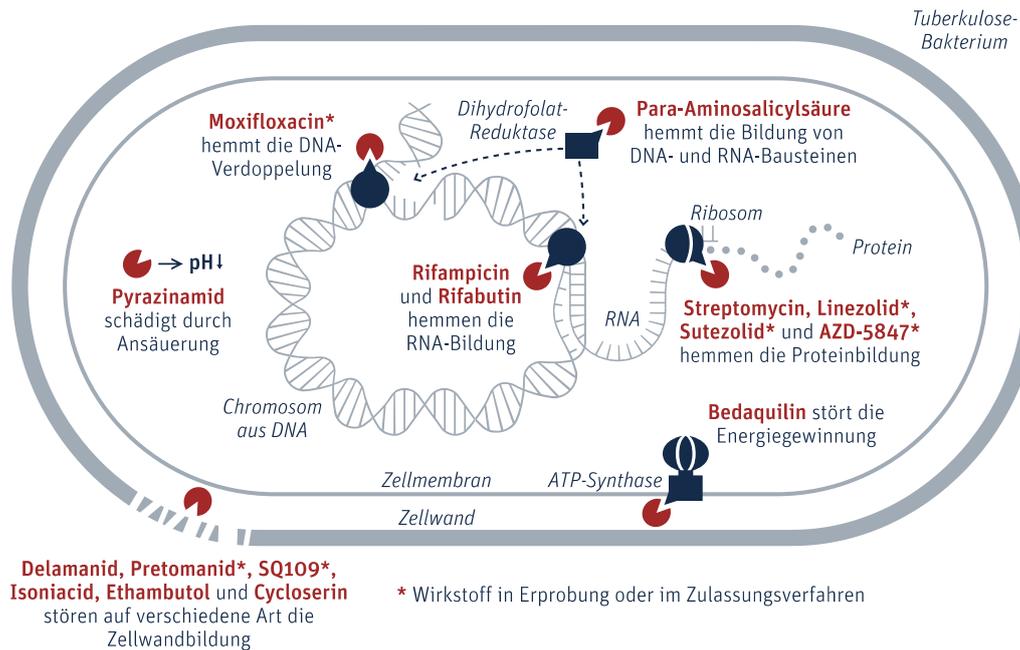


Abbildung 5: Angriffspunkte der antituberkulösen Medikamente an *Mycobacterium tuberculosis*

Quelle: Abbildungen zu Tuberkulose, Stand März 2016, © vfa [32]

2.1.3. Medikamentöse Behandlung

Im Rahmen der kürzeren, 6-monatigen Therapie der Tuberkulose werden die vier Medikamente Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid eingesetzt. Auf die grundlegenden Eigenschaften dieser Wirkstoffe soll in diesem Kapitel eingegangen werden. Anschließend werden weitere, insbesondere bei den resistenten Formen eingesetzte Medikamente kurz vorgestellt.

2.1.3.a. Isoniazid

Isoniazid (INH) ist ein Isonicotinsäurehydrazid (Abbildung 6, Folgeseite, rechts oben), erstmals 1952 als effektiver Hemmstoff insbesondere von *M. tuberculosis* und *M. bovis* beschrieben [33] und hat sich als Standard in der Therapie der Tuberkulose etabliert. Es wird angenommen, dass es als kleines, hydrophiles Molekül mittels Porine der Zellumhüllung in das Bakterium gelangt. Eine Diffusion ist aufgrund der stark lipophilen Zellwand der Mykobakterien unwahrscheinlich [34]. Im Zielorganismus angelangt, wird INH durch die bakterielle Katalase-Peroxidase (KatG) aktiviert und reagiert als Isonicotinsäure-Acylradikal spontan mit NAD⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und NADP⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) zu den entsprechenden Addukten (Abbildung 6, Folgeseite).

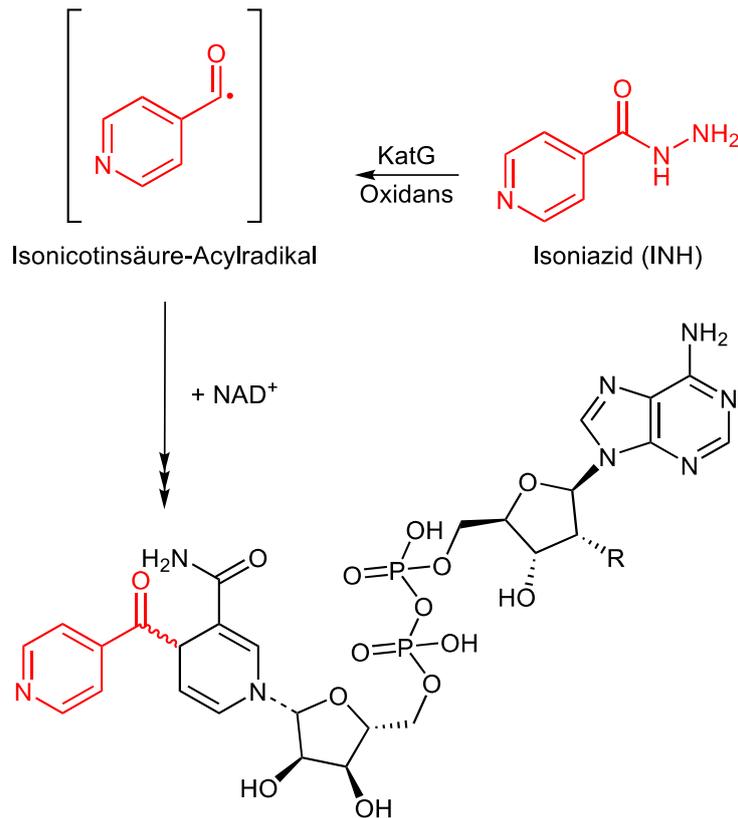


Abbildung 6: Schematischer Wirkungsmechanismus von Isoniazid

Isoniazid wird durch die KatG in ein Radikal umgewandelt und reagiert anschließend mit einem Molekül NAD⁺ (R = -OH) oder NADP⁺ (R = -Phosphat) zum entsprechendem Addukt ^[2, 35].

Das Isonicotinsäure-NAD-Addukt ist ein Inhibitor der InhA (eine *enoyl-acyl-carrier-protein* Reduktase), ein NADH abhängiges Enzym im Mykolsäure-Synthese-Weg. Das Isonicotinsäure-NADP-Addukt wiederum hemmt die Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR) und stört damit die DNA-Synthese. Die Selektivität der Verbindung erklärt sich durch Aktivierung des Prodrugs durch die bakterielle Katalase-Peroxidase, die im humanen Wirtsorganismus nicht vorkommt ^[19]. Dieser Mechanismus ist ebenso eine der Schwachstellen von Isoniazid, da bei geringer Katalase-Peroxidase-Aktivität auch die Umsetzung zum aktiven Addukt vermindert ist. So zeigen z.B. die Mykobakterien, die keine Tuberkulose auslösen können (MOTT: *mycobacteria other than tuberculosis*) eine natürliche Resistenz gegenüber Isoniazid ^[35, 36]. Weiterhin kann unter einer nicht adäquat geführten Therapie eine Selektion von Mutanten mit geringer KatG-Aktivität stattfinden und zu Resistenzen führen ^{[2], [19]}. Zu den zweithäufigsten Resistenzfällen zählen Mutationen des Gens *inhA* und damit Veränderung der exprimierten Target-Struktur ^{[31], [37]}. Neben der Entwicklung zahlreicher Isoniazid-Analoga sind auch Isoniazid-NAD-Addukt Abwandlungen Gegenstand aktueller Forschung, um der Prodrug-Aktivierung durch die KatG aus dem Weg zu gehen ^{[2], [38-40]}. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand hat es jedoch noch kein solches Produkt zur Marktreife geschafft. In Deutschland wurde in den übermittelten Resistenzfällen im Jahr 2015 bei anteilig 8,9 % der Betroffenen eine Resistenz zumindest gegenüber Isoniazid festgestellt ^[5].

2.1.3.b. Rifampicin

Als Naturstoff erstmals 1957 aus *Streptomyces mediterranei* isoliert, gehören die Rifamycine strukturell zu den Ansa-Verbindungen. Hier wird ein aromatischer Strukturteil von einer aliphatischen Kette wie ein Henkel überbrückt (Abbildung 7) ^[41–43]. Zuerst wurden die Rifamycine A - E, später O, S und SV entdeckt und kategorisiert, in den darauffolgenden Jahren sind noch mehr Strukturen bekannt geworden ^[43]. Eine chemisch strukturelle Abwandlung von Rifamycin SV führte zu dem heute gängigen Rifampicin (RMP), welches international auch als Rifampin bekannt ist (Abbildung 8) ^{[19], [43], [44]}. Im Vergleich zum kleinen hydrophilen Isoniazid wird angenommen, dass RMP die Zellwand durch Diffusion passiert. Damit lässt sich auch die synergistische Wirkung mit dem Zellwand destabilisierenden Ethambutol erklären ^[34]. In der Bakterienzelle wird die Proteinsynthese durch Bindung an die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase gehemmt ^{[2], [19]}. Zudem ist es ein Substrat des Membranproteins und prominenten Transporters P-GP (Permeabilitäts-Glykoprotein) und induziert CYP-III A4 (Cytochrom P450), ein Enzym, welches für die Verstoffwechslung vieler gängiger Arzneistoffe relevant ist ^{[19], [31], [45]}.

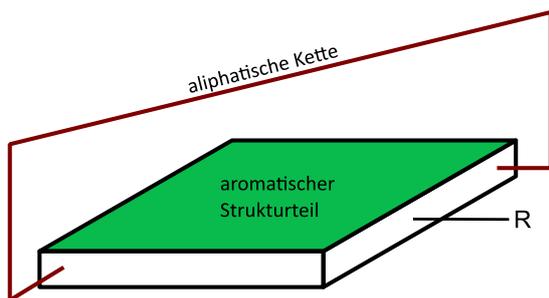


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rifamycine

Reste „R“ je nach Rifamycin-Derivat Rifampicin, Rifabutin oder Rifapentin. Hier nicht weiter definiert.

In Anlehnung an: PRELOG *et al.*, *Helv. Chim. Acta* **56** (7), 1973, S. 2280 ^[43]

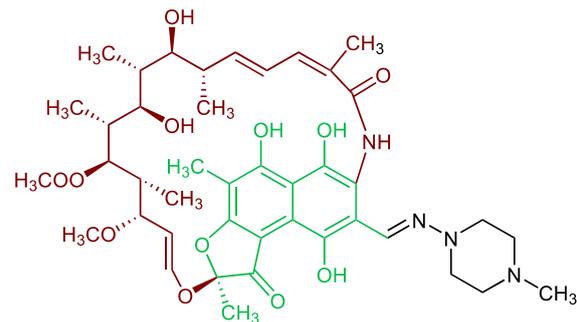


Abbildung 8: Rifampicin in konformer Darstellung zu Abbildung 7

Der schwarz gefärbte Abschnitt zeigt die chemisch strukturellen Änderungen zum Naturstoff Rifamycin SV, siehe zugehöriger Absatz.

Es ist als einziges antituberkulöses Mittel gegen nahezu ruhende Erreger in verkäsenden Granulomen wirksam ^[19]. Neben Rifampicin sind weitere Rifamycine im Gebrauch, darunter Rifabutin und Rifapentin. Ersteres wird insbesondere in der antiretroviralen Therapie als Alternative zu RMP eingesetzt, da die zuvor angesprochenen stoffwechsel-induktiven Eigenschaften von RMP die Behandlung ungünstig beeinflussen ^{[31], [46]}. Weiterhin hat es Anwendung bei gesicherten Resistenzen gegenüber Rifampicin ^[31]. Rifapentin verfügt über eine verlängerte Halbwertszeit und wird bislang in den USA in der präventiven Therapie der latenten Tuberkulose angewendet, hat jedoch kein besseres Wirkprofil als RMP ^{[2], [31]}. Resistenzen bei Rifampicin resultieren in 96 % der Bakterien-Stränge aus Mutationen in einem 81 bp langen Abschnitt des *rpoB*-Gens ^[47]. Dieses Gen codiert für die β -

Untereinheit der RNA-Polymerase, Veränderungen an dieser Stelle führen zu Konformationsänderungen der Einheit und vermindern die Effektivität von Rifampicin ^{[31], [37]}. Ein vermindertes Ansprechen dieses Wirkstoffs wird von den gängigen Guidelines aufgrund des Wegfalls eines der effektivsten Mittel vorwiegend als multiresistente Tuberkulose (MDR-Tb) tituiert ^{[31], [47]}. Ein Blick in die Statistik zeigt, dass in Deutschland im Jahr 2015 in 3,6 % der übermittelten Fälle mindestens eine Resistenz gegenüber Rifampicin vorlag, Tendenz weiter steigend ^[5].

2.1.3.c. Ethambutol

Wie bei Isoniazid wird bei Ethambutol (EMB, Abbildung 9) angenommen, dass es aufgrund seiner Größe die Porin-Kanäle der Zellumhüllung passiert um in das Zellinnere zu gelangen ^[34]. Obwohl die Einführung des Wirkstoffes in die Therapie der Tuberkulose lange zurück liegt (1966), ist das Target nicht genau bekannt ^[37]. Eine Hemmung der Arabinosyl-Transferase, die in der Biosynthese der Arabinogalaktane involviert ist, wird postuliert.

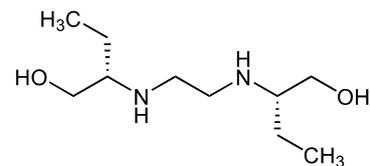


Abbildung 9: Ethambutol
Das S,S-Isomer wird therapeutisch genutzt.

Als essentieller Zellwandbestandteil wird dadurch die Stabilität über verknüpftes Peptidoglykan und veresterte Mykolsäuren gestört ^[2, 48, 49], weiterhin sind Effekte auf Lipoarabinomananne beschrieben ^[34, 49]. Als wichtiges resistenzvermittelndes Gen wird somit *embCAB* bezeichnet, da es für die Arabinosyl-Transferase codiert und daher bei Mutationen die Sensitivität von Ethambutol erwiesenermaßen herabsetzt ^[37]. Die veränderte Zellwand-Integrität führt zu einer oberflächenreduzierten, sphärischen Form der Erreger ^[50] und steigert zusätzlich die Effektivität der gängigen aber auch der ineffektiven Chemotherapeutika wie Clarithromycin ^[2, 37]. Ethambutol zählt zu den Standardtherapeutika in der Behandlung der Tuberkulose. Die Dreifachtherapie mit Isoniazid, Rifampicin und Pyrazinamid wird heute nicht mehr empfohlen, da selbst bei nachgewiesener Sensibilität der genannten Wirkstoffe auf das Bakterium eine Gefahr eines falsch-positiven Ergebnisses zu hoch ist. Um der Resistenzentwicklung aus dem Weg zu gehen, werden alle vier Medikamente zusammen eingesetzt ^[31]. Eine weitere Anwendung findet EMB als Präventivmaßnahme nach Kontakt mit MDR/XDR-Tb Patienten, hat hierzulande jedoch nur geringe Bedeutung ^[31]. Aufgrund der möglichen Sehkraft einschränkenden Nebenwirkung werden regelmäßige Augenuntersuchungen während der Therapie durchgeführt ^[19]. Kinder unter 5 Jahren werden demnach in der Regel nicht mit Ethambutol therapiert, da keine ausreichende Visus-Kontrolle gewährleistet werden kann ^[46]. Auch an dieser Stelle soll erwähnt sein, dass in Deutschland im Jahr 2015 bei 2,5 % der registrierten Fälle mindestens eine Resistenz gegenüber Ethambutol vorlag ^[5].

2.1.3.d. Pyrazinamid

Mit der Einführung von Pyrazinamid (PZA) in den frühen 1950-ern konnte die Behandlung der Tuberkulose auf 6 Monate reduziert werden ^[37]. Als strukturverwandte Verbindung von Isoniazid (Abbildung 10) wird angenommen, dass es das Bakterium über Porine ^[34] oder wie eine andere Arbeit berichtet, durch passive Diffusion erreicht ^[37]. Ungeachtet der strukturellen Ähnlichkeit zu INH, ist der genaue Wirkmechanismus hier nicht vollständig geklärt, eine Umwandlung von PZA in Pyrazincarbonsäure durch die bakterielle Pyrazinamidase gilt jedoch als gesichert und bildet den ersten Schritt ^[2, 37]. Das genannte Enzym wird durch *pncA* codiert, dessen Mutation wiederum für eine der Resistenzen verantwortlich gemacht wird ^[34]. Nach Desaminierung zur Säure soll eine Azidifizierung des Ziel-Organismus stattfinden ^[2, 34], dessen Wirkung in sauren Umgebungen wie phagozytierten Bakterien ^[19] und den fast ruhenden Erregern in Gewebläsionen besonders effektiv ist ^[37]. Dass die Säure das therapeutische Agens ist, wird durch die Tatsache bekräftigt, dass Bakterien-Stränge mit *pncA*-Gen Mutationen immer noch sensitiv auf Pyrazincarbonsäure sind ^[2]. Daneben wird eine Hemmung der bakteriellen Mykolsäuresynthese durch Inhibition der Fettsäuresynthase I (FAS I) als potentieller Wirkmechanismus beschrieben ^[19, 37]. Natürliche Resistenzen existieren in verwandten Mykobakterien wie *M. avium*, *M. bovis*, *M. smegmatis* und *M. kansasii* aufgrund fehlender Pyrazinamidase und/oder spezifischen Effluxpumpen zum Ausschleusen des Prodrugs, was diesen Wirkstoff spezifisch für die Therapie von *Mycobacterium tuberculosis* macht ^[34, 51]. Damit die Reihe zur regionalen Resistenzentwicklung vollständig wird, seien hier die 3,8 % Fälle in Deutschland im Jahr 2015 genannt, die zumindest eine Resistenz gegenüber Pyrazinamid aufwiesen ^[5].

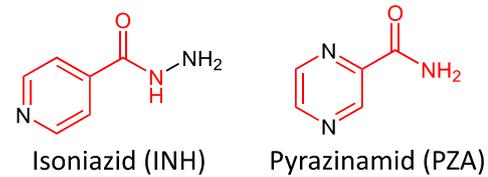


Abbildung 10: Struktureller Vergleich von Isoniazid (INH) und Pyrazinamid (PZA)

2.1.3.e. Zweitrang- oder Reservemedikamente, Nicht-Standardtherapie

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Wirkstoffe zählen zu den Erstrangmedikamenten oder neuer, zur Standardtherapie. Hier soll ein kurzer Überblick über die je nach Fachliteratur unterschiedlich bezeichneten Zweitrang- oder Reservemedikamente oder der Nicht-Standardtherapie gegeben werden ^[19, 31, 52]. Für Deutschland bildet momentan die *Leitlinie zur*

Tabelle 1: Wirkstoffe in der Therapie einer multiresistenten Tuberkulose nach neuer WHO-Einteilung (2016)

Adaptiert aus: WHO, *treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis* 49 (3), 2017, S. 6^[52]

Gruppe	Medikamentöse Option
A	<i>Levofloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin</i>
B	<i>Amikacin, Capreomycin, Kanamycin, (Streptomycin)</i>
C	<i>Ethionamid/Prothionamid, Cycloserin/Terizidon, Linezolid, Clofazimin</i>
D	<ol style="list-style-type: none"> 1 <i>Pyrazinamid, Ethambutol, hochdosiertes Isoniazid</i> 2 <i>Bedaquilin, Delamanid</i> 3 <i>Paraaminosalicylsäure, Imipenem-Cilastatin, Meropenem, Amoxicillin-Clavulansäure, Thioacetazon</i>

Therapie der Tuberkulose im Erwachsenenalter von SCHABERG et al. ein umfangreiches Nachschlagewerk^[31]. International sind die aktuellen WHO-Empfehlungen mit der neuen Einteilung der therapeutisch wichtigen Medikamente in die Gruppen A - D zu nennen, welche aufgrund des späteren Erscheinens erst teilweise in die deutschen Leitlinien übernommen wurden (siehe auch Tabelle 1). Sie soll jedoch als Grundlage weiterer Ausführungen zu Therapieoptionen herangezogen werden^[52]. Neben der besprochenen Standardtherapie wird in beiden Veröffentlichungen ein schrittweises Herangehen an resistente Formen vorgeschlagen, welche die molekulare Charakterisierung der Resistenzen miteinschließt. Ein erwähnenswerter Punkt ist, dass die Zweitrangmedikamente auch aus anderen Gründen, wie Unverträglichkeiten angewendet werden und nicht immer

ein vermindertes Ansprechen des Erregers auf die Erstrangmedikamente voraussetzen^[31]. Bei starken Nebenwirkungen oder Monoresistenzen wird die Standardtherapie um Fluorchinolone wie Levofloxacin, Moxifloxacin und Gatifloxacin ergänzt (Gruppe A)^[52]. Die WHO betont in diesem Zusammenhang noch einmal, dass eine Rifampicin/Rifampin-Monoresistenz einer MDR-Tb gleichzusetzen ist und als solche behandelt werden soll. Bei Polyresistenzen gegen mehrere Standardtherapeutika wird hier der zusätzliche Einsatz von Aminoglykosiden wie Kanamycin, Capreomycin (in Deutschland nicht im Handel^[31]) und Amikacin empfohlen, welche falls nötig durch Streptomycin substituiert werden können (Gruppe B)^[52]. Neu im Vergleich zur älteren Leitlinie der WHO aus dem Jahre 2014 ist die Einteilung von Paraaminosalicylsäure (PAS) als Reserve (Gruppe D3), dafür wurden Clofazimin und Linezolid in Gruppe C, früher Gruppe IV, aufgenommen^[31, 52]. Clarithromycin und andere Makrolide sind ebenso in der Therapie der Tuberkulose nicht mehr vorgesehen. Die letzte Kategorie D beinhaltet zum einen bekannte Medikamente, wie Ethambutol, Pyrazinamid und hochdosiertes Isoniazid (Gruppe D1), als auch die neueren Wirkstoffe Bedaquilin und Delamanid (Gruppe D2). Als Reserve ist hier die Gruppe D3 anzusehen, in welcher sich dann die PAS und β -Lactam Antibiotika wie Meropenem in Kombination mit β -Lactamase-Inhibitoren befinden^[52]. Die Reihe der β -Lactam-Antibiotika schien für lange Zeit uninteressant für die Behandlung der Tuberkulose zu sein, da *Mycobacterium tuberculosis* eine ausgeprägte β -Lactamase Aktivität mit sich bringt und somit die Wirkstoffe unschädlich macht^[53]. Insbesondere durch die Kombination mit Clavulansäure als β -Lactamase-Hemmer ist die Therapie mit dieser Gruppe an Chemotherapeutika wieder interessant

geworden und Gegenstand aktueller Forschung ^[54, 55]. Weiterhin nimmt die WHO eine chirurgische Entfernung medikamentös schwer zugänglicher Infektionsherde in bestimmten individuellen Situationen als Therapieoption neu in ihren Maßnahmenkatalog auf ^[52].

2.2. Resistenzmechanismen und der Einfluss von Effluxpumpen

Die ausgeprägt lipophile Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis* stellt eine natürliche Barriere für unterschiedliche Umwelteinflüsse dar ^[15, 16, 20] (siehe auch Kapitel 2.1.1). Weiterhin reduziert die hohe β -Laktamase Aktivität des Erregers die Wirksamkeit gängiger β -Laktam-Antibiotika ^[53] und die langen Generationszeiten ^[15, 19] bedingen eine ebenso lange Therapiedauer, da viele Arzneistoffe in den aktiven Stoffwechsel der Zellteilung eingreifen und dadurch das Zeitfenster für die Wirkung begrenzt ist ^[60]. Diese und weitere erregerspezifischen Eigenschaften sind jedoch nicht für alle Resistenzen verantwortlich. *Mycobacterium tuberculosis* verfügt nach gegenwärtigem Kenntnisstand über keine

Plasmide, die den horizontalen Gentransfer erlauben würden, d.h. es kann kein Austausch von resistenzvermittelnder DNA stattfinden ^[61, 62]. Die spontane Mutation bestimmter Gene wird daher als Hauptgrund für die Resistenzentwicklung angesehen ^[63] und kann sich z.B. bei ungenügender Therapie oder Therapieabbruch aus zuvor sensiblen Stämmen entwickeln ^[2]. Mittlerweile ist eine ganze Reihe an Genen bekannt, deren Veränderung eine Resistenz bedingen kann. In der Regel handelt es sich hierbei um Abschnitte, die für Targets der Wirkstoffe kodieren oder für solche, die für die Aktivierung der Prodrugs nötig sind ^[58]. In Abschnitt 2.1.3 wurde ein

Tabelle 2: Auflistung bekannter resistenzvermittelnder Gene ausgewählter Wirkstoffe bei *Mycobacterium tuberculosis* ohne Anspruch an Vollständigkeit

Wirkstoff(e)	Gen	Funktion des Gens	Referenz
Isoniazid	<i>inhA</i>	Katalase-Peroxidase	[31], [37]
	<i>KatG</i>	Enoyl-ACP-Reduktase	
Rifampicin	<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase (Untereinheit β)	[47]
Ethambutol	<i>embCAB</i>	Arabinosyl-Transferase	[37]
Pyrazinamid	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	[2, 34]
Levofloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin	<i>GyrA</i>	DNA-Gyrase (Untereinheit A)	[37, 56]
	<i>GyrB</i>	DNA-Gyrase (Untereinheit B)	
Kanamycin, Amikacin, Capreomycin	<i>rrs</i>	16S rRNA	[57]
Streptomycin	<i>rrs</i>	16S rRNA	[57]
	<i>rpsL</i>	S12 ribosomales Protein	
Thioacetazon, Prothionamid	<i>EthA</i>	Monoxygenase	[2]
Cycloserin	<i>alr</i>	Alanin Racemase	[58, 59]
Bedaqualin	<i>atpE</i>	ATP Synthase	[58]
Delamanid	<i>Rv0407</i>	Dehydrogenase	[58]
	<i>Rv3547</i>	Nitroreduktase	

Einblick in die resistenzvermittelnden Prozesse der Standardtherapeutika gegeben, die Auflistung aller weiteren bekannten Mutationen ist hier nicht angedacht. In einer tabellarischen Übersicht (Tabelle 2) sollen verantwortliche Gene ausgewählter Standard und Nicht-Standardtherapeutika dargestellt werden, damit ein grober Überblick gewonnen werden kann. Für mehr Informationen sei für den interessierten Leser auf ein detailliertes, aktuelles Review von NASIRI et al. (2017) hingewiesen ^[58]. Da nicht alle Resistenzen auf die natürliche Beschaffenheit des Erregers und Target-Gen-Mutationen zurückzuführen sind, muss es andere Mechanismen geben, darunter spielen Effluxpumpen eine

bedeutende Rolle ^[63]. Neben einer hohen intrinsischen Aktivität der Pumpen bei *Mycobacterium tuberculosis* ^[64], können Mutationen in den Regulator-Genen für eine Überexpression verantwortlich sein ^[65]. Ebenso ist eine Induktion durch Gabe von Medikamenten beschrieben, die zur Resistenzentwicklung beiträgt ^[65, 66].

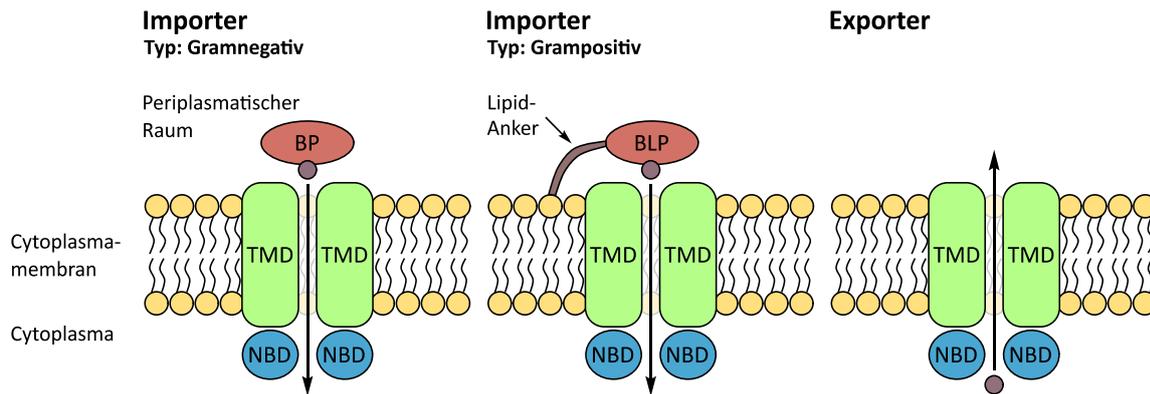
Effluxpumpen - Entdeckung, Einteilung und Bedeutung für die Therapie

Transporter, die Substanzen aktiv aus der Zelle ausschleusen und so für ein geringeres Ansprechen von Wirkstoffen auf Erreger sorgen, wurden schon früh entdeckt. So beschreibt MCMURRY et al. 1980 den aktiven Efflux von Tetracyclin in *Escherichia coli* ^[67]. NIKAIDO postuliert in seinem Artikel aus dem Jahre 1994, dass trotz der Verfügbarkeit immer gezielterer und effizienterer neuer Medikamente gerade weniger substanzspezifische Resistenzmechanismen wie z.B. Effluxpumpen in der künftigen Klinik an Bedeutung gewinnen werden ^[68]. Mittlerweile wird das Auftreten von Efflux-Systemen, deren Klassifizierung und Substratspezifität als auch potentiellen Inhibitoren im Zusammenhang mit der Therapie der Tuberkulose ausgiebig untersucht ^[69–73]. Bakterielle Effluxpumpen werden in 5 Kategorien eingeteilt, darunter ATP-binding cassette (ABC) family, Major facilitator superfamily (MFS), Multidrug toxic compound extrusion (MATE) family, Small multidrug resistance (SMR) family und Resistance-nodulation-division (RND) family ^[74], wobei die MATE Familie für *Mycobacterium tuberculosis* eine untergeordnete Rolle spielt und hier nicht weiter beschrieben wird. Die Einteilung von Transportern zu den einzelnen Familien wird grundsätzlich nach Funktion und Phylogenetik getroffen. Im Vergleich werden Enzyme nur nach ihren katalysierenden Prozessen kategorisiert ^[75]. Die Familien sollen im Folgenden vorgestellt werden und dabei der Bezug zu den jeweiligen Transportsystemen in den Mykobakterien hergestellt werden.

2.2.1. Transporter Familien

2.2.1.a. ATP-binding cassette (ABC)

Diese Transporter-Familie bezieht ihre Energie für den Im- oder Export von Substrat aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) ^[76] und zählt damit zu den primären Transportern, die aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten arbeiten ^[77]. Während prokaryotische Formen Substanzen aus der Zelle hinaus und hinein transportieren können, ist bei Eukaryoten, sowie bei den humanen ABC-Transportern nur der Export bekannt ^[78]. Grundsätzlich bestehen ABC-Transporter aus 4 Proteindomänen, wobei in 2 transmembranäre, hydrophobe Domänen (TMD1 und TMD2) und 2 Nukleotid-bindende, hydrophile Domänen (NBD1 und NBD2) unterschieden wird.



BP: Bindeprotein; BLP: Bindelipoprotein; TMD: Transmembranäre Domäne; NBD: Nukleotid-bindende Domäne; ●: Substrat

Abbildung 11: Schematische Darstellung der verschiedenen ABC-Transporter Typen

Prokaryoten verfügen über Im- als auch Exporter, bei Eukaryoten sind nur Exporter bekannt. Beim gramnegativen Bakterium bindet ein Bindeprotein (BP) im periplasmatischen Raum an das Substrat und entlässt es anschließend am passenden Importer. Grampositive Bakterien benötigen dafür in der Cytoplasmamembran verankerte Bindelipoproteine (BLP). Bei Eukaryoten sind die einzelnen Domänen oft als komplettes Polypeptid kodiert, während bei Prokaryoten meist einzelne Proteindomänen zum Transporter zusammengefügt werden.

In Anlehnung an: BRAIBANT et al., *FEMS microbiology reviews*, **24** (4), 2000, S. 450 ^[79]

Die 4 Domänen können unterschiedlich verknüpft sein, so kann TMD und NBD als ein Polypeptid auftreten, welches zusammen mit einem weiteren Peptid dieser Art einen Transporter bildet. Andererseits können TMD1 und TMD2 als auch NBD1 und NBD2 ein Polypeptid bilden, die in ähnlicher Weise mit ihrem Gegenstück ein funktionales Protein schaffen ^[80]. Das humane, gut untersuchte Efflux-Protein P-GP besteht im Gegensatz aus einem einzigen Polypeptid, in dem alle 4 Domänen vereint sind ^[80]. Bakterielle Import-Systeme vom ABC-Typ benötigen zudem ein Binde-Protein, welches das Substrat im Fall von gramnegativen Bakterien im periplasmatischen Raum aufnimmt und an den zugehörigen Transporter entlässt (Bindeprotein-abhängige Transportsysteme; BP). Im Fall von grampositiven Bakterien werden in der Cytoplasmamembran verankerte Lipoproteine beschrieben, die diese Funktion übernehmen (Bindelipoprotein-abhängige Transportsysteme; BLP) (Abbildung 11) ^[77]. Die beiden TMD's bestehen i.d.R. aus 6 - 10 transmembranären α -Helices, welche die Pore für den Substrattransport bilden. Je nach Konformation und Art des Transporters, kann sie extrazellulär oder intrazellulär von zu transportierenden Molekülen erreicht werden ^[77,80]. Im Vergleich zu den Nukleotid-bindenden Domänen sind diese Proteindomänen nicht stark konserviert, d.h. sie zeigen artspezifische Unterschiede in ihrer Struktur, die aus der Entwicklung substanzspezifischer Transporter resultieren ^[77]. Für den Transport bindet das Substrat vermutlich an spezifische Reste der transmembranären Domänen, welche nicht für alle Proteine aufgeklärt sind. Als Beispiel sei hier wieder P-GP genannt, bei dem viele, strukturell unterschiedliche Substrate einem Efflux ausgesetzt sind, sodass lediglich von einer Binde-Region gesprochen wird und das Protein auch als MDR-Pumpe bezeichnet wird ^[77]. Eventuell sind hier substanzspezifische Sequenzen für die Bindung beschrieben. Die Nukleotid-

bindende Domäne ist ca. 200 Aminosäuren lang ^[80] und enthält mehrere stark bis weniger stark konservierte Regionen ^[81]. Darunter befinden sich das Walker-A-Motiv (auch P-Loop genannt), der Q-Loop, das C-Motiv, Walker-B-Motiv sowie das H-Motiv, auf deren Strukturen hier nicht weiter eingegangen werden soll. Walker-A und -B-Motiv sind 90 - 120 Aminosäurereste voneinander entfernt, was sie von Kinasen unterscheidet und ein Charakteristikum eines ABC-Transporters darstellt. Alle genannten Sequenzen erfüllen Teilaufgaben, die mit der Bindung von ATP, der koordinativen Bindung von Magnesium-Ionen und Wasser Molekülen sowie der Hydrolyse zu ADP verknüpft sind ^[82]. Da dieser Energiegewinnungsprozess für alle Transporter dieser Art gleich ist, besteht auch eine hohe Homologie in den NBD's ^[80]. Der eigentliche Prozess des Stoffübergangs vom intra- zum extrazellulärem Raum und umgekehrt ist bislang nicht endgültig geklärt, es werden verschiedene Modelle diskutiert ^[77, 81, 82]. Allen ist gemeinsam, dass die Dimerisierung der beiden NBD unter Bindung zweier Moleküle ATP stattfindet und damit ein katalytisches Zentrum zur Hydrolyse entsteht. Dadurch soll eine Konformationsänderung der TMD bewirkt werden, die im Resultat das Substrat transportiert. Dabei ist nicht bekannt, ob beide oder nur ein Molekül ATP hydrolysiert werden ^[77, 82]. Ebenso ist die Energie, die aus der Hydrolyse von ATP entsteht laut computer-gestützten Berechnungen um ein Vielfaches geringer, als für eine theoretische Konformationsänderung des Proteins nötig wäre ^[76].

ABC-Transporter in Mycobacterium tuberculosis

Im Jahr 2000 beschrieben BRAIBANT et al. nach umfangreicher Analyse des im Jahre 1998 ^[83] sequenzierten Genoms von *Mycobacterium tuberculosis* 26 rekonstituierte und 11 unvollständige ABC-Transporter ^[79, 83]. Sie zeigten damit unter anderem, dass diese Familie ca. 2,5 % des gesamten Genoms ausmacht, dazu sind es im Vergleich bei *Escherichia coli* ca. 5 % ^[79]. Lediglich die Gene *Rv0194*, *Rc1819c* und *Rc1747* kodieren für einen vollwertigen Transporter, bestehend aus 2 transmembranären und

2 nukleotid-bindenden Domänen. Die Anderen kodieren für einzelne Bestandteile, in etwa einer TMD, einer NBD oder Kombinationen daraus, sodass mehrere Genprodukte zur Ausbildung eines funktionalen Transporters nötig sind ^[79]. BRAIBANT et al. fanden heraus, dass die dafür

Tabelle 3: Beispiele für zusammengesetzte ABC-Transporter nach BRAIBANT et al. ^[79]	
Gen-Name	Mögliche Expressionsprodukte
<i>Rv1218c–Rv1217c</i>	(NBD) ₂ – (TMD1, TMD2)
<i>Rv1273c–Rv1272c</i>	(TMD1, NBD1) – (TMD2, NBD2)
<i>drrA–drrB–drrC</i>	(NBD) ₂ – TMD1 – TMD2
<i>Rv1458c–Rv1457c–Rv1456c</i>	(NBD) ₂ – TMD1 – TMD2
<i>Rv2688c–Rv2687c–Rv2686c</i>	(NBD) ₂ – TMD1 – TMD2

verantwortlichen, zusammengehörigen Abschnitte nur wenige Aminosäure-Sequenzen entfernt im Genom verankert sind ^[79], ein paar Beispiele dazu sind in nebenstehender Tabelle gelistet (Tabelle 3). Für die eingangs erwähnten 11 unvollständigen ABC-Transporter befinden sich keine passenden Gegenstücke in der direkten Nachbarschaft ^[79]. Für ein paar der Transporter sind Regulator-Gene

bekannt, welche die Expression einer Reihe von Transporter und anderen Proteinen beeinflussen können. So ist für *whiB7* bekannt, dass es für eine Reihe von Resistenzen sorgt, welche die Wirkung von Clarithromycin, Erythromycin, Lincomycin, Spectinomycin und Streptomycin betreffen ^[84]. Eventuell werden die Expressionsraten der Transporter-Gene *Rv1258c*, *Rv1473c* und die ribosomale Methyltransferase *Rv1988* durch diesen Regulator modifiziert ^[84]. Ähnliches gilt für *Rv1219c*, welches die Expression der Gene *Rv1218c–Rv1217c* beeinflussen soll ^[85]. Von den 26 beschriebenen Ex- und Importern sind für die Betrachtung der Resistenzmechanismen nur die Exporter von Interesse, da diese wirksame Substanzen aktiv aus der Zelle hinausbefördern. Mehrere dieser Transporter sind im Zusammenhang mit resistenzvermittelnden Prozessen bei gängigen antituberkulösen Medikamenten beschrieben. *Rv0194* zählt zu einem der besser untersuchten Transportern der ABC-Familie. In *M. smegmatis* exprimiert, stellten DANILCHANKA et al. fest, dass dieser Exporter für eine erhöhte minimale Hemmkonzentration (MHK) bei Ampicillin, Vancomycin, Novobiocin und Erythromycin sorgte und postulieren, dass *Rv0194* eine MDR-Pumpe in *Mycobacterium Tuberculosis* darstellt^[86]. Eine andere Quelle bestätigt zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber Isoniazid im Zusammenhang mit diesem Transporter ^[72]. Dieselbe Arbeit von NARANG et al. zeigt, dass ein vermindertes Ansprechen von Isoniazid auf *M. tuberculosis* Stämme ohne eine der bekannten Gen-Mutationen auf eine Hochregulation spezifischer Effluxpumpen zurückzuführen ist ^[72], was die Rolle von MDR-Pumpen für die Resistenzentwicklung betont. *Rv1218c–Rv1217c* exprimieren einen Transporter, welcher sich aus den in Tabelle 3 genannten Bestandteilen zusammensetzen könnte. Eine Überexpression dieser Gene in klinischen *Mycobacterium tuberculosis* Isolaten aus China, welche mindestens für zwei der Standardtherapeutika Resistenzen aufwiesen, zeigten einen Zusammenhang zwischen der Aktivität dieses Effluxpumpen Komplexes und der verminderten Wirksamkeit von Rifampicin und Isoniazid ^[87]. *Rv1218c* alleine scheint zudem für den Export von chemisch unterschiedlichen Substanzklassen wie Novobiocinen, Biaryl Piperazine, Pyridine, Bisanilinopyrimidine, Pyrazole und zum Teil für Pyrazolone eine Rolle zu spielen ^[88]. In dem Zusammenhang sei nochmal auf das zuvor erwähnte, zugehörige Regulator-Gen *Rv1219c* hingewiesen. Weitere Untersuchungen wurden unter anderem für das Operon *rrrA–rrrB–rrrC* getätigt, wobei für *rrrA* und *rrrB* z.B. eine Resistenz durch den Efflux von Tetracyclin, Streptomycin, Ethambutol und Chloramphenicol vermutet wird ^[89]. Da die Proteine der ABC-Familie nicht die einzigen relevanten Transportsysteme in *Mycobacterium tuberculosis* darstellen, wird auf eine Auflistung der restlichen bekannten Mitglieder verzichtet.

2.2.1.b. Major facilitator superfamily (MFS)

Diese Familie stellt die größte und mannigfaltigste Superfamilie der sekundären Transporter dar, welche im Gegensatz zur ABC-Familie ihre Energie aus dem Protonengradienten beziehen ^[90, 91]. Ungefähr ein Viertel aller bekannten Membran-Transport Proteine der Prokaryoten gehören zu dieser

Familie ^[92]. Grundsätzlich kann in 3 verschiedene Arten von Mechaniken unterschieden werden, dazu zählen Uniporter, Antiporter und Symporter. Letzterer transportiert ein Substrat und ein Co-Substrat, z.B. Protonen in dieselbe Richtung, das Gegenstück dazu bildet der Antiporter. Bei einem Uniporter passiert ein Substrat das Transport-Protein alleine (Abbildung 12) ^[90, 93, 94].

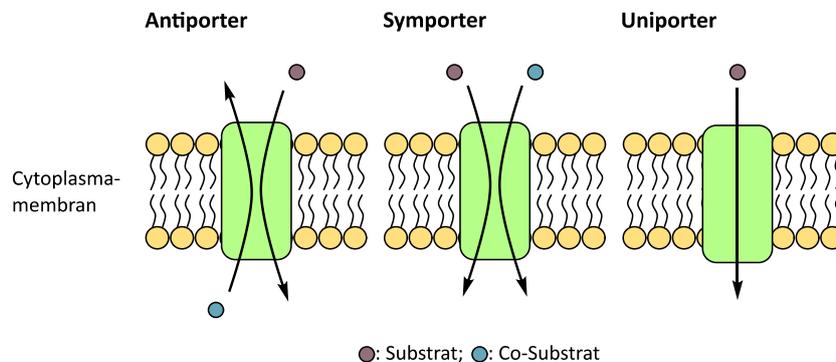


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Antiporter, Symporter und Uniporter

Der Mechanismus impliziert, dass bei einem Uniporter nur entlang des Konzentrationsgefälle des Substrats transportiert werden kann, während die anderen beiden Pumpen die Protonen-motorische Kraft (PMF: proton-motive-force) ausnutzen können, um entgegen des Gefälle zu arbeiten ^[94]. Die räumliche Proteinstruktur scheint für alle 3 Transporter-Arten ähnlich zu sein, sodass grundlegende Eigenschaften der MFS-Familie formuliert werden können ^[94]. In der Regel bestehen die Proteine aus 12 - 14 transmembranären α -Helices (TMS: transmembranäre Segmente), wobei diese in zwei Domänen ähnlicher Größe organisiert sind ^[90, 94, 95]. Wie bei den anderen Familien, verfügen auch die Transporter vom MFS-Typ über bestimmte konservierte Abschnitte, die sie charakterisieren und identifizieren lassen, aber hier nicht weiter spezifiziert werden sollen ^[95]. Ein älteres, akzeptiertes Modell des eigentlichen Transportmechanismus ist das „Rocker-Switch“-Modell (Abbildung 13, Folgeseite). Es geht von einem Protein aus, welches auf der einen Membranseite in einer offenen Konformation vorliegt, während die andere Seite verschlossen ist. Durch Bindung des Substrats an spezifische Aminosäurereste in der offenen Region wird eine Konformationsänderung bewirkt, welche eine Rotation der starren, porenbildenden Domänen auslöst und den gebundenen Stoff auf der anderen Seite freigibt ^[90].

Rocker-Switch Mechanismus

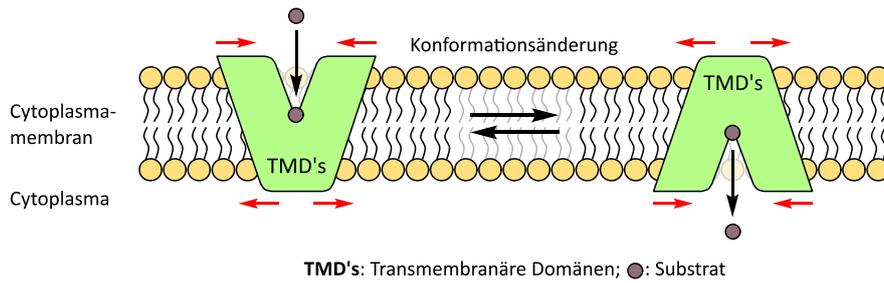


Abbildung 13: Schematischer Ablauf des Rocker-Switch Mechanismus

Substratbindung soll durch Substrat-Aminosäurereste-Interaktion und Salzbrücken-Bildung zur Konformationsänderung (Rotation) führen, die den Stofftransport ermöglicht.

In Anlehnung an: *SLOTBOOM, nature reviews microbiology*, **12** (2), 2014, S. 84 ^[96], mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

Bestätigung des Mechanismus wird in der nachgewiesenen Interaktion von Substrat und Binde-Region und in der Ausbildung spezifischer Salzbrücken gesehen ^[90]. Röntgenstrukturen einiger bekannter Transport-Proteine zeigen jedoch auch einen Zwischenzustand, in dem eine beidseitig geschlossene Konformation mit Einschluss des Substrats auftritt, welche dieses starre Modell nicht vorsieht ^[94]. Neuere Erkenntnisse anhand dieser Röntgenaufnahmen postulieren ein anderes, flexibleres Modell, welches sich besser an die beobachteten Ereignisse angleicht (Abbildung 14).

Clamp-and-Switch Mechanismus

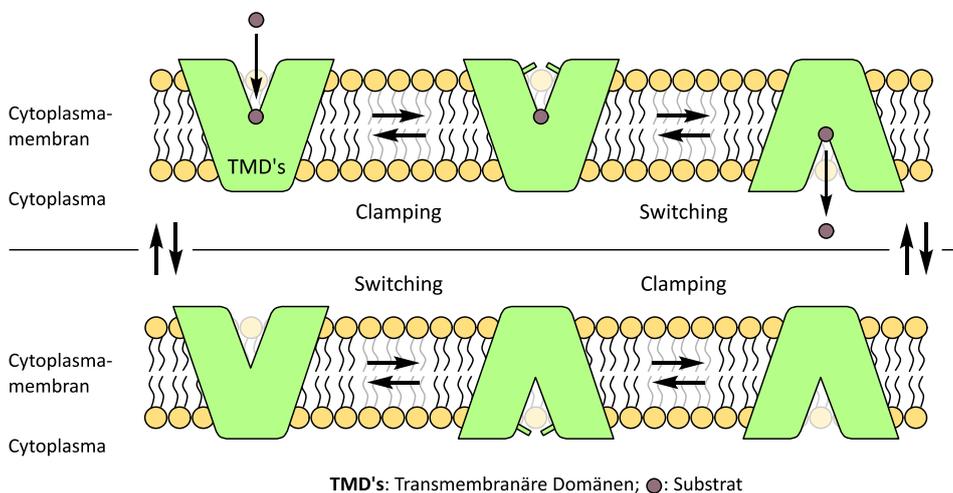


Abbildung 14: Schematischer Ablauf des Clamp-and-Switch Mechanismus

Substratbindung löst die Änderung in eine geschlossene, zu einer Seite ausgerichteten Konformation aus („clamping“). Nach Rotation der Domäne („switching“) wird das Substrat entlassen und der Prozess kehrt sich um. Das Modell ist vereinfacht für einen Uniporter mit symmetrischen Proteinanteilen beschrieben. Die Übertragung auf Sym- und Antiporter ist jedoch möglich, wobei zu beachten ist, dass eine Konformationsänderung nur durch Bindung des Substrats und eines Co-Substrats möglich ist.

In Anlehnung an: *QUISTGAARD et al., nature reviews molecular cell biology*, **17** (2), 2016, S. 129 ^[94], mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

QUISTGAARD et al. stellen dieses als „Clamp-and-Switch“-Mechanismus bezeichnete Modell in ihrer veröffentlichten Arbeit (Jahr 2016) vor. Demnach werden 4 Konformationen beschrieben, welche die

Zwischenzustände miteinschließen, in dem sich die porenbildenden Helices zu einer geschlossenen Struktur verbiegen („clamp“) und denen sich die Rotation der Domänen anschließt („switch“) ^[94].

MFS-Transporter in Mycobacterium tuberculosis

In einer ähnlichen Weise wie die Arbeitsgruppe um BRAIBANT et al., unternahmen ROSSI et al. im Jahr 2002 den Versuch, die heute bekannten Effluxpumpen vom MFS-Typ anhand des Genoms von *Mycobacterium tuberculosis* zu identifizieren ^[95]. Sie beschrieben nach ihren Analysen 16 potentielle MFS-Transporter, welche auch Proteine aufweisen, die aus 9 - 11 und 15 TMS aufgebaut sind ^[95]. Motiv C, eine der konservierten Sequenzen, stellt ein Charakteristikum für Antiporter dar und konnte in allen gefundenen Pumpen zugeordnet werden. Sie postulierten, dass dieses Motiv daher für die Protonen-Bindung essentiell zu sein scheint ^[95]. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand sind für 10 der 16 Transporter erhöhte MHK bei gängigen antituberkulösen Mitteln beschrieben, sodass sie relevante Effluxpumpen darstellen. Die Expressionsprodukte der Gene *rpoB* und *gyrA* stehen in einem gesicherten Zusammenhang mit Resistenzentwicklungen bei Rifampicin und manchen Fluorchinolonen (vgl. Tabelle 2). Bei einem isoliertem MDR-Bakterien-Stamm konnte trotz vorliegender Mutationen dieser beiden Gene unter Einwirken von Rifampicin und Ofloxacin eine erhöhte Expression des Gens *Rv1258c* beobachtet werden, welches für eine Efflux-pumpe codiert ^[97]. Ähnliche Ergebnisse erzielten JIANG et al., wobei ein Stamm mit denselben Mutationen die Überexpression von *Rv1258c* und *Rv1410c* bei Isoniazid und Rifampicin Stress auslöste ^[98]. Auch in der Resistenz gegenüber β -Laktamen und Tetracyclin soll *Rv1258c* involviert sein ^[99, 100]. Früh wurde entdeckt, dass dieses Protein seine Energie aus der protonenmotorischen Kraft bezieht, da der Entkoppler Carbonylcyanid-*m*-chlorpenylhydrazon (kurz: CCCP) die Funktion durch Störung des Protonengradienten einschränkte ^[100]. *Rv1410c*, ein weiteres Mitglied der MFS-Familie, fördert Resistenzen gegenüber Isoniazid und Rifampicin ^[72, 98], sowie Streptomycin und Tetracyclin ^[101]. Es konnte gezeigt werden, dass zur vollen Funktionalität ein Oberflächen-lipoprotein LprG nötig ist ^[102]. Beide sollen zusätzlich für das Überleben des Organismus während der Infektion essentiell sein ^[102]. Eine Gruppe um ZHANGA et al. fand heraus, dass *Rv0191* und 3 weitere Transportproteine anderer Familien Pyrazincarbonsäure, die aktive Form von Pyrazinamid, binden ^[103]. Bei Überexpression dieser Gene konnte die Wirkung von PZA durch Hemmung mit Reserpin und Verapamil wieder hergestellt werden ^[103].

2.2.1.c. Small multidrug resistance (SMR) family

Die Vertreter werden wegen der Aminosäuren von ca. 100 - 140 Kettenlänge in der *small multidrug resistance family* zusammengefasst ^[104]. Sie bestehen i.d.R. aus 4 transmembranären α -Helices mit kurzen hydrophoben Loops, weswegen auch angenommen wird, dass die Proteine nur in oligomeren Strukturen als funktionelle Transporter fungieren können ^[104]. Im Vergleich mit den anderen genannten Familien, ist das natürliche Substratspektrum auf lipophile Substanzen, hauptsächlich quartäre Ammoniumverbindungen begrenzt ^[104]. Wie die Mitglieder der MFS-Familie, beziehen jedoch auch sie ihre Energie aus dem Protonengradienten, was sie zu sekundär aktiven Transportern macht ^[104-106]. Der Mechanismus der Substrattranslation ist hier nicht vollends geklärt, BAY et al. (2008) fassen in ihrem umfangreichen Review über die SMR-Familie 8 verschiedene etablierte Modelle zusammen, deren Beschreibungen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein soll ^[104].

SMR-Transporter in Mycobacterium tuberculosis

Im Zusammenhang mit Resistenzentwicklungen bei *Mycobacterium tuberculosis* spielt diese Protein-Familie eine untergeordnete Rolle. Lediglich ein Transporter ist immer wieder im Fokus diverser Arbeiten, dabei handelt es sich um Rv3065, welcher auch unter der Bezeichnung *mmr* des codierenden Gens bekannt ist ^[105-108]. Eine frühe Veröffentlichung (1998) untersuchte dieses Gen im Zusammenhang mit dem Efflux verschiedener Substanzen und deckte unter anderem für Tetraphenylphosphonium (TTP), Ethidiumbromid, Erythromycin, Acriflavin und Safranin O einen Export-Mechanismus auf ^[108]. Die Hemmung dieses Transporters durch CCCP bestätigt wieder die Zugehörigkeit zu einer Familie, welche die protonenmotorische Kraft als Energiequelle nutzt ^[108]. In den letzten Jahren war *mmr* immer wieder in der Resistenzvermittlung gegenüber antituberkulösen Mitteln beschrieben worden. Dabei zeigten sich teilweise gegensätzliche Beobachtungen (vgl. ^[105, 107] mit ^[106]), die jedoch Mutmaßungen über die Funktion dieses Gens anstellen lassen. So wurde in den ersten beiden Quellen eine Überexpression im Zusammenhang mit anderen Genen nach Einwirken von Isoniazid beschrieben und *mmr* als potentielle Effluxpumpe beschrieben ^[105, 107]. Eine jüngere Arbeit von RODRIGUES et al. testete die Wirksamkeit von INH auf Bakterien-Stämme mit Überexpression, keiner Expression des Gens und dem Wild-Typ H37Rv von *Mycobacterium tuberculosis* und beobachtete keine nennenswerten Unterschiede in den genannten Gruppen ^[106]. Vielmehr wird angenommen, dass der allgemein medikamenteninduzierte Stress auf einen Organismus spezifische Kompensationsmechanismen je nach individuellem Genotyp einleitet ^[106]. Gründe für solche Regulationsprozesse werden für Isoniazid z.B. in den zellwandschädigenden Eigenschaften und der Entstehung toxischer Metabolite gesehen, welche eine erhöhte(n) Aktivität/Stress verschiedenster Gene in Tuberkulose Bakterien auslösen. In diesem Zusammenhang ist für das Verständnis von Resistenzphänomenen unerlässlich, zu unterscheiden, ob ein potentieller Efflux-Transporter

tatsächlich aufgrund des Wirkstoffs oder der begleitenden, oft Zell-schädigenden Effekte hochreguliert wird. Natürlich kann ebenso die Hemmung einer Pumpe, die toxische Nebenprodukte oder entstandene Defekte zum Selbstschutz entfernt, die Wirkung des ursprünglich verabreichten Agens somit verstärken.

2.2.1.d. Resistance-nodulation-division (RND) family

Ihrem hauptsächlichlichen Vorkommen in gramnegativen Bakterien Rechnung tragend, treten die Transporter der RND-Familie immer gepaart mit zwei weiteren Proteinen auf ^[109]. Durch ein *outer membran factor* (OMF) und ein periplasmatisches Protein (*membran fusion protein*: MFP) wird der Export von Substanzen vom Cytosol bis über die äußere Zellwand ermöglicht ^[110]. Für einige Modellorganismen, wie z.B. *Escherichia coli*, ist eines dieser drei Komponenten-Systeme, AcrAB/TolC, aufgeklärt worden ^(111, 110). So bildet AcrB den eigentlichen RND-Transporter, während AcrA das MFP und TolC das OMF bildet ^(111, 110). Versuche mit inaktivierten Genen, welche die beiden zusätzlichen Proteine kodieren, zeigten, dass das System durch Ausfall einer dieser Proteine seine Funktion verliert ^[109]. Es wird diskutiert, dass das Transportsystem seine Substrate sowohl aus dem Zellinneren als auch aus dem Periplasma aufnehmen und ausschleusen kann ^[109]. Die Struktur des RND-Proteins wird i.d.R. aus 12 transmembranären Abschnitten gebildet, als sekundär aktive Systeme, beziehen auch sie ihre Energie aus dem Protonengradienten ^[70, 109–111]. Die Substrate sind häufig lipophile Substanzen ^[109], die mit der Funktion der Zellwand assoziiert werden ^[111]. Eine Arbeitsgruppe um PÉREZ et al. fand heraus, dass das Transporter-Protein zumindest in *Mycobacterium tuberculosis* erst durch Phosphorylierung funktionstüchtig wird, in dem sie in Mutanten, welche die Kinase PknD nicht enthielten, keine Aktivität der Pumpen messen konnten ^[111].

RND-Transporter bei Mycobacterium tuberculosis

In genannter Art sind ca. 13 potentielle Transporter beschrieben ^[70, 83, 110], dabei werden sie alle mit dem Namen „mmpL“ (*mycobacterial membrane proteins, large*) und einer nachstehenden Ziffer benannt. Sie spielen ebenso wie die SMR-Transporter eine untergeordnete Rolle in der Resistenzvermittlung bei *Mycobacterium tuberculosis* ^[110]. MmpL7 (Rv2942) konnte als potentieller Isoniazid Transporter nach Überexpression in *M. smegmatis* erkannt werden, während in gleichem Versuch Ethambutol, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Tetracyclin, Rifampin, Ethidiumbromid, Doxorubicin und Tetraphenylphosphonium nicht beeinflusst wurden ^[70]. Weiterhin wurde von derselben Arbeitsgruppe der Effekt von 3 Effluxpumpen-Inhibitoren getestet, wobei Reserpin und CCCP eine hemmende Wirkung auf die Pumpenaktivität zeigten, während Verapamil wirkungslos blieb ^[70]. Um Isoniazid als Substrat des Transporters nachzuweisen, wurde mit C₁₄-markierter Substanz gearbeitet und der Beweis erbracht ^[70]. Diese Ergebnisse stehen auf dem ersten Blick im Widerspruch mit denen von

DOMENECH et al., welche diese Effekte für Isoniazid nicht feststellen konnten ^[110]. Hier muss differenziert werden, dass letztgenannter Arbeitskreis für die Untersuchung den Modell-Organismus H37Rv nutzte, während PASCA et al. ihre Versuche in *M. smegmatis* durchführten ^[70, 110]. Im Gegensatz zu H37Rv, liegt in *M. smegmatis* das untersuchte Gen und damit auch das natürliche Substrat Phthiocerol-Dimycolat der Pumpe nicht vor, sodass keine konkurrierenden Transportprozesse ausgewertet werden können ^[70]. Die Beurteilung, ob mmpL7 ein wichtiger Faktor in der Resistenzvermittlung gegenüber Isoniazid in klinisch relevanten pathogenen Stämmen darstellt, ist somit nicht einfach zu treffen.

2.2.2. Abschließende Betrachtung und Zusammenfassung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten deutlich geworden ist, kann eine Bezug einer Resistenz zu einer Transporter-Aktivität nicht immer korrekt hergestellt werden. Oft sind die beschriebenen Pumpen in vielerlei Prozesse involviert, welche von der eigentlichen Wirkstoff-Ausschleusung, der Entfernung toxischer Metabolite, kompensatorischen Mechanismen, bis hin zum Export von geschädigtem Zellmaterial durch den Einfluss der antibiotischen Therapie reichen ^[70, 106, 110]. Bei der Frage nach den resistenzvermittelnden Prozessen durch den Einfluss spezifischer Transporter muss zudem berücksichtigt werden, ob die Methode für die Klärung der Problemstellung geeignet ist und ob der untersuchte Stamm genügend Rückschlüsse für eine Verallgemeinerung zulässt. Um einen Überblick über die erwähnten und weiteren, nicht genannten Effluxpumpen zu gewinnen, ist nachfolgende Tabelle bestimmt (Tabelle 4, Folgeseite). Anhand der zitierten Quellen wurde eine Übersicht erstellt, welche die Grundlage für die spätere Beurteilung der Ergebnisse und der Diskussion bieten soll. Dabei soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die genannten Wirkstoffe und Transporter in den meisten Fällen lediglich im Zusammenhang mit dem Phänomen einer Resistenz beschrieben wurden.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung beschriebener und weiterer Effluxpumpen

Familie	Rv-Nummer (Gen-Name)	Im Zusammenhang mit einer Resistenz beobachtete Wirkstoffe	Bekannte Inhibitoren
ABC	<i>Rv0194</i>	Isoniazid ^[72] , β -Laktame ^[86] , Streptomycin ^[86] , Ampicillin ^[86]	Reserpin ^[86]
	<i>Rv0933 (pstB)</i>	Isoniazid ^[72] , Rifampicin ^[117]	
	<i>Rv1218c–Rv1217c</i>	Isoniazid ^[87, 99] , Rifampicin ^[87] , β -Laktame ^[99]	
	<i>Rv1458c–Rv1457c–Rv1456c</i>	Isoniazid ^[116] , Rifampicin ^[116] , Streptomycin ^[116] , Ethambutol ^[116]	
	<i>Rv2688c–Rv2687c–Rv2686c</i>	Ciprofloxacin ^[115]	Reserpin ^[115] , CCCP ^[115] , Verapamil ^[115]
	<i>Rv2936–Rv2937–Rv2938 (drrA–drrB–drrC)</i>	Tetracyclin ^[89] , Streptomycin ^[89] , Ethambutol ^[89] , Rifampicin ^[112] , Isoniazid (drrA) ^[112]	Reserpin ^[89] , Verapamil ^[89]
	<i>Rv1819c (bacA)</i>	Isoniazid ^[98]	
	<i>Rv1273c–Rv1272c</i> <i>Rv2136c</i>	Isoniazid ^[72] Isoniazid ^[65]	
MFS	<i>Rv1634</i>	Isoniazid ^[72, 112] , Rifampicin ^[112] , Ciprofloxacin ^[91]	
	<i>Rv1250</i>	Isoniazid ^[72]	
	<i>Rv1258c (Tap-like)</i>	Isoniazid ^[98] , Rifampicin ^[69, 97, 98] , Ofloxacin ^[97] , Tetracyclin ^[100]	CCCP ^[100] , Verapamil ^[69]
	<i>Rv1410c (P55)</i>	Isoniazid ^[72, 98] , Rifampicin ^[98] , Streptomycin ^[101] , Tetracyclin ^[101]	Verapamil ^[72] , CCCP ^[72]
	<i>Rv2846c (efpA)</i>	Isoniazid ^[72, 112, 114]	
	<i>Rv0849</i>	β -Laktame ^[99]	Verapamil ^[118]
	<i>Rv2333c (stp)</i>	Tetracyclin ^[95]	
	<i>Rv0191</i> <i>Rv1877</i>	Pyrazincarbonensäure/Pyrazinamid ^[103] Tetracyclin ^[114] , Erythromycin ^[114] , Novobiocin ^[114] , Kanamycin ^[114]	Verapamil ^[103] , Reserpin ^[103]
<i>Rv2459 (jefA)</i>	Isoniazid ^[112, 113] , Ethambutol ^[113]		
SMR	<i>Rv3065 (Mmr)</i>	Isoniazid ^[105–108] , Erythromycin ^[108] , Acriflavin ^[108]	Verapamil ^[106] , CCCP ^[106]
RND	<i>Rv2942 (mmpL7)</i>	Isoniazid ^[70]	Reserpin ^[70] , CCCP ^[70]

Abkürzungen: CCCP: Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon

2.3. Inhibitoren von Effluxpumpen und deren Entwicklungsstand

In diesem Kapitel sollen die Ansätze der Hemmung, die derzeit diskutierten Substanzen im Zusammenhang mit der ergänzenden Therapie der Tuberkulose, sowie der Bezug zur vorliegenden Arbeit vermittelt werden.

2.3.1. Ansätze der Effluxpumpen-Hemmung und der Einsatz von Inhibitoren

Inhibitoren bezeichnen grundsätzlich Substanzen, die ganz oder teilweise hemmend auf einen Prozess wirken ^[119]. Dabei können im biochemischen Sinne enzymatische Reaktionen, Rezeptoren und Transportsysteme reversibel oder irreversibel beeinflusst werden ^[120]. Besonders die Hemmung der Pumpenaktivität soll hier im Vordergrund stehen und dabei werden folgende, in Abbildung 15 genannten Ansätze diskutiert ^[121, 122].

Ansatzpunkte inhibitorischer Substanzen an bakteriellen Transportern

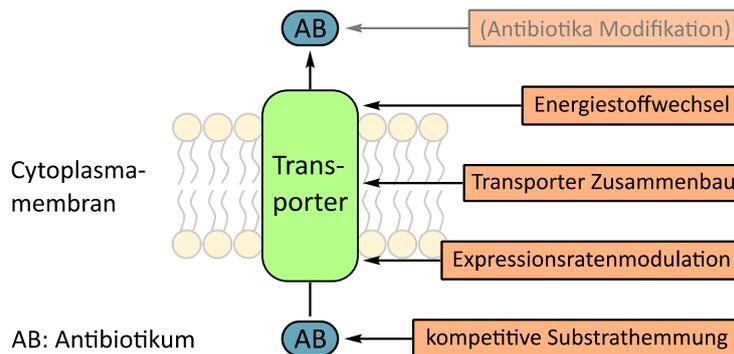


Abbildung 15: Ansatzpunkte inhibitorischer Substanzen an bakteriellen Transportern

Die Modifikation von bereits etablierten Wirkstoffen mit dem Ziel, Effluxpumpen zu umgehen, seien hier erwähnt, stellen aber keine direkten Inhibitoren dar und sind daher nicht Gegenstand der Diskussion. Der Mechanismus der unter anderem in dem vorangegangenen Kapitel und der in Tabelle 4 genannten Inhibitoren ist nicht endgültig geklärt und da ein Effluxpumpen-Inhibitor implizieren würde, dass hier konkurrierende und nicht-konkurrierende Substratbindungsprozesse am Transporter stattfinden, sollte besser allgemein von Effluxpumpen-Modulatoren gesprochen werden. Die Bezeichnung Effluxpumpen-Inhibitor (EPI) hat sich jedoch durchgesetzt.

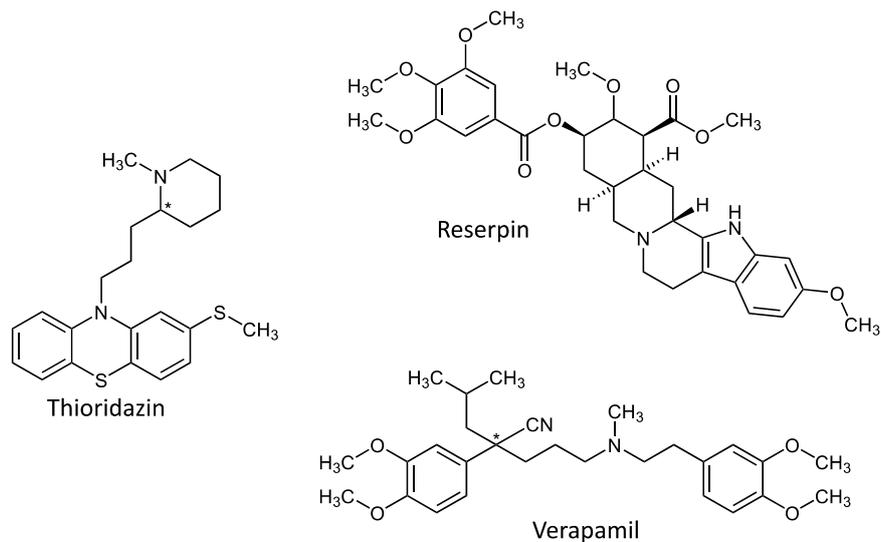


Abbildung 16: Diskutierte Inhibitoren Verapamil, Thioridazin und Reserpin

Derzeit diskutierte Inhibitoren im Zusammenhang mit der Therapie der Tuberkulose sind Verapamil ^[69, 115, 123], Reserpin ^[115, 123, 124] und die Phenothiazine, darunter insbesondere Thioridazin ^[125–129] (Abbildung 16). Das in der vorangegangenen Tabelle erwähnte Carbonylcyanid-*m*-Chlorophenylhydrazon (CCCP) stellt eine Substanz dar, welche aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften ausschließlich im Labor genutzt wird und voraussichtlich keine klinische Verwendung erfahren wird ^[121]. Als Entkoppler der protonenmotorischen Kraft (PMF) kann sie zu den Stoffen gezählt werden, die den Energiestoffwechsel und damit die Funktion verschiedener davon abhängiger Transporter negativ beeinflussen, ebenso sind direkte Effluxpumpen-hemmende Eigenschaften berichtet worden ^[115]. Da die toxischen Effekte mit Schädigung der Zellwand bis hin zum Zelltod die Vitalität des zu testenden Organismus beeinträchtigen, ist eine qualitative Aussage zu synergistischen Effekten in Kombination mit Antibiotika schwer zu treffen ^[121]. Das Phenylalkylamin Verapamil ist ein Calcium-Kanal-Blocker, der in der Behandlung von Herz-Kreislauf Erkrankungen wie der Hypertonie eingesetzt wird ^[130]. Es ist ein bekannter Inhibitor von humanem P-GP ^[129] und zeigt auch bei Mykobakterien eine Wirkung in der Hemmung von Effluxpumpen, was nicht zuletzt durch die Verwandtschaft prokaryotischer und eukaryotischer Transporter erklärt werden kann ^[131]. Eine Arbeit von AMARAL et al. vergleicht bakterielle und humane MDR-Transporter und nennt die partielle Homologie der Membranproteine als Gründe für vergleichbare Hemmstoff- und Substratprofile ^[131]. In einer Versuchsreihe von MACHADO et al. wurde in einem Ethidiumbromid-Essay, welcher zur Beurteilung der Effluxpumpen-Aktivität dient, nachgewiesen, dass sowohl Verapamil, als auch Flupenthixol, Thioridazin, Chlorpromazin und Haloperidol die Akkumulation von Ethidiumbromid in der mykobakteriellen Zelle fördern, was einer Hemmung bestimmter Transporter gleichkommt ^[132]. Wie die Literatur aus Tabelle 4 belegt, existieren eine Reihe Nachweise für eine inhibitorische oder modulierende Wirkung von Verapamil ^[69, 72, 89, 103, 106, 115, 118]. Eine andere, praxisnähere Arbeit von GUPTA

et al. untersuchte die Therapie der Lungentuberkulose in einem Mausmodell (C3HeB/FeJ) unter der Standardmedikation und unter Hinzunahme von Verapamil ^[69]. In einem *microplate Alamar blue assay* bestimmten die Autoren zunächst die minimale Hemmkonzentration des Calcium-Kanal Blockers ^[69]. Um die Eigenwirkung gering halten zu können, wurde die Hälfte der MHK von Verapamil in Kombination mit den Standards eingesetzt. Hier konnte beispielsweise für Rifampicin im Vergleich mit der alleinigen Gabe der doppelte Wirkstoffspiegel im Bakterium beobachtet werden, der auf den synergistischen Effekt mit Verapamil zurückgeführt wird ^[69]. In der Zusammenfassung wird beschrieben, dass im Vergleich mit der Standardtherapie die Gesamttherapiedauer bei kombinierter Verabreichung um 2 Monate von 6 auf 4 Monate reduziert werden konnte ^[69]. Wie vorangegangene zitierte Arbeiten belegen, sind neben den Effluxpumpen hemmenden Eigenschaften auch bakterizide Wirkungen erreichbar, welche jedoch außerhalb jeglicher therapeutischen Dosierung liegen und mit toxischen Nebenwirkungen verbunden sind. Worin genau die inhibitorischen oder modulierenden Effekte von Verapamil, Thioridazin und auch anderen Ionen-Kanal-Blockern liegen, versuchte im Weiteren die Arbeitsgruppe um MACHADO et al. zu ergründen ^[132]. In niedrigeren Konzentrationen hemmen diese Substanzen unter anderem durch die Calcium-Kanal Modulation davon abhängige ATP-Syntheseprozesse, welche als Energielieferanten für die Funktion bestimmter Proteine, darunter Transporter, essentiell sind ^[125, 132]. In ihrer Versuchsanordnung konnte im Mykobakterium nach einem Tag ein Absinken der ATP-Konzentration unter Einfluss der Inhibitoren gemessen werden ^[132]. In einem weiteren Essay untersuchten sie den Effekt der Stoffe auf intrazelluläre, phagozytierte Bakterien und stellten fest, dass die Ionen-Kanal blockierenden Eigenschaften zu einer Azidifizierung des Lysosoms führte und damit indirekt eine immunmodulierende Wirkung bei Makrophagen auslöste. Die vorher nicht dazu befähigten Immunzellen konnten dadurch den Erreger erfolgreich abtöten ^[132]. Es kann zusammengefasst werden, dass von den betrachteten Substanzen Verapamil und das Phenothiazin Thioridazin durch ihre Ionen-Kanal-beeinflussenden Effekte den Energiestoffwechsel stören, eine inhibitorische Wirkung am Transporter selbst kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In einer weiteren Arbeit wurde das bezüglich der Calcium-Kanal blockenden Eigenschaften weniger aktive Isomer R-Verapamil und der Metabolit Norverapamil in ähnlicher Weise getestet und kein nennenswerter Unterschied zum Verapamil festgestellt ^[133]. Die zu erwartenden geringeren Nebenwirkungen solcher Abwandlungen sollten den Therapieverlauf begünstigen und in Betracht gezogen werden. Reserpin zählt zur Gruppe der Antisymphathotonika und wird in Ausnahmefällen aufgrund seiner Noradrenalin-speicher-modulierenden Wirkung als blutdrucksenkendes Mittel eingesetzt, wobei die Wirkung auf der Hemmung einer humanen Mg²⁺ abhängigen ATPase beruht ^[130]. Wie auch Verapamil hemmt es das humane P-GP ^[129]. Im Zusammenhang mit *Mycobacterium tuberculosis* sind vergleichbare inhibitorische und immunmodulierende Ereignisse beschrieben worden, welche hier nicht weiter diskutiert werden sollen ^[70, 86, 89, 103, 115]. Weiterhin wird versucht, die

Expression der verantwortlichen Transporter zu hemmen, in dem z.B. spezifische Regulatorproteine ins Visier genommen werden ^[121, 122]. Die Idee der Störung der Transporter Zusammensetzung hat ihren Ursprung in gramnegativen Bakterien, bei denen Mehrkomponenten-Proteine ein Kanal-System über die ganze Zellumhüllung ausbilden, z.B. AcrAB/TolC vom RND-Typ ^[110, 121, 134]. Letztere beiden Ansätze sind bei Mykobakterien nach aktuellem Kenntnisstand nicht im Fokus der Forschung. Es kann festgehalten werden, dass die Effektivität von Antituberkulotika durch Effluxpumpen beeinflusst wird und diese eine Rolle in der Resistenzentwicklung spielen. Der positive Einfluss von Hemmstoffen ist in vielen Arbeiten belegt, muss aber noch durch praxisnähere Studien unterstützt werden und die Anwendung in eine Form gelangen, die klinisch nutzbar ist. Damit eine Therapie von einem künftigen Einsatz der EPI's profitieren kann, muss weiter erörtert werden, zu welchem Grad die einzelnen Medikamente von Efflux betroffen sind. Das Nebenwirkungsprofil der Inhibitoren sollte, falls möglich, geringgehalten werden und der Mehrwert einer Ko-Administration z.B. in der Reduzierung der Therapiedauer belegt sein.

2.3.2. Der Einsatz von Dihydropyridinen (DHP)

Zunächst stehen Dihydropyridine nicht im Vordergrund der Forschung neuartiger Wirkstoffe, die eine Therapie der Tuberkulose unterstützen könnten. Als Calcium-Antagonisten oder treffender Calcium-Ionen-Kanal Blocker wird zumindest die Verbindung zum wirkungsverwandten, im vorherigen Abschnitt diskutiertem Verapamil hergestellt ^[49, 130]. Nach der allgemeinen Charakterisierung von Dihydropyridinen soll in den darauffolgenden Abschnitten der Zusammenhang zum übergeordneten Thema hergestellt werden.

Charakterisierung von Dihydropyridinen und deren therapeutischer Einsatz

Grundstruktur der nach ihr benannten Klasse von Wirkstoffen bildet der zentrale 1,4-Dihydropyridin-Ring. Erstes bekanntes Derivat mit therapeutischem Nutzen ist das Nifedipin (Abbildung 17) ^[19, 49, 130].

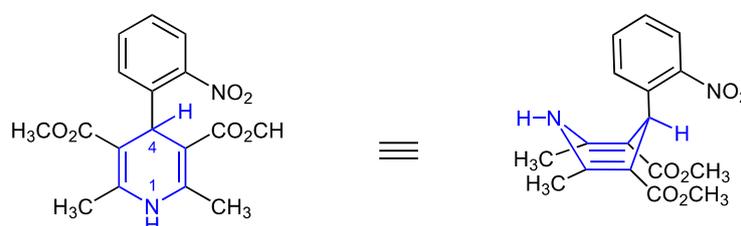


Abbildung 17: Nifedipin mit Hervorhebung der markanten 1,4-DHP Grundstruktur

Der zentrale Ring liegt in der Wannenkongformation vor (Abbildung 17, rechts), der Aryl-Rest an C-4 in einer axialen Stellung, die unter anderem durch die Ester an C-3 und -5 und den Substituenten am Phenylrest bedingt wird ^[130, 135]. Wie die Arbeit von GOLDMANN et al. 1991 hervorhebt, sind es die sterischen Anordnungen, die maßgeblich zum therapeutischen Effekt beitragen, weniger der zentrale

namensgebende Körper ^[135]. Durch Inversion am DHP-Ring kann der 4-Aryl-Ring in einer axialen oder äquatorialen Stellung vorliegen. Bei Einführung asymmetrischer Ester-Gruppen entsteht ein Chiralitätszentrum am C-4. Frühe Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass die Stellung des Aryl-Restes und die gebildeten Enantiomere durch verschiedene Ester maßgeblich die Aktivität am Kanal beeinflussen ^[135]. So führten Variationen des oben dargestellten Grundkörpers zu Derivaten, die umgekehrt Calcium-agonistische Effekte aufwiesen, welche aber keine therapeutische Verwendung fanden ^[135]. Alle Dihydropyridin-Derivate, die derzeit verwendet werden, sind mit Ausnahme des Nifedipins chiral ^[49]. Wie eingangs erwähnt, gehören die DHP's neben den Phenylalkylaminen wie Verapamil und dem Benzothiazethin Diltiazem zu den Calcium-Ionen-Kanal Blockern, was ihrem Einsatz in der Behandlung von Herz-Kreislauf Erkrankungen, insbesondere der Hypertonie gerecht wird ^[19, 49, 130]. Die drei genannten Typen unterscheiden sich neben der chemischen Struktur in ihren Präferenzen für unterschiedliche Calcium-Kanäle ^[19, 130]. Die Dihydropyridine weisen eine höhere Beteiligung bei der Hemmung von Transportern des L-Typs als die Nicht-Dihydropyridine auf ^[130]. Durch den Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle, welche unter physiologischen Umständen nur einen Bruchteil der extrazellulären Konzentration ausmachen, werden davon abhängige Prozesse aktiviert ^[19, 49]. Darunter leistet die Verringerung der Kontraktilität glatter Gefäßmuskelzellen einen wesentlichen Beitrag zur dilatierenden, blutdrucksenkenden Wirkung und begründet den Einsatz der Wirkstoffe ^[19, 49, 130]. Alle Dihydropyridine werden über das Cyp-III A4 System verstoffwechselt, was bei der Behandlung bzgl. potentieller Arzneimittelinteraktionen berücksichtigt werden muss ^[49]. So müssen DHP-Dosen unter Therapie mit Rifampicin, einem Cyp-III A4 Induktor, angepasst werden, da sonst subtherapeutische Wirkstoffspiegel den blutdrucksenkenden Effekt gefährden ^[49]. Die Wirkung und der Bindungsmodus der Dihydropyridine an Kanälen vom L-Typ ist weitestgehend aufgeklärt. Der Calcium Transporter besteht aus mehreren Einheiten, welche als α_1 , α_2 , β , γ und δ bezeichnet werden, wobei alle aktiven Substanzen an der α_1 -Untereinheit angreifen ^[19, 130]. Die Bindung sorgt für eine Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit und infolgedessen zu einem geringeren Calcium-Einstrom ^[19, 49, 130]. Als wichtige Struktur Merkmale für die Anlagerung an die Untereinheit sind eine freie NH-Gruppe und eine strukturell kleinere Ester Funktion aufgrund der Interaktion mit bestimmten Aminosäuren der Bindungstasche und einer variablen. Daneben sind Elektronenakzeptoren am 4-Phenylring aus sterischen Gründen in *ortho*- oder *meta*-Stellung präferiert ^[130]. Die aus dem Bindungsmodus gewonnenen Erkenntnisse führten zu der Entwicklung weiterer Dihydropyridine nach dem Vorbild des Nifedipins mit verbesserten Wirkeigenschaften. Darunter seien beispielhaft Nitrendipin, Felodipin und Isradipin der sogenannten zweiten mit asymmetrischen Ester-Funktionen und Amlodipin sowie Lercanidipin der dritten Generation mit zusätzlich basischem Charakter in den Seitenketten genannt ^[19, 49, 130] (Abbildung 18).

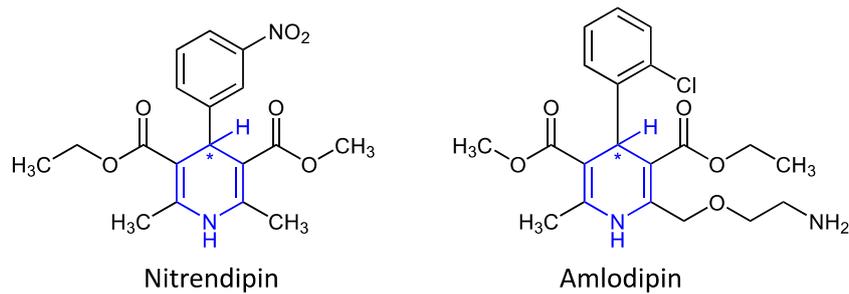


Abbildung 18: Nitrendipin und Amlodipin als Vertreter der 2. und 3. Generation

Zusammenhang zum übergeordneten Thema - Modulation von Effluxpumpen

Wie auch für Verapamil, sind für Dihydropyridine verschiedenster Struktur P-GP modulierende Eigenschaften beschrieben. So untersuchte schon früh ein Arbeitskreis um YOSHINARI et al. (1989) den Effekt von Dihydropyridinen auf resistente murine Leukämie-Zellen (P388) und beobachtete eine Wiederherstellung der Wirkung der Zytostatika Adriamycin und Vincristin^[136], was auf die Modulation von Effluxpumpen schließen lässt. Ausgehend von Niludipin wurden hier Modifikationen an der 2,6-Position des Rings durchgeführt^[136]. Im Jahr 1998 erfolgte eine Studie mit Strukturabwandlungen des C-4 Restes, wobei die Ester-Funktion als Konstante durch einen 3,5-bispyridyl Propylester ersetzt wurde^[137]. Neben des ebenso begünstigenden Effektes auf die Wirkung von Vincristin und Doxyrubicin an resistenten P388-Zellen wurden Calcium-Kanal betreffende Eigenschaften der Derivate analysiert, worin eine zunehmende strukturelle Entfernung von der Aryl-Struktur an Position 4 und die komplexe Ester-Struktur mit einer Abnahme der Ionen-Kanal Sensitivität einhergehen^[137]. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den eingangs erwähnten Struktur-Wirkungs Beziehungen^[130]. ZHOU et al. entwickelten 6 Jahre später weitere Dihydropyridin- und Pyridin-Derivate und testeten ihre Effekte auf die P-GP überexprimierende, resistente Zell-Linie MCF-7/adr^[138]. Asymmetrische Ester-Funktionen, eine 2,6-Dimethyl-Struktur und verschieden substituierte 4-Phenyl-Reste charakterisieren diese Verbindungen^[138]. Alle diese Arbeiten betonen, dass die Calcium-Kanal-Aktivität nicht an der P-GP modulierenden Wirkung beteiligt zu sein scheint, eine Reduzierung dieses Nebeneffektes ist aus therapeutischer Sicht jedoch wünschenswert^[136–139]. Der Zusammenhang zwischen Ionen-Kanal beeinflussenden Therapeutika wie Verapamil und Thioridazin und einer möglichen immunmodulierenden und nicht auszuschließenden Effluxpumpen hemmenden Eigenschaft auf Mykobakterien wurde im vorherigen Abschnitt diskutiert. Ebenso ist es anerkannt, dass Homologien in Proteinsequenzen der Transportsysteme Rückschlüsse auf vergleichbare Hemm- und Substratprofile zwischen Eukaryoten und Prokaryoten ziehen lassen. Der Gedankengang, Dihydropyridine bei resistenten Mykobakterien zu testen ist nicht neu und zum Einstieg in diese Thematik sollen bereits vorhandene Arbeiten dazu kurz zusammengefasst werden.

Dihydropyridine als antituberkulöse Mittel?

Im Jahre 2001 entwickelte ein Arbeitskreis um DESAI et al. Derivate von Dihydropyridinen mit Veränderungen in Position 3 und 5 des zentralen Ringes und zeigte antituberkulöse Aktivität dieser Verbindungen auf ^[140]. Statt der Carboxylester wurden hier Carboxamide mit verschiedenen Phenyl-Substituenten eingeführt ^[140]. Elektronenziehende Gruppen an der aromatischen Endgruppe beeinflussen die Stabilität der Säureamide, deren enzymatische Hydrolyse im Bakterium zum eigentlichen Agens führen soll. Ebenso wird die Calcium-Kanal-Aktivität durch die Veränderung der Ester verringert ^[140, 141]. Dieses Grundgerüst griffen später noch weitere Arbeiten auf, wobei zusätzlich eine Reihe neuer Substituenten an Position 4 des DHP-Ringes vorgestellt wurden ^[141–146]. MAHNAM et al. (2012) postulierten ein potentielles Target, in dem sie aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der synthetisierten Dihydropyridine mit NADH den Enoyl-Acyl-Carrier InhA ins Visier nahmen ^[141]. Im Affinitäts-Essay erzielten deren Carboxamide und zugehörige Ester sowie die Carbonsäuren miteinander vergleichbare Hemmeffekte. Dabei betonten sie, dass dieses Enzym nur der Anfang einer Reihe von Testungen darstellt, und daneben durchaus andere Zielstrukturen vorliegen können ^[141]. Bei den Substitutionen der Position 4 haben sich neben unterschiedlichen Arylen auch Heteroaryl-Strukturen durchgesetzt ^[142, 143, 145–148], darunter das 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol ^[148]. Wohingegen alle genannten Arbeiten NH-unsubstituierte Verbindungen thematisieren, gibt es auch wenige, welche die Synthese und antimykobakterielle Eigenschaften von N-Aryl substituierten Dihydropyridinen beschreiben. Dazu zählen eine Arbeit von MANVAR et al. (2010) und SONALI et al. (2013) ^[144, 149]. Letztere Arbeit beschreibt Ethyl-, die andere Methyl-Ester in Position 3 bzw. 5, dazu bei beiden verschieden substituierte Phenyl und N-Phenyl-Reste. Die Darstellung erfolgte durch eine „Eintopfsynthese“ aus aromatischem Aldehyd, Anilin und Ethyl- bzw. Methylacetoacetat ^[144, 149]. Wie all diese Arbeiten nahelegen sollen, gibt es Hinweise und Belege für eine antituberkulöse Wirkung von Dihydropyridinen, wobei ein bestimmtes Target bislang nicht identifiziert werden konnte. Eine Zusammenfassung der erwähnten Referenzen und deren Substanzen liefert Abbildung 19 auf der Folgeseite.

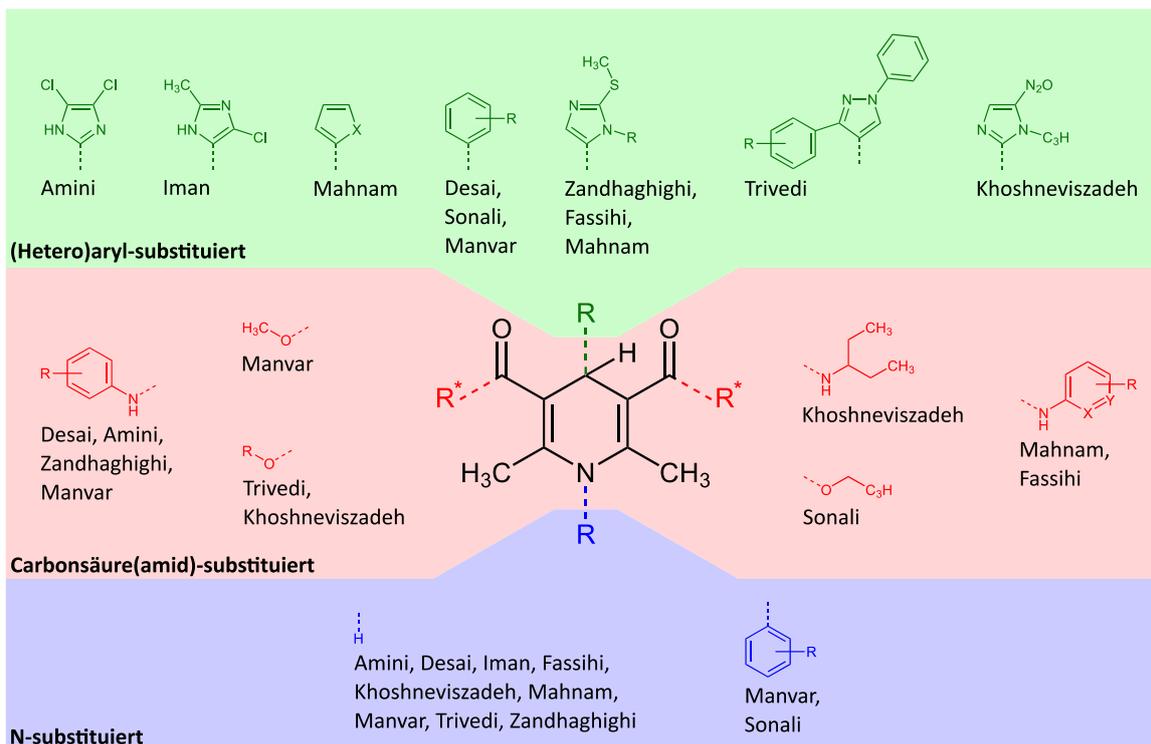


Abbildung 19: Beschriebene Dihydropyridine mit antituberkulotischem Potential

Dihydropyridine, welche bisher auf ihre antituberkulotische Aktivität getestet wurden, ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Es wurden überwiegend symmetrische Ester-Funktionen (R*) verwendet.

Quellen in alphabetischer Reihenfolge: Amini et al. (2008) ^[142], Desai et al. (2001) ^[140], Fassihi et al. (2009) ^[143], Iman et al. (2015) ^[145], Khoshneviszadeh et al. (2009) ^[147], Mahnam et al. (2012) ^[141], Manvar et al. (2010) ^[144], Sonali et al. (2013) ^[149], Trivedi et al. (2011) ^[148], Zandhaghighi et al. (2017) ^[146].

2.4. Zielstellung der Arbeit

In der Therapie bakterieller Infektionen spielt die Resistenzentwicklung eine an Bedeutung zunehmende Rolle für das Versagen gängiger Antibiotika ^{[2], [6-8]}. Das Entwickeln von Inhibitoren oder Modulatoren der unter anderem dafür verantwortlichen Effluxpumpen bietet hierbei einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Behandlung mit bereits etablierten und effektiven Medikamenten ^{[69], [150]}. Viele Arbeitskreise beschäftigen sich derzeit mit mykobakteriellen EPI's, wobei deren Angriffspunkte und Spezifitäten nicht genau bekannt sind ^{[69-71], [86], [151-153]}. Aufgrund von Homologien bakterieller und humaner Transportproteine und der Erkenntnis, dass Inhibitoren des humanen P-GP (ABCB1) auch artverwandte prokaryotische Pumpen hemmen können, ist der Gedanke gereift, ihren Einsatz in der Therapie der resistenten Formen der Tuberkulose zu evaluieren ^[131]. Der Einsatz von Verapamil, Thioridazin, Reserpin und anderen Vertretern als strukturell nicht verwandte ABCB1-Hemmer und deren ebenso erwiesene Eigenschaft als antibakteriell wirkende Substanzen begründet eine Beteiligung von Effluxpumpen. Wie die vorangegangenen Abschnitte dargelegt haben, zeigen Calcium-Ionen-Kanal Blocker wie die Dihydropyridine ebenfalls eine P-GP Hemmung. Durch Ersetzen der Ester-Gruppierung an Position 3 und 5 mit Carboxamiden unterschiedlichster Struktur gelang man zu vielversprechenden Verbindungen, darunter haben sich vom Pyrazol abgeleitete Grundkörper an C-4 bewährt. Durch die Modifikationen konnte eine Minderung der Calcium-Kanal Aktivität erzielt werden, welche aus therapeutischer Sicht wichtig für die Reduktion von Nebenwirkungen ist. Für Dihydropyridine, die am Stickstoff des zentralen Ringes substituiert sind, liegen nur wenige Daten vor. Nach derzeitigem Kenntnisstand beschreiben zwei Arbeiten die antimykobakterielle Aktivität von N-Aryl-Verbindungen mit Ethyl- und Methyl-Estern an Position 3 und 5 am Tuberkulose Laborkeim H37Rv. An diesem Punkt soll die vorliegende Arbeit mit der Synthese von zwei Reihen neuartiger 1,4-Dihydropyridine abgebildeter Substitutionsmuster anknüpfen (Abbildung 20). Die Aktivität der Verbindungen soll alleine und in Kombination mit antituberkulösen Wirkstoffen getestet und ausgewertet werden. Dazu soll vorab das Ausmaß ihrer Effluxpumpen-modulierenden Eigenschaften bei P-GP bestimmt werden.

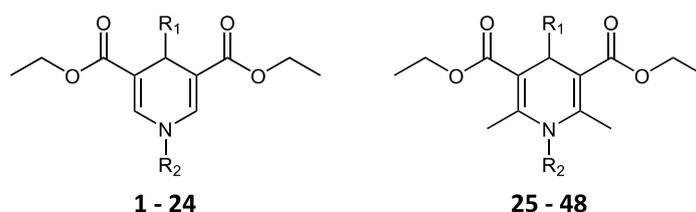


Abbildung 20: Zielverbindungen der vorliegenden Arbeit

2,6-unsubstituierte (**1 - 24**) und 2,6-dimethylsubstituierte (**25 - 48**) 1,4-Dihydropyridine, wobei R₁ und R₂ unterschiedliche, hier nicht weiter aufgeführte, aromatische Reste darstellen.

3. Synthese und Strukturaufklärung der Verbindungen

3.1. Darstellung der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine

3.1.1. Diskussion zum Mechanismus der Synthese

Die HANTZSCH-Dihydropyridin-Synthese geht von der Reaktion einer C-H-aziden Verbindung wie Ethylacetoacetat mit einem Amin und Aldehyd aus. Diese Reaktionen führen jedoch zu 2,6-substituierten 1,4-Dihydropyridinen ^[154, 155]. Ziel dieser Arbeit bestand darin, sowohl 2,6-Dimethylsubstituierte, als auch 2,6-unsubstituierte Derivate als Testkandidaten herzustellen. CHEKAVICHUS et al. (1982) beschreibt in einer seiner Arbeiten eine Synthese, die Ethylpropiolat, eine α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindung, mit Arylamin und aromatischem Aldehyd in Eisessig umsetzt um die gewünschten unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine zu erhalten ^[156]. Folgender Reaktionsweg (Abbildung 21) kann angenommen werden.

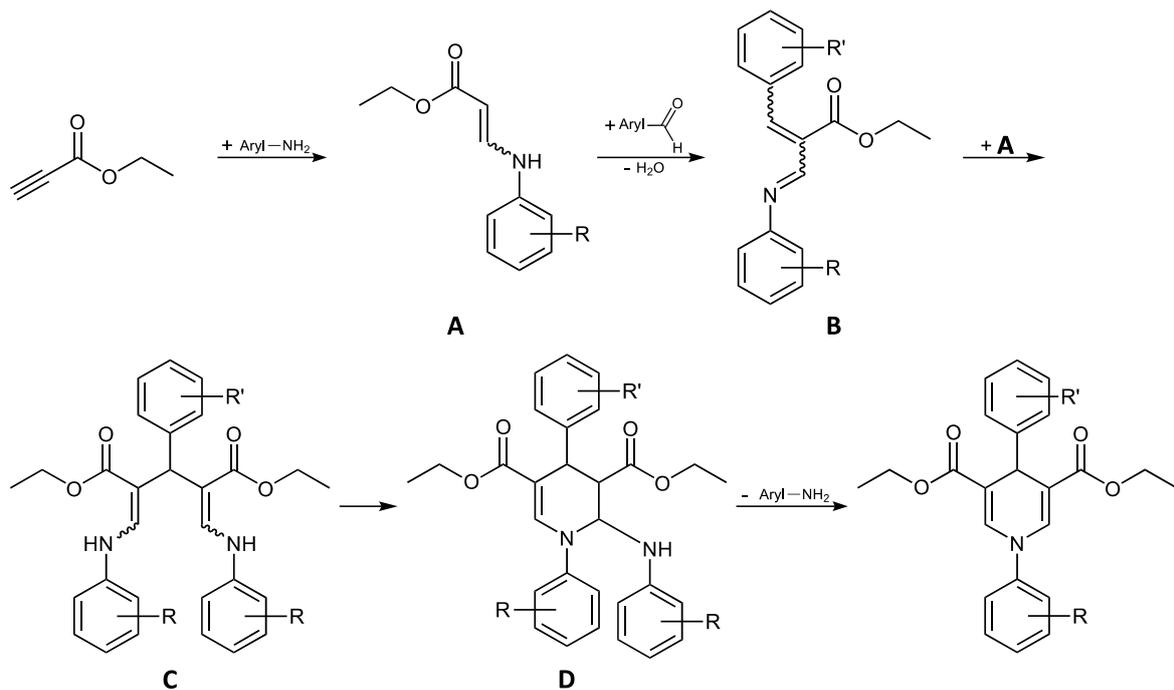


Abbildung 21: Möglicher Reaktionsweg zur Synthese der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine

Nachfolgende Abbildungen zum Reaktionsmechanismus zeigen vereinfachend die Umsetzung von Benzaldehyd und Anilin mit Ethylpropiolat. CHENNAT et al. (1975) postulierte, dass die Reaktion mit einer Addition des Amins an Ethylpropiolat beginnt um das resultierende Aminoacrylat **A** zu bilden ^[157]. Der Carbonsäureester als elektronenziehende Gruppe fördert den elektrophilen Charakter der Dreifachbindung und lässt einen säurekatalysierten nukleophilen Angriff des Arylamins wie in Abbildung 22 gezeigt zu. Das intermediär gebildete Allen wird unter Delokalisierung der positiven

Ladung hin zur Carbonyl-Gruppe zum stabileren, konjugiertem Enamin isomerisieren. Durch nachfolgende Deprotonierung kann Verbindung **A** dargestellt werden.

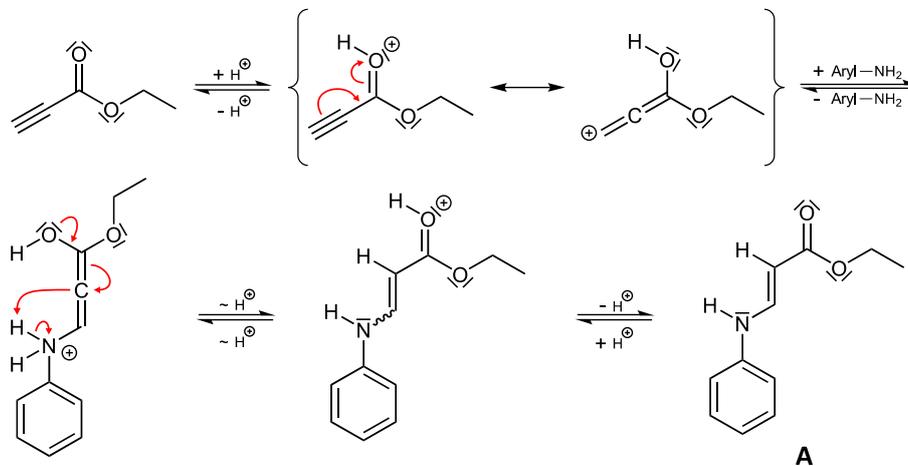


Abbildung 22: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Aminoacrylat A

Anschließend reagiert das Enamin **A** mit einem Molekül aromatischen Aldehyds zur Struktur **B** ^[157, 158]. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs im Enamin ist delokalisiert, sodass die in Abbildung 23 (oben rechts) gezeigten mesomeren Grenzstrukturen denkbar sind. Hieraus wird ersichtlich, dass der α -Kohlenstoff in Nachbarschaft zur Carbonyl-Gruppe als Nukleophil am elektrophilen Aldehyd angreifen kann. Dem Bestreben nach Ladungsausgleich folgend wird das gebildete Zwischenprodukt über Umlagerung eines Wasserstoffatoms zur Hydroxyl-funktion letztlich Wasser abspalten. Nach weiterer Abgabe eines Protons und Ausbildung einer Doppelbindung lässt sich Verbindung **B** darstellen.

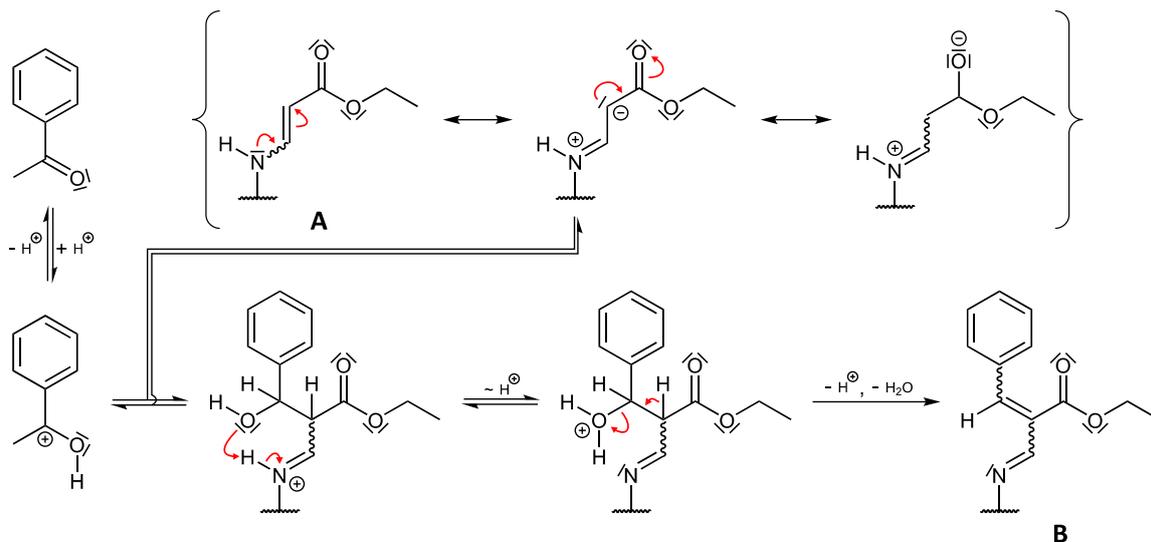


Abbildung 23: Reaktionsmechanismus der Reaktion von Enamin A mit Benzaldehyd zu Verbindung B

Im nächsten Schritt wird ein weiteres Molekül **A** nukleophil über den α -Kohlenstoff die soeben gebildete Verbindung **B** an der elektrophilen Doppelbindung angreifen (Abbildung 24). Durch Delokalisierung der negativen Ladung hin zum Imin-Stickstoff und Protonenübertragung findet ein

Ladungsausgleich statt. Das verbleibende Imin kann ebenso zum Enamin isomerisieren und es wird das Divinylmethan-Derivat **C** erhalten ^[158].

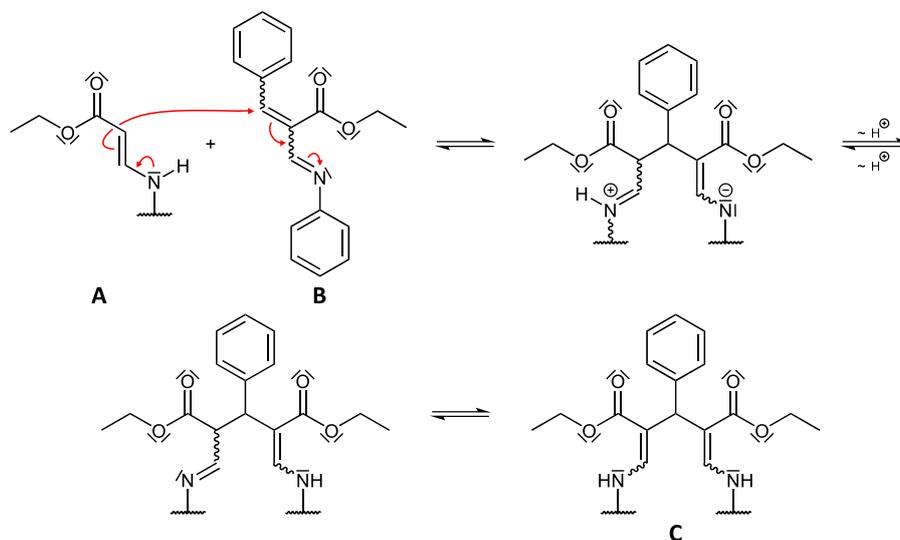


Abbildung 24: Reaktion von Enamin A mit B zu Verbindung C

YANG et al. (2010) beschreiben die Bildung von Verbindungen des Typs **C** als Schlüsselschritt in der Synthese dieser 1,4-Dihydropyridine. In einem separaten Versuch setzten sie ein isoliertes Divinylmethan analog **C** mit und ohne aromatischen Aldehyd um. Im Vergleich zu der Reaktion ohne Aldehyd, erhöhte sich die Ausbeute des 1,4-Dihydropyridins ^[158]. Es wird angenommen, dass das nach dem Ringschluss abgespaltene Arylamin (Abbildung 26, Folgeseite) durch Reaktion mit dem überschüssigen Aldehyd unter Bildung des in Abbildung 25 gezeigten Imins abgefangen wird und das Gleichgewicht zu Gunsten des Endproduktes verschiebt. Der Ringschluss findet unter nukleophilem Angriff eines der Stickstoff-Atome an eine im Molekül gegenüberliegende Doppelbindung statt (Abbildung 26, Folgeseite). Aus dem intermediär gebildeten Aminoaldehyd **D** geht unter Abspaltung eines Anilinderivates das gewünschte Produkt hervor ^[158], ^[159]. Während den praktischen Arbeiten konnten bei routinemäßiger massenspektrometrischer Verlaufskontrolle des Reaktionsansatzes die Verbindungen **A**, **B** und das Imin (Abbildung 25) bei allen Synthesen zugeordnet werden, was den Reaktionsverlauf in der Form bestätigt.

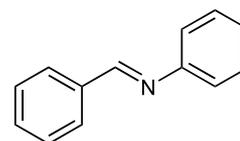


Abbildung 25: Zwischenstufe des Imin

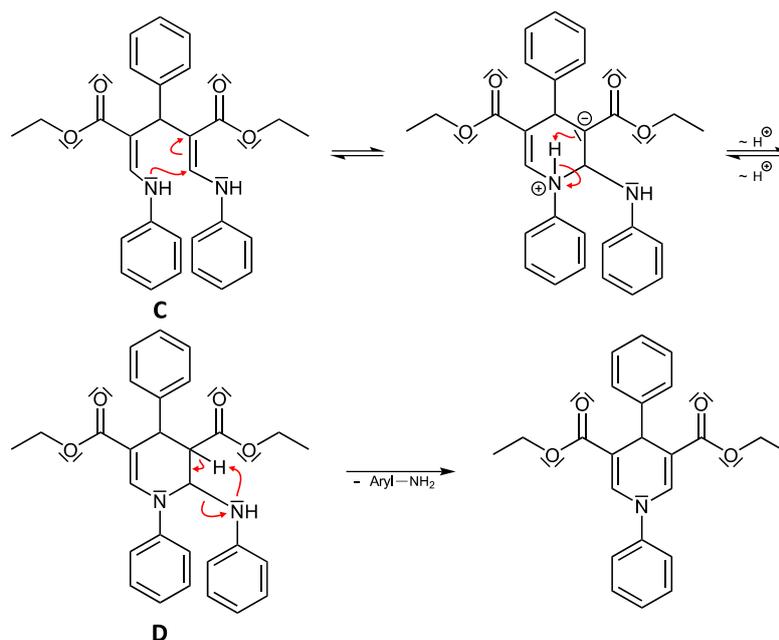
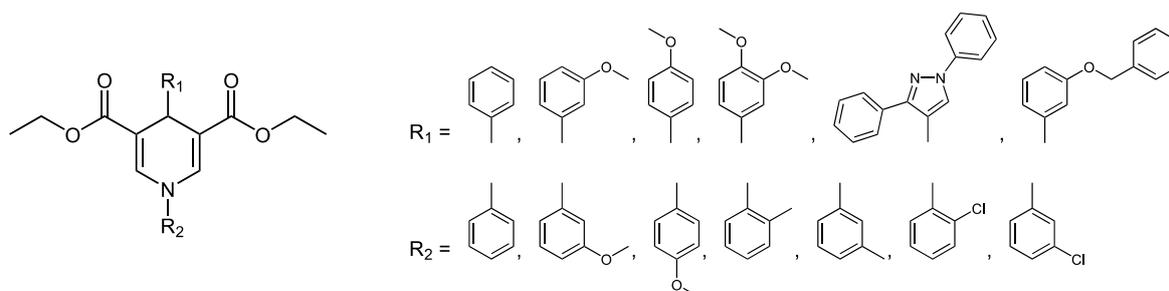


Abbildung 26: Ringschluss zu Verbindung D und Eliminierung des Arylamins zum 1,4-Dihydropyridin

Ziel der Synthese (2,6-unsubstituierte Dihydropyridine)

Es sollte eine repräsentative, strukturell vergleichbare Reihe der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine erstellt werden. Als Modellsubstanz wurde die Reaktion aus Benzaldehyd, Ethylpropionat und Anilin ausgewählt, aus der sich alle anderen Verbindungen dieser 2,6-unsubstituierten Klasse ableiten. Modifizierungen fanden demnach nur im *N*-Phenyl und Phenyl-Abschnitt des Moleküls statt, was sich durch die Verwendung verschiedener Aniline und aromatischer Aldehyde realisieren ließ. Zum Einsatz kamen 3- und 4-Methoxyanilin, 2- und 3-Toluidin und 2- und 3-Chloranilin. Neben Benzaldehyd wurde bei den Aldehyden 3-, 4-Methoxybenzaldehyd, 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 3-Benzyloxybenzaldehyd und ein Diphenyl-substituierter Pyrazolaldehyd verwendet. Folgende Tabelle soll eine Übersicht des Synthesepans darstellen.

Tabelle 5: Synthetisierte 2,6-unsubstituierte 1,4-Dihydropyridine

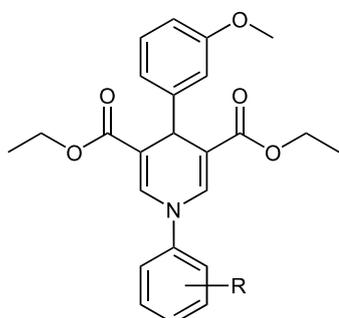


Die Synthese mit den *meta*-substituierten Anilinen 3-Methoxyanilin, 3-Toluidin und 3-Chloranilin blieb erfolglos, auf die Schwierigkeiten wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

3.1.2. Synthese der Zielverbindungen, Problemstellungen und Lösungen

Die „Eintopfsynthese“ aus aromatischem Aldehyd, substituiertem Anilin und Ethylpropiolat mit Eisessig als Katalysator war schnell und unkompliziert durchführbar. Die Reaktionszeiten beliefen sich auf wenige Stunden bis wenige Tage. In Abhängigkeit von den verwendeten aromatischen Aldehyden und Anilinen ergaben sich jedoch große Differenzen in den Ausbeuten bis hin zur Erfolgslosigkeit bei *meta*-substituierten Anilinen. Verantwortlich hierfür sind elektrochemische Besonderheiten der

Tabelle 6: Vergleich der Aniline (2,6-unsubstituiert, Synthese)



Nr.	-R	Ausbeute [%]
5	-H	31,66
6	-4-Methoxy	52,86
7	-2-Methyl	40,00
8	-2-Chlor	19,63

Edukte. Die Methoxy-Gruppe im 4-Methoxyanilin erhöht durch ihren +M-Effekt die Elektronendichte im Aromaten, insbesondere in *ortho*- und *para*-Position, sodass hier die Nukleophilie des Stickstoffes erhöht und die Reaktion begünstigt wird (Tabelle 6). Mit durchschnittlichen Ausbeuten über 50 % für die Derivate mit *ortho*-Methoxyanilin grenzt sich diese Verbindungsklasse deutlich von den Anderen ab. Aufgrund des deaktivierenden Effektes des Chlor-Substituenten auf den Anilin-Stickstoff sind hier erwartungsgemäß geringere Ausbeuten zu verzeichnen, der Effekt der Methyl-Gruppe in den Toluidinen ist vernachlässigbar.

Für das Scheitern der Darstellung von *meta*-substituierten Anilinen können ebenfalls elektrochemische Eigenschaften verantwortlich sein, der Hauptgrund muss jedoch woanders gesucht werden. In der Kontrolle des Reaktionsverlaufes konnte mittels massenspektrometrischer Untersuchung eine Masse gefunden werden, die weder dem Produkt, den Edukten oder etwaigen Zwischenprodukten zugeordnet werden konnte. Allerdings lässt sich die Masse mit dem aus Ethylpropiolat, aromatischem Aldehyd und substituiertem Anilin gebildetem Chinolin-Derivat zuordnen (Abbildung 27). Eine Arbeit von S. KIKUCHI et al. (2007) beschreibt eine neuartige Synthese zur Herstellung von 2,3-disubstituierten Chinolinen mittels Drei-Komponenten Eintopfsynthese unter Verwendung von *meta*- und *para*-substituierten Anilinen, aromatischem Aldehyd und

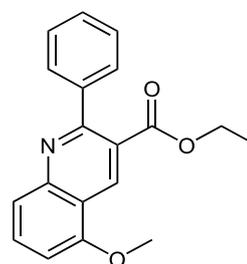


Abbildung 27: Mögliche Struktur eines der Chinoline

Ethylpropiolat. Zuerst soll eine Kondensationsreaktion aus Anilin und aromatischem Aldehyd zum Imin (Abbildung 25) stattfinden, woraus sich im Anschluss in einer Art Diels-Alder-Reaktion das Ethylpropiolat an das Imin mit Bildung des Dihydrochinolins anlagert. Nach Oxidation gelangen wir zum

aromatischen Chinolin (Abbildung 28). Die Stereoselektivität der Anlagerung kann von den Autoren nicht erklärt werden ^[160].

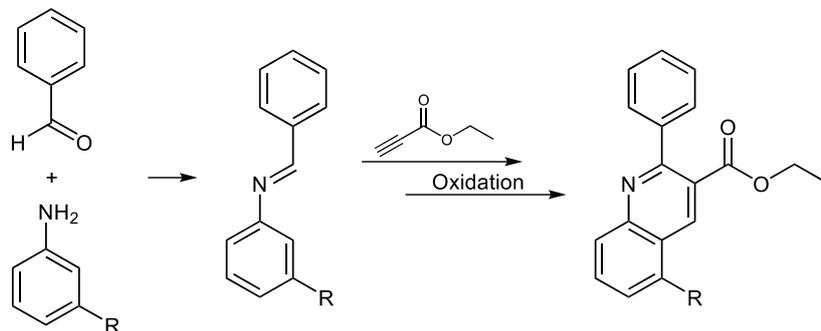


Abbildung 28: Möglicher Reaktionsweg zur Ausbildung des Chinolins

Es ist durchaus denkbar, dass das Chinolin bei *meta*-substituierten Anilinen ein präferierter Reaktionsschritt ist, da z.B. die Methoxy-Gruppe *ortho* und *para* dirigiert und somit eine Reaktion vom Typ Diels-Alder in direkter Nachbarschaft des Stickstoffes begünstigt ist. Ein Versuch, die Bildung des 1,4-Dihydropyridins unter Sauerstoffausschluss in Argon-Atmosphäre zu fördern, um damit die Oxidation zum stabilen aromatischen Chinolin zurückzudrängen, gelang nicht. In der massenspektrometrischen Untersuchung des Reaktionsansatzes konnten dann Massen gefunden werden, die sowohl dem Dihydrochinolin als auch dem oxidiertem, aromatischen Chinolin zugeordnet werden konnten. Es ergeben sich die nachfolgenden 4 möglichen Reaktionsprodukte aufgrund der unterschiedlichen Anlagerung des Dienophils Ethylpropiolat an das Imin (Abbildung 29, Folgeseite).

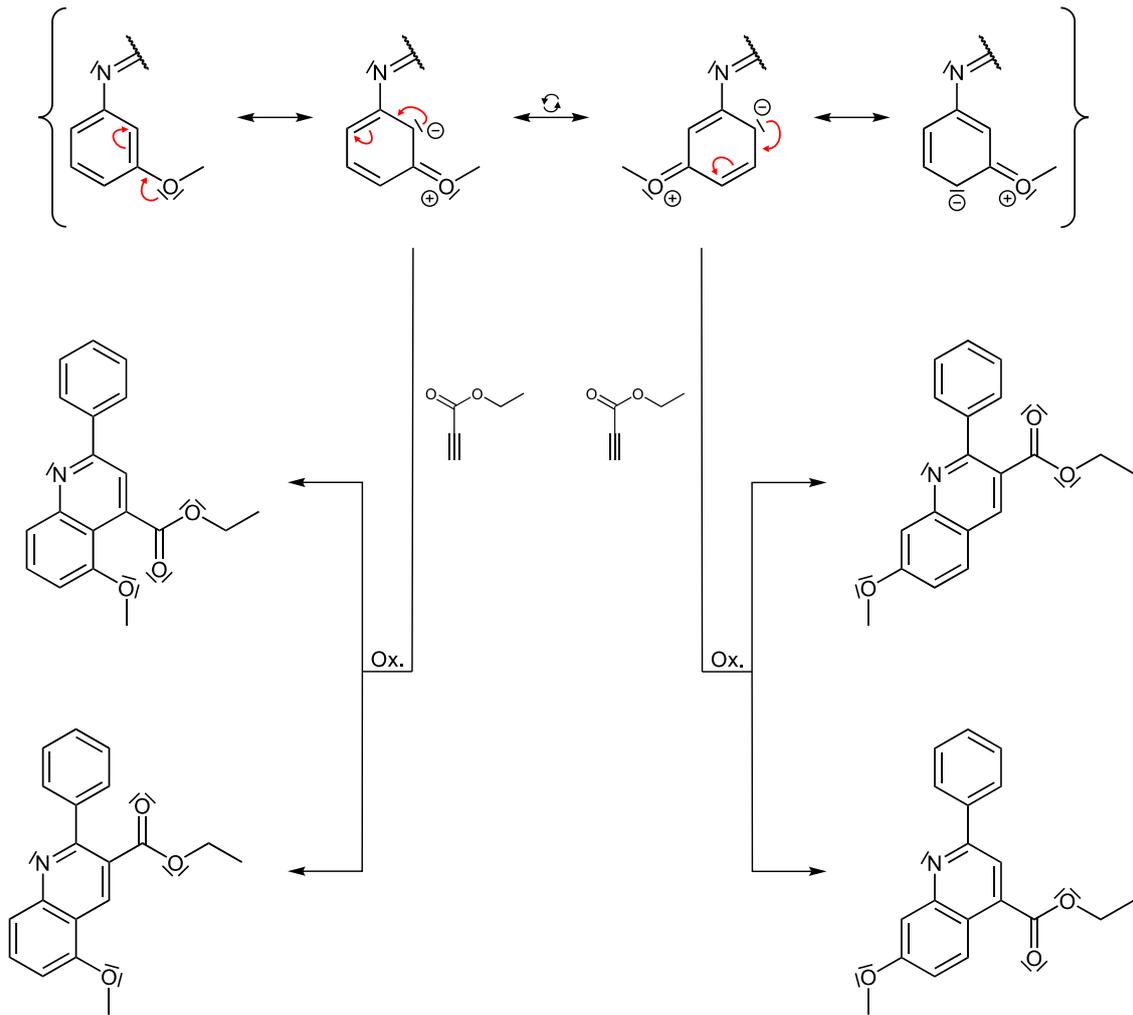


Abbildung 29: Mesomere Effekte am Imin und Möglichkeiten der Ausbildung der Chinoline

3.2. Darstellung der 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine

3.2.1. Diskussion zum Mechanismus der Synthese

Die Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen erfolgte in Anlehnung an die Synthesevorschrift von A. E. SAUSIN' et al. (1980), bei der Aldehyd und Anilin mit dem doppelten Äquivalent an β -Ketonsäureester in einer „Eintopfreaktion“ umgesetzt werden^[161]. In Abbildung 30 ist der mögliche Reaktionsweg schematisch dargestellt, der zu den 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridinen führt.

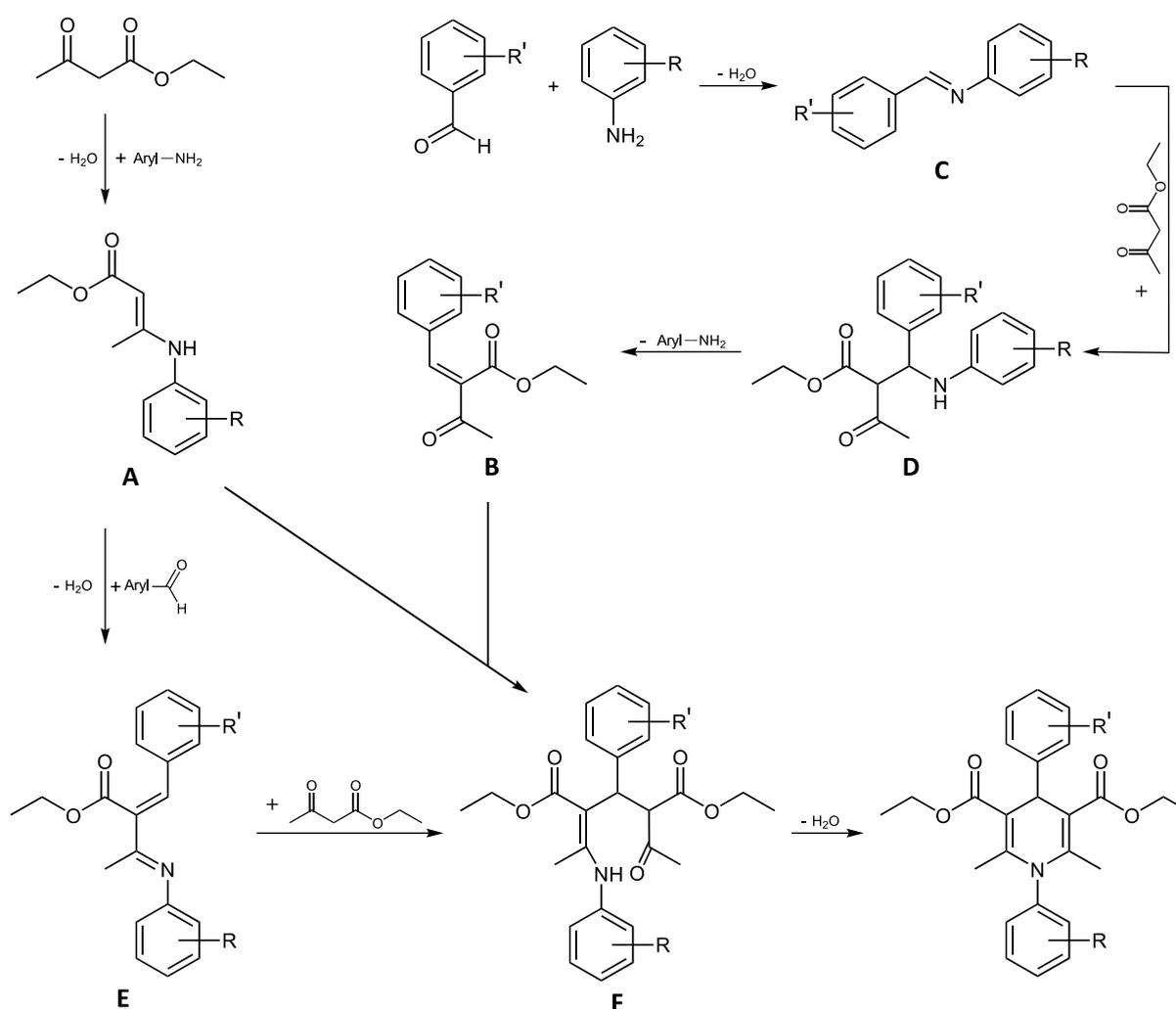


Abbildung 30: Möglicher Reaktionsweg zur Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine

Nachfolgende Abbildungen zum Reaktionsmechanismus beschreiben vereinfacht die Reaktion von Benzaldehyd und Anilin mit Ethylacetoacetat, sodass die Reste R und R' nicht weiter aufgeführt werden. Der Arbeit von KATRITZKY et al. (1986) zufolge, die den Reaktionsmechanismus der Hantzsch-

Dihydropyridin-Synthese mittels Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) untersucht hat, werden zu Beginn die Verbindungen **A** und **B** gebildet ^[162]. Der Anilin-Stickstoff greift dazu als Nukleophil am elektrophilen Carbonyl-Kohlenstoff des β -Ketonsäureesters unter Ausbildung eines intermediären Halbaminals an. Durch Eliminierung von Wasser entsteht im Anschluss das Enamin **A** (Abbildung 31).

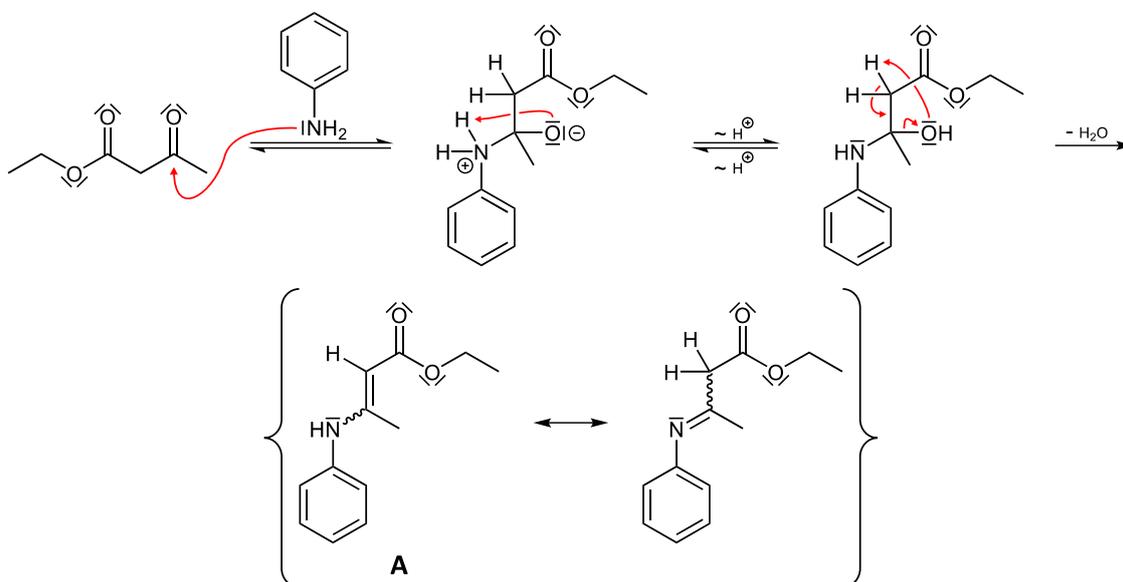


Abbildung 31: Intermediäre Halbaminallstruktur und Bildung von Enamin A

In derselben Arbeit wird beschrieben, dass das Chalkon **B** sich weder aus dem β -Ketonsäureester Methylacetoacetat und Benzaldehyd, noch aus dem daraus analog zu **A** gebildetem Enamin und Benzaldehyd synthetisieren ließ. Es wird postuliert, dass es über die Zwischenstufe des Imins **C** aus dem Aldehyd und dem Amin zustande kommen muss (Abbildung 32).

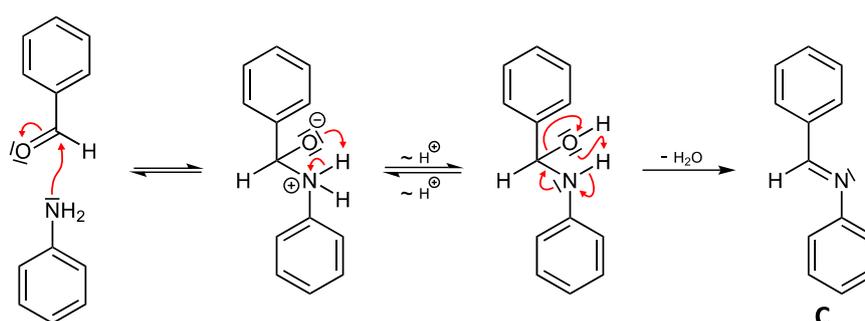


Abbildung 32: Bildung des Imins C

Eine weitere Arbeit nennt Verbindung **D** als Zwischenstufe, dabei wird von einer Michael-Addition des CH-aziden Ketonsäureesters an das Imin **C** ausgegangen und es ist dokumentiert, dass Verbindungen vom Typ **D** in der Lage sind, ihren Anilin-Rest unter Bildung des Chalkons **B** abzuspalten ^[163]. Der mögliche Weg ist in Abbildung 33 dargestellt.

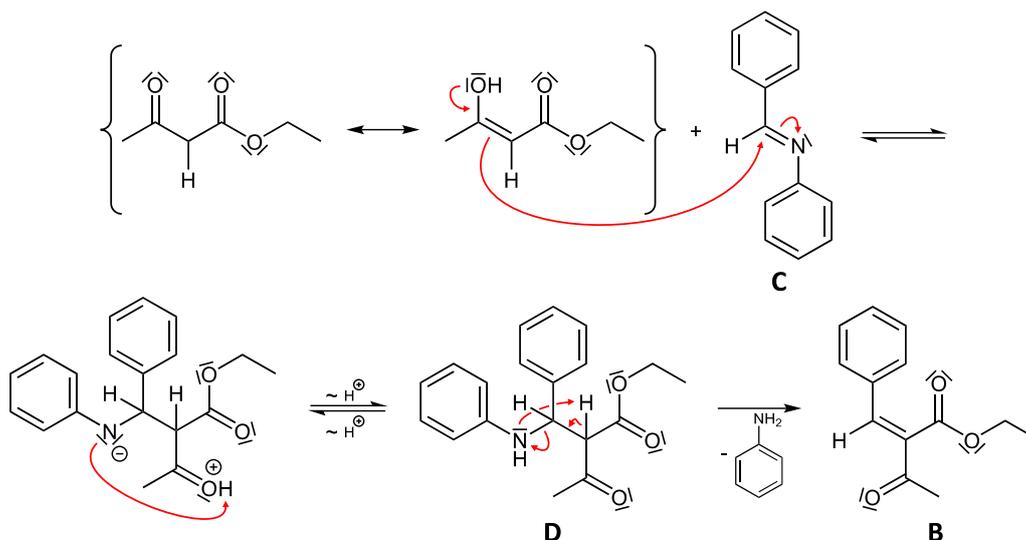


Abbildung 33: Reaktion von Imin C über Verbindung D zu Chalkon B

Laut den Untersuchungen von KATRITZKY et al. (1986) ist die Reaktion von **A** und **B** zur Zwischenstufe **F** der langsamere, geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Abbildung 34, Folgeseite), während der sich anschließende Ringschluss und die Elimination von Wasser zum Dihydropyridin schneller ablaufen (Abbildung 35, Folgeseite)^[162]. Dabei lagern sich Enamin **A** und Chalkon **B** so aneinander an, dass zuerst das ringoffene Produkt **F** entsteht. Davon ausgehend kann der nukleophile Stickstoff am gegenüberliegenden α -Carbonyl-Kohlenstoff angreifen. Nach einer Protonenumverteilung kann dann die intermediäre Halbaminalstruktur ausgebildet werden, die nach Wassereliminierung zum gewünschten 2,6-dimethylsubstituiertem 1,4-Dihydropyridin führt (Abbildung 35, Folgeseite).

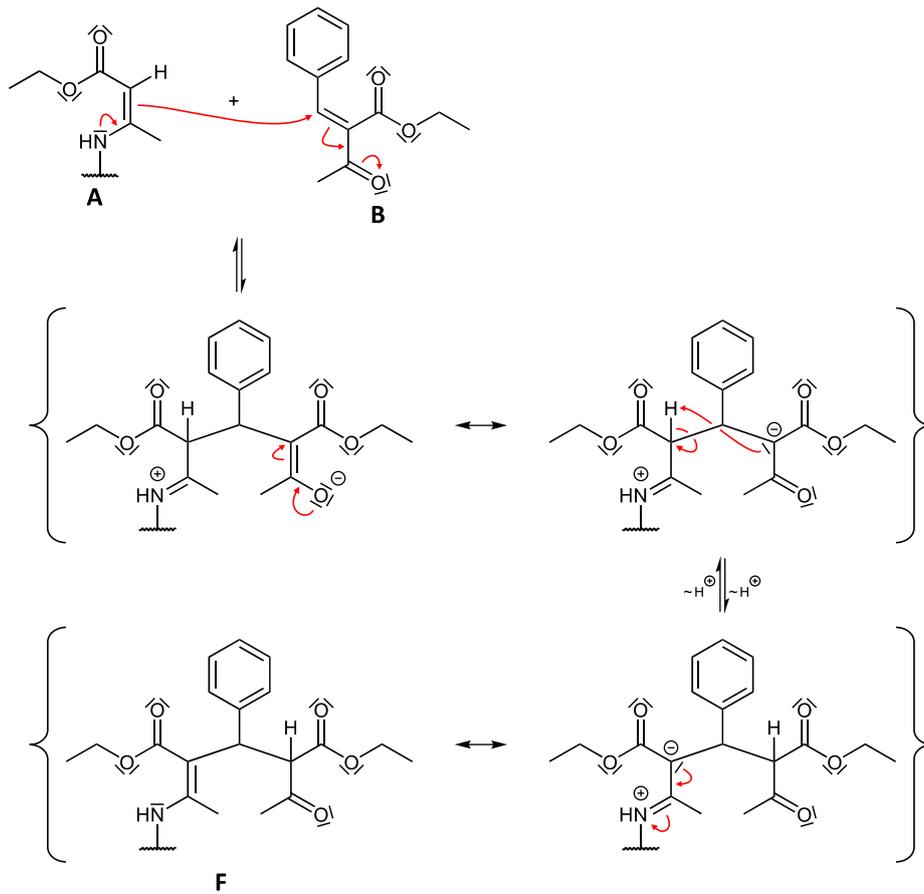


Abbildung 34: Reaktion von Verbindung A mit Verbindung B zum ringoffenem Produkt F

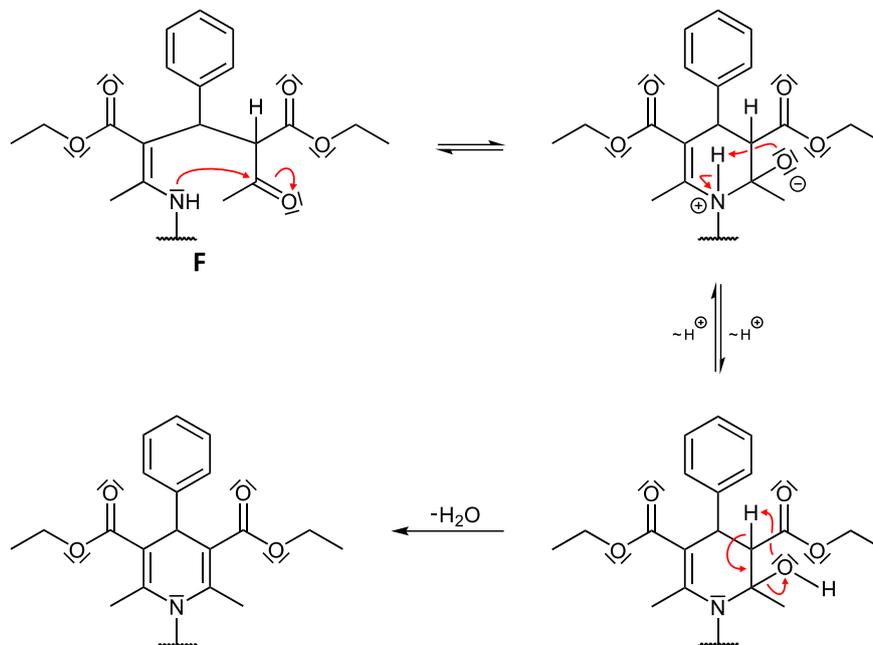


Abbildung 35: Ringschluss über erneute Halbaminstruktur mit Wassereliminierung zum 1,4-Dihydropyridin

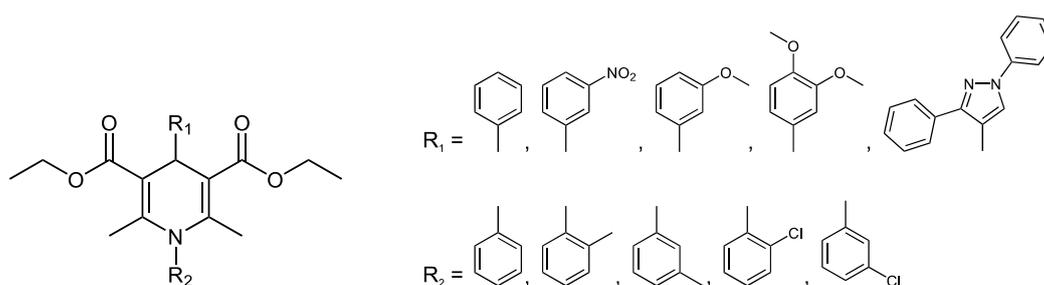
Während der praktischen Arbeiten konnten die Verbindungen A, B und C bei routinemäßiger massenspektrometrischer Kontrolle des Reaktionsverlaufs zugeordnet werden, wonach sich sowohl

die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion von **A** und **B**, als auch die Bildung von **B** über **C** und **D** nachvollziehen lässt. Es konnte im selben Versuch bei routinemäßiger Verlaufskontrolle eine Masse gefunden werden, die der Verbindung **E** zugeordnet werden kann. In letztgenannter Arbeit wurde auch ein Weg über dieses Molekül als möglicher Reaktionsverlauf beschrieben, wobei anschließend über eine weitere Michael-Addition mit dem β -Ketonsäureester die Zwischenstufe **F** und nach Ringschluss und Wasserelimination das gewünschte Dihydropyridin entsteht. Den Autoren zu Folge spielt dieser Reaktionsweg jedoch im Vergleich zur Hauptroute über die Anlagerung von **A** an **B** eine untergeordnete Rolle ^[162].

Ziel der Synthese (2,6-dimethylsubstituierte Dihydropyridine)

Auch aus der Reihe der 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine wurden repräsentative, strukturell vergleichbare Verbindungen synthetisiert. Dabei wurde als Modellsubstanz das Produkt aus Benzaldehyd, Ethylacetoacetat und Anilin hergestellt, das den Grundtyp aller weiteren Verbindungen darstellt. Modifizierungen wurden wie auch schon bei den 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridinen ausnahmslos im Phenyl- und *N*-Phenyl-Teil des Moleküls vorgenommen, sodass hier mit verschiedenen Anilinen und Benzaldehyden variiert wurde. Als Aniline wurden 2-Chloranilin, 3-Chloranilin, 2-Toluidin und 3-Toluidin verwendet. Im Bereich der Aldehyde wurden 3-Methoxybenzaldehyd, 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 3-Nitrobenzaldehyd und ein Diphenyl-substituierter Pyrazolaldehyd eingesetzt. Einen Überblick über die Zielverbindungen soll nachfolgende Tabelle geben.

Tabelle 7: Synthetisierte 2,6-dimethylsubstituierte 1,4-Dihydropyridine

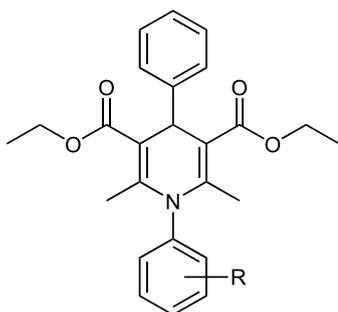


Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird hier auf die Auflistung aller Einzelbezeichnungen mit Verweis auf den experimentellen Teil verzichtet (siehe dazu Abschnitt 6.1.4). Werden einzelne Verbindungen im Text besprochen, sind Abbildungen eingefügt.

3.2.2. Synthese der Zielverbindungen, Problemstellungen und Lösungen

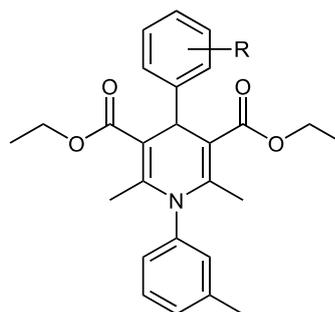
Wie eingangs beschrieben, handelt es sich bei der Synthese der Verbindungen um eine „Eintopfreaktion“ aus aromatischem Aldehyd, Anilin und Ethylacetoacetat. Ausgehend von der sich gut darstellbaren Modells substanz Nr. **25**, hat sich die Synthese der anderen Moleküle teilweise schwieriger gestaltet. Eine Rolle spielen hier sterische Einflüsse der Substituenten im *N*-Phenyl-Rest und elektrochemische Besonderheiten sowohl im *N*-Phenyl- als auch im 4-Phenyl-Rest. Die verwendeten Aniline mit *ortho*-Substitution wie 2-Chloranilin und 2-Toluidin behindern womöglich eine Anlagerung von Zwischenstufe **A** an **B** und den Ringschluss zum 1,4-Dihydropyridin, sodass hier die Ausbeuten der Endprodukte im Vergleich zu denen mit *meta*-Substitution größtenteils vermindert sind. Auch elektrochemische Effekte lassen sich hier diskutieren, so hat die Methyl-Gruppe im 2- oder 3-Toluidin wenig Einfluss auf die Nucleophilie des Anilin-Stickstoffes. Der Chlor-Substituent mindert durch seine höhere Elektronegativität die Reaktivität des Anilins (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich Aniline (2,6-dimethylsubstituiert, Synthese)



Nr.	-R	Ausbeute [%]
25	-H	23,37
26	-2-Methyl	11,76
27	-3-Methyl	13,74
28	-2-Chlor	2,64
29	-3-Chlor	5,78

Tabelle 9: Vergleich Aldehyde (2,6-dimethylsubstituiert, Synthese)



Nr.	-R	Ausbeute [%]
41	-3-Nitro	21,43
32	-3-Methoxy	14,25
37	-3,4-Dimethoxy	15,10

Neben Benzaldehyd wurden nur *meta*- oder *para*-substituierte Aldehyde eingesetzt, sodass sterische Einflüsse zu vernachlässigen sind. Elektrochemisch jedoch unterscheidet sich 3-Nitrobenzaldehyd von 3-Methoxybenzaldehyd und 3,4-Dimethoxybenzaldehyd. Günstig für die Reaktion des elektrophilen Aldehyds sind Substituenten, welche die Elektronendichte im Bereich des Carbonyl-Kohlenstoffs reduzieren, sodass ein nucleophiler Angriff begünstigt ist. Bei der Nitroverbindung sorgt der -M-Effekt für eine verminderte Elektronendichte, während sie bei den Methoxybenzaldehyden durch den +M-Effekt erhöht wird und somit die Reaktivität des Aldehyds abnimmt. In der Praxis wurden für die Derivate aus 3-Nitrobenzaldehyd höhere Ausbeuten erzielt, als für die Derivate der Methoxybenzaldehyde (Tabelle 9, vorherige Seite).

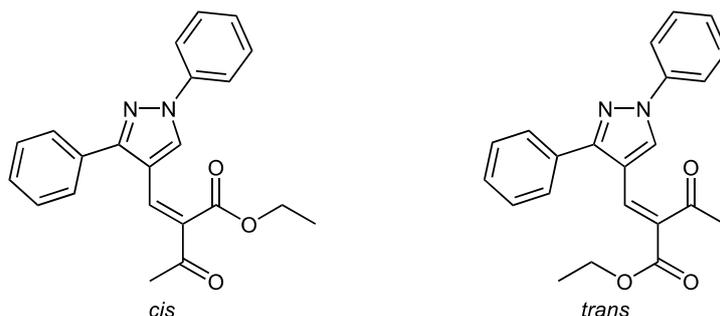
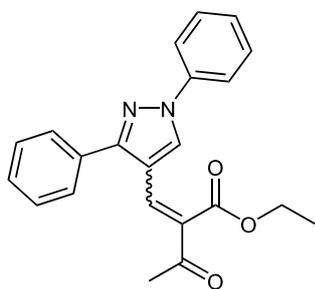


Abbildung 36: Verbindung 45a in *cis*- und *trans*-Form

Im Fall des Diphenyl-substituierten Aldehyds mit Pyrazol-Grundstruktur konnte bei den Verbindungen **45** und **47** unter den normalen Reaktionsbedingungen (zum Rückfluss in trockenem Ethanol erhitzt) kein Produkt gewonnen werden. Bei Kontrolle des Reaktionsverlaufes wurde die Bildung des Imins (vgl. Abbildung 32) mit zeitlich versetzter Reaktion zum Chalkon (vgl. Abbildung 33) beobachtet. Die Ausbildung des Enamins (vgl. Abbildung 31) konnte im Ansatz massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden, sodass die Synthese auf dieser Stufe verblieb. Nach Abbruch der Reaktion und Aufarbeitung wurde das Chalkon **45a** (Tabelle 10) isoliert und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie identifiziert. Aufgrund der Doppelbindung zwischen den beiden Carbonyl-Funktionen in Richtung Pyrazol-Gerüst ergeben sich *cis-trans*-Isomere (Abbildung 36). Die Signale im $^1\text{H-NMR}$ erscheinen teilweise versetzt doppelt, falls sich die magnetische Umgebung der Wasserstoffatome in beiden Isomeren durch die unterschiedliche räumliche Koordination des Moleküls stark unterscheidet. Im anderen Fall verschmelzen die Peaks der korrespondierenden Protonen und zeigen eine höhere Intensität.

Tabelle 10: Verbindung 45a mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8,45$ (2 s, 1H, 5-H v. Pyrazol v. *cis* u. *trans*); 7,89 - 7,86 (m, 4H, 2-H u. 6-H v. *N*-Phenyl oder 2-H u. 6-H v. Phenyl v. *cis* u. *trans*); 7,70 - 7,67 u. 7,63 - 7,61 (m, 4H, 2-H u. 6-H v. *N*-Phenyl oder 2-H u. 6-H v. Phenyl v. *cis* u. *trans*); 7,59 - 7,49 u. 7,44 - 7,40 (m, 14H, 3-H, 4-H, 5-H v. *N*-Phenyl, 3-H, 4-H, 5-H v. Phenyl und C-CH-C v. *cis* u. *trans*); 4,32 (q, 2H, O-CH₂-CH₃ v. *cis* o. *trans*); 4,23 (q, 2H, O-CH₂-CH₃ v. *cis* o. *trans*); 2,44 (s, 3H, C-CH₃ v. *cis* o. *trans*); 2,37 (s, 3H, C-CH₃ v. *cis* o. *trans*); 1,24 (2 t, 3H, O-CH₂-CH₃ v. *cis* u. *trans*)

Nachfolgende Abbildung zeigt das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Verbindung **45a** und dient zur Veranschaulichung und Erklärung der Isomerie (Abbildung 37). Für die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$

Spektren der im Zusammenhang mit dieser Arbeit gezeigten Moleküle wurde das Programm MestReNova in der Programmversion 8.0.2-11021 verwendet [164].

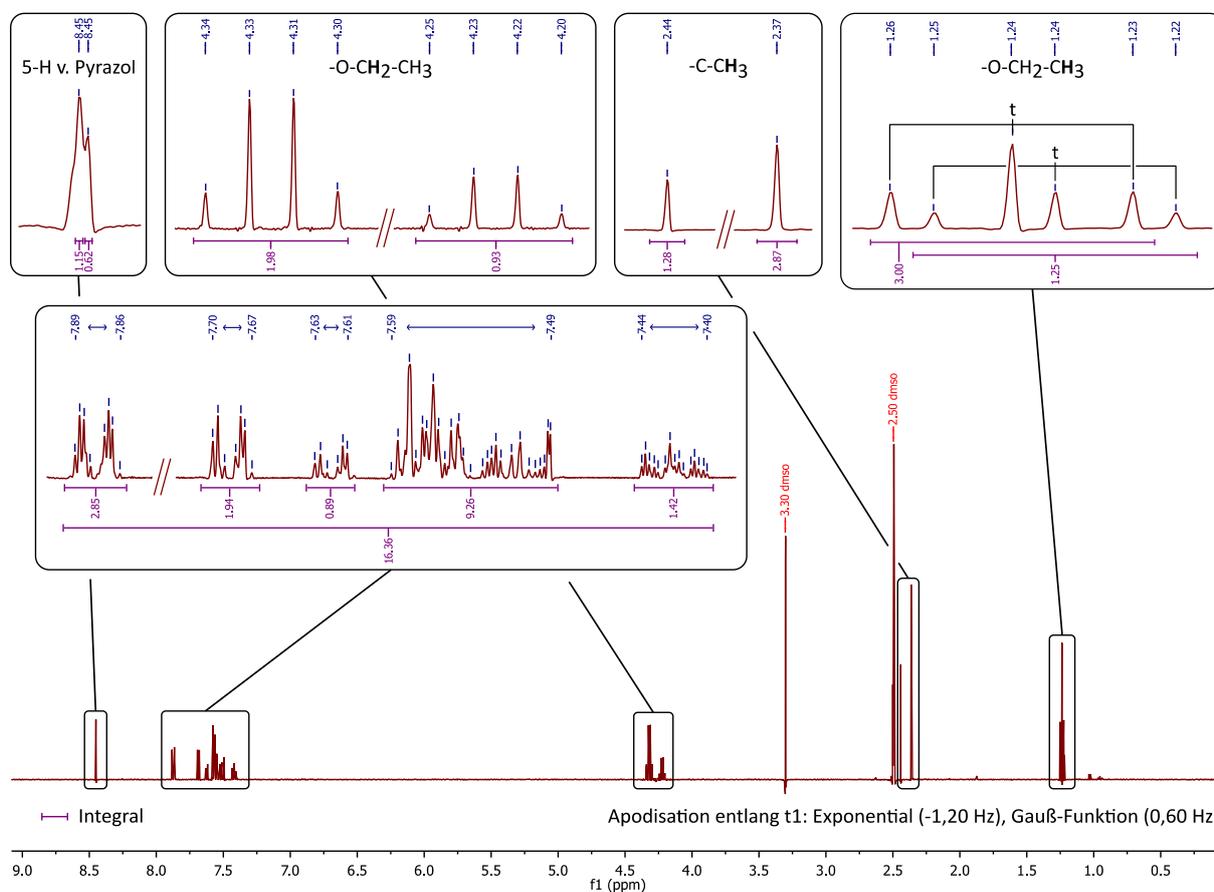


Abbildung 37: ¹H-NMR der Verbindung 45a mit Angabe der Integrale zum Verständnis der *cis-trans*-Isomerie

Durch Multiplikation des FIDs (*free induction decay*) mit einer mathematischen Funktion kann die Auflösung erhöht oder das Signal-Rausch-Verhältnis des Spektrums gesenkt werden. Bei Verwendung der in der Software implementierten Exponential- und Gauß-Funktion mit den in der Grafik angegebenen Parametern kann das vorherige Singulett bei 8,45 ppm als 2 benachbarte Singulett aufgelöst werden. Dadurch wird erkennbar, dass das Proton Nr. 5 im Pyrazol-Gerüst dem *cis*- und dem *trans*-Isomer zugeordnet werden kann (siehe nebenstehende Abbildung 38). Das Verhältnis beider Singulett Peaks zueinander ist ca. 0,5. Die endständige Methylgruppe des Ethylesters erscheint als doppeltes Triplett für beide Isomere bei 1,24 ppm. Die benachbarte Methylengruppe tritt zweifach als Quartett bei 4,32 und 4,23 ppm auf. Die Methyl-Gruppe in Nachbarschaft zur Carbonyl-Funktion kommt für das *cis*- und *trans*-Isomer als Singulett bei 2,44 und 2,37 ppm vor. Bei allen genannten Peaks wird ein Verhältnis von ungefähr 0,5 gewahrt, sodass die Theorie der *cis-trans*-Isomerie gestützt wird.

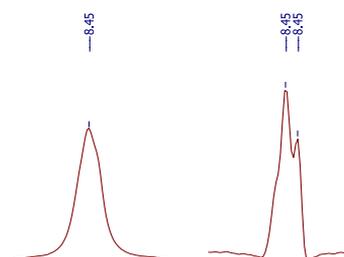


Abbildung 38: Vergleich des Singulett mit (rechts) und ohne (links) Modifikation des FIDs

Im aromatischen Abschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von 7,89 - 7,40 ppm lassen sich nur noch bedingt Zuordnungen treffen. Durch Vergleich mit anderen Spektren der 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde lässt sich voraussagen, dass das Multiplett bei 7,89 - 7,86 ppm dem H-2 und H-6 des *N*-Phenyl- oder des Phenyl-Ringes zuzuordnen ist. Das Integral von ca. 3 bedeutet, dass hier bei einem Verhältnis von 0,5 genau 4 Wasserstoffatome vorliegen, sodass es sich hier wieder um die *cis*- und *trans*-Protonen handelt. Von der Struktur her ist der nächste Signalabschnitt mit der Intensität von ca. 2 bei 7,70 - 7,67 ppm und von ca. 1 bei 7,63 - 7,61 ppm dem letzten ähnlich und lässt sich ebenfalls dem H-2 und H-6 des jeweils anderen Ringsystems zuordnen. Dadurch dass hier die beiden äquivalenten *cis*- und *trans*-Signale verschoben sind, müssen es diese sein, die stärker durch die Isomerie beeinflusst werden. Das Wasserstoffatom an Position 4 an einem der beiden Phenyl-Ringe wird durch das übernächste Multiplett bei 7,44 - 7,40 ppm beschrieben. Auch hier liegen 2 Protonen vor, die beiden Isomeren zugeschrieben werden können. Das breite Multiplett bei 7,59 - 7,49 ppm beinhaltet die verbleibenden aromatischen und das Methin-Proton von *cis*- und *trans*-Form. Hier ist eine genauere Zuordnung aufgrund der engen Lage der Signale nicht mehr möglich. Im gezeigten Spektrum ist zum besseren Verständnis die Summe der Integrale unter dem Signalabschnitt von 7,89 - 7,40 ppm mit ca. 16,5 Protonen dargestellt. Dieser Wert ergibt sich aus den 10 Wasserstoffatomen der beiden Phenyl-Ringe und dem Methin-Proton. Bei dem angesprochenen Verhältnis von *cis/trans* oder *trans/cis* von 0,5 ergeben sich die $11 + 5,5 = 16,5$ Protonen.

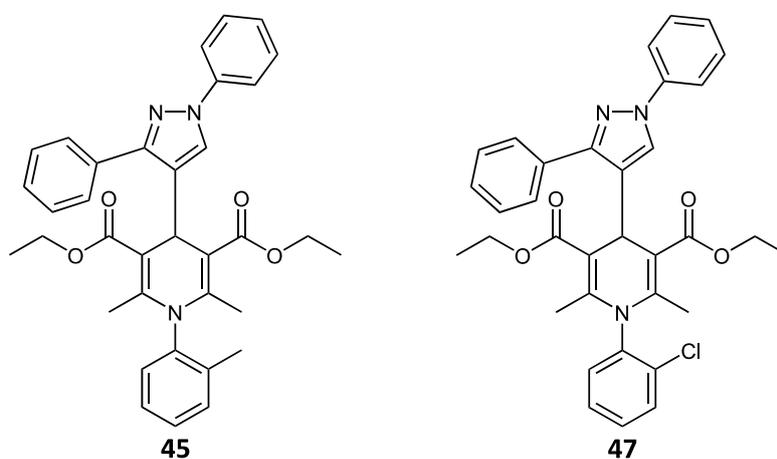


Abbildung 39: Verbindung 45 und 47

Da die Synthese von Verbindung 45 und 47 (Abbildung 39) unter diesen Bedingungen nicht in ausreichender Ausbeute stattfinden konnte, wurde nach alternativen Synthesemöglichkeiten gesucht. An viele Stellen des Reaktionsverlaufes ist eine Hilfsbase oder -säure denkbar. Beispielsweise kann die Reaktivität des Aldehyds als auch des Ketons im Ethylacetoacetat durch Einsatz von Säure gesteigert werden, sodass der nukleophile Angriff des Anilins begünstigt wird. In einem nächsten Versuch wurden geringe Mengen Eisessig verwendet um die Ausbeuten des Endproduktes in dem Maße zu erhöhen, dass es isolierbar wird. In einem parallel ablaufenden Ansatz wurde das Chalkon als Ausgangsstoff mit

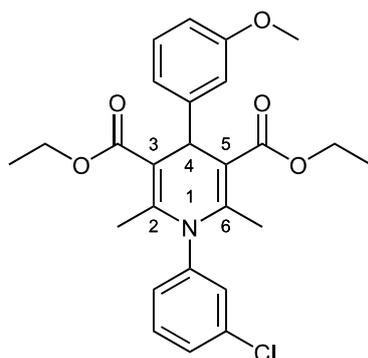
stöchiometrischen Mengen Anilin und Ethylacetoacetat mit Essigsäure als Katalysator umgesetzt. In beiden Ansätzen gelang es, Verbindung **45** und **47** in ausreichender Ausbeute zu gewinnen. Die Reaktionszeiten verkürzten sich durch den Einsatz von Essigsäure auf wenige Stunden, die Anzahl der in der Dünnschichtchromatographie sichtbaren Nebenprodukte stieg jedoch in gleichem Maße an. Im Anschluss an die Reaktion folgte im Vergleich zu der üblichen Methode ein weiterer Aufreinigungsschritt, in dem die überschüssige Säure ausgeschüttelt werden musste. Durch die vermehrte Bildung nicht identifizierter Nebenprodukte wurde zudem die säulenchromatographische Trennung des Gemisches erschwert, sodass sich diese Methode für die übrigen 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen nicht durchgesetzt hat.

3.3. Strukturaufklärung der synthetisierten 1,4-Dihydropyridine und deren Eigenschaften

3.3.1. Identifizierung der Grundstruktur mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Allen Verbindungen ist das charakteristische Wasserstoffatom an Position 4 des Dihydropyridin-Ringes gemeinsam. Aufgrund seiner isolierten Stellung eignet es sich als Startpunkt für die weiterführende Auswertung der Spektren. Die 2,6-dimethyl-substituierten Derivate geben ein Signal der beiden Methyl-Gruppen bei niedrigen ppm, dagegen erscheinen die Protonen der 2,6-unsubstituierten Strukturen im Bereich der Aromaten bei hohen ppm. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum treten die Kohlenstoffatome der Ethylester-Gruppe aufgrund der Symmetrie des Moleküls als chemisch und magnetisch äquivalent auf, dies gilt jedoch nicht für die zugehörigen Wasserstoffatome. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aller Strukturen lässt sich wider Erwarten kein reines Quartett oder Triplett für die Methylen- oder Methyl-Gruppe finden, es handelt sich hierbei um ein Spektrum höherer Ordnung. Das ABX_3 -System mit diastereotoper Methylengruppe wurde beispielhaft für die Verbindungen **34** und **39** aufgeklärt. Zur Veranschaulichung wird nachfolgend Verbindung **34** (Tabelle 11) vorgestellt. Mit Hilfe der Software PERCH (Version 2008.1 SA) wurde iterativ ein simuliertes ABX_3 -System berechnet, dessen Übereinstimmung mit dem experimentellen System nachfolgend gezeigt wird.

Tabelle 11: Verbindung 34 und deren $^1\text{H-NMR}$ -Daten



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-D_6): $\delta = 7,59 - 7,54$ (m, 2H, 5-H, 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,42 (s, 1H, 2-H v. 3-Cl-Ph); 7,25 - 7,24 (m, 1H, 4-H v. 3-Cl-Ph); 7,23 ("t", $^3J = 7,8$ Hz, 1H, 5-H v. 3- $\text{CH}_3\text{-O-Ph}$); 6,87 (d"t", $^3J_{6/5} = 7,7$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, 1H, 6-H v. 3- $\text{CH}_3\text{-O-Ph}$); 6,78 ("t", $^4J = 2,0$ Hz, 1H, 2-H v. 3- $\text{CH}_3\text{-O-Ph}$); 6,77 (ddd, $^3J_{4/5} = 8,0$ Hz, $^4J_{4/2} = 2,7$ Hz, $^4J_{4/6} = 0,9$ Hz, 1H, 4-H v. 3- $\text{CH}_3\text{-O-Ph}$); 5,02 (s, 1H, 4-H); 4,08 (ABX_3 , $^2J_{\text{AB}} = -10,9$ Hz, $^3J_{\text{AX3}} = 7,1$ Hz, 2H, $\text{COOCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}_\text{X3}$); 4,07 (ABX_3 , $^2J_{\text{BA}} = -10,9$ Hz, $^3J_{\text{BX3}} = 7,0$ Hz, 2H, $\text{COOCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{CH}_\text{X3}$); 3,73 (s, 3H, 3- $\text{CH}_3\text{-O-Ph}$); 1,98 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-C-2}$ u. -C-6); 1,16 ppm (ABX_3 , $^3J_{\text{X3A}} = 7,1$ Hz, $^3J_{\text{X3B}} = 7,0$ Hz, 6H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_\text{X3}$)

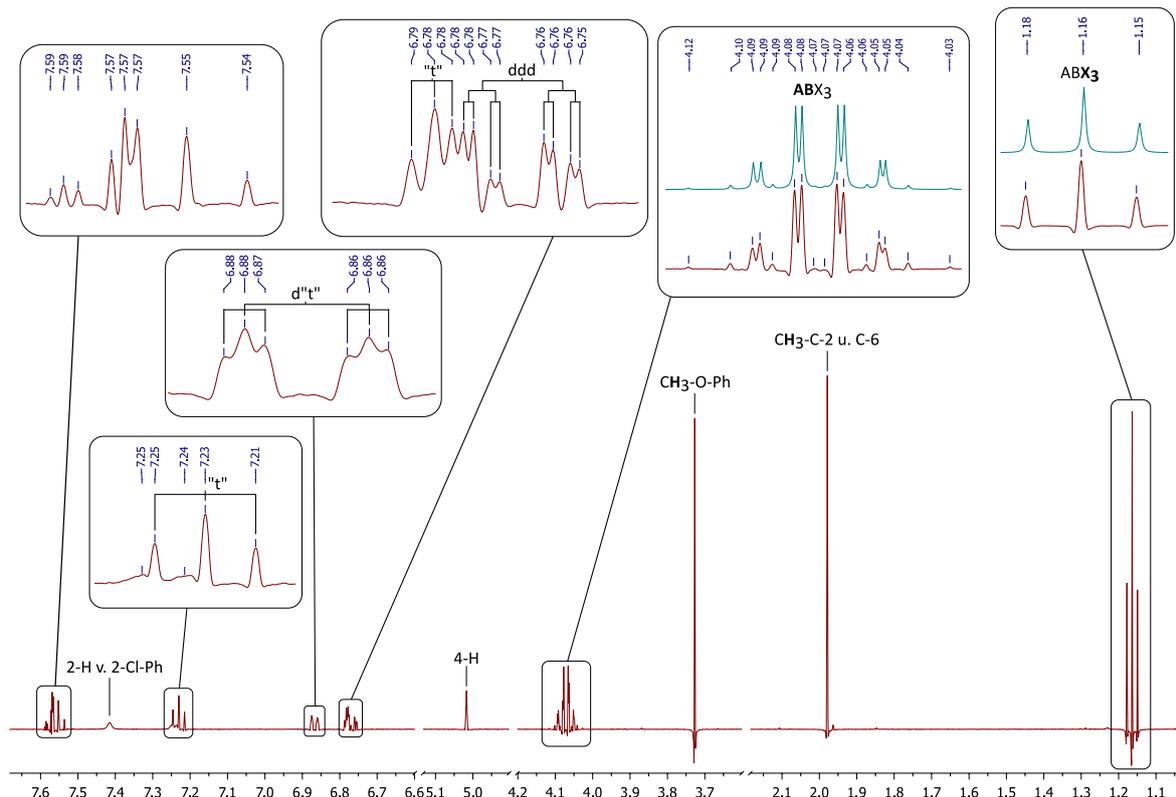


Abbildung 40: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **34**, reduziert auf die relevanten Bereiche

In Abbildung 40 wird das ^1H -NMR Spektrum von **34** gezeigt. In der Detailansicht des AB- und des X_3 -Abschnittes ist das mit der Software simulierte Spektrum in blau, oberhalb des Originalen wiedergegeben. Auffällig ist, dass das X_3 -System bei 1,16 ppm keine Aufspaltung gemäß seiner beiden magnetisch verschiedenen Kopplungspartner A und B aufweist und als Tripletts erscheint. Das AB-System bei 4,07 ppm und 4,08 ppm zeigt jedoch eine charakteristische Aufspaltung für Systeme höherer Ordnung, hier koppeln die zwei magnetisch unterschiedlichen Protonen der beiden symmetrischen Methylen-Gruppen mit den Wasserstoffatomen der beiden endständigen ebenfalls symmetrischen Methyl-Gruppen. Zusätzlich liegt eine geminale Kopplung vor, erkennbar durch die negative Kopplungskonstante von $^2J_{\text{AB}} = -10,91$ Hz, die durch die Wechselwirkung der beiden Methylen-Protonen untereinander hervorgerufen wird. Alle anderen Verbindungen verfügen ebenfalls über diastereotope Methylen-Gruppen, die genauso ein ABX_3 -System ergeben. Da die exakte Analyse jedoch nur für die beiden genannten Verbindungen vorgenommen wurde, wird in den anderen Fällen lediglich von Multipletts gesprochen.

Exemplarische Zuordnungen der H-NMR Spektren

Exemplarisch sollen hier die weiteren Signale der Verbindung **34** erläutert werden. Wie einleitend beschrieben, tritt die 2,6-Dimethyl-Gruppe in diesem Beispiel als Singulett bei 1,98 ppm auf. Das Wasserstoffatom an Position 4 erscheint bei 5,02 ppm und die Methyl-Protonen der Methoxyphenyl-Gruppe bei 3,73 ppm. Durch den +M-Effekt der letztgenannten Gruppe lassen sich die Signale der zugehörigen aromatischen Wasserstoffkerne differenzieren.

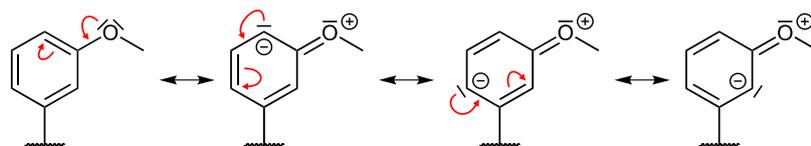


Abbildung 41: Mesomere Grenzstrukturen des 3-Methoxyphenyl-Rests

Wie Abbildung 41 verdeutlichen soll, sind erwartungsgemäß *ortho*- und *para*-Stellung zur Methylether-Gruppe durch die höhere Elektronendichte hochfeld verschoben. Im Spektrum zeigt sich, dass sich das Resonanzsignal von H-5 mit 7,23 ppm von den Signallagen der anderen Protonen bei 6,87 - 6,77 ppm so weit unterscheidet, dass eine Auswertung nach 1. Ordnung möglich ist. Das Signal des Wasserstoffkerns H-5 in *meta*-Stellung ergibt sich aus der Kopplung mit den zwei unterschiedlichen Kernen H-4 und H-6, sodass hier genau genommen von einem Duplett von Dupletts gesprochen werden muss, im Spektrum erscheint es jedoch als Triplet und wird daher in Anführungszeichen gesetzt. Die Kopplungskonstante von ${}^3J = 7,8$ Hz muss daher als Mittel aus der Kopplung mit H-4 und H-6 angesehen werden. Gleiches gilt für die Protonen H-4 und H-2. Durch die räumliche Trennung des letztgenannten Atoms ergibt sich die geringe Kopplungskonstante von ${}^4J = 2,0$ Hz über 4 Bindungen, auch hier würden wir ein Duplett von Dupletts erwarten, erhalten jedoch ein Triplet. Das Proton an Position 6 zeigt ein Duplett von Tripletts mit ${}^3J_{6/5} = 7,7$ Hz und ${}^4J = 1,2$ Hz, wobei letztere wieder das Mittel aus der Kopplung mit H-2 und H-4 darstellt und als Duplett von Dupletts von Dupletts (ddd) erscheinen müsste. Nur bei H-4 lässt sich das Signal eindeutig mit all seinen Kopplungskonstanten (${}^3J_{4/5} = 8,0$ Hz, ${}^4J_{4/2} = 2,7$ Hz, ${}^4J_{4/6} = 0,9$ Hz) als Duplett von Dupletts von Dupletts (ddd) bestimmen.

Im aromatischen 3-Chlorphenyl-Rest lassen sich die Signale nur bedingt zuordnen. So wurde im Vergleich mit anderen synthetisierten Derivaten mit gleichem Rest das Multiplett bei 7,25 – 7,24 ppm H-4 zugeordnet, das breite Singulett bei 7,42 ppm dem isolierten Wasserstoffatom an Position 2. Bei 7,59 – 7,54 ppm erscheint ein Multiplett für die verbleibenden Protonen H-5 und H-6.

3.3.2. Strukturelle und stereochemische Eigenschaften

Bei Betrachtung der Verbindungen **17 – 20** und **44 – 48** (Abbildung 42) lässt sich feststellen, dass sich die Signale der beiden Methylen-Gruppen von denen bei Verbindung **34** unterscheiden. Abbildung 43

(Folgeside) zeigt die relevanten $^1\text{H-NMR}$ -Signale der Methylen-Gruppen von Verbindung **34** und **46**. Dabei ist auffällig, dass das Signal der Substanz **46** im Vergleich zu **34** aus zwei voneinander getrennten Multipletts besteht, die sich bei genauerer Betrachtung aus jeweils zwei Quartetts zusammensetzen. Röntgenstrukturanalysen verwandter Substanzen belegen, dass der 1,4-Dihydropyridin-Ring eine Boot-Konformation einnimmt und der 4-Phenyl-Rest nahezu senkrecht zur Ringebene des Pyridins angeordnet ist ^[165–168]. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass die Methylengruppen in Verbindung **34** minimal durch den Rest in Position 4 beeinflusst werden und daher die jeweiligen A- und B-Teile des ABX_3 -Systems identische Signale ergeben. Der 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl-Rest in dieser Position bei Verbindung **46** stört die Symmetrie, der AB-Teil ist aufgespalten. Die klare Struktur der resultierenden Quartett-Paare einerseits und der nur minimal ausgeprägte Dach-Effekt andererseits lässt vermuten, dass es sich hier um zwei Multipletts mit der Zuordnung AA^* und BB^* handeln muss und schließt eine Zuordnung als AB- und einen A^*B^* -Teil aus. Das bedeutet, dass sich die magnetische Umgebung der beiden Methylen-Protonen durch die Einführung eines voluminöseren Rests an Position 4 maßgeblich verändert hat. Hervorzuheben ist, dass der hier nicht dargestellte X_3 -Abschnitt seine Triplet-ähnliche Signalstruktur wie bei Verbindung **34** behält.

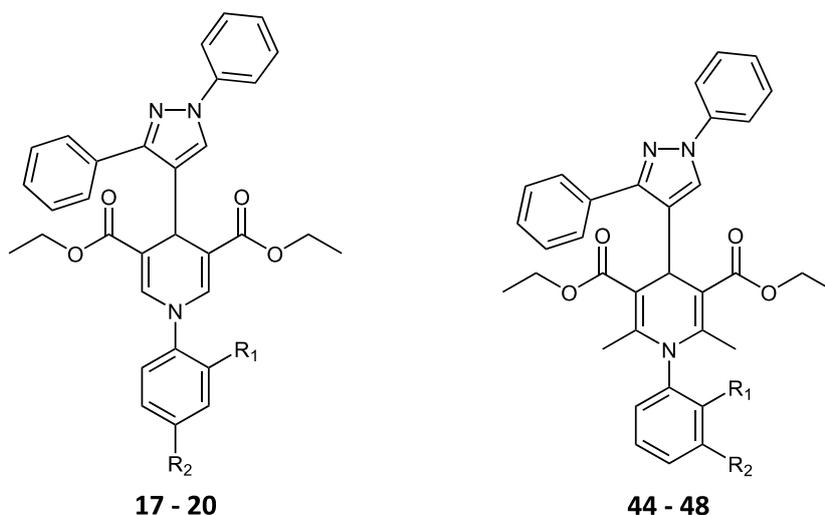


Abbildung 42: Übersicht über die Verbindungen 17-20 und 44-48
 Reste der Derivate hier nicht weiter spezifiziert.

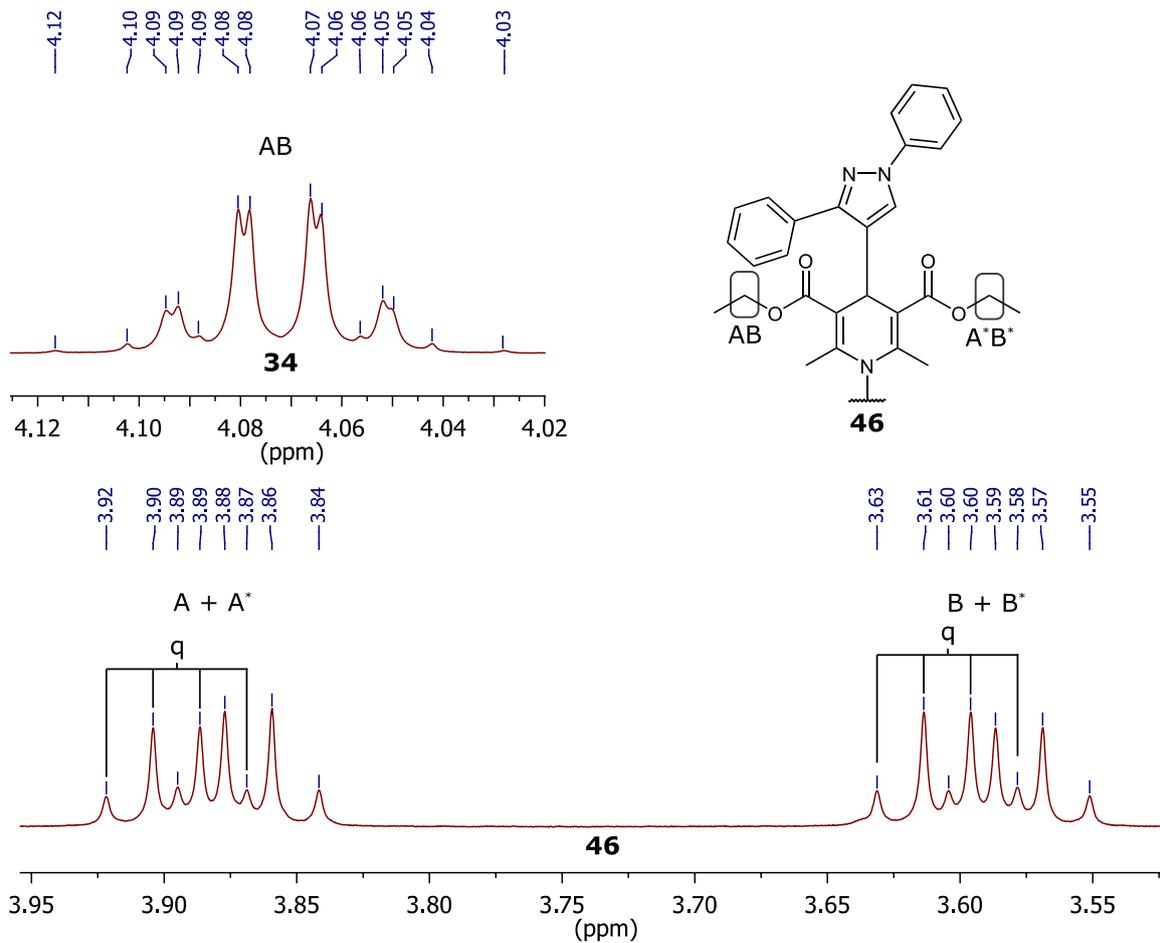


Abbildung 43: Vergleich der ¹H-NMR Signale der Methylengruppen der Verbindungen 34 und 46 (Ausschnitt)

Als Sonderfälle seien hier die 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen mit solchen *N*-Phenyl-Resten erwähnt, die in *ortho*-Stellung substituiert sind. HILGEROTH (1994) hat gezeigt, dass die freie Drehbarkeit der *N*-Phenyl-Bindung durch sterische Hinderung eines solchen Restes beeinträchtigt wird und hat die nötige Energiedifferenz zur Überwindung der Rotationsbarriere mittels Aufnahme von Hochtemperatur-Spektren bestimmt ^[169]. Es handelt sich bei diesen Verbindungen um Rotationsisomere, die sowohl in den ¹H-NMR- als auch in den ¹³C-NMR-Spektren bei Raumtemperatur gedoppelte Signale zeigen und dadurch ihre Zuordnung erschweren. Durch die freie Drehbarkeit der *N*-Phenyl-Bindung bei den 2,6-unsubstituierten Derivaten lassen sich hier keine Rotamere beobachten.

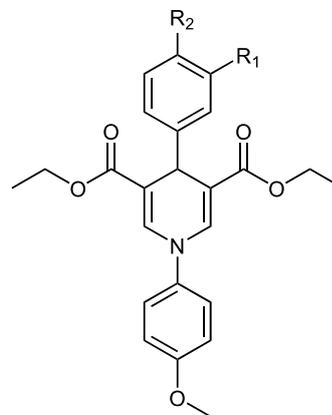
3.3.3. Fluoreszenzeigenschaften

Wie im letzten Abschnitt thematisiert, sind auch Fluoreszenzerscheinungen an die Struktur der Verbindung gekoppelt. Das 1,4-Dihydropyridin-Grundgerüst scheint für das Auftreten essentiell, da verwandte Pyridin-Gerüste keine Fluoreszenz aufweisen^[170]. Das freie Elektronenpaar am Stickstoff ist delokalisiert und kann zur Anregung des aromatischen Gerüsts mobilisiert werden. Zusätzlich erweitert die Carbonyl-Funktion an 3,5-Position das konjugierte π -Elektronensystem. CHEKAVICHUS et al. (1983) machte die Beobachtung, dass die Einführung eines Aryl-Substituenten an Position 1 in 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridinen im Vergleich zu Analoga, welche über keinen Substituenten am Stickstoff verfügen, eine bathochrome Verschiebung des UV-Langwellen-Maximum

zur Folge hat. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass in 2,6-dimethylierten 1,4-Dihydropyridinen eine Aryl-Gruppe am Stickstoff für eine hypsochrome Verschiebung sorgt. Es wird davon ausgegangen, dass die Aryl-Gruppe die Methyl-Gruppen sterisch so beeinflusst, sodass diese wiederum die Ester-Gruppen aus ihrer Ebene drängen^[156]. Das planare Gerüst, was für Fluoreszenzerscheinungen förderlich ist, wird so vermutlich gestört. Eine weitere Arbeit, welche die Fluoreszenz in 1,4-Dihydropyridinen thematisiert, deutet darauf hin, dass die Methyl-Gruppen in Position 2 und 6 für die veränderten Fluoreszenzeigenschaften verantwortlich sind und führen dies auf die freie Drehbarkeit zurück, da sie dadurch für eine strahlungslose innere Umwandlung der absorbierten Strahlung sorgen^[170].

Während der praktischen Arbeiten konnte bei routinemäßiger Reaktionsverlaufskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie für alle 2,6-unsubstituierten Verbindungen bei eingestrahlem UV-Licht von 254 nm Wellenlänge blaue Fluoreszenz beobachtet werden. Bei den Derivaten **6**, **10** und **14**, in Tabelle 12 gezeigt, konnte zusätzlich bei Tageslicht eine gelbliche Fluoreszenz des kristallinen Produktes festgestellt werden. Hier stärken die elektronenspendenden Methoxy-Gruppen das π -Elektronensystem. Die 2,6-dimethylsubstituierten 1,4-Dihydropyridine zeigten keine dieser zuletzt erwähnten Eigenschaften.

Tabelle 12: Verbindungen 6,10 und 14



Nr	-R ₁	-R ₂
6	-Methoxy	-H
10	-H	-Methoxy
14	-Methoxy	-Methoxy

3.3.4. Reaktivität der 3,5-Diethylester-Funktion

In derselben Arbeit von CHEKAVICHUS et al. (1983) wurde die Reaktivität der Ester-Gruppen in 1,4-Dihydropyridinen untersucht. Während die Hydrolyse von entsprechenden Gruppierungen bei Pyridin-Analoga ohne Schwierigkeiten stattfinden kann, ist sie hier durch die vinyloge Carbamid Struktur erschwert (Abbildung 44). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Einführung eines Substituenten wie einem Aryl- oder Alkyl-Rest in Position 1 die Esterhydrolyse erleichtert ^[156]. Dabei konnte kein Unterschied in der Reaktivität zwischen 2,6-unsubstituierten Verbindungen und deren 2,6-dimethylsubstituierten Analoga festgestellt werden ^[156]. Die beeinträchtigte Konjugation der vinylogen Struktur bei zwei Methylgruppen in Position 2 und 6 erhöht zwar die Reaktivität des Esters, die sterische Hinderung dieser Gruppen aber erschwert wiederum den Angriff eines Agens am Carbonyl-Kohlenstoff ^[156]. Wird zusätzlich ein Aryl-Substituent in Position 4 eingeführt, wird die Reaktivität aus gleichem Grund erniedrigt ^[156].

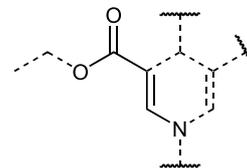


Abbildung 44: Hervorhebung des vinylogen Strukturelements

4. Ergebnisse und Diskussion der bioanalytischen Essays

Mit der Kenntnis, dass gängige Antibiotika wie Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol einem aktiven Efflux aus der Erregerzelle unterliegen und Calcium-Kanal Blocker der Dihydropyridin-Struktur potentielle Hemmstoffe dieses Prozesses darstellen, soll vorab die Effluxpumpen modulierende Eigenschaft der synthetisierten Verbindungen untersucht werden. Dazu wird ein Modell genutzt, welches Aussagen über inhibitorische Eigenschaften der Substanzen am ABC-Transporter Permeabilitäts-Glykoprotein (P-GP oder ABCB1) erlaubt. In einem weiteren Experiment soll dann die Wirkung der hier beschriebenen Verbindungen auf den Laborkeim H37Rv alleine, und in Kombination mit ausgewählten Antituberkulotika untersucht werden. Das Ausmaß der P-GP Hemmung und mögliche Effekte einer kombinatorischen Anwendung am Laborkeim soll anschließend in einen Zusammenhang gebracht und im Vergleich mit Ergebnissen bereits vorhandener Literatur diskutiert werden.

4.1. P-GP Hemmwirkung am Zellmodell des murinen T-Lymphoms (L5178Y)

4.1.1. Methodenbeschreibung

Zur Charakterisierung der inhibitorischen Effekte an P-GP diente das Zellmodell des murinen T-Lymphoms L5178Y und deren durch Gen-Transfektion mit humanem P-GP (ABCB1) erhaltenen Sub-Linie L5178Y-mdr, welche vermehrt P-GP exprimiert und während der Kultivierung mit dem Zytostatikum Colchicin selektiert wird. Eine detailliertere Beschreibung der Methode und der zugrundeliegenden Statistik findet sich im experimentellen Teil (6.2.2), hier in Kürze. Nach Anzucht und Entnahme einer definierten Zellpopulation beider Linien in Eppendorf-Gefäße wurden die zu testenden Verbindungen (1 µM) zugefügt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Fluoreszenz-Indikator für P-GP Aktivität Rhodamin 123 hinzugefügt und weiter für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation und zweimaligen Waschen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung wurde die verbleibende Fluoreszenz von Rhodamin 123 in der Zelle mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Aus den resultierenden Fluoreszenzwerten für L5178Y und L5178Y-mdr jeweils mit und ohne potentiell effluxpumpen Inhibitor (EPI) wurde das *fluorescence-activity-ratio* (FAR) mit folgender Formel berechnet.

$$FAR = \frac{F_{Zelle-mdr-EPI} / F_{Zelle-mdr}}{F_{Zelle-EPI} / F_{Zelle}} \quad \left| \quad F = \text{Fluoreszenz der im Index beschriebenen Zelle} \right.$$

Demnach bedeutet ein FAR-Wert von über 1,0 eine inhibitorische Wirkung an P-GP der Modell-Zelle,

wobei Werte von 1,0 oder weniger keinen Effekt haben. Um einen Testreihen übergreifenden Vergleich zu ermöglichen, wurde Verapamil als bekannter P-GP Inhibitor eingesetzt und die FAR-Werte der getesteten Verbindungen in Relation gesetzt, wie in folgender Formel angegeben.

$$Eff_{Verb} = \frac{FAR_{Verbindung}}{FAR_{Verapamil}} \quad \left| \quad FAR = \text{fluorescence-activity-ratio} \right.$$

Bei einem Eff_{Verb} , über 1,0 kann somit davon ausgegangen werden, dass die betrachtete Substanz eine stärkere P-GP-Affinität aufweist als die Referenz Verapamil. Ebenso liegen bei Werten von 1,0 oder geringer vergleichbare Hemmungen vor oder es ist kein Mehrwert ersichtlich.

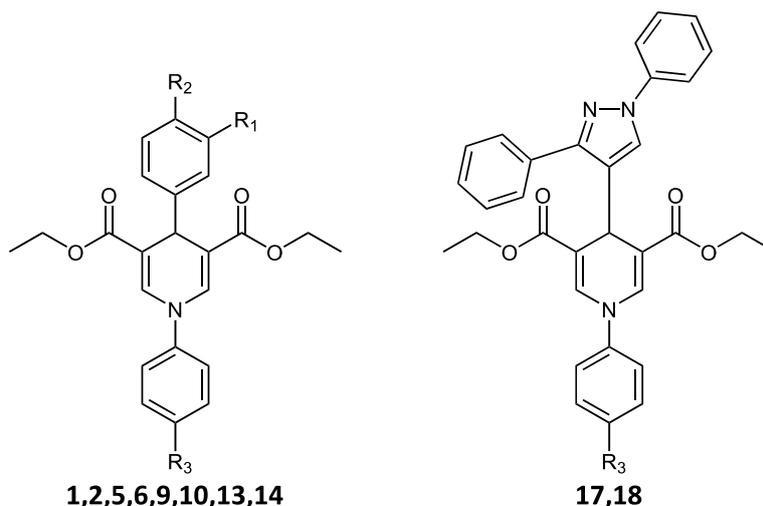
4.1.2. Der P-GP Essay

Von den insgesamt 48 in dieser Arbeit synthetisierten Dihydropyridinen erfolgte die Testung von 21 Substanzen. Die Auswahl resultiert aus der nicht zeitgleichen Fertigstellung aller Verbindungen und stellt keine Willkür dar. Im Folgenden soll auf die Ergebnisse und Beobachtungen beider Substanzgruppen im P-GP-Essay eingegangen werden. Dabei wird zuerst auf die 2,6-unsubstituierten Verbindungen eingegangen, anschließend auf die 2,6-dimethylsubstituierten.

4.1.2.a. Ergebnisse der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine

Ein Überblick über die getesteten Substanzen dieser Klasse und deren FAR-Werte bietet Tabelle 13 (Folgeside). Es handelt sich hierbei um Dihydropyridine, die mit Ausnahme von **17** und **18** verschiedene Methoxy-Substitutionsmuster an beiden variierten Molekülabschnitten aufweisen. Alle Verbindungen und der Standard wurden bei einer Konzentration von 1 μM vermessen, wie in der Methodenbeschreibung angegeben.

Tabelle 13: Überblick der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine im P-GP-Essay (n = 3)



Nr.	-R ₁	-R ₂	-R ₃	FAR-Wert ($\bar{x} \pm SD$)	Eff _{Verb,}
1	-H	-H	-H	4,3 ± 0,7	2,9
2	-H	-H	-Methoxy	3,9 ± 0,6	2,6
5	-Methoxy	-H	-H	1,11 ± 0,08	0,7
6	-Methoxy	-H	-Methoxy	3,4 ± 0,4	2,3
9	-H	-Methoxy	-H	5,8 ± 0,9	3,9
10	-H	-Methoxy	-Methoxy	1,19 ± 0,09	0,8
13	-Methoxy	-Methoxy	-H	7,3 ± 1,5	4,9
14	-Methoxy	-Methoxy	-Methoxy	5,2 ± 0,7	3,5
17	-	-	-H	3,5 ± 0,4	2,3
18	-	-	-Methoxy	3,5 ± 0,5	2,3
Konzentration 1 µM		Standard Verapamil		1,5 ± 0,2	1

Alle Verbindungen dieser Reihe zeigen eine Aktivität an P-GP und fast alle mindestens eine um den Faktor 2,3 höhere als Verapamil. Lediglich zwei (**5** und **10**) weisen niedrigere Werte als der Standard auf. Verbindung **13** stellt mit einem FAR-Wert von 7,3 die aktivste Verbindung dar und erreicht eine fast 5-fache Wirkung des Standards während Substanz **5** mit einem FAR-Wert von 1,11 die schwächste dieser Reihe bildet.

Auswertung der Substituenten Effekte der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine

Wie der Vergleich der Paare **1** und **2**, **9** und **10** sowie **13** und **14** zeigt, sorgt die Einführung einer 4-Methoxy-Gruppe am *N*-Phenyl-Abschnitt bei diesen Verbindungen für eine Reduktion der Aktivität. Bei Verbindung **17** und **18** lässt sich dieser Effekt nicht beobachten, ebenso erhalten wir für **5** und **6** ein umgekehrtes Verhältnis. Die Einführung einer Methoxy-Gruppe an Position 3 des 4-Phenyl-Ringes führt bei Verbindung **1** und **5** sowie **2** und **6** zu einer Reduktion der Aktivität von 4,3 auf 1,11 bzw. 3,9 auf 3,4. Während ein 4-Methoxy-Rest am 4-Phenyl-Ring bei Verbindung **9** im Vergleich zu **1** eine

Erhöhung von 4,3 auf 5,8 bedeutet, sorgt er bei **10** zu **2** für eine Senkung von 3,9 auf 1,19, sodass sich an dieser Stelle keine eindeutige Tendenz bezüglich der Methoxy-Substituenten abbildet. Ebenso würde man aus den gemachten Beobachtungen bei **5**, **6**, **9** und **10** ein nur mäßiges, gemischtes Potential für die 3,4-Dimethoxy-Gruppen bei **13** und **14** vermuten, welche wider Erwarten die höchste (**13**) und dritt höchste (**14**) Hemmwirkung mit 7,3 und 5,2 aufweisen. Aufgrund nur zweier Verbindungen vom Typ **17** und **18** in dieser Reihe lassen sich nur wenige Rückschlüsse auf den Effekt von 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd ziehen. Mit FAR-Werten von jeweils 3,5 erzielen diese Substanzen Hemmwerte, die mehr als die doppelte Wirkung von Verapamil erreichen. Im Vergleich dieser mit den Verbindungen **1** und **2**, welche sich nur durch den Aldehyd unterscheiden, schneiden sie jedoch schlechter ab. Der eingangs beobachtete abschwächende Effekt der *N*-(4-Methoxyphenyl)-Gruppe ist hier jedoch nicht zu beobachten.

4.1.2.b. Ergebnisse der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine

Auch hier bietet Tabelle 14 der Folgeseite einen Überblick über die getesteten Substanzen, gepaart mit ihren FAR-Werten. Mit Ausnahme der Verbindungen **41**, **45** und **46**, die über eine Nitro-Gruppe bzw. den komplexeren 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl-Rest verfügen, handelt es sich um strukturell sehr ähnliche Derivate. Im Vergleich mit den zuvor an P-GP getesteten Substanzen stellt das Charakteristikum die Einführung zweier Methyl-Gruppen an Position 2 und 6 des Dihydropyridin-Grundgerüsts dar, sodass hier teilweise im direkten Vergleich die Auswirkungen dieser Veränderung beobachtet werden kann.

Tabelle 14: Überblick der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine im P-GP-Essay (n = 3)

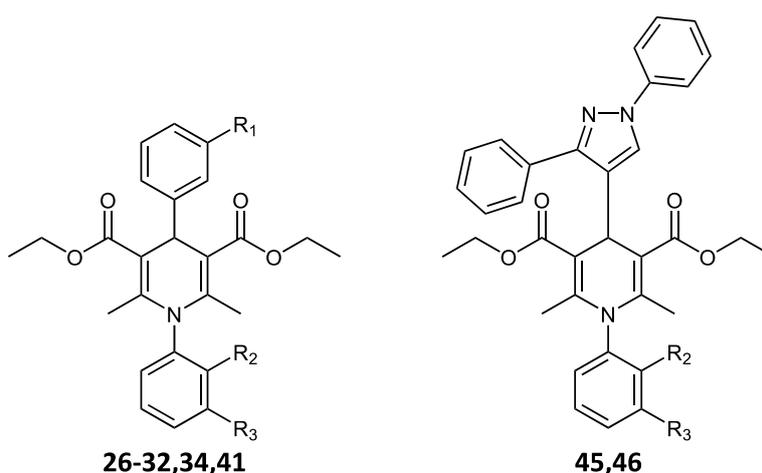


Tabelle 14 (Fortführung): Überblick der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine im P-GP-Essay (n = 3)

Nr.	-R ₁	-R ₂	-R ₃	FAR-Wert	Eff _{verb,}
26	-H	-Methyl	-H	1,45	0,36
27	-H	-H	-Methyl	1,57	0,39
28	-H	-Chlorid	-H	2,59	0,65
29	-H	-H	-Chlorid	3,61	0,9
30	-Methoxy	-H	-H	2,21	0,55
31	-Methoxy	-Methyl	-H	1,53	0,38
32	-Methoxy	-H	-Methyl	1,48	0,37
34	-Methoxy	-H	-Chlorid	1,57	0,39
41	-Nitro	-H	-Methyl	4,05	1,01
45	-	-Methyl	-H	13,21	3,29
46	-	-H	-Methyl	20,24	5,05
Konzentration 1 µM			Standard Verapamil	4,01	1

Auch hier zeigen alle getesteten Verbindungen eine Aktivität an P-GP, wobei jedoch lediglich **45** und **46** eine ca. 3-fache bzw. 5-fache Wirkung von Verapamil erzielen. Die anderen Derivate zeigen Hemmwirkungen, die von einer ähnlichen Wirkung bis hin zu einem Drittel des Standards reichen. Demnach führt **46** die Reihe mit einem FAR-Wert von 20,24 an, während **26** den geringsten Effekt mit 1,45 aufweist.

Auswertung der Substituenten Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine

Bei Betrachtung der Reihe **26** - **29**, welche sich nur im *N*-Phenyl-Abschnitt unterscheiden, lassen sich zwei Beobachtungen machen. Zum einen zeigen **28** und **29** mit einem Chlorid-Substituent mit FAR-Werten von 2,59 bzw. 3,61 eine höhere Aktivität als **26** und **27** mit FAR-Werten von 1,45 und 1,57. Zum zweiten lässt sich hier eine Präferenz für die *meta*- gegenüber der *ortho*-Position ableiten, da die beiden Verbindungen, welche aus 3-Chloranilin (**29**) und 3-Methylanilin (**27**) resultieren, ihren Gegenstücken aus 2-Chloranilin (**28**) und 2-Methylanilin (**26**) überlegen sind. In der nächsten Reihe sind die Dihydropyridine **30** - **32** und **34** vertreten, welche sich zu ihren Vorgängern in der 3-Methoxy-Funktion unterscheiden und die mit Ausnahme von **30** am *N*-Phenyl-Abschnitt dieselben Substitutionsmuster zeigen. Die Einführung der Methoxy-Gruppe führt bei **34** von einem FAR-Wert von 3,61 (**29**) zu einer Senkung auf 1,57. Im Falle von **26** (1,45) zu **31** (1,53) und **27** (1,57) zu **32** (1,48) konnte nur ein schwacher, teils umgekehrter Effekt beobachtet werden. Ebenfalls in dieser Reihe befindet sich Dihydropyridin **30**, welches als Alleinstellungsmerkmal aus einem Anilin resultiert. Der zulässige Vergleich mit **31**, **32** und **34** lässt darauf schließen, dass bei Vorhandensein einer Methoxy-Gruppe ein Fehlen der Substitution im *N*-Phenyl-Abschnitt aktivitätssteigernd ist (FAR-Wert von 2,21 für **30**). Die Nitro-Gruppierung bei Dihydropyridin **41** zeigt in Kombination mit der 3-Methyl-Gruppe des *N*-Phenyl-

Abschnittes eine Hemmwirkung mit einem FAR-Wert von 4,05, welche gerade beim Standard Verapamil liegt. Das Fehlen zusätzlicher Nitro-Verbindungen in dieser Reihe lässt keine weiteren Schlussfolgerungen zu. Lediglich der Vergleich von **27** (1,57), **32** (1,48) und **41** (4,05) ist möglich und es lässt sich ableiten, dass die Einführung der stark elektronenziehenden Gruppe einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit hat. Die beiden letzten getesteten Verbindungen **45** und **46** resultieren aus einem 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd. Sie bilden die beiden einzigen Dihydropyridine dieser Reihe, welche mit FAR-Werten von 13,21 (**45**) und 20,24 (**46**) einen deutlich stärkeren Effekt auf P-GP aufweisen als Verapamil. Der Pyrazol-Aldehyd führt bei **45** im Vergleich mit **26** und **31**, sowie **46** im Vergleich mit **27** und **32** zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung. Auch hier lässt sich das Substitutionsmuster der *N*-Phenyl-Abschnitts wie eingangs erwähnt deuten, sodass die *meta*-Position im Vorteil ist.

Anhand der Ergebnisse lassen sich grundlegende Eigenschaften formulieren, die eine Hemmwirkung an P-GP bezüglich der 2,6-dimethylsubstituierten Substanzen charakterisieren. Zum einen hat sich herausgestellt, dass eine *meta*-Substitution im *N*-Phenyl-Abschnitt einer *ortho*-Substitution vorzuziehen ist, wobei die Rolle von Verbindungen ohne jegliche Derivatisierung wie Verbindung **30** nicht endgültig geklärt werden kann. Weiterhin hat die Substitution am 4-Phenyl-Abschnitt Einfluss auf die Affinität, wie die Paare **29/34**, **27/32/46** sowie **26/31/45** nahelegen. Im Vergleich mit einem unsubstituierten Phenyl-Rest kann bei Einführung einer Methoxy-Gruppe eine tendenzielle Aktivitätsminderung verzeichnet werden, während der Austausch mit 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl eine Steigerung bedeutet. Bei Betrachtung der Substitutionsmuster im *N*-Phenyl-Abschnitt sticht hervor, dass die Derivatisierung mit einem Chlor-Substituent bessere Ergebnisse erzielt als die mit einer Methyl-Gruppe. Der elektronenziehende Effekt von Chlor und Halogenen allgemein könnte neben der unterschiedlichen relativen Atomgröße für eine bessere Bindung an der Zielstruktur verantwortlich sein. Eine Testung weiterer Halogen-substituierter Verbindungen könnte hier aufschlussreiche Informationen liefern, war im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geplant und durchgeführt worden, da nur eine Abschätzung der P-GP Effekte beabsichtigt wurde.

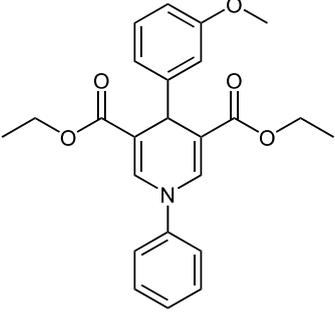
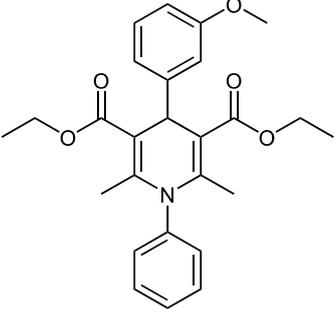
4.1.2.c. Vergleich beider Reihen und Bezug zum Target

Damit eine vergleichende Diskussion geführt werden kann, wurden die FAR-Werte in Relation zum Standard Verapamil gesetzt. Bei Betrachtung beider Reihen, welche sich grundlegend in der Substitution an Position 2 und 6 des Grundgerüsts unterscheiden fällt auf, dass die 2,6-unsubstituierte Reihe (nachfolgend 1. Reihe genannt) im Mittel eine höhere Affinität an P-GP aufweist als die 2,6-dimethylsubstituierte (nachfolgend 2. Reihe genannt). Für einen sinnvollen Vergleich sollte jedoch immer nur ein Parameter geändert werden, sodass hier nicht verallgemeinert

werden kann. Da die Verbindungen mit Ausnahme eines Paares strukturell zu unterschiedlich sind, kann nur eine Tendenz formuliert werden.

Die Substanzen **5** und **30** lassen einen direkten Vergleich zu (Tabelle 15), sie unterscheiden sich nur am Dihydropyridin-Grundgerüst. Hier zeigt sich eine verminderte Aktivität für die 2,6-dimethyl-substituierte Verbindung **30** (0,55) gegenüber **5** (0,7), die nur in Bezug auf den Standard Verapamil ersichtlich wird.

Tabelle 15: Vergleich der P-GP-Hemmwerte von Verbindung 5 und 30

		
	5	30
<i>Eff_{Verb}</i> ,	0,7	0,55
FAR-Wert	1,11	2,21

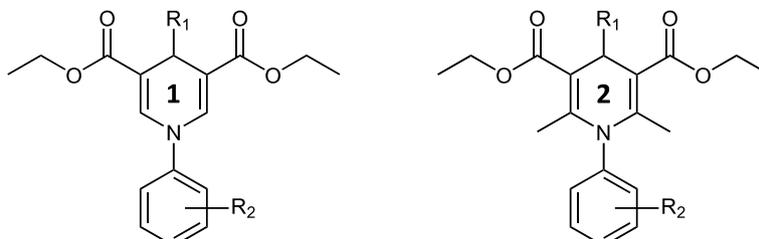
Ungeachtet des Unterschieds der zwei Methyl-Gruppen am Grundgerüst können weitere Vermutungen über Substituenten-Effekte beider Substanz-Reihen angestellt werden. Daher soll ein möglicher Einfluss der Derivatisierung der *N*-Phenyl-Gruppe diskutiert, anschließend dasselbe für die 4-Phenyle durchgeführt werden.

Auswertung der N-Phenyl-Substitutionsmuster

Der Effekt der unsubstituierten *N*-Phenyl-Gruppierung in der zweiten Test-Reihe ließ sich nicht mit Sicherheit einordnen, da nur eine Verbindung vorlag. Bei Miteinbeziehen der ersten Reihe wird ersichtlich, dass die Einführung einer Methoxy-, Methyl- oder Chlor-Gruppe bei gleichbleibendem 4-Phenyl-Rest mit Ausnahme des Paares **5/6** und **17/18** zu einer verminderten Affinität führt (Tabelle 16). Innerhalb der Substituenten wird ein elektronenziehender Effekt wie Chlor gegenüber einer eher elektronenspendenden Methyl-Gruppe präferiert. Weder die Rolle der Methoxy-Gruppe, noch eine Abstufung bezüglich der Stellung kann in dieser Versuchsreihe endgültig geklärt werden. Ein Ansatz für die Erklärung der geringeren Wirkung von *ortho*-substituierten gegenüber den *meta*-substituierten Derivaten bietet die Stereochemie. Durch die räumliche Nähe der Methyl- oder Chlor-Gruppe zur 2,6-dimethyl-Gruppe des Grundgerüsts bei *ortho*-Position, kommt es zu einer Einschränkung der Drehbarkeit des *N*-Phenyl-Ringes, so wie schon in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Dieser Verlust der Flexibilität könnte für eine eingeschränkte Wirksamkeit dieser Verbindungsklasse ausschlaggebend

sein. In *meta*-Position wird die räumliche Hinderung weniger, bei *para* vernachlässigbar gering sein. Im Vergleich dazu sind die Verbindungen der ersten Reihe nicht von dieser Einschränkung betroffen, da die beiden Methyl-Gruppen an Position 2 und 6 nicht vorhanden sind.

Tabelle 16: Effekt der N-Phenyl-Substitutionsmuster beider Reihen (P-GP, n = 3)



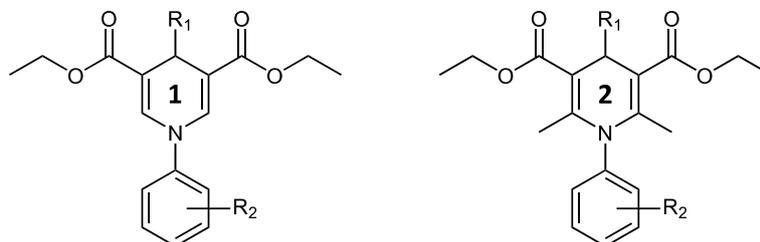
Reihe	-R ₁	Nr	-R ₂	FAR-Wert	Effekt
1	-Phenyl	1	-H	4,3	↓ 9 %
		2	-4-Methoxy	3,9	
1	-3-Methoxyphenyl	5	-H	1,11	↑ 206 %
		6	-4-Methoxy	3,4	
1	-4-Methoxyphenyl	9	-H	5,8	↓ 79 %
		10	-4-Methoxy	1,19	
1	-3,4-Dimethoxyphenyl	13	-H	7,3	↓ 29 %
		14	-4-Methoxy	5,2	
1	-1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl	17	-H	3,5	- 0 %
		18	-4-Methoxy	3,5	
2	-3-Methoxyphenyl	30	-H	2,21	↓ 31 %
		31	-2-Methyl	1,53	
2	-3-Methoxyphenyl	30	-H	2,21	↓ 33 %
		32	-3-Methyl	1,48	
2	-3-Methoxyphenyl	30	-H	2,21	↓ 29 %
		34	-3-Chlor	1,57	

Auswertung der 4-Phenyl-Substitutionsmuster

Ausgehend von einer unsubstituierten 4-Phenyl-Verbindung birgt der Austausch zu einem 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-Rest in der Hälfte der beschriebenen Fälle einen Mehrwert bezüglich der Affinität an P-GP (Tabelle 17). Ein Wasserstoff-Brücken-Akzeptor wie eine Methoxy-Gruppe kann eine Rolle in der Bindung am Target spielen. Da die Ergebnisse von 4-Phenyl über 4-(3-Methoxyphenyl), 4-(4-Methoxyphenyl) bis 4-(3,4-Dimethoxyphenyl) keine eindeutige Linie vorgeben, kann hier kein klarer

Effekt ausgemacht werden. Eher scheint ein sterisch anspruchsvoller Substituent wie 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl) oder 4-(3,4-Dimethoxyphenyl) die Hemmwirkung zu begünstigen.

Tabelle 17: Effekt der 4-Phenyl-Substitutionsmuster beider Reihen (P-GP, n = 3)



Reihe	-R ₂	Nr	-R ₁	Eff _{Verb.}
1	-H	1	-Phenyl	2,9
	-H	5	-(3-Methoxyphenyl)	0,7
	-H	9	-(4-Methoxyphenyl)	3,9
	-H	13	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	4,9
	-H	17	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	2,3
1	-4-Methoxy	2	-Phenyl	2,6
	-4-Methoxy	6	-(3-Methoxyphenyl)	2,3
	-4-Methoxy	10	-(4-Methoxyphenyl)	0,8
	-4-Methoxy	14	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	3,5
	-4-Methoxy	18	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	2,3
2	-2-Methyl	26	-Phenyl	0,36
	-2-Methyl	31	-(3-Methoxyphenyl)	0,38
	-2-Methyl	45	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	3,29
2	-3-Methyl	27	-Phenyl	0,39
	-3-Methyl	32	-(3-Methoxyphenyl)	0,37
	-3-Methyl	46	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	5,05

Target-spezifische Besonderheiten an P-GP

Bislang ist keine hochauflösende Struktur des humanen P-GP verfügbar ^[76, 78], Studien und mathematische Berechnungen werden vorwiegend mit vorhandenen Modellen von Maus ^[76] oder beispielsweise Hamster durchgeführt ^[171]. Ebenso wenig ist eine detaillierte Vorstellung des Bindungsmodus, noch der Bindungsregion von Substraten gereift ^[76, 171]. Für die Region der Bindung wird jedoch angenommen, dass sie im neutralen, membrandurchdringenden Abschnitt liegt ^[76, 78, 171]. Es wird vermutet, dass hier mehrere Bindungstaschen vorliegen, welche die Möglichkeit haben, miteinander zu interagieren ^[78]. Weiterhin werden sie bzgl. ihrer räumlichen Ausprägung als flexibel

beschrieben ^[78], woher auch die Tatsache rühren soll, dass je nach Substrat inhibierende oder induzierende Effekte beobachtet werden können ^[78, 171]. Die Vielfalt der bindenden, strukturell unterschiedlichen Substanzen wird aus demselben Grund als polyspezifisch und nicht als unspezifisch bezeichnet ^[78]. SHARON ET AL. versuchen in ihrer Arbeit Eigenschaften von P-GP-Substraten aus den von ihnen gemachten Erkenntnissen abzuleiten, weisen jedoch darauf hin, dass sich bislang keine allgemein gültigen Regeln formulieren lassen ^[78]. Zum einen besteht ein überwiegender Teil der für die Bindungsregion verantwortlichen transmembranären Domäne aus Aminosäuren, welche Wasserstoff-Brücken-Donatoren darstellen ^[78]. Daher wird angenommen, dass zwei bis drei Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren in einem Substrat für eine bessere Bindung vorliegen sollten ^[78]. Ebenso sind vermehrt Seitenketten mit der Aminosäure Tryptophan beschrieben, welche in der Fixierung hydrophober aromatischer Reste zum Einsatz kommen sollen ^[78].

Ableitung potentiell günstiger Strukturelemente der synthetisierten Dihydropyridine

Früh konnte gezeigt werden, dass die räumliche Struktur der Dihydropyridine einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit an Calcium-Kanälen darstellt ^[135], daher muss man grundlegend die Annahme formulieren, dass sie auch Einfluss auf die Wirkung an anderen Targets bedeutet. Der Ring des Grundkörpers liegt in einer flachen Wannen-Konformation vor (siehe auch Abschnitt 2.3.2), während der 4-Phenyl-Rest eine pseudoaxiale Stellung bevorzugt ^[135]. Diese Grundform ist durch Ringinversion und Drehbarkeit flexibel, wird jedoch durch unterschiedliche Substitutionsmuster zunehmend starrer ^[135]. Bei den 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridinen ist zusätzlich eine äquatoriale Stellung der Ester-Gruppen bevorzugt ^[135] und der *N*-Phenyl-Rest ist dadurch ebenso in seiner Drehung eingeschränkt ^[169].

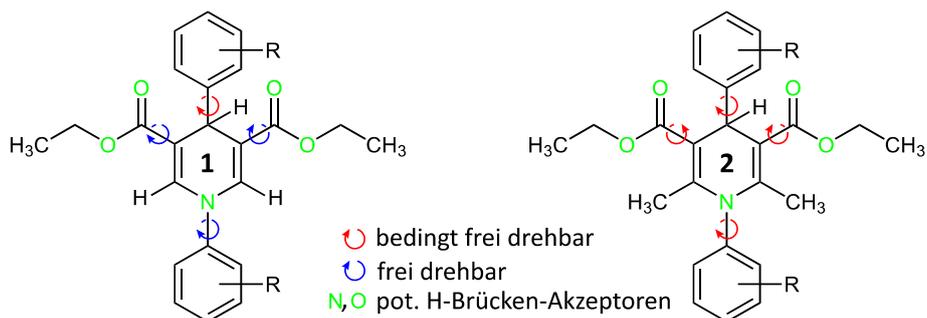


Abbildung 45: Flexibilität des DHP-Grundkörpers und mögliche Wasserstoff-Brücken

Relativ flexibel hingeben zeigen sich die 2,6-unsubstituierten Verbindungen durch das Fehlen der beiden Methyl-Gruppen^[135] (Abbildung 45). Die synthetisierten Verbindungen der ersten Reihe zeigten im Mittel bessere Werte als die der zweiten Reihe, sodass man postulieren kann, dass eine gegebene Flexibilität der Struktur einen günstigen Einfluss auf die Wirkung hat. Daneben weisen alle Substanzen dieselben potentiellen Gruppen im Grundgerüst auf, die als Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren fungieren können. Dazu zählen die Sauerstoff-Atome der beiden Ester als auch der Stickstoff des zentralen 1,4-Dihydropyridin Ringes, dessen Elektronenpaar nicht in eine Aromatizität eingebunden ist. Der Effekt zusätzlicher Wasserstoff-Brücken hat sich in der P-GP Testreihe nur bedingt nachvollziehen können, so wiesen die Derivate mit 4-(3,4-Dimethoxyphenyl) mit zwei weiteren Akzeptoren die höchste Wirkung auf, während nur eine Methoxy-Substitution wechselnde Wirkung im Vergleich mit dem unsubstituierten 4-Phenyl zeigte. Für 4-(1,3-Diphenyl-1H-Pyrazol-4-yl) ergaben sich konstant mittelmäßige bis gute Werte, was den Effekt eines sterisch anspruchsvolleren und hydrophoben Restes an Position 4 des DHP-Grundgerüsts beschreibt.

4.1.2.d. Bezug zur Effluxpumpen-Affinität bei *Mycobacterium tuberculosis*

Aufgrund des Fehlens detaillierter Informationen über die strukturellen Besonderheiten der Effluxpumpen im gefragtem Erreger, kann vom humanen P-GP im Maus-Modell nicht direkt auf einen Effekt beim Bakterium geschlossen werden. Da jedoch bestimmte Merkmale von Transporter-Systemen gleichbleibend sind und daher diese Proteine auch zurecht nach tcdb (*transporter-classification-database*) in Gruppen eingeteilt werden, kommt man zu der Annahme, dass eine Präferenz für eine bestimmte Familie übergreifend existiert. Über die Beschreibung der Effekte an P-GP können also allgemein Mutmaßungen über deren Aktivität an ABC-Transportern getroffen werden, sodass hier folgende Annahmen erlaubt sind. Zum einen kann postuliert werden, dass die synthetisierten Verbindungen, die sich im Maus-Essay vielversprechend zeigten ebenso eine günstige Wirkung an Transportern der ABC-Familie in *Mycobacterium tuberculosis* versprechen. Im Umkehrschluss müssen die synthetisierten Verbindungen, die keine oder nur eine geringe Aktivität zeigten nicht zwangsweise unwirksam sein, da die strukturellen Besonderheiten der mykobakteriellen ABC-Transporter, sowie auch der anderen im Detail nicht bekannt sind. Zusammengefasst heißt das,

dass grundsätzlich alle Effluxpumpen (Tabelle 4) für eine Hemmung in Frage kommen. Eine Präferenz für ausgewählte Verbindungen an ABC-Transportern kann jedoch vorliegen und soll später untersucht werden. Demnach soll im Folgenden versucht werden diese Ergebnisse mit Hilfe von Testungen der Verbindungen am Laborkeim H37Rv alleine und in Kombination mit gängigen Antituberkulotika einzugrenzen. Mit Hilfe dieser Daten soll die Frage beantwortet werden, inwieweit die synthetisierten Dihydropyridine Effluxpumpen-Hemmer bei *Mycobacterium tuberculosis* darstellen und es soll eine Abschätzung beteiligter Transporter nach dem Ausschluss-Prinzip vorgenommen werden.

4.2. GFP-H37Rv Aktivitätsbestimmungen

4.2.1. Methodenbeschreibung

Zur Beschreibung der antimykobakteriellen Effekte wurden die synthetisierten Dihydropyridine am Laborkeim H37Rv getestet. Die Versuche wurden extern im Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von PD Dr. Norbert Reiling durchgeführt. Für die Beurteilung des Wachstums wurden green-fluorescent-protein (GFP) exprimierende *M. Tuberculosis* H37Rv Bakterien mit Hilfe von Plasmiden hergestellt, welche sich nach Inkubation mit den zu testenden Verbindungen durch Messung der relativen Licht Absorption bei 528 nm auswerten lassen. Eine detailliertere Versuchsbeschreibung und deren Auswertungsmethode findet sich im Anhang (6.2.3.a).

4.2.2. Der GFP-H37Rv-Wachstums-Essay

Von den insgesamt 48 synthetisierten Verbindungen wurden 37 auf ihre antimykobakterielle Aktivität am Laborkeim H37Rv getestet. Neben der Ermittlung der Wachstumshemmung auf den Erreger alleine, wurde für ausgewählte Verbindungen eine Hemmung in Kombination mit den Referenzwirkstoffen Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, Ciprofloxacin und Clofazimin durchgeführt, um Effluxpumpen-modulierende Effekte untersuchen zu können.

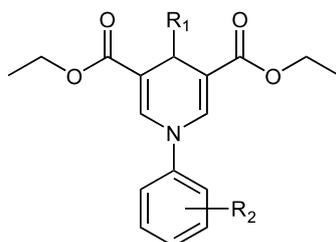
4.2.2.a. Ergebnisse der 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine

Eine Zusammenfassung aller ermittelten Messwerte bieten Tabelle 18 (sortiert nach 4-Phenyl-Substitutionsmustern) und Tabelle 19 (sortiert nach *N*-Phenyl-Substitutionsmustern), die eingesetzte Konzentration lag bei 1 µg/ml. Bei der Messung zeigten 10 Dihydropyridine Aktivität am Erreger mit über 30 % Hemmwirkung, von denen die Verbindungen **2**, **5** und **14** Werte von über 60 % erzielten. Bei 8 Substanzen können weniger als 10 % Aktivität verzeichnet werden, drei davon zeigen nahezu keine Aktivität (**15**, **19** und **24**). Wie auch bei der Beschreibung der Ergebnisse des P-GP Essays, sollen hier die 4-Phenyl- und *N*-Phenyl-Substitutionsmuster zuerst getrennt voneinander diskutiert werden.

Auswertung der 4-Phenyl-Substitutionsmuster

In Tabelle 18 (Folgeseite) sind die Verbindungen **1** - **24** in Gruppen aufgelistet. Die Sortierung nach dem jeweils konstanten *N*-Phenyl-Substituent macht die Auswirkungen der Derivatisierung an Position 4 des Dihydropyridin-Grundgerüsts sichtbar. Weiterhin wird ein Wert in Prozent dargestellt, der den Effekt des jeweiligen Derivates in der Gruppe bezüglich der einfachen 4-Phenyl-Substitution darstellt. Dabei wird eine Aktivitätssteigerung durch einen Pfeil nach Oben, ein -Verlust durch einen Pfeil nach Unten symbolisiert.

Tabelle 18: Effekt der 4-Phenyl-Substitutionsmuster auf die Wachstumshemmung (bei 1 µg/ml, n = 3)



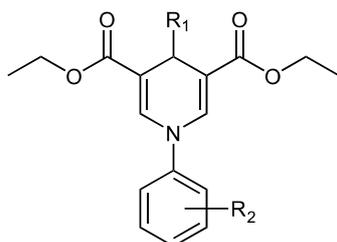
-R ₂	Nr	-R ₁	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Effekt bezogen auf R ₁ = Phenyl
-H	1	-Phenyl	56,5 ± 21,9	
-H	5	-(3-Methoxyphenyl)	60,51 ± 4,82	↑ 7 %
-H	9	-(4-Methoxyphenyl)	24,91 ± 3,79	↓ 56 %
-H	13	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	29,55 ± 10,16	↓ 48 %
-H	17	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	20,22 ± 6,92	↓ 64 %
-H	21	-(3-Benzyloxyphenyl)	19,96 ± 11,57	↓ 65 %
-4-Methoxy	2	-Phenyl	59,75 ± 1,59	
-4-Methoxy	6	-(3-Methoxyphenyl)	40,52 ± 7,17	↓ 32 %
-4-Methoxy	10	-(4-Methoxyphenyl)	34,94 ± 9,84	↓ 42 %
-4-Methoxy	14	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	59,26 ± 7,32	↓ 1 %
-4-Methoxy	18	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	4,95 ± 21,08	↓ 92 %
-4-Methoxy	22	-(3-Benzyloxyphenyl)	7,37 ± 13,28	↓ 88 %
-2-Methyl	3	-Phenyl	33,58 ± 0,77	
-2-Methyl	7	-(3-Methoxyphenyl)	40 ± 5	↑ 19 %
-2-Methyl	11	-(4-Methoxyphenyl)	2,43 ± 6,96	↓ 93 %
-2-Methyl	15	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	0,36 ± 8,49	↓ 99 %
-2-Methyl	19	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	≤ 0	↓ ≥ 100 %
-2-Methyl	23	-(3-Benzyloxyphenyl)	14,41 ± 10,92	↓ 57
-2-Chlor	4	-Phenyl	9,07 ± 2,65	
-2-Chlor	8	-(3-Methoxyphenyl)	36,71 ± 0,44	↑ 305 %
-2-Chlor	12	-(4-Methoxyphenyl)	24,16 ± 5,57	↑ 166 %
-2-Chlor	16	-(3,4-Dimethoxyphenyl)	8,67 ± 7,71	↓ 4 %
-2-Chlor	20	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	12,36 ± 15,69	↓ 36 %
-2-Chlor	24	-(3-Benzyloxyphenyl)	0,47 ± 4,18	↓ 95 %

Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen wird ersichtlich, dass eine Derivatisierung des 4-Phenyl-Restes in der Regel mit einem Aktivitätsverlust einhergeht. Eine Ausnahme bildet Verbindung **12** mit einer 4-Methoxyphenyl-Substitution mit einer ca. anderthalbfachen Steigerung gegenüber Nr **4**. Ebenso führen die Strukturen **5**, **7** und **8** mit einer 3-Methoxy-Substitution zu 7 %, 19 % bzw. der ca. dreifachen Aktivitätssteigerung. Hier zeigt sich, dass die Einführung einer Methoxy-Gruppe in der betrachteten Messreihe als einziges Substitutionsmuster einen Mehrwert gegenüber der Phenyl-Substitution bietet. Bei Auswertung der Stellung ist eine Methoxy-Funktion an Position 3 der an Position 4 vorzuziehen, was die Paare **5/9**, **6/10**, **7/11** und **8/12** nahelegen. Im Gegensatz sind bei einer 3,4-Dimethoxy-Substitution wechselnde Effekte beobachtbar. So weist Nr **14** vergleichbare Hemmwerte mit dem Phenyl-Derivat **2** von 59 % auf, während in allen anderen Fällen eine teilweise deutliche Aktivitätsminderung zu verzeichnen ist (**13**: ↓ 48 %, **15**: ↓ 99 %; **16**: ↓ 4 %). Der sterisch anspruchsvolle 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl-Rest führt wie der ebenso voluminösere 3-Benzoyloxyphenyl-Rest zu einer Wirkungsminde rung bis hin zum Aktivitätsverlust bei Nr **19**. Allgemein lässt die Gruppenauswertung erkennen, dass ein Dihydropyridin mit *N*-Phenyl- oder *N*-(4-Methoxyphenyl)-Rest im Mittel bessere Hemmwirkungen erzielt als mit *N*-(2-Methylphenyl)- oder *N*-(2-Chlorphenyl)-Rest.

Auswertung der N-Phenyl-Substitutionsmuster

Die abschließend formulierte Tendenz lässt sich bei der Auswertung der *N*-Phenyl-Substitutionsmuster bestätigen (Tabelle 19, Folgeseite). Bei gleichbleibendem 4-Phenyl-Rest zeigt sich, dass die *N*-(4-Methoxyphenyl)-Substitution einen Mehrwert zum einfachen *N*-Phenyl-Rest darstellen kann. Dies wird durch die Paare **1/2**, **9/10** und **13/14** bestätigt, bei denen eine Steigerung der Wirkung von 6 %, 40 % und 101 % ermittelt wird. Weiterhin wird aus der Darstellung ersichtlich, dass mit Ausnahme der Verbindungen **20** und **23** die Einführung einer *N*-(2-Chlorphenyl)- und *N*-(2-Methylphenyl)-Substitution mit einer Aktivitätsminderung gegenüber der *N*-Phenyl oder *N*-(4-Methoxyphenyl)-Derivatisierung einhergeht.

Tabelle 19: Effekt der N-Phenyl-Substitutionsmuster auf die Wachstumshemmung (bei 1 µg/ml, n = 3)



-R ₁	Nr	-R ₂	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Effekt bezogen auf R ₂ = H
-Phenyl	1	-H	56,5 ± 21,9	
-Phenyl	2	-4-Methoxy	59,75 ± 1,59	↑ 6 %
-Phenyl	3	-2-Methyl	33,58 ± 0,77	↓ 41 %
-Phenyl	4	-2-Chlor	9,07 ± 2,65	↓ 84 %
- (3-Methoxyphenyl)	5	-H	60,51 ± 4,82	
- (3-Methoxyphenyl)	6	-4-Methoxy	40,52 ± 7,17	↓ 33 %
- (3-Methoxyphenyl)	7	-2-Methyl	40 ± 5	↓ 34 %
- (3-Methoxyphenyl)	8	-2-Chlor	36,71 ± 0,44	↓ 39 %
- (4-Methoxyphenyl)	9	-H	24,91 ± 3,79	
- (4-Methoxyphenyl)	10	-4-Methoxy	34,94 ± 9,84	↑ 40 %
- (4-Methoxyphenyl)	11	-2-Methyl	2,43 ± 6,96	↓ 90 %
- (4-Methoxyphenyl)	12	-2-Chlor	24,16 ± 5,57	↓ 3 %
- (3,4-Dimethoxyphenyl)	13	-H	29,55 ± 10,16	
- (3,4-Dimethoxyphenyl)	14	-4-Methoxy	59,26 ± 7,32	↑ 101 %
- (3,4-Dimethoxyphenyl)	15	-2-Methyl	0,36 ± 8,49	↓ 99 %
- (3,4-Dimethoxyphenyl)	16	-2-Chlor	8,67 ± 7,71	↓ 71 %
- (1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	17	-H	20,22 ± 6,92	
- (1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	18	-4-Methoxy	4,95 ± 21,08	↓ 76 %
- (1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	19	-2-Methyl	≤ 0	↓ ≥ 100 %
- (1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	20	-2-Chlor	12,36 ± 15,69	↓ 39 %
- (3-Benzyloxyphenyl)	21	-H	19,96 ± 11,57	
- (3-Benzyloxyphenyl)	22	-4-Methoxy	7,37 ± 13,28	↓ 63 %
- (3-Benzyloxyphenyl)	23	-2-Methyl	14,41 ± 10,92	↓ 28 %
- (3-Benzyloxyphenyl)	24	-2-Chlor	0,47 ± 4,18	↓ 98 %

Zusammenfassung und Ableitung potentiell günstiger Struktur-Elemente

Beim Vergleich der Tabelle 18 und Tabelle 19 kristallisiert sich heraus, dass für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Grundstruktur bestimmte Substitutionsmuster für eine gesteigerte Aktivität am Erreger *M. tuberculosis* vorteilhaft sind. Dazu zählen an Position 4 des Grundgerüsts die Einführung eines Phenyl- oder 3-Methoxyphenyl-Restes, während sich am Stickstoff der Phenyl- und 4-Methoxyphenyl-Rest bewährt haben. Höchste Aktivität erzielte dabei eine Kombination aus 4-(3-Methoxyphenyl)- und N-Phenyl-Rest mit ca. 61 % bei Verbindung **5** (1 µg/ml). Wechselnde Effekte wurden bei der Einführung von 4-(4-Methoxyphenyl)- und 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-Rest beobachtet, während sowohl *N*-(2-Methylphenyl), *N*-(2-Chlorphenyl) als auch 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl) und 4-(3-Benzoyloxyphenyl) zu Aktivitätsminderung bis hin zur Wirkungslosigkeit bei Verbindung **19** führen.

Tabelle 20: Abstufung der Struktur-Wirkungsbeziehungen (Bezug der Reste auf Tabelle 18/20)

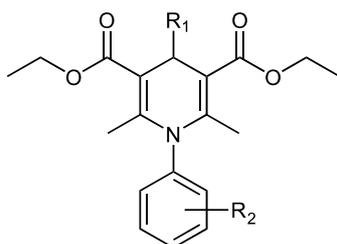
R₁: 4-(3-Methoxyphenyl) > 4-Phenyl > 4-(4-Methoxyphenyl) ≈ 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)
> 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl) ≈ 4-(3-Benzoyloxyphenyl)

R₂: *N*-(4-Methoxyphenyl) > *N*-Phenyl > *N*-(2-Methylphenyl) ≈ *N*-(2-Chlorphenyl)

4.2.2.b. Ergebnisse der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine

Auch hier bietet Tabelle 21 der Folgeseite eine Zusammenfassung der erzielten Hemmwerte, die eingesetzte Konzentration lag im Gegensatz zur vorherigen Messreihe bei 10 µg/ml. Aufgrund der Testung von nur 13 der 24 synthetisierten Verbindungen lassen sich keine Reihen kompletter Substitutionsmuster wie bei den 2,6-unsubstituierten Verbindungen aufstellen. Alle Ergebnisse sollen daher gleichzeitig einer Betrachtung unterzogen werden. Die ermittelten Messwerte stellen eine Mittelung aller erhaltenen Werte der Daten aus dem Inhibitions-Essay dar (4.2.3.a), wobei dort in jeder Messung neben den synergistischen Effekten mit den Referenzwirkstoffen die Einzelwirkung untersucht wurde.

Tabelle 21: Antimykobakterielle Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen (bei 10 µg/ml)



-R ₁	Nr	-R ₂	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]
-Phenyl	25 ^[b]	-H	≤ 0
-Phenyl	26 ^[b]	-2-Methyl	≤ 0
-Phenyl	27 ^[c]	-3-Methyl	9,07 ± 3,35
-Phenyl	28 ^[c]	-2-Chlor	≤ 0
-Phenyl	29 ^[c]	-3-Chlor	≤ 0
-(3-Methoxyphenyl)	30 ^[b]	-H	19,75 ± 6,44
-(3-Methoxyphenyl)	31 ^[a]	-2-Methyl	≤ 0
-(3-Methoxyphenyl)	32 ^[a]	-3-Methyl	≤ 0
-(3-Methoxyphenyl)	34 ^[a]	-3-Chlor	≤ 0
-(3-Nitrophenyl)	41 ^[b]	-3-Methyl	16,14 ± 4,47
-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	45 ^[b]	-2-Methyl	2,69 ± 8,51
-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	46 ^[a]	-3-Methyl	9,95 ± 5,54
-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	47 ^[a]	-2-Chlor	≤ 0

^[a] n = 6; ^[b] n = 9; ^[c] n = 12

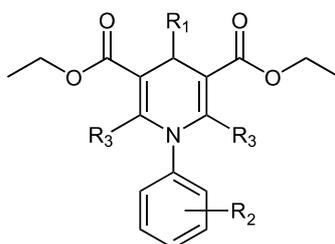
Dabei fällt auf, dass die aktivste Substanz hier lediglich eine Hemmwirkung von ca. 20 % erzielte (Nr **30**). Neben 8 Substanzen, die auf den Erreger keine Wirkung zeigten, erhalten wir lediglich für die verbleibenden 5 Verbindungen Werte zwischen 3 % und 20 %. Als Tendenz lässt sich formulieren, dass ein N-(2-Chlorphenyl)- oder N-(3-Chlorphenyl)-Rest zur Wirkungslosigkeit führt. Die Einführung einer Nitrophenyl Gruppierung an Position 4 des Grundgerüsts (Nr **41**) bildet mit ca. 16 % die zweite Substanz, welche über 10 % Hemmung erreichte. Es kann vermutet werden, dass eine elektronenziehende Komponente einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit ausübt. Wie auch schon bei den P-GP Ergebnissen diskutiert, könnten hier die sterisch-strukturellen Besonderheiten eine Rolle spielen. Durch die 2,6-dimethyl-Substitution wird das Grundgerüst bei *ortho*-Derivatisierung der N-Phenyl-Gruppe zunehmend starrer und unflexibel. So weisen ebenso Verbindung **26**, **28**, **31** und **47** keine oder eine vernachlässigbar geringe Aktivität wie bei **45** mit ca. 3 % auf. Zur Ableitung potentiell

günstiger Strukturelemente sind die vorhandenen Daten nicht ausreichend, sodass darauf an dieser Stelle verzichtet werden soll.

4.2.2.c. Vergleich beider Dihydropyridin Reihen

Bei Betrachtung beider Dihydropyridin Reihen lassen sich 7 Paare strukturell vergleichbarer Verbindungen gegenüberstellen, welche sich nur in der Substitution an Position 2 und 6 unterscheiden. Die Daten sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich der antimykobakteriellen Effekte beider Dihydropyridin-Reihen



Nr	-R ₁	-R ₂	-R ₃	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Minderung um
1 25	-Phenyl	-H	-H -Methyl	56,5 ± 21,9 ≤ 0	↓ 100 %
3 26	-Phenyl	-2-Methyl	-H -Methyl	33,58 ± 0,77 ≤ 0	↓ 100 %
4 28	-Phenyl	-2-Chlor	-H -Methyl	9,07 ± 2,65 ≤ 0	↓ 100 %
5 30	-3-Methoxyphenyl	-H	-H -Methyl	60,51 ± 4,82 19,75 ± 6,44	↓ 65 %
7 31	-3-Methoxyphenyl	-2-Methyl	-H -Methyl	40 ± 5 ≤ 0	↓ 100 %
19 45	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	-2-Methyl	-H -Methyl	≤ 0 2,69 ± 8,51	-
20 47	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	-2-Chlor	-H -Methyl	12,36 ± 15,69 ≤ 0	↓ 100 %

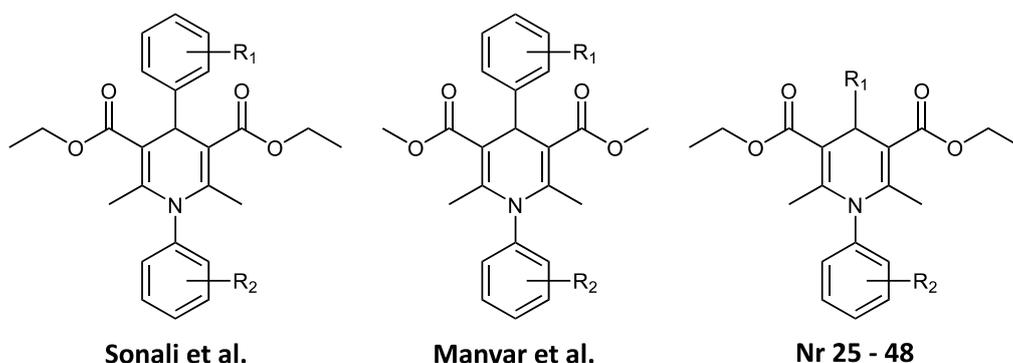
Bei Berücksichtigung, dass die 2,6-unsubstituierten Verbindungen in einer 10-fach geringeren Konzentration vermessen wurden (1 µg/ml zu 10 µg/ml), kann aus den Messwerten geschlossen werden, dass die 2,6-dimethylsubstituierten Derivate keine oder nur eine unwesentliche Hemmwirkung am Keim *M. tuberculosis* aufweisen. Mit Ausnahme einer betrachteten Gegenüberstellung (Nr **19/45**) führt die 2,6-Substitution zu einem Aktivitätsverlust der zuvor aktiven Verbindungen. Gründe könnten in der starren Molekülstruktur der 2,6-dimethylsubstituierten

Dihydropyridine gesucht werden, da insbesondere hier die in ihrer Drehung eingeschränkten *ortho*-substituierten N-Phenyl-Derivate verglichen wurden.

4.2.2.d. Mögliche Targets der aktiven Verbindungen am Erreger *M. tuberculosis*

Die Untersuchung der Wirkung von unterschiedlich substituierten Dihydropyridinen am Erreger *M. tuberculosis* ist nicht neu, es sind jedoch nur wenige Informationen über mögliche Angriffspunkte der Substanzen vorhanden. Die synthetisierte Reihen 2,6-unsubstituierter und 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen, die zusätzlich aromatische Substituenten am Stickstoff des Grundgerüsts tragen, wurde zudem nach gegenwärtigem Kenntnisstand nahezu nicht untersucht. Bezugnehmend auf Abschnitt 2.3.2, gibt es zwei Arbeiten, die strukturell ähnliche Verbindungen behandeln, MANVAR et al. (2010) ^[144] und SONALI et al. (2013) ^[149] (Tabelle 23). In der ersten Referenz werden 2,6-dimethylsubstituierte Dihydropyridine mit Methylestern an Position 3 und 5 betrachtet, welche verschiedene Substitutionsmuster an 4-Phenyl und *N*-Phenyl aufweisen ^[144]. Für die 13 beschriebenen DHP's werden vergleichbar geringe Aktivitäten am Testkeim H37Rv erhalten ^[144]. Der Arbeitskreis um SONALI lässt 6 verschiedene 2,6-dimethylsubstituierte Dihydropyridine mit Ethylestern an Position 3 und 5 am Erreger testen und erhält mit Ausnahme einer Verbindung mit MANVAR vergleichbare geringe Hemmwirkungen ^[144, 149].

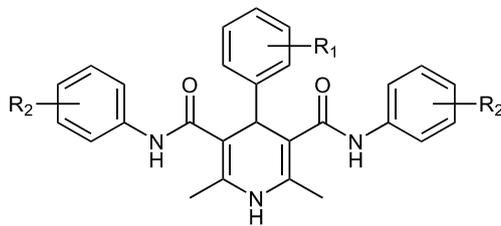
Tabelle 23: Struktureller Vergleich der DHP's zwischen Sonali et al., Manvar et al. und den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen 25 - 28



Im Gegensatz liegen keine Informationen für 2,6-unsubstituierte DHP's vor, die sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit als vielversprechend herausgestellt haben. Zwei Arbeiten, die in Abschnitt 2.3.2 genannt wurden benennen ein potentielles Target ihrer spezifischen Dihydropyridine und bestätigen ihre Vermutung durch Testung am vermeintlichen Zielenzym InhA ^[140, 141], welches in der Mykolsäure-Synthese eine Rolle spielt. Beide Autoren distanzieren sich von der Annahme, dass dies die alleinige Target-Struktur bildet, es soll lediglich ein Ansatzpunkt für weitere Versuche darstellen ^[140, 141]. Da diese Dihydropyridine nur entfernt strukturverwandt mit den synthetisierten 2,6-unsubstituierten

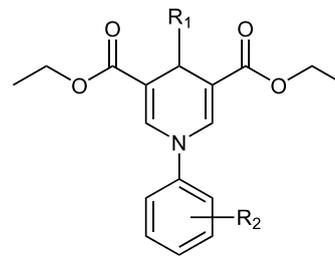
Verbindungen sind, kann abschließend nicht geklärt werden, welche Ziel-Struktur für die antimykobakterielle Wirkung in Frage kommen könnte (Tabelle 24).

Tabelle 24: Struktureller Vergleich der DHP's zwischen Desai et al., Manvar et al. und den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen 1 - 24



Desai et al.

Manvar et al.



Nr 1 - 24

Im Anschluss an die Messung der Eigenwirkung der synthetisierten Dihydropyridine sollte ihr Verhalten in Kombination mit den gängigen Referenzsubstanzen wie Rifampicin und Isoniazid untersucht werden. Dadurch soll das Ausmaß der Modulation von Effluxpumpen bestimmt werden.

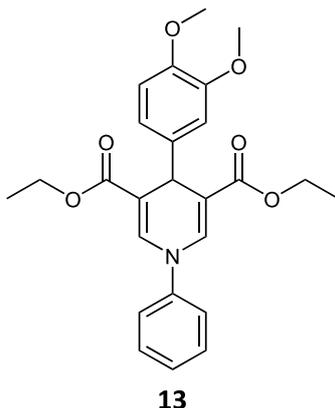
4.2.3. Der GFP-H37Rv-Inhibitions-Essay

Um möglichst nur Effluxpumpen-modulierende Effekte beobachten zu können, sollte die eigene Hemmwirkung der Testsubstanz auf den Erreger minimiert sein. Gleichzeitig ist es notwendig, Bruchteile der MHK der Referenzsubstanz einzusetzen, da ein Zusatznutzen bei zu hoher Eigenwirkung nicht mehr messbar wird. Ziel folgender Versuchsanordnungen war es daher, nicht oder kaum aktive Verbindungen im GFP-H37Rv-Essay mit geringen Konzentrationen an gängigen Wirkstoffen zu kombinieren, um die Auswirkungen zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um dieselbe Methodik wie im Wachstums-Essay (siehe 6.2.3.a), nur dass zu Beginn der Inkubationszeit sowohl mit der zu testenden Substanz als auch mit der Referenz inkubiert wurde. Da die 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine bei 1 µg/ml deutlich bessere Hemmwirkungen erzielten als die 2,6-dimethylsubstituierten, wurde aus der ersten Reihe lediglich eine schwach hemmende aber im Vergleich mit dem Standard Verapamil deutlich P-GP-aktive Substanz ausgewählt (Nr **13**). Aus der zweiten Reihe wurden insgesamt 13 DHP's getestet, welche allesamt nur schwach P-GP-aktiv waren, dafür nahezu keine Hemmwirkung auf den Erreger aufwiesen.

4.2.3.a. Effluxpumpen-modulierende Effekte des 2,6-unsubstituierten Dihydropyridins Nr 13

Um bei Verbindung **13** eine Konzentration wählen zu können, bei der die eigene Hemmwirkung auf den Erreger minimiert wird, wurde eine weitere Testreihe an GFP-H37Rv durchgeführt (siehe Abschnitt 6.2.3.a, Tabelle 25).

Tabelle 25: Antimykobakterielle Effekte unter verschiedenen Konzentrationen (Nr 13, n = 3)



Konzentration	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	P-GP Aktivität FAR-Wert ($\bar{x} \pm \text{SD}$) / Eff_{verb}
5 µg/ml	46,11 ± 12,4	-
1,5 µg/ml	37,45 ± 30,2	-
0,5 µg/ml	8,76 ± 19,4	-
Zuvor getestete Konzentration und P-GP Aktivität		
1 µg/ml	29,55 ± 10,6	-
1 µM	-	7,3 ± 1,5 / 4,9

Von der höchsten getesteten Konzentration von 5 µg/ml ist im Mittel eine Tendenz zu geringerer Hemmwirkung mit weniger als 10 % bei 0,5 µg/ml am Erreger *M. tuberculosis* zu erkennen. Für die Messung der Effluxpumpen-modulierenden Effekte wurde daher 0,3 µg/ml als Richtwert genutzt. Verbindung **13** wurde in Kombination mit suboptimalen Konzentrationen von Isoniazid, Ciprofloxacin und Clofazimin inkubiert und die Ergebnisse nach 7 Tagen ausgewertet (Tabelle 26, Folgeseite).

Tabelle 26: Effluxpumpen-modulierende Effekte von Nr 13 (n = 3)

Verbindung (Konzentration)	Wachstumshemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Effekt-Steigerung durch Nr 13 um
Isoniazid (0,08 µg/ml)	49,76 ± 9,01	
Isoniazid (0,08 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	69,79 ± 5,2	↑ 40 %
Ciprofloxacin (0,4 µg/ml)	18,42 ± 16,53	
Ciprofloxacin (0,4 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	45,68 ± 5,63	↑ 33 %
Clofazimin (0,3 µg/ml)	38,88 ± 7,25	
Clofazimin (0,3 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	60 ± 3	↑ 35 %

In Kombination mit Isoniazid sind die stärksten synergistischen Effekte von ca. 40 % erkennbar, während sich Ciprofloxacin und Clofazimin knapp dahinter mit 33 % und 35 % einreihen. Neben der in höheren Konzentrationen beobachteten eigenen Hemmwirkung von Verbindung **13**, können an dieser Stelle unter Vernachlässigung dieser Wirkung auch Effluxpumpen-modulierende Eigenschaften angenommen werden. Eine Diskussion dieser Ergebnisse soll im Anschluss an die Betrachtung der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen stattfinden.

4.2.3.a. Effluxpumpen-modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine

Insgesamt 13 Verbindungen wurden aus der Reihe der 2,6-dimethylsubstituierten Gruppe auf ihre Effluxpumpen-modulierenden Effekte getestet, die Richtkonzentration blieb dabei bei 10 µg/ml. Dabei fand die Kombination mit Rifampicin (¼ der MHK), Isoniazid (¼ und ½ der MHK) und Ethambutol (¼ der MHK, nur 10 Verbindungen) als Referenzsubstanzen statt. Nachfolgend sollen die einzelnen Messreihen und deren Ergebnisse vorgestellt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sollen am Ende dieses Abschnittes die getesteten Verbindungen und deren Substitutionsmuster nochmals dargestellt werden (Tabelle 30).

Messreihe mit Rifampicin

Die eigenen Hemmwirkungen der Verbindungen sind wichtig für die Beurteilung des Mehrwerts bei betrachteter Referenz in der Messreihe. Daher finden sie sich mit in der nachfolgenden Tabelle 40. Hat eine Substanz in der Testreihe eine zu hohe Eigenwirkung, kann ein positiver Effekt nicht nur auf die Hemmung von Effluxpumpen zurückgeführt werden. Folgende Daten konnten mit Rifampicin bei ¼ der MHK erhoben werden.

Tabelle 27: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Rifampicin (RIFA) (n = 3)

Nr	Reihe	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Effekt Steigerung RIFA durch Nr um
		Keim + RIFA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + RIFA + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	
25	MHK _{25%}	83,06 ± 7,91	≥ 100	90,9 ± 4,8	-
26	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	84,09 ± 7,17	-
27	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	≥ 100	76,95 ± 7,56	-
28	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	73,25 ± 7,15	57,04 ± 4,62	↑ 23 %
29	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	≥ 100	76,76 ± 7,56	-
30	MHK _{25%}	83,06 ± 7,91	83,3 ± 10,8	60,48 ± 3,46	↑ 27 %
31	MHK _{25%}	77,49 ± 2,51	99,57 ± 1,59	72,11 ± 11,23	↑ 7 %
32	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	96 ± 6	-
34	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	56 ± 11	↑ 33 %
41	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	67,86 ± 9,57	69,03 ± 11,02	↑ 15 %
45	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	≥ 100	62,07 ± 3,98	↑ 23 %
46	MHK _{25%}	77,49 ± 2,51	85,15 ± 6,56	88,19 ± 27,24	-
47	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	≥ 100	100,35 ± 16,39	-

Bei Betrachtung der Reihe mit Rifampicin als Referenzsubstanz sind für die Kombination mit der jeweiligen Verbindung nur geringe Effekte beobachtbar. Am stärksten ist bei Berücksichtigung der Eigenwirkung Nr **34** mit einer Steigerung von 33 % und Nr **45** mit 23 %, zuletzt Nr **31** mit 7 %. Sowohl Nr **28**, Nr **30**, als auch Nr **41** haben eine synergistische Wirkung, deren Effekt von der Verbindung und/oder Referenzsubstanz Rifampicin abzuleiten ist und nicht als Effluxpumpen-modulierend interpretiert werden kann. Ebenso wenig lassen sich klare Strukturmerkmale ausmachen, welche die wirkungsvollen Substanzen beschreiben würden. Die aussichtsreichste Substanz Nr **34** ist ein Dihydropyridin mit einem *N*-(2-Chlorphenyl)- und einem 4-(3-Methoxyphenyl)-Rest. Verwandte Verbindungen wie Nr **28** und Nr **29**, welche sich in Stellung des Chlor- bzw. eines 4-Phenyl-Substituenten unterscheiden, zeigen dagegen nur einen geringen bis keinen Effekt. Bei Nr **45** mit einer Steigerung der Wirksamkeit von Rifampicin um 23 % stellt der 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-Rest das Charakteristikum dar. Auch hier zeigen die strukturverwandten Substanzen **46** und **47** keine Effektsteigerung in Kombination mit der Referenz.

Messreihe mit Isoniazid

Bei der Testung mit Isoniazid ergaben sich in nachfolgender Tabelle 28 erhaltene Daten.

Tabelle 28: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Isoniazid (INH) (n = 3)

Nr	Reihe	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Effekt Steigerung INH durch Nr um
		Keim + INH ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + INH + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	
25	MHK _{25%}	71,01 ± 0,84	99,34 ± 16,17	17,8 ± 2,5	↑ 75 %
	MHK _{50%}	41,35 ± 1,51	≥ 100	37,61 ± 0,98	↑ 9 %
26	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	26,25 ± 2,00	↑ 65 %
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	35,32 ± 5,78	↑ 34 %
27	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	74,74 ± 1,22	20,1 ± 1,8	↑ 73 %
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	83,56 ± 2,72	24,24 ± 3,50	↑ 54 %
28	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	19,79 ± 1,12	↑ 73 %
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	27,56 ± 3,53	↑ 48 %
29	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	11,57 ± 1,34	↑ 84 %
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	13,39 ± 1,76	↑ 75 %
30	MHK _{25%}	71,01 ± 0,84	77,16 ± 2,91	25,1 ± 1,2	↑ 65 %
	MHK _{50%}	41,35 ± 1,51	83,3 ± 10,8	39,48 ± 1,02	↑ 5 %
31	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	35 ± 2	↑ 52 %
	MHK _{50%}	33,81 ± 0,52	99,57 ± 1,59	33,38 ± 0,46	↑ 1 %
32	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	11,4 ± 1,1	↑ 84 %
	MHK _{50%}	42,1 ± 0,5	≥ 100	42,14 ± 1,73	-
34	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	15,01 ± 0,31	↑ 79 %
	MHK _{50%}	42,1 ± 0,5	≥ 100	40,8 ± 1,5	↑ 3 %
41	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	17,4 ± 1,1	↑ 75 %
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	67,86 ± 9,57	42,75 ± 5,95	↑ 2 %
45	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	31,34 ± 3,26	↑ 56 %
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	≥ 100	36,88 ± 0,39	↑ 15 %
46	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	94,94 ± 4,51	26,14 ± 2,33	↑ 63 %
	MHK _{50%}	33,81 ± 0,52	85,15 ± 6,56	31,01 ± 0,77	↑ 8 %
47	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	23,9 ± 2,8	↑ 66 %
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	≥ 100	32 ± 1	↑ 27 %

Im Vergleich mit der Referenzsubstanz Rifampicin sind hier deutliche Aktivitätssteigerungen um bis zu 84 % (¼ MHK) bei Nr **29** und Nr **32** erkennbar. Im Mittel liegen bei allen Verbindungen Verbesserungen der Wirksamkeit von Isoniazid von über 52 % (¼ MHK) vor, während die Effekte bei halber MHK teilweise stark abfallen. Aufgrund der Aktivität nahezu aller Verbindungen, lassen sich auch hier nur erschwert Struktur-Wirkungsbeziehungen formulieren. Im Mittel erzielen 4-Phenyl-substituierte Dihydropyridine marginal höhere Steigerungen der Wirksamkeit als 4-(3-Methoxyphenyl)- und 4-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-substituierte. Eine *N*-(2-Methylphenyl)-Derivatisierung führt in allen Fällen zu einer Senkung des Effektes (**26**, **31** und **45**) und eine *ortho*-Substitution am *N*-Phenyl vermindert auch hier im Mittel die Wirksamkeit gegenüber der *meta*-Position (vergleiche dazu die Paare **26/27**, **28/29**, **31/32** und **45/46**).

Messreihe mit Ethambutol

Bei der Testung mit Ethambutol wurden insgesamt 10 Verbindungen vermessen, wobei die Konzentration der Referenz bei ¼ der MHK eingestellt wurde, um mögliche Effekte zu untersuchen. Nachfolgende Daten konnten aus der Messreihe erhoben werden (Tabelle 29).

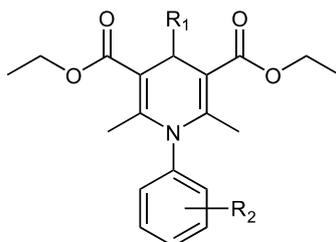
Tabelle 29: Effluxpumpen modulierende Effekte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen, Ethambutol (EMB) (n = 3)

Nr	Reihe	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Effekt Steigerung EMB durch Nr um
		Keim + EMB ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Keim + EMB + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	
25	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	≥ 100	78,07 ± 11,35	↑ 17 %
26	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	55,07 ± 1,99	↑ 24 %
27	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	85,37 ± 2,23	90,72 ± 2,81	-
28	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	78,24 ± 9,89	95,85 ± 3,50	-
29	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	86,99 ± 4,83	80,8 ± 1,8	↑ 9 %
30	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	80,3 ± 5,6	80,58 ± 8,96	↑ 15 %
32	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	55,34 ± 2,01	↑ 24 %
34	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	47,65 ± 8,34	↑ 35 %
41	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	77,71 ± 1,18	85,2 ± 0,92	↑ 10 %
45	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	82,71 ± 5,65	70,34 ± 5,08	↑ 26 %

Aufgrund der im Mittel höheren Wachstumshemmungen der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine dieser Messreihe qualifizieren sich nur 4 Verbindungen für eine Betrachtung der synergistischen Wirkung mit Ethambutol. Nr **34** erzielte eine Effektsteigerung von 35 %, während Nr **26** und Nr **32** beide Steigerungen von 24 % und Nr **25** von 17 % aufweisen. Die unzureichende Datenlage macht auch hier keine Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen möglich. Der Vergleich

von **25** und **26** lässt vermuten, dass die Einführung einer Methyl-Gruppe einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit hat, während ein Chlorid-Substituent im Vergleich zum Methyl-Substituent bei dem Paar **32** und **34** eine weitere Steigerung bedeutet. Bei Betrachtung beider Paare wird zudem ersichtlich, dass hier die 4-(3-Methoxyphenyl)-Substitution gegenüber der 4-Phenyl-Substitution bevorzugt wird.

Tabelle 30: Getestete 2,6-dimethylsubstituierte Verbindungen im GFP-H37Rv-Inhibitions-Essay (Übersicht)



Nr	-R ₁	-R ₂
25	-Phenyl	-H
26	-Phenyl	-2-Methyl
27	-Phenyl	-3-Methyl
28	-Phenyl	-2-Chlor
29	-Phenyl	-3-Chlor
30	-(3-Methoxyphenyl)	-H
31	-(3-Methoxyphenyl)	-2-Methyl
32	-(3-Methoxyphenyl)	-3-Methyl
34	-(3-Methoxyphenyl)	-3-Chlor
41	-(3-Nitrophenyl)	-3-Methyl
45	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	-2-Methyl
46	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	-3-Methyl
47	-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)	-2-Chlor

4.2.4. Zusammenfassung und Diskussion des GFP-H37Rv-Inhibitions-Essays

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Effekt der 2,6-unsubstituierten Verbindung Nr **13** in Kombination mit Isoniazid, Ciprofloxacin und Clofazimin getestet. Bei vernachlässigbar geringer eigener Wachstumshemmung von unter 10 % bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml ergaben sich mittelmäßige Steigerungen der Wirksamkeit von 33 % (für Ciprofloxacin), 35 % (für Clofazimin) und 40 % (für Isoniazid). Unter Berücksichtigung der möglichen Mechanismen der Transporter-Modulation (siehe auch Abschnitt 2.3.1) sind mehrere Effekte denkbar. Neben der Hemmung des Energiestoffwechsels ist die Minderung der Transporter-Protein-Expressionsrate denkbar. Aufgrund der im Vergleich mit Verapamil deutlichen Effekte an P-GP (Maus-Modell), qualifiziert sich ebenso die

Inhibition einer Effluxpumpe selbst, sodass auf diesen Mechanismus weiter eingegangen werden soll. Daher kommen aufgrund der Homologie bakterieller und eukaryotischer Proteine insbesondere die Transportsysteme vom ABC-Typ in Frage. Laut der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Übersicht über die mögliche Beteiligung von Effluxpumpen im Zusammenhang mit einer Antibiotikaresistenz (Tabelle 4, S. 30) stellen die in nebenstehender Tabelle 31 gelisteten Proteine eine Option dar. Um die Auswahl weiter einzugrenzen wurde sich der browserbasierenden Software *Blast* bedient ^[172]. Sie ermöglicht den Vergleich von Proteinsequenzen nach bestimmten Einschränkungen. Mit der Sequenz des ABCB1-Proteins des Menschen (*Homo sapiens*) als Suchkriterium wurde die *UniProtKB/Swiss-Prot-Database*

Tabelle 31: Übersicht in Frage kommender ABC-Transporter <i>M. tuberculosis</i> (Nr 13)	
Familie	Rv-Nummer (Gen-Name)
ABC	Rv0194
	<i>Rv0933 (pstB)</i>
	<i>Rv1218c-Rv1217c</i>
	<i>Rv1458c-Rv1457c-Rv1456c</i>
	<i>Rv2688c-Rv2687c-Rv2686c</i>
	<i>Rv2936-Rv2937-Rv2938 (drrA-drrB-drrC)</i>
	<i>Rv1819c (bacA)</i>
	<i>Rv1273c-Rv1272c</i>
	<i>Rv2136c</i>

herangezogen und nach Ähnlichkeiten bei *M. tuberculosis* (*taxid 1773*) gesucht. Der ermittelte *Score* berücksichtigt Gleichheiten und Unterschiede, als auch das Auftreten von Lücken in der betrachteten Aminosäuresequenz. Die *Query cover* gibt in Prozent wieder, inwieweit die gesuchte Sequenz mit der gefundenen überlappt, wobei *identity* die Übereinstimmung der in diesem Bereich liegenden Aminosäuren bestimmt. Insofern ist sowohl ein hoher *Score*, als auch *Query cover* und damit *identity* bei der Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse wünschenswert. Als Fehler ist der *E-value* zu betrachten, der die Wahrscheinlichkeit angibt, zu welchem Grad zufällig dasselbe Ergebnis in derselben Datenbank gefunden werden kann. Um ein signifikantes Ergebnis erhalten zu können, sollte dieser Wert möglichst gering sein. Die nach möglichen Effluxpumpen gefilterten Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Blast-Ergebnisse des Vergleichs der Proteinsequenzen von P-GP (*Homo sapiens*) mit den Proteinen von *M. tuberculosis* ^[172]

Protein	Total Score	Query Cover	E-value	Identity
Rv0194	835	77 %	1x10 ⁻⁶⁰	32 %
Rv1273c	375	77 %	2x10 ⁻⁵³	28 %
Such Sequenz:	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 [Homo sapiens]</i>			
Database:	<i>UniProtKB/Swiss-Prot</i>			
Vergleichsorganismus:	<i>Mycobacterium tuberculosis (taxid 1773)</i>			
Verwendeter Algorithmus:	<i>blastp (Protein-Protein-Blast)</i>			

Als einzige Treffer, die mit der Liste der ABC-Transporter übereinstimmen, wurden die Proteine Rv0194 mit einer Übereinstimmung von 32 % und Rv1273c mit 28 % der überlappenden Aminosäuren gefunden. Als Effluxpumpen kommen somit insbesondere für Verbindung **13**, aber vermutlich auch für die anderen Dihydropyridine der 2,6-unsubstituierten Reihe die Transportproteine Rv0194 und Rv1273c für eine Hemmung in Frage. Dies ergibt sich aus den gesteigerten Werten aus dem P-GP Essay gegenüber dem Standard Verapamil und dem GFP-H37Rv-Inhibitions-Essay mit den Referenzsubstanzen. Sowohl für Rv1094, als auch für Rv1273c sind Resistenzen im Zusammenhang mit Isoniazid beobachtet worden, was die Hypothese bekräftigt (Tabelle 4).

Weiterhin wurden insgesamt 13 Verbindungen der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine auf ihre synergistischen Effekte mit den Referenzsubstanzen Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol untersucht. Im GFP-H37Rv-Wachstums Essay erreichten die DHP's vernachlässigbar geringe Hemmwerte mit einem Maximalwert bei Nr **30** von 20 %. Sie eigneten sich daher für die Testung der Wirkungsverstärkung der Referenzen, um davon auf Effluxpumpen-modulierende Effekte schließen zu können. In Kombination mit Rifampicin (¼ MHK) konnte ein Zugewinn von maximal 33 % bei Nr **34** beobachtet werden, wobei mit Ausnahme von Nr **45** (23 %) und Nr **31** (7 %) nahezu keine Verstärkung mehr erzielt werden konnte. Ebenso schwach zeigten sich die Verbindungen zusammen mit Ethambutol (¼ MHK), wobei Maximalwerte von 35 % (Nr **34**) auftraten. Im Gegensatz zeichneten sich für die Kombination der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine mit Isoniazid (¼ MHK) durchweg deutliche Effekte ab, die mit Steigerungen der Wirksamkeit von bis zu 84 % einhergingen (Nr **29** und Nr **32**). Beim Vergleich der Reihen ¼ MHK und ½ MHK kann ein Absinken der Effektivität bei höherer Konzentration der Referenz beobachtet werden. Das kann damit begründet werden, dass eine Effluxpumpen-Modulation nur dann beobachtet werden sollte, wenn die zu beeinflussende Substanz keine zu hohe Eigenwirkung aufweist. So können in Kombination mit ¼ MHK deutlich stärkere Effekte als bei ½ MHK beobachtet werden. Diesen Sachverhalt soll Abbildung 46 (Folgesseite) anhand einiger Beispiele noch einmal verdeutlichen, trifft aber für alle getesteten 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine zu. So führt die Erhöhung der beteiligten Isoniazid Konzentration bei Verbindung **29**

von 84 % auf 75 %, während im Falle von Nr **32** ein vollständiger Verlust des Effektes eintritt. Die P-GP-Aktivität, welche mit Verapamil vergleichbare oder schwache Ergebnisse erzielte, lässt keine präferierte Beteiligung von Transporter des ABC-Typs vermuten, wie das bei den 2,6-unsubstituierten Verbindungen der Fall war.

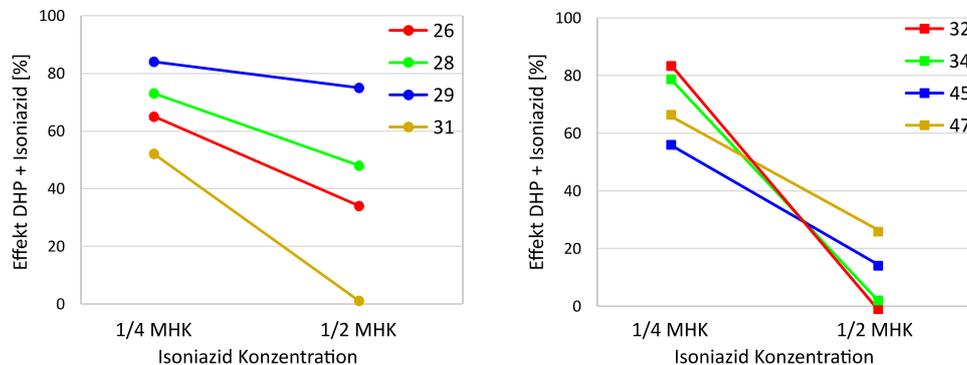


Abbildung 46: Wirkungssteigerung unter Berücksichtigung der eingesetzten MHK von Isoniazid

Da auf diesem Weg keine Eingrenzung über die Effluxpumpen erreicht werden kann, soll ein anderer Ansatz versucht werden. Aufgrund der Wirkungssteigerung von Isoniazid im GFP-H37Rv-Essay und den nahezu ausbleibenden Effekt bei Rifampicin und Ethambutol, kommen nach Durchsicht von Tabelle 4 (S. 30) alle in Tabelle 33 gelisteten Transport-Proteine in Frage. Einen weiteren Anhaltspunkt bietet eine neuere Arbeit von GARIMA et al., welche die Expressionsraten von ausgewählten mykobakteriellen Effluxpumpen bei Einsatz unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen untersucht ^[66]. Dabei kommen $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{2}$ der MHK von Isoniazid, Streptomycin, Rifampicin und Ethambutol zum Einsatz. Die höchsten Expressionsraten werden bei der Hälfte der MHK von Isoniazid und dem Viertel von Rifampicin, Ethambutol und Streptomycin erhalten. Die einzige Pumpe, welche in der betrachteten Messreihe nur von Isoniazid beeinflusst wird ist Rv1250, während Rv0194, Rv1273c, Rv1819c und Rv18177 ebenfalls durch Induktion der anderen Substanzen gesteigerte Raten aufweisen. Demnach könnte Rv1250 als Transporter vom MFS-Typ ein potentielles Target der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine darstellen. Die Arbeit von GARIMA et al. betrachtet jedoch nicht die weiteren in Tabelle 33 gelisteten Pumpen Rv2136, Rv2846c, Rv3065 und Rv2942, sodass der Kandidat nur eine Option darstellt, die es zu überprüfen gilt. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass auch Transporter betroffen sein können, die toxische Stoffwechselprodukte des Isoniazid-Metabolismus aus dem Bakterium ausschleusen. Damit würde nicht direkt der Efflux der eigentlichen Substanz verhindert, in allem Maße aber die Wirkung verstärkt.

Tabelle 33: Übersicht in Frage kommender Transporter *M. tuberculosis* (Nr 25 - 48)

Familie	Rv-Nummer (Gen-Name)
ABC	<i>Rv0194</i>
	<i>Rv1819c (bacA)</i>
	<i>Rv1273c-Rv1272c</i>
	<i>Rv2136</i>
MFS	<i>Rv1250</i>
	<i>Rv2846c (efpA)</i>
SMR	<i>Rv3065 (mmr)</i>
RND	<i>Rv2942 (mmpL7)</i>

5. Zusammenfassung und Ausblick

Einleitend wurde ein Überblick über den gegenwärtigen Kenntnisstand zum Thema *Mycobacterium tuberculosis* geliefert. Aufgrund der langen Generationszeiten, der natürlichen Resistenz gegen gängige Desinfektionsmittel, der Beschaffenheit der einzigartigen Zellwand und nicht zuletzt der pathogenen Schutzmechanismen bei Infektion stellt dieses Bakterium hohe Ansprüche an Arzneimittel, aber insbesondere auch an Patienten und behandelnde Einrichtungen. Neben den vielen verfügbaren diagnostischen Methoden und Therapieoptionen ist es bislang nicht gelungen, den Erreger weltweit wirkungsvoll einzudämmen, sodass bis zum heutigen Zeitpunkt die erhöhte Gefahr einer Ansteckung in bestimmten Regionen der Erde besteht. Insbesondere die langen Therapiezeiten beeinträchtigen eine adhärente Behandlung, welche aus Gründen wie Motivationsverlust, Verzug des Patienten oder Entwicklung von resistenten Erregern bei mangelnder Therapietreue und -überwachung resultiert. Gerade die Resistenzentwicklung ist in den letzten Jahren immer wieder in den Fokus der allgemeinen Forschung gerückt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Problem recherchiert und auf die derzeitigen Entwicklungen betreffend *M. tuberculosis* eingegangen. Während mehrerer Formen der Resistenz vorgestellt und diskutiert wurden, stand die Untersuchung von induzierten Effluxpumpen im Vordergrund. Neben einer Auflistung gegenwärtig bekannter Transporter und die Vorstellung der zugehörigen Familien fand eine Beurteilung der bislang verfügbaren Inhibitoren statt. Dabei wurde die Gruppe der Dihydropyridine als vielversprechende Grundstruktur aufgenommen und behandelt, welche wie Verapamil Calcium-Aktivität aufweisen. Der praktische Teil dieser Arbeit befasste sich demnach mit der Entwicklung neuartiger Dihydropyridine. Es wurden zwei Reihen von Grundstrukturen entworfen und synthetisiert, welche sich grundlegend in ihrer Substitution in Position 2 und 6 unterscheiden. Trotz einiger Probleme bei der Synthese und dem resultierenden Ausschluss weniger Verbindungsklassen konnten 48 Substanzen hergestellt werden, von denen im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 37 einer weiteren Testung zugänglich gemacht wurden. Die Herangehensweise sah vorab eine Bestimmung der P-GP Aktivität im Maus Modell vor, um Effluxpumpen modulierende Effekte an Transportern des ABC-Typs abschätzen zu können. Dabei zeigten sich die getesteten Verbindungen der ersten Reihe (2,6-unsubstituiert) als potente Strukturen gegenüber dem Standard Verapamil. Die Substanzen der zweiten Reihe (2,6-dimethylsubstituiert) erbrachten dagegen keine nennenswerten Ergebnisse, wobei die Werte in wenigen Fällen gerade die Wirkung von Verapamil erreichten. Mit diesem Wissen wurde zuvor die Wachstumshemmung beider Reihen auf den Laborkeim H37Rv ermittelt, wobei sich wiederum die Dihydropyridine mit einer 2,6-unsubstituierten Grundstruktur vielversprechend mit Hemmungen von bis zu 61 % (bei 1 µg/ml) zeigten. Im Gegensatz wurden mit den 2,6-dimethylsubstituierten Substanzen nur schwache Ergebnisse erzielt, die keinem Effekt gleichkommen. Zur Einschätzung der Wirkweise der Substanzen

der ersten Reihe am Keim *M. tuberculosis* wurde vergleichend Literatur herangezogen, deren DHP-Strukturen sich aber nur zum Teil mit den synthetisierten gegenüberstellen lassen. Aufgrund der unzureichenden Datenlage kann keine Aussage zu einem möglichen Target im Erreger gemacht werden, dennoch wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen für diese vollständig verfügbare Reihe der 2,6-unsubstituierten Verbindungen diskutiert. Um das Maß der Effluxpumpen-Aktivität auszuloten, erfolgte die Testung ausgewählter Dihydropyridine in Kombination mit den Referenzwirkstoffen Isoniazid, Ciprofloxacin, Clofazimin, Rifampicin und Ethambutol. Als Vertreter der ersten Reihe wurde aufgrund der potenten P-GP Aktivität Nr **13** eingesetzt und erzielte durchschnittliche Effektivitätssteigerungen für Ciprofloxacin, Clofazimin und Isoniazid von bis zu 40 %. Insgesamt 13 Substanzen aus der Reihe der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine erreichten bei der Testung mit Rifampicin und Ethambutol nur schwache Effekte, während deutliche Effekte in Kombination mit Isoniazid beobachtet werden konnten. Spitzenwerte ergaben sich für Nr **29** und Nr **32** mit 81 % Wirkungssteigerung gegenüber dem alleinigen Einsatz der Referenz bei $\frac{1}{4}$ MHK. Bei der Betrachtung der verwendeten MHK's von $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ ist ein stetes Absinken der Effektivität hin zu höherer MHK ersichtlich, was die Hypothese bestärkt, dass Effluxpumpen verantwortlich sein könnten. Für beide Reihen wurden potentiell beteiligte Transporter nach dem Ausschluss- bzw. dem Homologie-Prinzip ermittelt. Dafür wurde der Vergleich des humanem ABCB1-Proteins mit der Referenzdatenbank von *Mycobacterium tuberculosis* mittels der browserbasierenden Software *Blast* durchgeführt. Es konnten zwei Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen mit mykobakteriellen ABC-Transportern gefunden werden, Rv0194 (32 %) und Rv1273c (28 %). Demnach stellen für die P-GP aktiven 2,6-unsubstituierten Dihydropyridine, insbesondere Nr **13**, diese zwei Effluxpumpen ein potentielles Target dar. Für beide Proteine sind laut Literatur bereits Resistenzmechanismen beschrieben, die zumindest Isoniazid betreffen. Aufgrund des Ausbleibens der Effektivität der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine an Rifampicin und Ethambutol wurden nach Literaturvergleich nach dem Ausschluss-Prinzip ein potentieller Transporter aus der MFS-Familie ermittelt, Rv1250. Damit wurden für beide Reihen eine Beteiligung an Effluxpumpen-Modulation vorausgesagt und anhand theoretischer und praktischer Überlegungen Zielstrukturen bestimmt.

Ausblick

Die vielversprechenden Ergebnisse beider Dihydropyridin Reihen und der steigende Bedarf neuer antituberkulöser Mittel legt nahe, diese Substanzen weiter zu charakterisieren. Konkret sollten die verbleibenden 11 synthetisierten Verbindungen einer weiteren Testreihe zugänglich gemacht werden, sodass Hemmwerte am Erreger als auch Effluxpumpen beeinflussende Effekte abgeklärt werden können. Damit ließen sich in folgenden Versuchsanordnungen ebenso die potentiellen Transporter als Zielstrukturen einschränken, wobei im Rahmen dieser Arbeit bereits Gedankenexperimente dazu unternommen wurden. Um den künftigen Einsatz der neuen Dihydropyridine realisieren zu können, sollten zudem Zytotoxizitätstests durchgeführt werden, damit ein Einsatz am Menschen in Frage kommen kann. In diesem Zusammenhang wäre es auch sinnvoll, die Effekte an Calcium-Kanälen abzuklären, da es sich bei den hergestellten Dihydropyridinen um Verbindungen handelt, die sich von den Calciumantagonisten ableiten. Aufgrund ihrer Effluxpumpen-modulierenden Eigenschaften könnte eine Testung im Makrophagen Modell aufschlussreich sein. Wie unter anderem eine Arbeit von CROWLE et al. zeigt, können beispielsweise die Phenothiazine Thioridazin und Chlorpromazin durch Anreicherung in den Phagolysosomen und Inhibition der Kalium und Calcium Pumpen zu einer Azidifizierung der Vakuole führen, welche für die Auflösung der eingeschlossenen Erreger förderlich ist^[173]. Ähnliche Effekte wären für die synthetisierten Dihydropyridine denkbar und überprüfenswert.

6. Experimenteller Teil

6.1. Synthese und Charakterisierung der Verbindungen

6.1.1. Material und Methoden

Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes, der vorläufigen Bestimmung der Reinheit und des R_f -Wertes wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Verwendet wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Zur Probenvorbereitung wurde eine geringe Menge Substanz oder eine Stichprobe des Reaktionsansatzes in einem geeigneten Lösungsmittel, meist Aceton, gelöst. Die Lösung wurde dann mittels ausgezogener Glaskapillare auf der Platte dünn als Punkt aufgetragen. Als Fließmittel wurden Gemische aus Cyclohexan und Ethylacetat verwendet (Cyclohexan/Ethylacetat: 90-60/10-40 (v/v)). Zur Bestimmung des R_f -Wertes fand ausschließlich ein Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 70:30 (v/v) Verwendung. Die Entwicklung des Chromatogramms fand in einer dafür geeigneten, mit Fließmittel gesättigten Kammer statt und die Detektion erfolgte über UV-Strahlung mit Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Zur Berechnung des R_f -Wertes wurde die Laufhöhe der Substanz mit der Höhe der Laufmittelfront ins Verhältnis gesetzt.

Säulenchromatographie (SC)

Die Auftrennung des Reaktionsgemisches und Isolierung der Endverbindungen erfolgte mit der Säulenchromatographie. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die Wahl des Säulendurchmessers wird von der zu trennenden Substanzmenge, die Länge nach dem Trennproblem ausgewählt. Zum Einschlämmen des Füllmaterials in die Glassäule wird unter dem Abzug gearbeitet. Nach Vorlage einer geringen Menge Elutionsmittel in der Säule wird das Kieselgel in einem Becherglas mit weiterem Elutionsmittel aufgeschlämmt und anschließend in die mit Watte oder einer Fritte verschlossenen Säule gegossen (Nassfüllung). Bei geöffnetem Hahn wird nun in dieser Weise solange verfahren, bis die gewünschte Füllhöhe Kieselgel erreicht ist. Währenddessen wird die Säule mit einem Korkring abgeklopft um die Packungsdichte zu erhöhen und eventuelle Luftblasen zu entfernen. Nach abgelassenem Elutionsmittel auf die oberste Kieselgelschicht wurden flüssige Substanzproben direkt mit Hilfe einer Pipette aufgetragen und mit einer Schicht Seesand bedeckt. Ölige Substanzen wurden vorher auf Kieselgel gezogen, indem das Öl mit einer ausreichenden Menge Kieselgel zur Trockne eingeengt und dann aufgetragen wurde. Hier wurde vor dem Probenauftrag noch eine zusätzliche Schicht Seesand eingefüllt. Als mobile Phase im aufgesetzten Scheidetrichter wurden Gemische aus Cyclohexan und Ethylacetat verwendet und zum

Start der Säule vorsichtig eingetropft, um eine Aufwirbelung des Probenauftrags zu vermeiden. Die verwendeten Mischungsverhältnisse sind in der jeweiligen Substanzbeschreibung aufgelistet. Die in Reagenzgläsern gesammelten Fraktionen wurden mittels DC auf ihre Zusammensetzung und Reinheit geprüft und entsprechend eingengt.

Massenspektrometrie

Die Elektrosprayionisation-Massenspektren (ESI-MS) wurden an einem Finnigan LCQ Classic (Thermo Electron) aufgenommen. Dazu wurde die mit der Probe je nach Löslichkeit mit Methanol oder Chloroform hergestellte Stammlösung (ca. 1-5 mg/ml) mit Methanol im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Die Injektion erfolgte mit einer Spritzenpumpe (20 μ l/min). Das Massenspektrometer verfügt über eine beheizbare Kapillare mit einer Betriebstemperatur von 220 C°, die Ionisierung im Elektronenspray erfolgt wahlweise bei 5,0 kV positiv oder negativ. Das Gerät scannt zur Messung einen Massenbereich von 50-2000 m/z .

Falls Massenfragmente auftraten, wurden sie durch Vergleich mit gängiger Literatur zugeordnet und im experimentellen Teil angegeben. Das durchgängige Auftreten von substanzspezifischen Fragmenten sicherte die Strukturanalytik zusätzlich ab und erleichterte die Identifizierung von bekannten und neuen Verbindungen desselben Typs im Reaktionsgemisch. Die Masse/Ladungsverhältnisse im experimentellen Teil sind in folgender Form angegeben:

m/z -Verhältnis (prozentualer Anteil des Fragments, [Zuordnung des Fragments])

Die einzelnen Wertepaare werden mit Semikola getrennt.

NMR-Spektroskopie

Zur Identifizierung der Endverbindungen wurde unter anderem die NMR-Spektroskopie verwendet. Die ^1H -NMR Spektren wurden an einem Gerät der Firma Agilent Technologies (400 MHz VNMRs und 500 MHz DD2) aufgenommen. Die Proben wurden standardmäßig bei 27 °C vermessen, die verwendete Arbeitsfrequenz ist im experimentellen Teil bei der jeweiligen Substanz angegeben. Als Lösungsmittel für die Proben wurde d-DMSO genommen, in wenigen Fällen CDCl_3 .

Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und für Signale mit definierten Multiplizitäten auf die Symmetrieachse bezogen. Sie ist in absteigender Reihenfolge angegeben und bei solchen, die lediglich als Multipletts („m“) beschrieben werden können, wurde der Bereich der chemischen Verschiebung angegeben. Die Syntax der Angaben im experimentellen Teil lautet wie folgt:

chemische Verschiebung (Multiplizität, Kopplungskonstante [Hz], Anzahl Protonen, Zuordnung).

Hierbei steht „s“ für Singulett, „d“ für Duplett, „t“ für Triplet und „q“ für Quartett, Kombinationen aus den genannten Abkürzungen sind möglich. Einzelne Wertepaare werden durch Semikola getrennt. Ist die Multiplizität in Anführungszeichen gesetzt, handelt es sich um eine Überlagerung zweier oder mehrerer Signale desselben Protons mit unterschiedlichen Kopplungspartnern, deren Signalstruktur im Spektrum nur als ein bestimmtes Multiplett erscheint. Die Kopplungspartner können demnach nicht

zugeordnet werden und es wird die gemittelte Kopplungskonstante angegeben. Ist die Zuordnung mit dem angegebenen Molekülabschnitt nicht eindeutig erkennbar, sind die betreffenden Protonen fett markiert (z.B. $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$). Bei der Auswertung der Rotamerenpaare wird unspezifisch von Rotamer A und B gesprochen. Eine Zuordnung wurde hier nicht getroffen.

Analytische HPLC (*High-Pressure-Liquid-Chromatography*) zur Reinheitsbestimmung

Die Reinheit der Verbindungen wurde mittels analytischer HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan; LC-10AD, SIL-HAT auto sampler) mit einer XTerra RP-18 Säule (3,5 μM ; 3,9 x 100 mm) der Firma Waters (Milford, MA, USA) durchgeführt. Der UV-Vis-Detektor SPD-M10A VP PDA wurde auf 254 nm eingestellt. Falls nichts anderes angegeben, betrug die Flussrate 0,8 ml/min. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Wasser und Methanol (im folgendem MeOH) verwendet. Der MeOH-Anteil wurde innerhalb von 15 min von 5 % auf 95 % erhöht. Für eine verbesserte Trennschärfe wurde beiden Eluenten 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) zugesetzt.

Schmelzbereich Bestimmung

Die Bestimmung des Schmelzbereichs wurde mit dem Gerät apotec[®] Schmelzpunktbestimmer MPplus der Firma Wepa (Messbereich 25 °C – 360 °C; Messgenauigkeit 25 °C – 200 °C: $\pm 0,3$ °C; > 200 °C – 360 °C: $\pm 0,5$ °C) durchgeführt. Dafür wurde eine geringe Menge Substanz in einer dafür geeigneten Kapillare aufgenommen und in einem ersten Durchlauf der grobe Schmelzbereich ermittelt (Aufheizrate: 25 °C/min). In zwei folgenden, neuen Messungen wurde 10 °C unter diesem Bereich temperiert um dann die exakte Messung zu beginnen (Aufheizrate der Messung: 1 °C/min).

Elementaranalyse

Die Bestimmung des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffgehalts wurden an einem CHNS-932 Analyseautomaten (LECO) durchgeführt. Dafür wurde das automatische Mikroverfahren genutzt.

Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden größtenteils am Institut für Pharmazie Halle(Saale) erhalten. Kommerziell bei Sigma-Aldrich erworben wurden

3-Methoxybenzaldehyd

3,4-Dimethoxybenzaldehyd

Ethylpropiolat.

Verwendete Chemikalien des Instituts für Pharmazie:

2-Chloranilin	Chloroform	Methanol
2-Toluidin	Cyclohexan	Molekularsieb 3 Å
3-Chloranilin	Diethylether	Natrium
3-Nitrobenzaldehyd	Dimethylformamid	Natriumchlorid
3-Toluidin	Dimethylsulfoxid	Natriumsulfat, wasserfrei
Aceton	Eisessig	Phenylhydrazin
Acetophenon	Ethanol	Phosphoroxchlorid
Anilin	Ethylacetat	Phosphorpentoxid
Benzaldehyd	Kaliumcarbonat	Phtalsäurediethylester
Calciumchlorid	Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 mm)	Seesand

6.1.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV1 – Synthese der 2,6-unsubstituierten Verbindungen

In einem Rundkolben geeigneter Größe wurden 1 eq. des jeweiligen Aldehyds, 1 eq. des jeweiligen Anilins und 2 eq. Ethylpropiolat unter Zusatz von Eisessig in Ethanol im Silikonölbad in Form einer Eintopfreaktion zum Rückfluss erhitzt oder bei einer bestimmten Temperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde mit Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie verfolgt. Bei Reaktionsende wurde der Eisessig durch dreimaliges Ausschütteln mit 10 %-iger Kochsalzlösung gegen Ethylacetat entfernt. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und es folgte, wenn nichts anderes angegeben eine säulenchromatographische Auftrennung des Gemisches. Zur Auskristallisation des Produkts haben sich Methanol, Ethanol oder Gemische aus Ether und Methanol im Volumenverhältnis 1:5 bewährt.

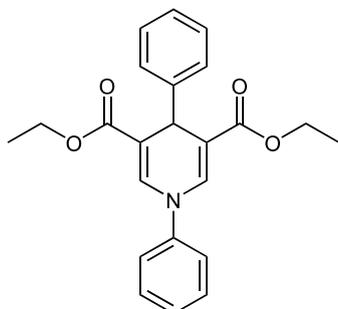
AAV2 – Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen

In einem Rundkolben geeigneter Größe wurden 1 eq. des jeweiligen Aldehyds, 1 eq. des jeweiligen Anilins und 2 eq. Ethylacetoacetat unter Zusatz von Methanol oder Ethanol im Silikonölbad in Form einer Eintopfreaktion zum Rückfluss erhitzt, in manchen Fällen auch nur bei einer bestimmten Temperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde mit Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie verfolgt. Wenn nichts anderes angegeben ist, erfolgte im Anschluss eine Trennung des Reaktionsgemisches mittels Säulenchromatographie. Um die einzelnen Fraktionen zuordnen zu können, wurde zunächst auf die gesuchte Masse mittels Massenspektrometrie untersucht. Um den Bereich zu bestimmen, der eingeeengt werden soll, wurde die Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt. Zur Auskristallisation des Produkts haben sich Methanol, Ethanol oder Gemische aus Ether und Methanol im Volumenverhältnis 1:5 bewährt.

6.1.3. Synthese der 2,6-unsubstituierten 1,4-Dihydropyridine

6.1.3.a. Derivate mit Benzaldehyd als Aldehydkomponente

(1) Diethyl 1,4-diphenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat

**Verbindung Nr.**

1

Summenformel $C_{24}H_{25}NO_5$ **Molekulargewicht**

377,44 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (1,99 mmol; 211 mg), Anilin (1,99 mmol; 185 mg) und Ethylpropiolat (3,97 mmol; 389 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 24 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **1** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 12,70 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,46 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

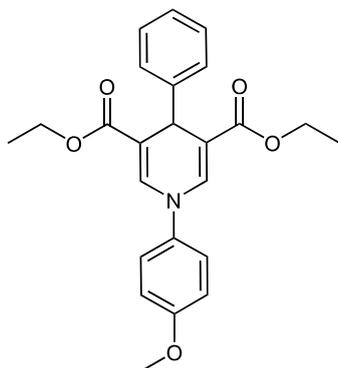
Schmelzbereich 140,9 – 144,2 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 14,47 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 777,68 (100, [2M + Na]⁺); 401,48 (14, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 378,74 (8, [M + H]⁺); 332,38 (4, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,63 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,51 – 7,46 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. N-Ph); 7,35 – 7,31 (m, 1H, 4-H v. N-Ph); 7,27 – 7,24 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,17 – 7,13 (m, 1H, 4-H v. Ph); 4,80 (s, 1H, 4-H); 4,08 – 3,96 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,13 – 1,11 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(2) Diethyl *N*-(3-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

2

Summenformel

C₂₄H₂₅NO₅

Molekulargewicht

407,47 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (4,09 mmol; 434 mg), 4-Methoxyanilin (4,09 mmol; 504 mg) und Ethylpropiolat (8,18 mmol; 802 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 4 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 3 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (80:20) an. Unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches wurde Verbindung **2** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 63,00 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,43 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 116,1 – 117,3 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,13 min)

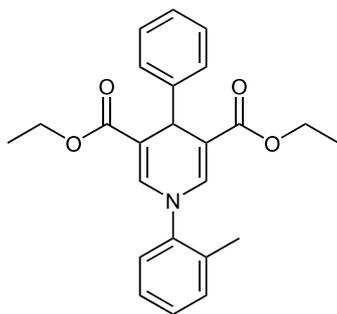
Elementaranalyse Ber.: C 70,75; H 6,18; N 3,44 %

Gef.: C 70,29; H 6,27; N 3,39 %

Massenspektrum m/z (%) = 837,01 (22, [2M + Na]⁺); 430,91 (100, [M + Na]⁺); 408,64 (5, [M + H]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 362,53 (28, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,50 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,42 – 7,38 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 7,27 – 7,23 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,16 – 7,12 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,04 – 7,00 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 4,78 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,93 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,77 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(3) **Diethyl 4-phenyl-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate**



Verbindung Nr.

3

Summenformel

C₂₄H₂₅NO₄

Molekulargewicht

391,47 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (6,39 mmol; 678 mg), 2-Toluidin (6,39 mmol; 685 mg) und Ethylpropiolat (12,77 mmol; 1253 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 65 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (90:10) an. Unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches wurde Verbindung **3** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 16,45 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,56 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 105,8 – 106,3 °C

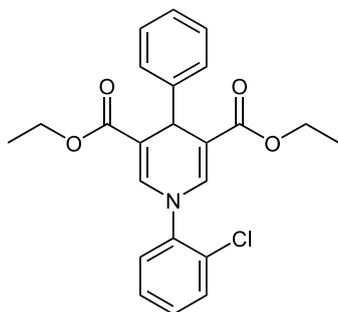
Reinheit 99,51 % (Retentionszeit: 12,40 min)

Elementaranalyse Ber.: C 73,64; H 6,44; N 3,58 %
Gef.: C 72,68; H 6,43; N 3,74 %

Massenspektrum m/z (%) = 805,12 (100, [2M + Na]⁺); 414,54 (42, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 392,58 (37, [M + H]⁺); 346,47 (17, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,40 – 7,27 (m, 8H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. 2-CH₃-Ph und 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,28 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,18 – 7,14 (m, 1H, 4-H v. Ph); 4,81 (s, 1H, 4-H); 4,05 – 3,93 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,28 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 1,11 – 1,08 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(4) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

4

Summenformel

C₂₃H₂₂ClNO₄

Molekulargewicht

411,88 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (1,62 mmol; 172 mg), 2-Chloranilin (1,62 mmol; 207 mg) und Ethylpropiolat (3,24 mmol; 318 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol gerührt (ca. 69 h bei 60 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **4** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 18,90 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,50 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 138,7 – 139,6 °C

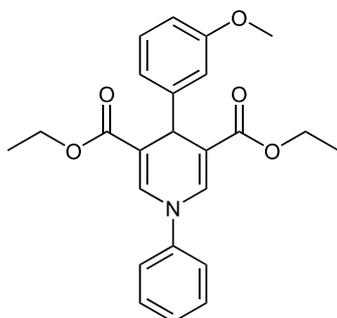
Reinheit 99,32 % (Retentionszeit: 12,44 min)

Massenspektrum m/z (%) = 845,15 (100, [2M + Na]⁺); 434,67 (49, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 412,55 (49, [M + H]⁺); 366,54 (27, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,68 – 7,67 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,65 – 7,64 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,52 – 7,45 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph); 7,36 – 7,34 (m, 2H, 2-H, 6-H v. Ph); 7,34 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,29 – 7,26 (m, 2H, 3-H, 5-H v. Ph); 7,18 – 7,14 (m, 1H, 4-H v. Ph); 4,79 (s, 1H, 4-H); 4,05 – 3,94 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,11 – 1,08 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.3.b. Derivate mit 3-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(5) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-*N*-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

5

Summenformel

C₂₄H₂₅NO₅

Molekulargewicht

407,47 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (1 mmol; 136 mg), Anilin (1 mmol; 93 mg) und Ethylpropiolat (2 mmol; 196 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 6 h bei 80 C°). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung 5 im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 31,66 %; gelbes Pulver

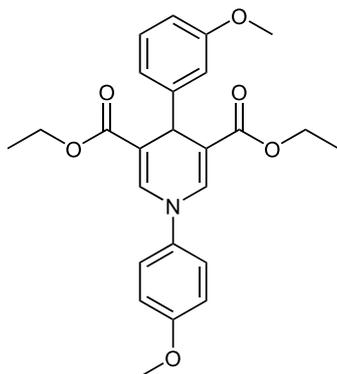
R_f-Wert 0,41 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 14,44 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 837,65 (100, [2M + Na]⁺); 430,31 (8, [M + Na]⁺); 408,26 (5, [M + H]⁺); (ESI-Positiv, MeOH) 363,33 (11, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,63 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,57 - 7,46 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,35 - 7,31 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,18 ("t", ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,84 (d"t", ³J_{6/5} = 7,9 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,77 ("t", ⁴J = 2,1 Hz, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,74 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 4,77 (s, 1H, 4-H); 4,08 - 3,98 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,69 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 1,15 - 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(6) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

6

Summenformel

C₂₅H₂₇NO₆

Molekulargewicht

437,49 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (4,4 mmol; 599 mg), 4-Methoxyanilin (4,4 mmol; 542 mg) und Ethylpropiolat (8,8 mmol; 863 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 5 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **6** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 52,86 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 119,8 – 121,2 °C

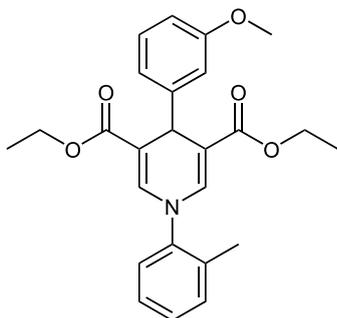
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,09 min)

Elementaranalyse Ber.: C 68,64; H 6,22; N 3,20 %
Gef.: C 68,10; H 6,17; N 3,17 %

Massenspektrum m/z (%) = 897,29 (36, [2M + Na]⁺); 461,19 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 437,44 (4, [M + H]⁺); 393,99 (27, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,50 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,41 – 7,38 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 7,18 („t“, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 7,04 – 7,01 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,84 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,7 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,77 (dd, ⁴J_{2/4} = 2,6 Hz, ⁴J_{2/6} = 1,6 Hz, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,73 (ddd, ³J_{4/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 4,76 (s, 1H, 4-H); 4,08 – 3,96 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,77 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 3,69 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 1,14 – 1,11 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(7) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

7

Summenformel

C₂₅H₂₇NO₅

Molekulargewicht

421,49 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (5,93 mmol; 807 mg), 2-Toluidin (5,93 mmol; 635 mg) und Ethylpropiolat (11,86 mmol; 1163 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 73 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz von Methanol Verbindung **7** auskristallisiert.

Ausbeute 40,00 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 109,6 – 110,5 °C

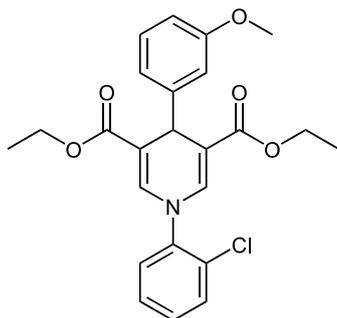
Reinheit 99,44 % (Retentionszeit: 12,36 min)

Elementaranalyse Ber.: C 71,24; H 6,46; N 3,32 %
Gef.: C 70,27; H 6,46; N 3,49 %

Massenspektrum m/z (%) = 865,22 (100, [2M + Na]⁺); 444,90 (23, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 422,28 (10, [M + H]⁺); 376,32 (14, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,40 – 7,33 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. 2-CH₃-Ph); 7,28 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,20 („t“, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,90 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,7 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,83 (dd, ⁴J_{2/4} = 2,6 Hz, ⁴J_{2/6} = 1,6 Hz, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,75 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,7 Hz, ⁴J_{2/6} = 0,9 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 4,80 (s, 1H, 4-H); 4,06 – 3,95 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,71 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 2,28 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(8) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(3-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

8

Summenformel

C₂₄H₂₄ClNO₅

Molekulargewicht

441,91 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (5,66 mmol; 771 mg), 2-Chloranilin (5,66 mmol; 722 mg) und Ethylpropiolat (11,31 mmol; 1110 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 71 h bei 80 C°). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz von Methanol Verbindung **8** auskristallisiert.

Ausbeute 19,63 %; gelb-grünes Pulver

R_f-Wert 0,40 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 127,0 – 128,0

Reinheit 99,90 % (Retentionszeit: 12,40 min)

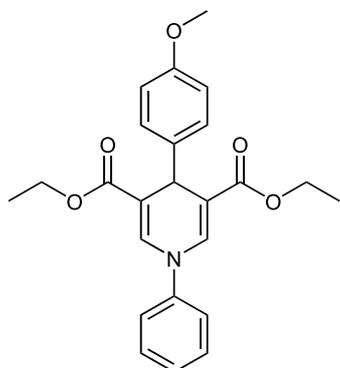
Elementaranalyse Ber.: C 65,23; H 5,47; N 3,17 %
Gef.: C 64,61; H 5,55; N 2,90 %

Massenspektrum m/z (%) = 905,11 (100, [2M + Na]⁺); 464,78 (47, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 442,51 (25, [M + H]⁺); 396,53 (56, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,68 – 7,66 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,63 – 7,61 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,51 – 7,45 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph); 7,34 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,19 („t“, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,93 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,7 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,87 (dd, ⁴J_{2/4} = 2,6 Hz, ⁴J_{2/6} = 1,5 Hz, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,74 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,9 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 4,77 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,95 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,70 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.3.c. Derivate mit 4-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(9) Diethyl 4-(4-methoxyphenyl)-*N*-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

9

Summenformel

C₂₄H₂₅NO₅

Molekulargewicht

407,47 g/mol

Darstellung 4-Methoxybenzaldehyd (1,84 mmol; 251 mg), Anilin (1,84 mmol; 171 mg) und Ethylpropiolat (3,68 mmol; 361 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 46 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **9** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 12,40 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,40 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 138,1 – 139,9 °C

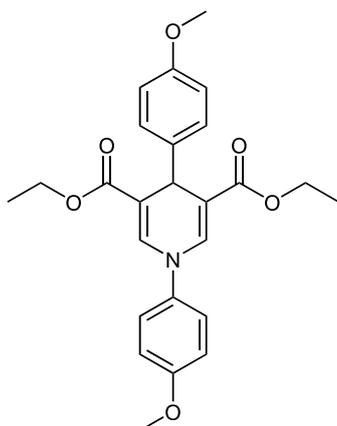
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,01 min)

Elementaranalyse Ber.: C 70,75; H 6,18; N 3,44 %
Gef.: C 69,57; H 6,14; N 3,40 %

Massenspektrum m/z (%) = 837,04 (34, [2M + Na]⁺); 430,92 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 362,62 (37, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,6 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,51 – 7,45 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,34 – 7,31 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,17 – 7,14 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,82 – 6,79 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 4,73 (s, 1H, 4-H); 4,08 – 3,97 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,68 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 1,14 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(10) Diethyl 1,4-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

10

Summenformel

C₂₅H₂₇NO₆

Molekulargewicht

437,49 g/mol

Darstellung 4-Methoxybenzaldehyd (1,71 mmol; 233 mg), 4-Methoxyanilin (1,71 mmol; 211 mg) und Ethylpropiolat (3,43 mmol; 336 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 45 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **10** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 56,46 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

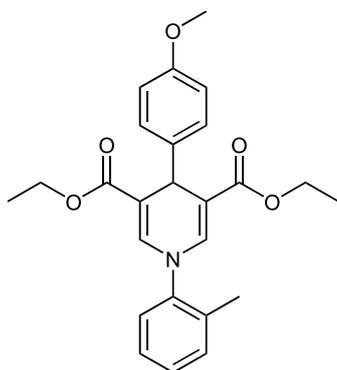
Schmelzbereich 120,5 – 121,1 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,02 min)

Massenspektrum m/z (%) = 896,95 (18, [2M + Na]⁺); 461,14 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 393,80 (5, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,48 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,41 – 7,38 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-(N-Ph)); 7,17 – 7,14 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 7,04 – 7,01 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-(N-Ph)); 6,82 – 6,79 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 4,71 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,95 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,77 (s, 3H, 4-CH₃-O-(N-Ph)); 3,68 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 1,13 – 1,11 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(11) Diethyl 4-(4-methoxyphenyl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

11

Summenformel

C₂₅H₂₇NO₅

Molekulargewicht

421,49 g/mol

Darstellung 4-Methoxybenzaldehyd (5,93 mmol; 807 mg), 2-Toluidin (5,93 mmol; 635 mg) und Ethylpropiolat (11,86 mmol; 1163 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 20 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (80:20) an. Unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches wurde Verbindung **11** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 21,40 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

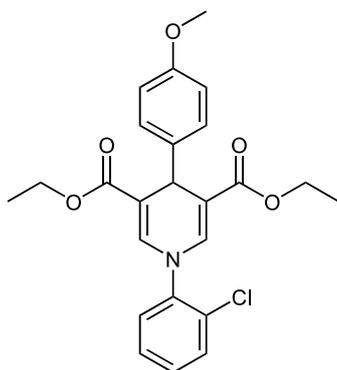
Schmelzbereich 87,4 – 89,1 °C

Reinheit 99,36 % (Retentionszeit: 12,22 min)

Massenspektrum m/z (%) = 865,33 (100, [2M + Na]⁺); 444,88 (14, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 314,71 (32, [M - C₇H₇O]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,40 – 7,31 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. 2-CH₃-Ph); 7,25 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,23 – 7,20 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,85 – 6,82 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 4,75 (s, 1H, 4-H); 4,05 – 3,93 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,70 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 2,28 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(12) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

12

Summenformel

C₂₄H₂₄ClNO₅

Molekulargewicht

441,91 g/mol

Darstellung 4-Methoxybenzaldehyd (5,66 mmol; 771 mg), 2-Chloranilin (5,66 mmol; 722 mg) und Ethylpropiolat (11,31 mmol; 1110 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 48 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz von Ethanol Verbindung **12** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 42,76 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,40 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 134,3 – 135,1 °C

Reinheit 99,85 % (Retentionszeit: 12,28 min)

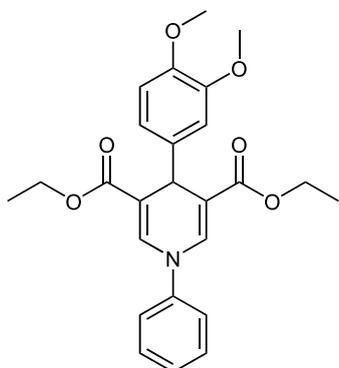
Elementaranalyse Ber.: C 65,23; H 5,47; N 3,17 %
Gef.: C 64,32; H 5,46; N 3,10 %

Massenspektrum m/z (%) = 905,38 (100, [2M + Na]⁺); 464,54 (24, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 335,23 (32, [M - C₇H₇O]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,68 – 7,66 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,64 – 7,62 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,51 – 7,45 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph); 7,31 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,26 – 7,23 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,84 – 6,81 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 4,72 (s, 1H, 4-H); 4,06 – 3,94 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,69 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.3.d. Derivate mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(13) Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

13

Summenformel

$C_{25}H_{27}NO_6$

Molekulargewicht

437,49 g/mol

Darstellung 3,4-Methoxybenzaldehyd (1,71 mmol; 284 mg), Anilin (1,71 mmol; 159 mg) und Ethylpropiolat (3,43 mmol; 336 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 47 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **13** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 15,97 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,24 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

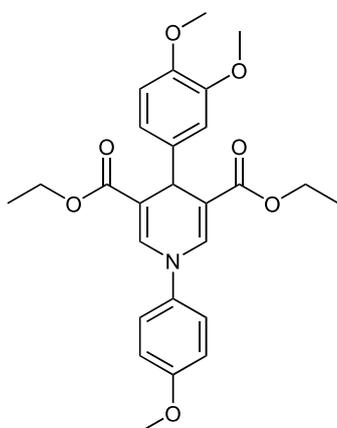
Schmelzbereich 107,8 – 109,8 °C

Reinheit 99,84 % (Retentionszeit: 13,73 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 897,37 (100, [2M + Na]⁺); 460,84 (29, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 392,36 (4, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,61 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,51 – 7,45 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,34 – 7,31 (m, 1H, 4-H v. Ph); 6,83 (d, ³J_{5/6} = 8,3 Hz, 1H, 5-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,81 (d, ⁴J_{2/6} = 2,1 Hz, 1H, 2-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,75 (dd, ³J_{6/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{6/2} = 2,1 Hz, 1H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,73 (s, 1H, 4-H), 4,10 – 3,99 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,68 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph); 1,16 – 1,13 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(14) **Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate**



Verbindung Nr.

14

Summenformel

C₂₆H₂₉NO₇

Molekulargewicht

467,52 g/mol

Darstellung 3,4-Methoxybenzaldehyd (1,6 mmol; 266 mg), 4-Methoxyanilin (1,6 mmol; 197 mg) und Ethylpropiolat (3,2 mmol; 314 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 22 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **14** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 51,30 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,16 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

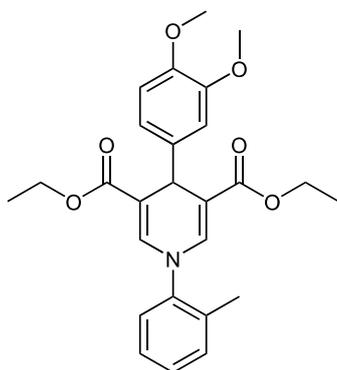
Schmelzbereich 138,7 – 139,3 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,70 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 957,15 (40, [2M + Na]⁺); 491,07 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 422,32 (20, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,49 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,41 – 7,38 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 7,04 – 7,01 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,83 (d, ³J_{5/6} = 8,3 Hz, 1H, 5-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,81 (d, ⁴J_{2/6} = 2,1 Hz, 1H, 2-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,75 (dd, ³J_{6/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{6/2} = 2,1 Hz, 1H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,71 (s, 1H, 4-H); 4,08 - 3,97 (m, 4H, COOCH₂CH₃), 3,77 (s, 3H, 4-CH₃-O-(N-Ph)); 3,68 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph); 1,15 - 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(15) Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

15

Summenformel

C₂₆H₂₉NO₆

Molekulargewicht

451,52 g/mol

Darstellung 3,4-Methoxybenzaldehyd (5,54 mmol; 921 mg), 2-Toluidin (5,54 mmol; 594 mg) und Ethylpropiolat (11,07 mmol; 1086 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 25 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (80:20) an. Unter Zusatz von Ethanol wurde Verbindung **15** auskristallisiert.

Ausbeute 35,22 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,26 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 109,8 – 110,6 °C

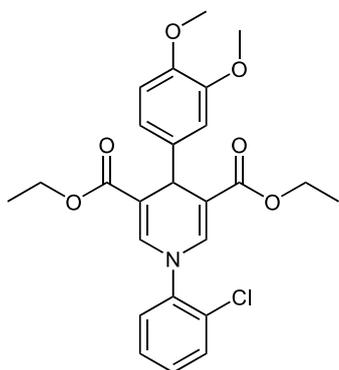
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,02 min)

Elementaranalyse Ber.: C 69,16; H 6,47; N 3,10 %
Gef.: C 68,38; H 6,42; N 3,26 %

Massenspektrum m/z (%) = 925,31 (100, [2M + Na]⁺); 475,05 (20, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 406,77 (4, [M - OC₂H₅]⁺); 315,62 (21, [M - C₈H₉O₂]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,41 – 7,34 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. 2-CH₃-Ph); 7,26 (s, 2H, 2-H, 6-H); 6,88 – 6,81 (m, 3H, 2-H, 5-H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,76 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,95 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,71 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph oder 4-CH₃-O-Ph); 3,69 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph oder 4-CH₃-O-Ph); 2,29 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 1,14 – 1,10 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(16) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

16

Summenformel

C₂₅H₂₆ClNO₆

Molekulargewicht

471,93 g/mol

Darstellung 3,4-Methoxybenzaldehyd (5,3 mmol; 881 mg), 2-Chloranilin (5,3 mmol; 676 mg) und Ethylpropiolat (10,59 mmol; 1039 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 51 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz von Methanol Verbindung **14** auskristallisiert.

Ausbeute 20,30 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,24 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 105,8 – 107,9 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 11,89 min)

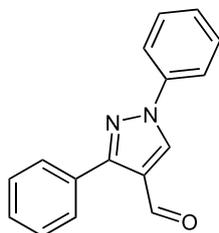
Elementaranalyse Ber.: C 63,63; H 5,55; N 2,97 %
Gef.: C 62,53; H 5,49; N 2,91 %

Massenspektrum m/z (%) = 965,67 (100, [2M + Na]⁺); 494,88 (25, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 335,24 (13, [M - C₈H₉O₂]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,68 – 7,66 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,63 – 7,61 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,51 – 7,45 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph); 7,32 (s, 2H, 2-H, 6-H); 6,88 – 6,85 (m, 3H, 2-H, 5-H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,73 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,96 (m, 4H, COOCH₂CH₃), 3,70 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph oder 4-CH₃-O-Ph); 3,69 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph oder 4-CH₃-O-Ph); 1,13 – 1,10 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.3.e. Synthese des 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd

(17a) 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd

**Verbindung Nr.**

17a

Summenformel $C_{16}H_{12}N_2O$ **Molekulargewicht**

248,29 g/mol

Darstellung In Anlehnung an die Vorschrift von ^[174] wurden 4 ml Essigsäure und 8,648 g Phenylhydrazin (80 mmol) zu einer Lösung von 11,536 g Acetophenon (96 mmol) in 360 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argon-Atmosphäre für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Bei Reaktionsende wurde das gebildete Präzipitat abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum über P_2O_5 wurden 13,424 g (79,80 %) Acetophenon-Phenylhydrazon isoliert. In einem nächsten Ansatz wurden 15 ml (191,4 mmol) Dimethylformamid und 18 ml Phosphoroxychlorid (191,4 mmol) bei 0 °C gekühlt. Dann wurde 13,424 g (63,8 mmol) Acetophenon-Phenylhydrazon gelöst in 15 ml Dimethylformamid tropfenweise zugegeben und anschließend 5 h bei 80 °C gerührt. Bei Ende der Reaktion und nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit kaltgesättigter K_2CO_3 -Lösung basisch gemacht. Das gebildete Präzipitat wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation in Ethanol resultierten 11,889 g (75 %) des 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd.

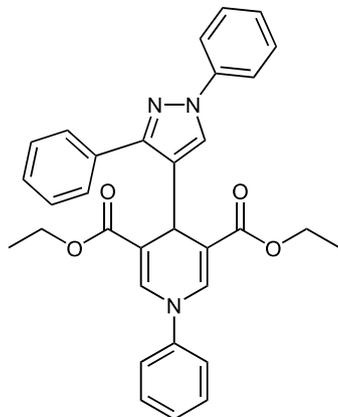
Ausbeute 59,85 %; beige Nadeln

Schmelzbereich 143,3 – 146,2 °C; Lit.: 142 – 146 °C ^[175]

¹H-NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 9,99 (s, 1H, CHO-Pyrazol); 9,32 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 8,01 – 7,91 (m, 4H, 2-H, 6H v. 1-Ph und 3-Ph); 7,60 – 7,42 ppm (m, 6H, 3-H, 4-H, 5-H v. 1-Ph und 3-Ph)

6.1.3.f. Derivate mit 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd als Aldehydkomponente

(17) Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

17

Summenformel

$C_{32}H_{28}N_3O_4$

Molekulargewicht

519,60 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (0,96 mmol; 238 mg), Anilin (0,96 mmol; 89 mg) und Ethylpropiolat (1,92 mmol; 188 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 24 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **17** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 16,10 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 137,8 – 138,7 °C

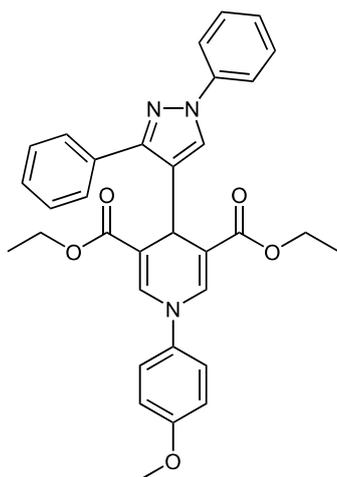
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,95 min)

Elementaranalyse Ber.: C 73,97; H 5,63; N 8,09 %
Gef.: C 73,05; H 5,72; N 7,94 %

Massenspektrum m/z (%) = 1060,97 (27, [2M + Na]⁺); 544,66 (13, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 520,85 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,34 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 7,99 – 7,97 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,86 – 7,84 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,55 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,51 – 7,43 (m, 8H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph oder 3-H, 5-H v. 1-Ph- oder 3-Ph-Pyrazol); 7,39 – 7,36 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,35 – 7,31 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,28 – 7,24 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 3-Ph-Pyrazol); 5,10 (s, 1H, 4-H); 3,98 – 3,92 u. 3,86 – 3,79 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 0,96 – 0,93 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(18) Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

18

Summenformel

C₃₃H₃₁N₃O₅

Molekulargewicht

549,63 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (5,46 mmol; 1356 mg), 4-Methoxyanilin (5,46 mmol; 672 mg) und Ethylpropiolat (10,92 mmol; 1071 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 95 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches wurde Verbindung **18** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 62,82 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,34 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 144,1 – 145,2 °C

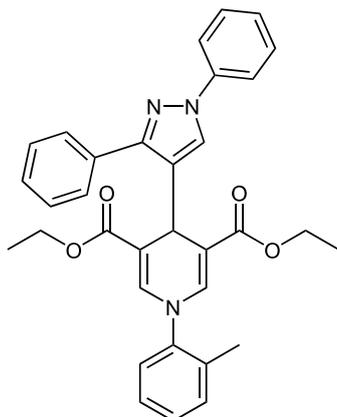
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,97 min)

Elementaranalyse Ber.: C 72,11; H 5,69; N 7,65 %
Gef.: C 70,99; H 5,77; N 7,46 %

Massenspektrum m/z (%) = 1121,93 (9, [2M + Na]⁺); 572,56 (10, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 550,74 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,32 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 7,99 – 7,98 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,87 – 7,85 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,47 – 7,43 (m, 6H, 3-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol, 3-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol und 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph); 7,43 (s, 2H, 2-H, 6-H), 7,40 – 7,36 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,28 – 7,24 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,05 – 7,02 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 5,08 (s, 1H, 4-H); 3,97 – 3,90 u. 3,84 – 3,77 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,78 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 0,95 – 0,92 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(19) Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

19

Summenformel

$C_{32}H_{28}N_3O_4$

Molekulargewicht

519,60 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (4,68 mmol; 1162 mg), 2-Toluidin (4,68 mmol; 502 mg) und Ethylpropiolat (9,37 mmol; 919 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 20 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (80:20) an. Unter Zusatz von Ethanol wurde Verbindung **19** auskristallisiert.

Ausbeute 5,35 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

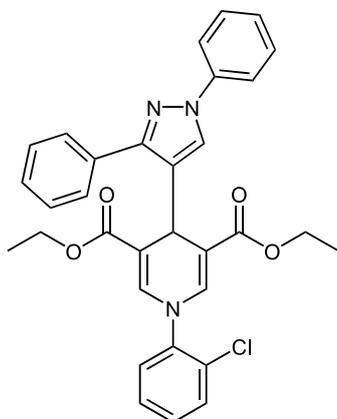
Schmelzbereich 182,5 – 185,2 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,21 min)

Massenspektrum m/z (%) = 1089,05 (34, [2M + Na]⁺); 556,93 (23, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 534,93 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,34 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 8,04 – 8,03 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,87 – 7,85 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,50 – 7,45 (m, 5H, 3-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol, 3-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol und 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,42 – 7,34 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. 2-CH₃-Ph); 7,29 – 7,26 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,24 (s, 2H, 2-H, 6-H); 5,11 (s, 1H, 4-H); 3,95 – 3,88 u. 3,81 – 3,74 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,32 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 0,93 – 0,90 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(20) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

20

Summenformel

C₃₂H₂₈ClN₃O₄

Molekulargewicht

554,04 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (1,2 mmol; 298 mg), 2-Chloranilin (1,2 mmol; 153 mg) und Ethylpropiolat (2,41 mmol; 236 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,2 ml Eisessig und 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 69 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs schloss sich eine Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat (80:20) an. Unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches wurde Verbindung **20** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 5,62 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,40 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 158,5 – 162,3 °C

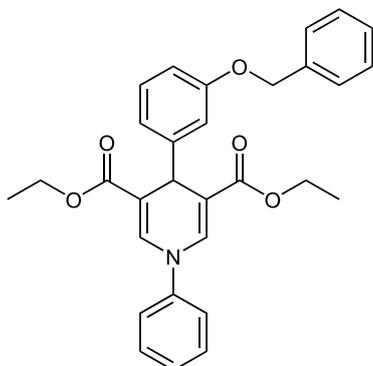
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 15,27 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 1128,95 (14, [2M + Na]⁺); 576,92 (20, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 556,50 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,32 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 8,05 – 8,03 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,81 – 7,79 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,76 – 7,74 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph), 7,70 – 7,68 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,54 – 7,46 (m, 6H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph, 3-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol und 3-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,42 – 7,39 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,32 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,30 – 7,26 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 5,09 (s, 1H, 4-H); 3,96 – 3,90 u. 3,83 – 3,77 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 0,93 – 0,90 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.3.g. Derivate mit 3-Benzyloxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(21) Diethyl 4-(3-(benzyloxy)phenyl)-*N*-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

21

Summenformel

C₃₀H₂₉NO₅

Molekulargewicht

483,56 g/mol

Darstellung 3-Benzyloxybenzaldehyd (3,45 mmol; 732 mg), Anilin (3,45 mmol; 321 mg) und Ethylpropiolat (6,89 mmol; 676 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 82 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **21** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 32,64 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,51 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 128,3 – 130,5 °C

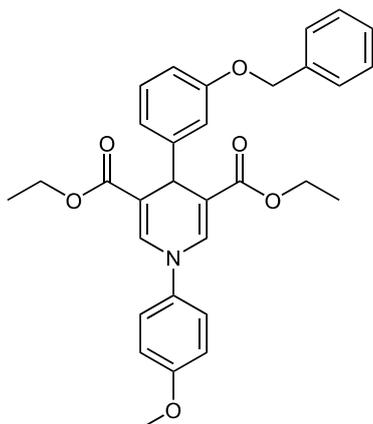
Reinheit 99,45 % (Retentionszeit: 13,13 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,52; H 6,05; N 2,90 %
Gef.: C 73,67; H 6,18; N 2,81 %

Massenspektrum m/z (%) = 988,99 (99, [2M + Na]⁺); 506,76 (94, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 484,36 (56, [M + H]⁺); 438,51 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,61 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,51 – 7,45 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. N-Ph); 7,40 – 7,38 (m, 2H, 2-H, 6-H v. Ph-CH₂-O); 7,34 – 7,31 (m, 3H, 4-H v. N-Ph und 3-H, 5-H v. Ph-CH₂-O); 7,30 – 7,27 (m, 1H, 4-H v. Ph-CH₂-O); 7,19 – 7,16 (m, 1H, 5-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 6,86 – 6,81 (m, 3H, 2-H, 4-H, 6-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 5,02 (s, 2H, Ph-O-CH₂-Ph); 4,77 (s, 1H, 4-H); 4,09 – 3,97 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,14 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(22) Diethyl 4-(3-(benzyloxy)phenyl)-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

22

Summenformel

C₃₁H₃₁NO₆

Molekulargewicht

513,59 g/mol

Darstellung 3-Benzyloxybenzaldehyd (6,49 mmol; 1377 mg), 4-Methoxyanilin (6,49 mmol; 799 mg) und Ethylpropionat (12,98 mmol; 1273 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,5 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 46 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **22** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 54,60 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,41 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 126,9 – 127,8 °C

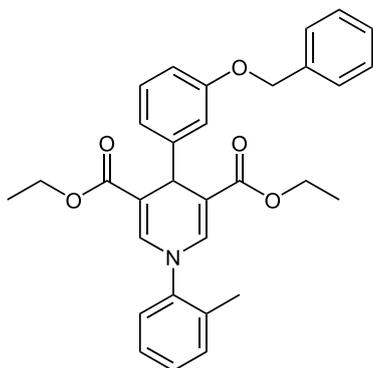
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,03 min)

Elementaranalyse Ber.: C 72,50; H 6,08; N 2,73 %
Gef.: C 71,32; H 6,08; N 2,65 %

Massenspektrum m/z (%) = 1048,88 (100, [2M + Na]⁺); 536,90 (63, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 514,51 (45, [M + H]⁺); 468,40 (41, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,49 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,41 – 7,37 (m, 4H, 3-H, 5-H v. 4-CH₃-O-Ph und 2-H, 6-H v. Ph-CH₂-O); 7,36 – 7,32 (m, 2H, 3-H, 5-H v. Ph-CH₂-O); 7,31 – 7,27 (m, 1H, 4-H v. Ph-CH₂-O); 7,19 – 7,16 (m, 1H, 5-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 7,04 – 7,01 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 4-CH₃-O-Ph); 6,87 – 6,80 (m, 3H, 2-H, 4-H, 6-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 5,03 (s, 2H, Ph-O-CH₂-Ph); 4,76 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 3,96 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,77 (s, 3H, 4-CH₃-O-Ph); 1,13 – 1,11 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(23) Diethyl 4-(3-(benzyloxy)phenyl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

23

Summenformel

C₃₁H₃₁NO₅

Molekulargewicht

513,59 g/mol

Darstellung 3-Benzyloxybenzaldehyd (3,35 mmol; 711 mg), 2-Anilin (3,35 mmol; 359 mg) und Ethylpropiolat (6,7 mmol; 657 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 66 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **23** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 49,34 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,48 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 116,5 – 118,3 °C

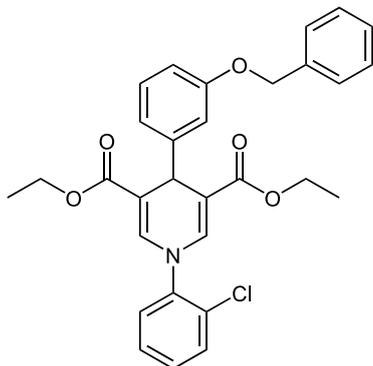
Reinheit 96,43 % (Retentionszeit: 13,16 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,83; H 6,28; N 2,81 %
Gef.: C 74,06; H 6,36; N 2,90 %

Massenspektrum m/z (%) = 1017,02 (100, [2M + Na]⁺); 520,96 (74, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 497,71 (33, [M + H]⁺); 453,56 (67, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,43 – 7,28 (m, 9H, 2-CH₃-Ph-Rest und Ph-CH₂-O-Rest); 7,28 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,20 („t“, ³J = 8,1 Hz, 1H, 5-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 6,92 – 6,91 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 6,83 (ddd, ³J_{4/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,4 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 1H, 4-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 5,04 (s, 2H, Ph-O-CH₂-Ph); 4,80 (s, 1H, 4-H); 4,06 – 3,94 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,27 (s, 3H, 2-CH₃-Ph); 1,12 – 1,09 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(24) Diethyl 4-(3-(benzyloxy)phenyl)-N-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

24

Summenformel

C₃₉H₂₈ClNO₅

Molekulargewicht

517,17 g/mol

Darstellung 3-Benzyloxybenzaldehyd (3,22 mmol; 683 mg), 2-Chloranilin (3,22 mmol; 411 mg) und Ethylpropiolat (6,45 mmol; 632 mg) wurden nach AAV 1 unter Zusatz von 0,4 ml Eisessig und 6 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 145 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende und nach dem Entfernen des Eisessigs wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **24** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 9,60 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,39 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 105,7 – 109,5 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,10 min)

Elementaranalyse Ber.: C 69,56; H 5,45; N 2,70 %
Gef.: C 68,60; H 5,43; N 2,66 %

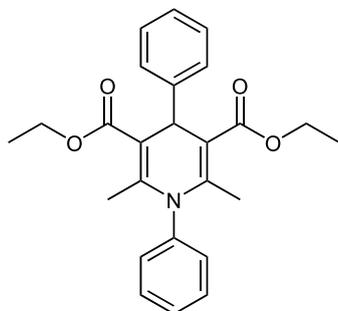
Massenspektrum m/z (%) = 1056,87 (51, [2M + Na]⁺); 542,48 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 519,32 (20, [M + H]⁺); 471,73 (34, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,68 – 7,66 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,63 – 7,62 (m, 1H, 3-H oder 6-H v. 2-Cl-Ph); 7,51 – 7,45 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 2-Cl-Ph); 7,42 – 7,40 (m, 2H, 2-H, 6-H v. Ph-CH₂-O); 7,38 – 7,34 (m, 2H, 3-H, 5-H v. Ph-CH₂-O); 7,34 (s, 2H, 2-H, 6-H); 7,32 – 7,29 (m, 1H, 4-H v. Ph-CH₂-O); 7,19 ("t", ³J = 7,8 Hz, 1H, 5-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 6,96 – 6,94 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 6,83 (ddd, ³J_{4/5} = 8,3 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,5 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,1 Hz, 1H, 4-H v. 3-(Ph-CH₂-O)-Ph); 5,03 (s, 2H, Ph-O-CH₂-Ph); 4,77 (s, 1H, 4-H); 4,06 – 3,95 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,12 – 1,10 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.4. Synthese der 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine

6.1.4.a. Derivate mit Benzaldehyd als Aldehydkomponente

(25) Diethyl 2,6-dimethyl-1,4-diphenyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

25

Summenformel

$C_{25}H_{27}NO_4$

Molekulargewicht

405,49 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (8 mmol; 849 mg), Anilin (8 mmol; 745 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 20 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende wurde Verbindung **25** aus dem abgekühltem Ansatz mittels Methanol in der Kälte auskristallisiert.

Ausbeute 23,37 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,54 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 153,4 – 156,8 °C

Reinheit 99,81 % (Retentionszeit: 12,24 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,05; H 6,71; N 3,45 %

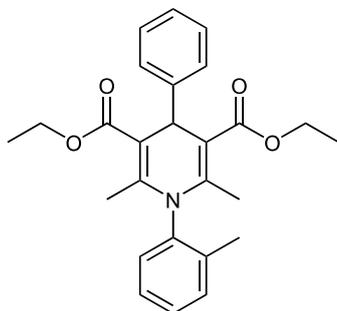
Gef.: C 73,18; H 6,67; N 3,47 %

Massenspektrum m/z (%) = 832,93 (43, [2M + Na]⁺); 428,50 (16, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 406,63 (25, [M + H]⁺); 360,68 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,53 – 7,44 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H v. N-Ph); 7,32 – 7,26 (m, 6H, 2-H, 6-H v. N-Ph und 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,19 – 7,14 (m, 1H, 4-H v. Ph); 5,02 (s, 1H, 4-H); 4,08 – 4,01 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,95 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,16 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(26) Diethyl 2,6-dimethyl-4-phenyl-*N*-(*o*-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

26

Summenformel

C₂₆H₂₉NO₄

Molekulargewicht

419,52 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (9,53 mmol; 1011 mg), 2-Toluidin (9,53 mmol; 1021 mg) und Ethylacetoacetat (19,07 mmol; 2482 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 4 ml Methanol gerührt (ca. 70 h bei 50 C°). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Diethylether 60:40 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **26** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 11,76 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,55 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 90,5 – 91,4 °C

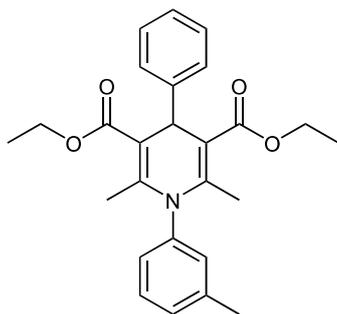
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,49 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,44; H 6,97; N 3,34 %
Gef.: C 73,77; H 7,20; N 3,15 %

Massenspektrum m/z (%) = 861,99 (20, [2M + Na]⁺); 442,59 (60, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 420,73 (26, [M + H]⁺); 374,67 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,44 – 7,11 (m, 18H, Ph-Rest und 2-CH₃-Ph-Rest v. A und B); 5,11 u. 5,01 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,08 – 3,98 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 2,15 u. 1,93 (s, 6H, 2-CH₃-Ph v. A und B); 1,88 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,14 – 1,11 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(27) Diethyl 2,6-dimethyl-4-phenyl-*N*-(*m*-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

27

Summenformel

C₂₆H₂₉NO₄

Molekulargewicht

419,52 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (3,178 mmol; 337 mg), 3-Toluidin (3,178 mmol; 341 mg) und Ethylacetoacetat (6,356 mmol; 827 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 1 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 23 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **27** in der Kälte auskristallisiert.

Ausbeute 13,74 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,56 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 99,4 – 103,2 °C

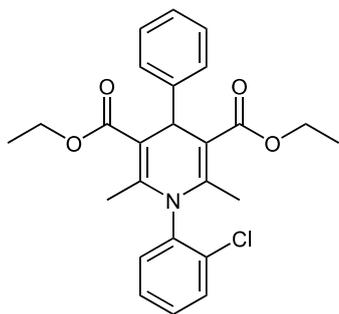
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,64 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,44; H 6,97; N 3,34 %
Gef.: C 73,48; H 7,12; N 3,22 %

Massenspektrum m/z (%) = 861,01 (54, [2M + Na]⁺); 442,65 (92, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 420,86 (33, [M + H]⁺); 374,62 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,41 – 7,37 (m, 1H, 5-H v. 3-CH₃-Ph); 7,32 – 7,26 (m, 5H, 4-H v. 3-CH₃-Ph, 2-H, 3-H, 5-H und 6-H v. Ph); 7,19 – 7,14 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,06 – 7,04 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-CH₃-Ph); 5,02 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 4,01 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,34 (s, 3H, 3-CH₃-Ph); 1,96 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,16 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(28) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-2,6-dimethyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

28

Summenformel

C₂₅H₂₆ClNO₄

Molekulargewicht

439,94 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (15 mmol; 1592 mg), 2-Chloranilin (15 mmol; 1914 mg) und Ethylacetoacetat (30 mmol; 3904 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 10 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 50 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **28** in der Kälte auskristallisiert.

Ausbeute 2,64 %; weiß-gelbliches Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 86,8 – 88,5 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,61 min)

Elementaranalyse Ber.: C 68,25; H 5,96; N 3,18 %

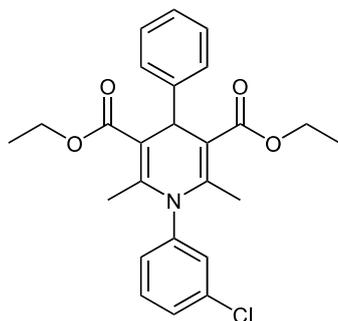
Gef.: C 67,74; H 6,13; N 3,10 %

Massenspektrum m/z (%) = 900,89 (42, [2M + Na]⁺); 462,80 (100, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 440,71 (32, [M + H]⁺); 395,36 (79, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,74 – 7,35 (m, 10H, Ph-Rest oder 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,31 – 7,11 (m, 8H, Ph-Rest oder 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 5,04 u. 4,99 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,05 – 3,96 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 1,93 u. 1,87 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,14 – 1,08 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(29) Diethyl *N*-(3-chlorophenyl)-2,6-dimethyl-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

29

Summenformel

C₂₅H₂₆ClNO₄

Molekulargewicht

439,94 g/mol

Darstellung Benzaldehyd (9,11 mmol; 967 mg), 3-Chloranilin (9,11 mmol; 1162 mg) und Ethylacetoacetat (18,22 mmol; 2371 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 4 ml Methanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 22 h bei 70 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **29** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 5,78 %; hellgelbes Pulver

R_f-Wert 0,56 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 123,8 – 124,3 °C

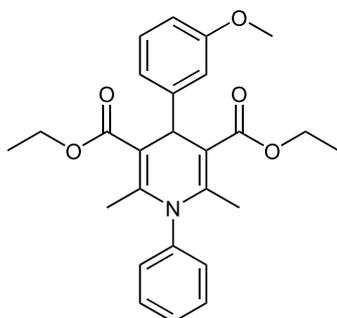
Reinheit 99,71 % (Retentionszeit: 12,77 min)

Massenspektrum m/z (%) = 900,87 (42, [2M + Na]⁺); 462,72 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 440,71 (24, [M + H]⁺); 395,22 (93, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,58 – 7,51 (m, 2H, 5-H, 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,44 (s, 1H, 2-H v. 3-Cl-Ph); 7,31 – 7,24 (m, 5H, 4-H v. 3-Cl-Ph und 2-H, 3-H, 5-H, 6-H v. Ph); 7,18 – 7,14 (m, 1H, 4-H v. Ph); 5,02 (s, 1H, 4-H); 4,07 – 4,02 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,96 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,15 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.4.b. Derivate mit 3-Methoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(30) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

30

Summenformel

C₂₆H₂₉NO₅

Molekulargewicht

435,52 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (8 mmol; 1089 mg), Anilin (8 mmol; 745 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 19 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **30** in der Kälte auskristallisiert.

Ausbeute 1,80 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,48 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 115,9 – 116,4 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,44 min)

Elementaranalyse Ber.: C 71,70; H 6,71; N 3,22 %

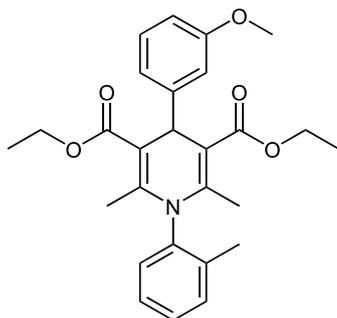
Gef.: C 70,65; H 6,57; N 3,24 %

Massenspektrum m/z (%) = 892,95 (49, [2M + Na]⁺); 458,53 (27, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 436,64 (30, [M + H]⁺); 390,63 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,54 – 7,44 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H v. Ph); 7,25 – 7,23 (m, 2H, 2-H, 6-H v. Ph); 7,22 („t“, ³J = 7,8 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,87 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,80 – 6,79 (m, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph), 6,75 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,9 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 5,01 (s, 1H, 4-H); 4,11 – 4,00 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,71 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 1,95 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,17 – 1,13 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(31) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

31

Summenformel

C₂₇H₃₁NO₅

Molekulargewicht

449,55 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (8,9 mmol; 1212 mg), 2-Toluidin (8,9 mmol; 954 mg) und Ethylacetoacetat (17,8 mmol; 2317 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 4 ml Methanol gerührt (ca. 283 h bei 55 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **31** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 10,10 %; gräuliches Pulver

R_f-Wert 0,48 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 97,9 – 98,5 °C

Reinheit 95,73 % (Retentionszeit: 12,81 min)

Elementaranalyse Ber.: C 72,14; H 6,95; N 3,12 %

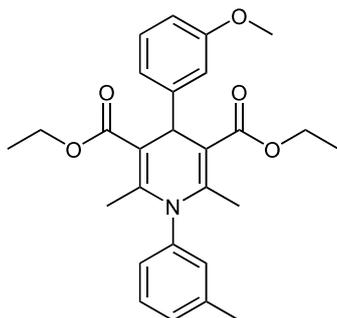
Gef.: C 71,72; H 6,89; N 3,13 %

Massenspektrum m/z (%) = 920,91 (16, [2M + Na]⁺); 472,56 (28, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 450,66 (21, [M + H]⁺); 404,63 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,43 – 7,29 (m, 7H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 7,24 – 7,20 u. 7,19 – 7,15 (m, 2H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 7,07 – 7,05 (m, 1H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 6,89 – 6,87 u. 6,84 – 6,82 (m, 2H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 6,79 – 6,71 (m, 4H, 2-H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 5,09 u. 4,99 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,08 – 3,99 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 3,72 u. 3,69 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 2,15 u. 1,97 (s, 6H, 2-CH₃-Ph v. A und B); 1,88 u. 1,87 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,16 – 1,12 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(32) Diethyl 4-(3-methoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

32

Summenformel

C₂₇H₃₂NO₅

Molekulargewicht

449,55 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (15 mmol; 2042 mg), 3-Toluidin (15 mmol; 1607 mg) und Ethylacetoacetat (30 mmol; 3904 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 10 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 6 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Ethanol Verbindung **32** auskristallisiert.

Ausbeute 14,25 %; beiges Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

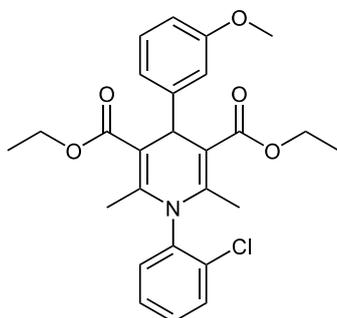
Schmelzbereich 96,5 – 97,2 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,75 min)

Massenspektrum m/z (%) = 921,01 (31, [2M + Na]⁺); 472,72 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 405,26 (79, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,41 – 7,37 (m, 1H, 5-H v. 3-CH₃-Ph); 7,29 – 7,26 (m, 1H, 4-H v. 3-CH₃-Ph); 7,22 (t, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 7,04 – 7,03 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-CH₃-Ph); 6,86 (d, ³J_{6/5} = 7,7 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,79 – 6,78 (m, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,75 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,9 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 5,01 (s, 1H, 4-H); 4,09 – 4,02 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,72 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 2,33 (s, 3H, 3-CH₃-Ph); 1,96 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,17 – 1,14 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(33) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(3-methoxyphenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

33

Summenformel

C₂₆H₂₈ClNO₅

Molekulargewicht

469,96 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (4,27 mmol; 581 mg), 2-Chloranilin (4,27 mmol; 545 mg) und Ethylacetoacetat (8,53 mmol; 1110 mg) wurden nach AAV2 unter Zusatz von 2,5 ml Methanol gerührt (ca. 426 h bei 55 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 80:20 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **33** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 4,00 %; beiges Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 78,0 – 78,6 °C

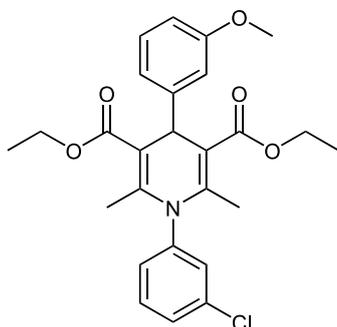
Reinheit 97,77 % (Retentionszeit: 12,77 min)

Elementaranalyse Ber.: C 66,45; H 6,01; N 2,98 %
Gef.: C 65,83; H 6,07; N 2,96 %

Massenspektrum m/z (%) = 960,79 (15, [2M + Na]⁺); 492,70 (73, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 424,53 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,72 – 7,69 (m, 1H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,67 – 7,65 (m, 1H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,60 – 7,58 (m, 1H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,56 – 7,52 (m, 2H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,52 – 7,46 (m, 2H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,34 – 7,31 (m, 1H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,20 u. 7,15 („t“, ³J = 7,9 Hz, 2H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 6,93 u. 6,87 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 2H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 6,88 u. 6,77 („t“, ⁴J = 2,1 Hz, 2H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 6,73 u. 6,70 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,6 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,9 Hz, 2H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 5,02 u. 4,97 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,04 – 3,96 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 3,71 u. 3,68 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph v. A und B); 1,91 u. 1,85 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,14 – 1,08 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(34) Diethyl *N*-(3-chlorophenyl)-4-(3-methoxyphenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

34

Summenformel

C₂₆H₂₈ClNO₅

Molekulargewicht

469,96 g/mol

Darstellung 3-Methoxybenzaldehyd (15 mmol; 2042 mg), 3-Chloranilin (15 mmol; 1914 mg) und Ethylacetoacetat (30 mmol; 3904 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 10 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 8 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wird nach Einengen unter Zusatz von Ethanol Verbindung **34** auskristallisiert.

Ausbeute 3,05 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,46 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 108,7 – 109,6 °C

Reinheit 99,80 % (Retentionszeit: 12,70 min)

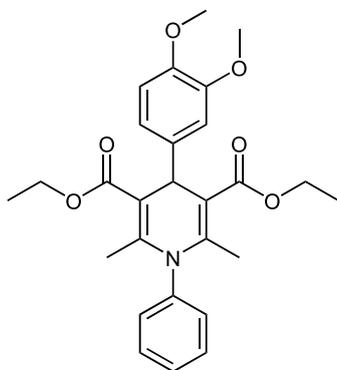
Elementaranalyse Ber.: C 66,45; H 6,01; N 2,98 %
Gef.: C 66,23; H 6,10; N 2,94 %

Massenspektrum m/z (%) = 960,83 (9, [2M + Na]⁺); 492,89 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 425,06 (97, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,59 – 7,54 (m, 2H, 5-H, 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,42 (s, 1H, 2-H v. 3-Cl-Ph); 7,25 – 7,24 (m, 1H, 4-H v. 3-Cl-Ph); 7,23 („t“, ³J = 7,8 Hz, 1H, 5-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,87 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,7 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, 6-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,78 („t“, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, 2-H v. 3-CH₃-O-Ph); 6,77 (ddd, ³J_{4/5} = 8,0 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,7 Hz, ⁴J_{4/6} = 0,9 Hz, 1H, 4-H v. 3-CH₃-O-Ph); 5,02 (s, 1H, 4-H); 4,08 (ABX₃, ²J_{AB} = -10,9 Hz, ³J_{AX3} = 7,1 Hz, 2H, COOCH_AH_BCH_{X3}); 4,07 (ABX₃, ²J_{BA} = -10,9 Hz, ³J_{BX3} = 7,0 Hz, 2H, COOCH_AH_BCH_{X3}); 3,73 (s, 3H, 3-CH₃-O-Ph); 1,98 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,16 ppm (ABX₃, ³J_{X3A} = 7,1 Hz, ³J_{X3B} = 7,0 Hz, 6H, COOCH₂CH_{X3})

6.1.4.c. Derivate mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd als Aldehydkomponente

(35) **Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

35

Summenformel

$C_{27}H_{31}NO_6$

Molekulargewicht

465,55 g/mol

Darstellung 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (5,37 mmol; 892 mg), Anilin (5,37 mmol; 500 mg) und Ethylacetoacetat (10,75 mmol; 1399 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 3 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 25 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **35** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 3,80 %; weiß-gelbliches Pulver

R_f-Wert 0,30 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

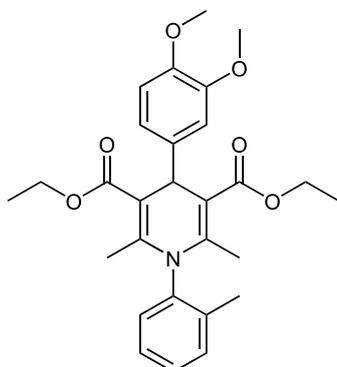
Schmelzbereich 83,2 – 89,3 °C

Reinheit 79,86 % (Retentionszeit: 11,92 min)

Massenspektrum m/z (%) = 953,19 (100, [2M + Na]⁺); 488,92 (40, [M + Na]⁺); 466,97 (ESI-Positiv, MeOH) (23, [M + H]⁺); 420,57 (23, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,53 – 7,50 (m, 2H, 3-H, 5-H v. Ph); 7,48 – 7,45 (m, 1H, 4-H v. Ph); 7,27 – 7,25 (m, 2H, 2-H, 6-H v. Ph); 6,90 – 6,88 (m, 1H, 5-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,82 – 6,79 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,95 (s, 1H, 4-H); 4,10 – 4,01 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,71 u. 3,70 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph); 1,95 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,18 – 1,15 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(36) **Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

36

Summenformel

C₂₈H₃₃NO₆

Molekulargewicht

479,57 g/mol

Darstellung 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (5,21 mmol; 866 mg), 2-Toluidin (5,21 mmol; 558 mg) und Ethylacetoacetat (10,43 mmol; 1357 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 2 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 20 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **36** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 12,00 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 111,1 – 111,4 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,24 min)

Elementaranalyse Ber.: C 70,13; H 6,94; N 2,92 %

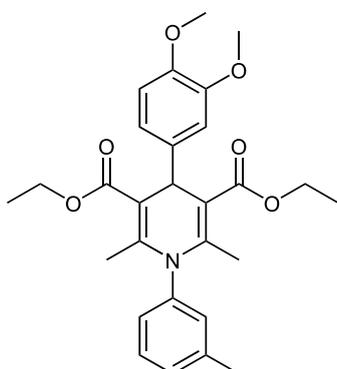
Gef.: C 69,51; H 6,92; N 2,90 %

Massenspektrum m/z (%) = 981,25 (100, [2M + Na]⁺); 503,14 (51, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 480,92 (12, [M + H]⁺); 434,51 (16, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,43 – 7,27 (m, 7H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 7,09 (dd, ³J = 7,5 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 1H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 6,90 – 6,88 (m, 1H, 3,4-(CH₃-O)₂-Ph-Rest v. A oder B); 6,85 – 6,76 (m, 5H, 3,4-(CH₃-O)₂-Ph-Rest v. A oder B); 5,04 u. 4,94 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,08 – 3,99 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 3,73 u. 3,70 u. 3,69 u. 3,68 (s, 12H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph v. A und B); 2,14 u. 2,03 (s, 6H, 2-CH₃-Ph v. A und B); 1,88 u. 1,86 (s, 12H, CH₃-C-2 u. – C-6 v. A und B); 1,16 – 1,12 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(37) Diethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-N-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

37

Summenformel

C₂₈H₃₃NO₆

Molekulargewicht

479,57 g/mol

Darstellung 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (8,34 mmol; 1386 mg), 3-Toluidin (8,34 mmol; 894 mg) und Ethylacetoacetat (16,68 mmol; 2171 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 38 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 50:50 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **37** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 15,10 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,33 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 134,3 – 135,7 °C

Reinheit 99,88 % (Retentionszeit: 12,28 min)

Elementaranalyse Ber.: C 70,13; H 6,94; N 2,92 %

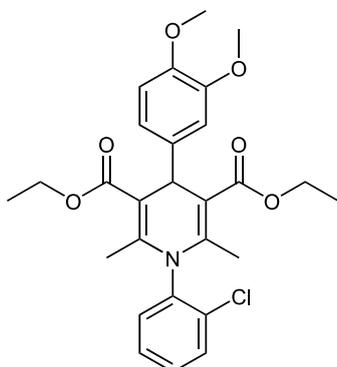
Gef.: C 69,52; H 6,91; N 2,88 %

Massenspektrum m/z (%) = 981,23 (100, [2M + Na]⁺); 504,03 (32, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 480,50 (13, [M + H]⁺); 435,10 (11, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,40 – 7,37 (m, 1H, 5-H v. 3-CH₃-Ph); 7,28 – 7,26 (m, 1H, 4-H v. 3-CH₃-Ph); 7,06 – 7,05 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-CH₃-Ph); 6,90 – 6,87 (m, 1H, 5-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,81 – 6,79 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,95 (s, 1H, 4-H); 4,08 – 4,00 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 3,72 u. 3,70 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph); 2,34 (s, 3H, 3-CH₃-Ph); 1,95 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,17 – 1,14 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(38) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

38

Summenformel

C₂₇H₃₀ClNO₆

Molekulargewicht

499,99 g/mol

Darstellung 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (10 mmol; 1662 mg), 2-Chloranilin (10 mmol; 1276 mg) und Ethylacetoacetat (20 mmol; 2603 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 68 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat/Ethanol 70/25/5 (v/v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **38** auskristallisiert.

Ausbeute 5,00 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

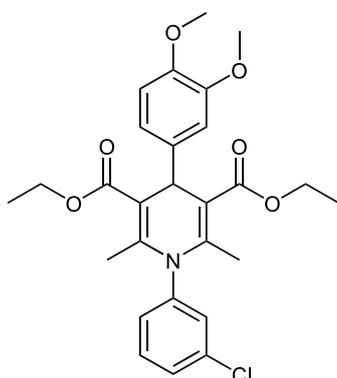
Schmelzbereich 112,1 – 112,4 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 12,28 min)

Massenspektrum m/z (%) = 1021,03 (95, [2M + Na]⁺); 522,81 (100, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 500,92 (35, [M + H]⁺); 454,95 (25, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,74 – 7,67 (m, 2H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,60 – 7,46 (m, 5H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,38 – 7,34 (m, 1H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 6,93 – 6,80 (m, 6H, 3,4-(CH₃-O)₂-Ph-Rest v. A und B); 4,98 u. 4,93 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,06 – 3,98 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 3,73 u. 3,70 u. 3,69 u. 3,68 (s, 12H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph v. A und B); 1,93 u. 1,85 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,17 – 1,10 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(39) Diethyl *N*-(3-chlorophenyl)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

39

Summenformel

C₂₇H₃₀ClNO₆

Molekulargewicht

499,99 g/mol

Darstellung 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (8 mmol; 1329 mg), 3-Chloranilin (8 mmol; 1021 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 24 h bei 80 °C). Bei Reaktionsende wurde unter Zugabe des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **39** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 8,80 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,33 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 120,9 – 121,7 °C

Reinheit 99,79 % (Retentionszeit: 12,26 min)

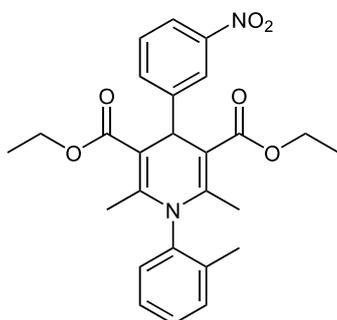
Elementaranalyse Ber.: C 64,86; H 6,05; N 2,80 %
Gef.: C 64,49; H 6,14; N 2,80 %

Massenspektrum m/z (%) = 1021,10 (100, [2M + Na]⁺); 522,39 (85, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 455,57 (21, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 7,58 – 7,52 (m, 2H, 5-H, 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,43 (s, 1H, 2-H v. 3-Cl-Ph); 7,26 – 7,24 (m, 1H, 4-H v. 3-Cl-Ph); 6,90 – 6,88 (m, 1H, 5-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 6,80 – 6,78 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3,4-(CH₃-O)₂-Ph); 4,95 (s, 1H, 4-H); 4,08 (ABX₃, ²J_{AB} = -10,9 Hz, ³J_{AX3} = 7,1 Hz, 2H, COOCH_AH_BCH_{X3}); 4,06 (ABX₃, ²J_{BA} = -10,9 Hz, ³J_{BX3} = 7,0 Hz, 2H, COOCH_AH_BCH_{X3}); 3,71 u. 3,70 (s, 6H, 3-CH₃-O-Ph u. 4-CH₃-O-Ph); 1,96 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,17 ppm (ABX₃, ³J_{X3A} = 7,1 Hz, ³J_{X3B} = 7,0 Hz, 6H, COOCH_AH_BCH_{X3})

6.1.4.d. Derivate mit 3-Nitrobenzaldehyd als Aldehydkomponente

(40) Diethyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

40

Summenformel

C₂₆H₂₈N₂O₆

Molekulargewicht

464,52 g/mol

Darstellung 3-Nitrobenzaldehyd (7,59 mmol; 1147 mg), 2-Toluidin (7,59 mmol; 813 mg) und Ethylacetoacetat (15,18 mmol; 1976 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 24 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **40** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 27,86 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 109,5 – 110,3 °C

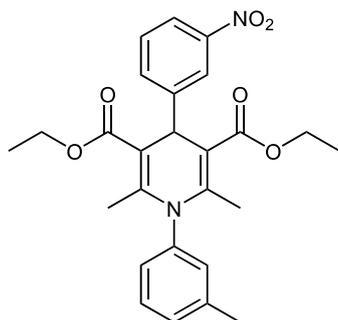
Reinheit 61,24 % (Retentionszeit: 12,71 min)

Elementaranalyse Ber.: C 67,23; H 6,08; N 6,03 %
Gef.: C 66,66; H 6,21; N 6,00 %

Massenspektrum m/z (%) = 951,08 (97, [2M + Na]⁺); 487,86 (38, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 466,06 (66, [M + H]⁺); 420,64 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,14 – 8,13 (m, 2H, 2-H v. 3-NO₂-Ph v. A und B); 8,07 – 8,03 (m, 2H, 4-H v. 3-NO₂-Ph v. A und B); 7,80 – 7,77 u. 7,74 – 7,72 (m, 2H, 6-H v. 3-NO₂-Ph v. A und B); 7,65 – 7,61 u. 7,61 – 7,57 (m, 2H, 5-H v. 3-NO₂-Ph v. A und B); 7,46 – 7,31 (m, 7H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 7,24 – 7,22 (m, 1H, 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 5,19 u. 5,09 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,10 – 3,97 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 2,16 u. 2,04 (s, 6H, 2-CH₃-Ph v. A und B); 1,92 u. 1,91 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,14 – 1,11 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(41) Diethyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-N-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

41

Summenformel

C₂₆H₂₈N₂O₆

Molekulargewicht

464,52 g/mol

Darstellung 3-Nitrobenzaldehyd (0,861 mmol; 130 mg), 3-Toluidin (0,861 mmol; 92 mg) und Ethylacetoacetat (1,72 mmol; 224 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 0,5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 7 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 80:20 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **41** in der Kälte auskristallisiert.

Ausbeute 21,43 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 114,4 – 115,2 °C

Reinheit 99,71 % (Retentionszeit: 12,90 min)

Elementaranalyse Ber.: C 67,23; H 6,08; N 6,03 %

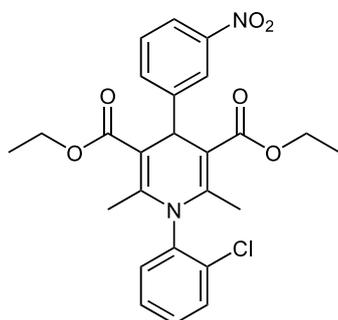
Gef.: C 66,03; H 5,96; N 5,99 %

Massenspektrum m/z (%) = 950,85 (43, [2M + Na]⁺); 487,55 (21, [M + Na]⁺);

(ESI-Positiv, MeOH) 465,72 (67, [M + H]⁺); 419,60 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,16 („t“, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, 2-H v. 3-NO₃-Ph); 8,07 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,4 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 1H, 4-H v. 3-NO₃-Ph); 7,76 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,8 Hz, ⁴J_{6/2} = 1,3 Hz, 1H, 6-H v. 3-NO₃-Ph); 7,63 („t“, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-NO₃-Ph); 7,44 – 7,40 (m, 1H, 5-H v. 3-CH₃-Ph); 7,32 – 7,29 (m, 1H, 4-H v. 3-CH₃-Ph); 7,17 – 7,14 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 3-CH₃-Ph); 5,09 (s, 1H, 4-H); 4,10 – 3,99 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,36 (s, 3H, 3-CH₃-Ph); 2,00 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,16 – 1,13 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(42) Diethyl *N*-(2-chlorophenyl)-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

42

Summenformel

C₂₅H₂₅ClN₂O₆

Molekulargewicht

484,93 g/mol

Darstellung 3-Nitrobenzaldehyd (6,87 mmol; 1038 mg), 2-Chloranilin (6,87 mmol; 876 mg) und Ethylacetoacetat (13,75 mmol; 1789 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml Methanol gerührt (ca. 92 h bei 50 °C). Bei Reaktionsende wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **42** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 15,50 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,46 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

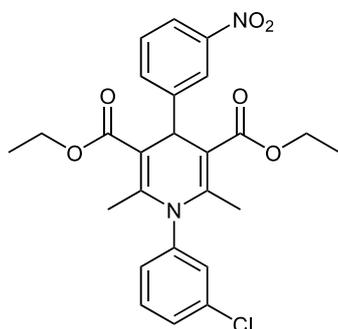
Schmelzbereich 126,1 – 126,8 °C

Reinheit 96,37 % (Retentionszeit: 12,85 min)

Massenspektrum m/z (%) = 990,83 (39, [2M + Na]⁺); 507,63 (18, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 486,00 (98, [M + H]⁺); 439,56 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,31 u. 8,12 („t“, J = 2,1 Hz, 2H, 2-H v. 3-NO₃-Ph v. A und B); 8,07 – 8,03 (m, 2H, 4-H v. 3-NO₃-Ph v. A und B); 7,81 – 7,79 (m, 2H, 6-H v. 3-NO₃-Ph v. A und B); 7,75 – 7,70 (m, 2H, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,65 – 7,49 (m, 8H, 5-H v. 3-NO₃-Ph v. A und B, 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 5,15 u. 5,08 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,05 – 3,96 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 1,97 u. 1,91 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,14 – 1,08 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(43) **Diethyl *N*-(3-chlorophenyl)-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

43

Summenformel

C₂₅H₂₅ClN₂O₆

Molekulargewicht

484,93 g/mol

Darstellung 3-Nitrobenzaldehyd (8,25 mmol; 1247 mg), 3-Chloranilin (8,25 mmol; 1052 mg) und Ethylacetoacetat (16,5 mmol; 2147 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml Methanol gerührt (ca. 69 h bei 50 °C). Bei Reaktionsende wurde unter Zusatz des Ether/Methanol-Gemisches Verbindung **43** im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute 28,40 %; weiß-gelbliches Pulver

R_f-Wert 0,48 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 129,7 – 131,0 °C

Reinheit 97,37 % (Retentionszeit: 12,74 min)

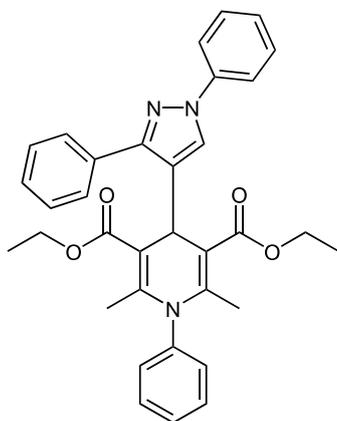
Elementaranalyse Ber.: C 61,98; H 5,20; N 5,78 %
Gef.: C 60,80; H 5,23; N 5,69 %

Massenspektrum m/z (%) = 990,68 (28, [2M + Na]⁺); 507,49 (24, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 485,56 (56, [M + H]⁺); 439,60 (100, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,12 („t“, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, 2-H v. 3-NO₃-Ph); 8,06 (ddd, ³J_{4/5} = 8,2 Hz, ⁴J_{4/2} = 2,3 Hz, ⁴J_{4/6} = 1,0 Hz, 1H, 4-H v. 3-NO₃-Ph); 7,78 (d“t“, ³J_{6/5} = 7,8 Hz, ⁴J = 1,3 Hz, 1H, 6-H v. 3-NO₃-Ph); 7,63 („t“, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5-H v. 3-NO₃-Ph); 7,61 – 7,54 (m, 3H, 2-H, 5-H, 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,35 – 7,34 (m, 1H, 4-H v. 3-Cl-Ph); 5,09 (s, 1H, 4-H); 4,10 – 3,99 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,00 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,16 – 1,12 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.1.4.e. Derivate mit 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd als Aldehydkomponente

(44) Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2,6-dimethyl-N-phenyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat



Verbindung Nr.

44

Summenformel

C₃₄H₃₃N₃O₄

Molekulargewicht

547,65 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (6,09 mmol; 1512 mg), Anilin (6,09 mmol; 567 mg) und Ethylacetoacetat (12,17 mmol; 1584 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 22 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **44** auskristallisiert.

Ausbeute 30,70 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 174,4 – 175,4 °C

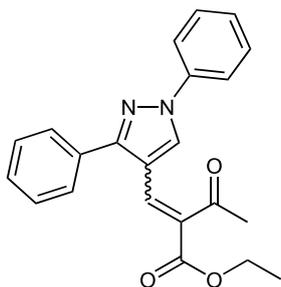
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,03 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,57; H 6,07; N 7,67 %
Gef.: C 73,84; H 6,13; N 7,60 %

Massenspektrum m/z (%) = 1116,81 (10, [2M + Na]⁺); 570,56 (24, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 548,56 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,17 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 7,88 – 7,82 (m, 4H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol und 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,54 – 7,45 (m, 7H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H v. Ph und 3-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol); 7,42 – 7,39 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,36 – 7,34 (m, 2H, 3-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,31 – 7,28 (m, 1H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 5,33 (s, 1H, 4-H); 3,91 – 3,85 u. 3,61 – 3,55 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,90 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 0,97 – 0,95 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(45a) Ethyl 2-((1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylen)-3-oxobutanoat



Verbindung Nr.

45a

Summenformel

C₂₂H₂₀N₂O₃

Molekulargewicht

360,41 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (8 mmol; 1986 mg), Anilin (8 mmol; 1021 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 15 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **45a** auskristallisiert.

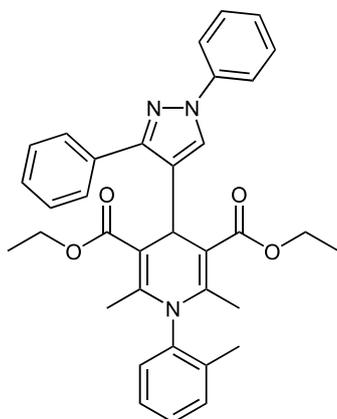
Ausbeute 12,30 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,45 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Massenspektrum m/z (%) = 361,45 (58, [M + H]⁺); 315,37 (100, [M - OC₂H₅]⁺)
(ESI-Positiv, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,45 (2 s, 1H, 5-H v. Pyrazol v. *trans* u. *cis*); 7,89 - 7,86 (m, 4H, 2-H u. 6-H v. *N*-Phenyl oder 2-H u. 6-H v. Phenyl v. *trans* u. *cis*); 7,70 - 7,67 u. 7,63 - 7,61 (m, 4H, 2-H u. 6-H v. *N*-Phenyl oder 2-H u. 6-H v. Phenyl v. *trans* u. *cis*); 7,59 - 7,49 u. 7,44 - 7,40 (m, 14H, 3-H, 4-H, 5-H v. *N*-Phenyl, 3-H, 4-H, 5-H v. Phenyl und C-CH-C v. *trans* u. *cis*); 4,32 (q, 2H, O-CH₂-CH₃ v. *trans* o. *cis*); 4,23 (q, 2H, O-CH₂-CH₃ v. *trans* o. *cis*); 2,44 (s, 3H, C-CH₃ v. *trans* o. *cis*); 2,37 (s, 3H, C-CH₃ v. *trans* o. *cis*); 1,24 (2 t, 3H, O-CH₂-CH₃ v. *trans* u. *cis*)

(45) **Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2,6-dimethyl-N-(o-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

45

Summenformel

C₃₅H₃₅N₃O₄

Molekulargewicht

561,68 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (8 mmol; 1986 mg), 2-Toluidin (8 mmol; 857 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol und 0,1 ml Eisessig zum Rückfluss erhitzt (ca. 5,5 h bei 80 °C). Die weitere Aufreinigung erfolgte wie bei AAV 1 mit anschließender Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Ethanol Verbindung **45** auskristallisiert.

Ausbeute 9,94 %; weißes Pulver

R_f-Wert 0,48 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

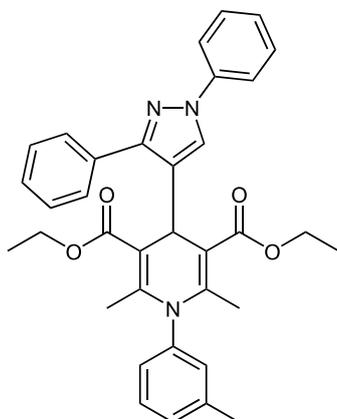
Schmelzbereich 169,2 – 170,4 °C

Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 15,05 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Massenspektrum m/z (%) = 1144,95 (5, [2M + Na]⁺); 584,50 (7, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 562,69 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,21 u. 8,12 (s, 2H, 5-H v. Pyrazol v. A und B); 7,90 – 7,77 (m, 8H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 7,53 - 7,25 (m, 20H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-CH₃-Ph-Rest v. A oder B); 5,37 u. 5,34 (s, 2H, 4-H v. A und B); 3,92 - 3,82 u. 3,59 - 3,45 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 2,28 u. 2,09 (s, 6H, 2-CH₃-Ph v. A und B); 1,84 u. 1,82 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 0,97 - 0,92 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(46) **Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2,6-dimethyl-N-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

46

Summenformel

C₃₅H₃₅N₃O₄

Molekulargewicht

561,68 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (1,78 mmol; 442 mg), 3-Toluidin (1,78 mmol; 191 mg) und Ethylacetoacetat (3,56 mmol; 463 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 15 h bei 80 C°). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Ethanol Verbindung **46** auskristallisiert.

Ausbeute 16,56 %; beiges Pulver

R_f-Wert 0,50 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 169,3 – 170,5 °C

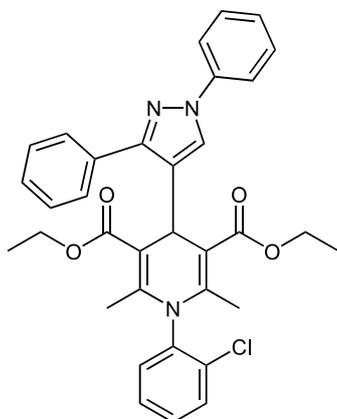
Reinheit 100,00 % (Retentionszeit: 13,20 min)

Elementaranalyse Ber.: C 74,84; H 6,28; N 7,48 %
Gef.: C 74,18; H 6,34; N 7,40 %

Massenspektrum m/z (%) = 1145,06 (19, [2M + Na]⁺); 584,68 (15, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 562,97 (100, [M + H]⁺); 516,91 (5, [M - OC₂H₅]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 8,16 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 7,88 – 7,81 (m, 4H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol und 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,52 – 7,46 (m, 4H, 3-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol und 3-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,43 – 7,38 (m, 2H, 4-H v. 1-Ph-Pyrazol und 4-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,32 – 7,27 (m, 2H, 4-H, 5-H v. 3-CH₃-Ph); 7,17 – 7,14 (m, 1H, 6-H v. 3-CH₃-Ph); 7,12 – 7,11 (m, 1H, 2-H v. 3-CH₃-Ph); 5,32 (s, 1H, 4-H); 3,92 – 3,84 u. 3,63 – 3,55 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 2,35 (s, 3H, 3-CH₃-Ph); 1,92 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 0,98 – 0,95 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

(47) **Diethyl 4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2,6-dimethyl-N-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

47

Summenformel

C₃₄H₃₂ClN₃O₄

Molekulargewicht

582,10 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (8 mmol; 1986 mg), 2-Chloranilin (8 mmol; 1021 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol und 0,1 ml Eisessig zum Rückfluss erhitzt (ca. 6 h bei 80 °C). Die weitere Aufreinigung erfolgte wie bei AAV 1 mit anschließender Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen wurde nach Einengen unter Zusatz von Methanol Verbindung **47** auskristallisiert.

Ausbeute 19,68 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,44 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 163,3 – 166,5 °C

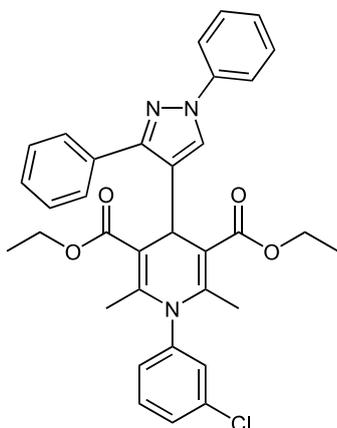
Reinheit 100 % (Retentionszeit: 15,24 min; Flussrate: 0,5 ml/min)

Elementaranalyse Ber.: C 70,16; H 5,54; N 7,22 %
Gef.: C 69,66; H 5,70; N 6,88 %

Massenspektrum m/z (%) = 1184,83 (1, [2M + Na]⁺); 604,51 (2, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 583,09 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,22 u. 7,82 (s, 2H, 5-H v. Pyrazol v. A und B); 8,04 - 8,02 (m, 2H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,89 - 7,86 (m, 2H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,77 - 7,65 (m, 7H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,59 - 7,34 (m, 14H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,28 - 7,21 (m, 2H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 7,05 - 7,03 (m, 1H, 1-Ph-,3-Ph-Pyrazol-Rest o. 2-Cl-Ph-Rest v. A oder B); 5,49 u. 5,45 (s, 2H, 4-H v. A und B); 4,07 - 3,94 u. 3,76 - 3,57 (m, 8H, COOCH₂CH₃ v. A und B); 1,98 u. 1,96 (s, 12H, CH₃-C-2 u. -C-6 v. A und B); 1,11 - 1,07 u. 1,04 - 1,00 ppm (m, 12H, COOCH₂CH₃ v. A und B)

(48) **Diethyl *N*-(3-chlorophenyl)-4-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarboxylat**



Verbindung Nr.

48

Summenformel

C₃₄H₃₂ClN₃O₄

Molekulargewicht

582,10 g/mol

Darstellung 1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyd (8 mmol; 1986 mg), 3-Chloranilin (8 mmol; 1021 mg) und Ethylacetoacetat (16 mmol; 2082 mg) wurden nach AAV 2 unter Zusatz von 5 ml trockenem Ethanol zum Rückfluss erhitzt (ca. 13 h bei 80 °C). Die Aufarbeitung bei Reaktionsende erfolgte säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Cyclohexan/Ethylacetat 75:25 (v/v). Aus den vereinten Fraktionen fiel nach Einengen Verbindung **48** aus.

Ausbeute 14,28 %; gelbes Pulver

R_f-Wert 0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat: 70/30)

Schmelzbereich 226,9 – 228,4 °C

Reinheit 96,99 % (Retentionszeit: 13,26 min)

Elementaranalyse Ber.: C 70,16; H 5,54; N 7,22 %
Gef.: C 69,48; H 5,55; N 7,14 %

Massenspektrum m/z (%) = 1184,92 (16, [2M + Na]⁺); 604,99 (27, [M + Na]⁺);
(ESI-Positiv, MeOH) 582,99 (100, [M + H]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,86 - 7,84 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,80 (s, 1H, 5-H v. Pyrazol); 7,72 - 7,70 (m, 2H, 2-H, 6-H v. 1-Ph-Pyrazol oder 2-H, 6-H v. 3-Ph-Pyrazol); 7,47 - 7,36 (m, 7H, 3-H, 4-H, 5-H v. 1-Ph-Pyrazol, 3-H, 4-H, 5-H v. 3-Ph-Pyrazol und 4-H, 5-H oder 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,28 - 7,24 (m, 1H, 4-H, 5-H oder 6-H v. 3-Cl-Ph); 7,11 ("t", ⁴J = 1,7 Hz, 1H, 2-H v. 3-Cl-Ph); 7,02 (d"t", ³J = 7,1 Hz, ⁴J = 1,9 Hz, 1H, 4-H, 5-H oder 6-H v. 3-Cl-Ph); 5,44 (s, 1H, 4-H); 4,06 - 3,98 u. 3,79 - 3,71 (m, 4H, COOCH₂CH₃); 1,98 (s, 6H, CH₃-C-2 u. -C-6); 1,12 - 1,08 ppm (m, 6H, COOCH₂CH₃)

6.2. Bioanalytische Methoden

6.2.1. Statistische Herangehensweise an die Auswertung der Messwerte

Zur Auswertung und vergleichenden Darstellung der Messwerte wurden mehrere statistische Parameter herangezogen und in den jeweiligen Abschnitten verwendet. Diese sollen hier in Kürze mit deren zu Grunde liegender mathematischer Funktion vorgestellt werden.

Der Mittelwert ist ein Lageparameter und beschreibt den Durchschnittswert einer Anzahl von n Messungen. Zur Präsentation der Daten wurde das arithmetische Mittel (\bar{x}) verwendet und mit folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n = Anzahl durchgeführter Messungen
 x_i = Einzelner Messwert.

Die Standardabweichung (SD) charakterisiert die durchschnittliche Abweichung aller gemessenen Einzelwerte in einer Stichprobe in Bezug auf deren arithmetisches Mittel und hat dieselbe Einheit wie der Messwert. Sie wird mit folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n = Anzahl durchgeführter Messungen
 x_i = Einzelner Messwert
 \bar{x} = arithmetisches Mittel

Aus der Standardabweichung (SD) lässt sich der Standardfehler (SEM) ermitteln. Er macht eine Aussage darüber, inwieweit der Mittelwert der Stichprobe von dem wahren Mittelwert der Grundgesamtheit entfernt ist. Durch Division der Standardabweichung mit der Wurzel des Stichprobenumfangs wird ein Parameter erzeugt, der von der Anzahl der Messungen unabhängig ist. Er wird demnach mit folgender Formel berechnet:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD = Standardabweichung
 n = Anzahl durchgeführter Messungen

6.2.2. Fluoreszenz-Aktivitäts-Essay zur Ermittlung inhibitorischer Eigenschaften an P-GP

6.2.2.a. Methodenbeschreibung

Die Messungen der inhibitorischen Eigenschaften ausgewählter Verbindungen vom 2,6-unsubstituierten Typ wurden am Institut für Pharmazie der Martin-Luther Universität Halle (Saale) von Marc Hemmer durchgeführt. Die 2,6-dimethylsubstituierten Dihydropyridine wurden extern *am Institut of Medical Microbiology, Universität Szeged*, unter Leitung von Ana Martins getestet. Die Methode und die Interpretation der resultierenden Ergebnisse soll hier in Kürze vorgestellt werden.

Für die Messung der P-GP Inhibition wurden die Maus-T-Lymphom Parentalzelllinie L5178Y und die Sub-Linie L5178Y-mdr verwendet, welche aus einer retroviralen Gen-Transfektion mit humanem P-GP resultierte und P-GP vermehrt exprimiert. Sie wurden bei 37 °C in einer Kohlenstoffdioxid-haltigen Atmosphäre (5 %) in McCoy's 5A Medium (10 % fetales Kalbserum, 2 mM L-Glutamin, 5 ml Gentamicin-Lösung (5 mg/ml)) kultiviert. Für die Kultivierung der Sub-Linie wurde das Zytostatikum Colchicin (60 ng/ml) eingesetzt, um eine Selektion der P-GP exprimierenden Zellen zu gewährleisten. Zellen beider Linien wurden in einer eingestellten Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in serumfreien McCoy's 5A Medium erneut aufgenommen. Proben beider Zelllinien von jeweils 0,5 ml wurden in zentrifugierbare Eppendorf-Gefäße abgefüllt und mit 5 µl der zu testenden Verbindung (1 µM in DMSO) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Fluoreszenzfarbstoff und ebenso P-GP Substrat Rhodamin 123 (5 µl einer 0,5 mM Lösung in Wasser) hinzugefügt. Nach weiteren 40 Minuten bei 37 °C wurden die Proben zentrifugiert, zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in PBS für die weitere Messung aufgenommen. Dabei wurden die Referenzproben ohne die zu testende Verbindung in selber Weise behandelt wie die soeben beschriebenen. Zur Bestimmung der P-GP inhibitorischen Eigenschaften wurde die verbleibende Fluoreszenz des Rhodamins 123 in der Zelle mittels Durchflusszytometrie bei 1×10^4 Zellen bestimmt (*Becton Dickinson FACScan flow cytometer*). Das *fluorescence-activity-ratio* (FAR) wurde dabei durch folgende Formel ermittelt.

$$FAR = \frac{F_{Zelle-mdr-EPI} / F_{Zelle-mdr}}{F_{Zelle-EPI} / F_{Zelle}} \quad \left| \quad F = \text{Fluoreszenz der im Index beschriebenen Zelle} \right.$$

Das resultierende Aktivitätsverhältnis gibt an, um welchen Faktor sich die Akkumulation von Rhodamin 123 in der inhibierten, P-GP-exprimierenden Zelle von der nicht-inhibierten P-GP-exprimierenden Zelle unterscheidet (Term über dem Bruchstrich) und ist ein Maß für die Hemmwirkung der verwendeten Testsubstanz. Dabei wird der Korrekturfaktor, der aus der Messung der Parentalzelllinie L5178Y mit und ohne Inhibitor resultiert, berücksichtigt (Term unter dem Bruchstrich). Demnach wird ein FAR-Wert größer als 1,0 als inhibitorische Wirkung der Testsubstanz auf P-GP interpretiert. Als Referenz wurde Verapamil als P-GP-Hemmstoff in selber Weise eingesetzt.

6.2.2.b. Tabellarische Übersicht der getesteten Verbindungen und deren Messwerte

Aus beiden Reihen der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Dihydropyridine wurden ausgewählte oder bis dato verfügbare Verbindungen auf ihre inhibitorischen Eigenschaften an P-GP nach zuvor beschriebenen Verfahren getestet. Dabei sind die in den zwei nachfolgenden Tabellen gelisteten Messwerte erhalten worden. Für die 2,6-unsubstituierten Verbindungen ist jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (SD) angegeben, für die 2,6-dimethylsubstituierten liegen lediglich die arithmetischen Mittel vor. Damit ein Vergleich beider Reihen möglich ist, wird der erzielte inhibitorische Effekt der einzelnen Verbindungen in Relation zum Effekt des verwendeten Standards Verapamil gesetzt ($Eff_{Verb,}$). Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel.

$$Eff_{Verb,} = \frac{FAR_{Verbindung}}{FAR_{Verapamil}} \quad \left| \quad FAR = \text{fluorescence-activity-ratio} \right.$$

Bezogen auf Verapamil liegt bei einem Wert über 1,0 demnach eine höhere Aktivität vor als beim Standard. Bei gleichen oder niedrigeren Werten ist kein Mehrwert im Vergleich mit dem Standard erzielt worden.

Tabelle 34: FAR- und Effektivwerte 2,6-unsubstituierter Derivate (n = 3)		
<i>Verbindung</i> [1 µM]	<i>FAR-Wert</i> ($\bar{x} \pm SD$)	<i>Eff_{Verb,}</i>
Verapamil	1,5 ± 0,2	1
1	4,3 ± 0,7	2,9
2	3,9 ± 0,6	2,6
5	1,11 ± 0,08	0,7
6	3,4 ± 0,4	2,3
9	5,8 ± 0,9	3,9
10	1,19 ± 0,09	0,8
13	7,3 ± 1,5	4,9
14	5,2 ± 0,7	3,5
17	3,5 ± 0,4	2,3
18	3,5 ± 0,5	2,3
-	-	-

Tabelle 35: FAR- und Effektivwerte 2,6-dimethylsubstituierter Derivate (n = 3)		
<i>Verbindung</i> [1 µM]	<i>FAR-Wert</i> (\bar{x})	<i>Eff_{Verb,}</i>
Verapamil	4,01	1
26	1,45	0,36
27	1,57	0,39
28	2,59	0,65
29	3,61	0,9
30	2,21	0,55
31	1,53	0,38
32	1,48	0,37
34	1,57	0,39
41	4,05	1,01
45	13,21	3,29
46	20,24	5,05

6.2.3. Messung der antituberkulotischen Aktivität und Inhibitions-Essay

6.2.3.a. Methodenbeschreibung

Die Versuche zur antituberkulotischen Aktivität am GFP-exprimierendem Stamm H37Rv wurden extern am Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von PD Dr. Norbert Reiling durchgeführt. Eine Beschreibung des Versuchsablaufes soll hier kurz abgehandelt werden.

Messung hemmender Eigenschaften auf das Wachstums GFP-exprimierender H37Rv Stämme

Green-fluorescent-protein (GFP) exprimierende *M. tuberculosis* H37Rv Bakterien wurden mittels Plasmid 32362:pMN437 (Addgene), freundlicherweise bereitgestellt von M. Niederweis^[176], hergestellt^[177]. Die Kultivierung von ca. 2×10^6 Bakterien erfolgte in 7H9 Medium unter Zusatz von 10 % OADC (Ölsäure, Rinderalbumin, Dextrose, Katalase), 0,05 % Tween 80 und 0,2 % Glycerol in einem Volumen von 100 μ l in mit einer luftdurchlässigen Membran (Porvair Sciences) verschlossenen *clear-bottom black 96-well plate* (Corning Inc.). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der relativen Licht Einheit (RLU: *relative-light-unit*) bei 528 nm unter Anregung bei 485 nm nach 7 Tagen in einer Dreifachbestimmung gemessen (Synergy 2, Biotek)^[177]. Für die Bestimmung des Effektes der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Verbindungen wurde in gleicher Weise verfahren. Dazu wurde zu Beginn der Kultivierung der Erreger mit der zu prüfenden Substanz inkubiert und das Wachstum ebenso nach 7 Tagen bestimmt. Als Referenzen wurden je nach Versuchsreihe Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Zur Untersuchung der Effluxpumpen modulierenden Eigenschaften wurde der präparierte Stamm zu Beginn der Inkubationszeit mit den zu testenden Verbindungen und einem der drei Referenzsubstanzen versetzt und das Wachstum nach 7 Tagen in derselben Weise gemessen.

Berechnung der Wachstums- und Hemmwerte mittels Standardisierung auf die Kontroll-Kultur

Die Proben wurden auf unterschiedlichen Platten mit je einer Kontroll-Kultur ausgebracht, deren gemessene Absorption einem Wachstum von 100 % gleichzusetzen ist. Die synthetisierten Verbindungen, deren Absorptionen 100 % der Kontrolle oder mehr aufweisen, haben demnach auf den Erreger keine antimykobakterielle Wirkung. Bei der Beurteilung, ob Effluxpumpen modulierende Effekte im Zusammenhang mit den Referenzsubstanzen auftreten, wurde ein Wert in Prozent geschaffen, der ausdrückt, um wie viel potenter die Kombination aus synthetisierter Verbindung (Nr) und Referenzwirkstoff (Referenz) gegenüber dem Referenzwirkstoff alleine ist. Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel.

$$\text{Effektsteigerung [\%]} = 100 - \frac{\text{Wachstum}_{\text{Keim+Nr+Referenz}} \times 100}{\text{Wachstum}_{\text{Keim+Referenz}}}$$

Positive Werte können einen Effluxpumpen modulierenden Effekt haben, Werte kleiner-gleich Null sind dahingehend als nicht aktiv zu interpretieren.

6.2.3.b. Übersicht Messwerte der 2,6-unsubstituierten Verbindungen

Die antimykobakterielle Wirkung der synthetisierten Verbindungen wurde auf den Erreger untersucht, die Richtkonzentration lag bei 1 µg/ml. Als Referenz wurde bei jeder der drei Reihen Rifampicin in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Aus den ermittelten Wachstumswerten aus drei technischen Replikaten wurde zusätzlich die resultierende Hemmung berechnet, welche sich aus der Differenz zwischen maximalem Wachstum des Keimes (100) und dem Wachstum nach Inkubation mit den Verbindungen ergibt.

Tabelle 36: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 1 (n = 3)		
Verb.-Nr (1 µg/ml)	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Hemmung Keim + Nr (100 - Wachstum) [%]
3	66,42 ± 0,77	33,58 ± 0,77
4	90,93 ± 2,65	9,07 ± 2,65
7	60 ± 5	40 ± 5
8	63,29 ± 0,44	36,71 ± 0,44
12	75,84 ± 5,57	24,16 ± 5,57
21	80,04 ± 11,57	19,96 ± 11,57
22	92,63 ± 13,28	7,37 ± 13,28
Rifampicin	3,42 ± 0,66	96,58 ± 0,66

Tabelle 37: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 2 (n = 3)		
Verb.-Nr (1 µg/ml)	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Hemmung Keim + Nr (100 - Wachstum) [%]
11	97,57 ± 6,96	2,43 ± 6,96
15	99,64 ± 8,49	≤ 0
16	91,33 ± 7,71	8,67 ± 7,71
19	≥ 100	≤ 0
20	87,64 ± 15,69	12,36 ± 15,69
23	85,59 ± 10,92	14,41 ± 10,92
24	99,53 ± 4,18	≤ 0
Rifampicin	2,74 ± 0,37	97,26 ± 0,37

Tabelle 38: Antimykobakterielle Effekte 2,6-unsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) und der Referenzverbindung Rifampicin (RIFA) - Messreihe 3 (n = 3)		
Verb.-Nr (1 µg/ml)	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Hemmung Keim + Nr (100 - Wachstum) [%]
1	43,5 ± 21,9	56,5 ± 21,9
2	40,25 ± 1,59	59,75 ± 1,59
5	39,49 ± 4,82	60,51 ± 4,82
6	59,48 ± 7,17	40,52 ± 7,17
9	75,09 ± 3,79	24,91 ± 3,79
10	65,06 ± 9,84	34,94 ± 9,84
13	70,45 ± 10,16	29,55 ± 10,16
14	40,74 ± 7,32	59,26 ± 7,32
17	79,78 ± 6,92	20,22 ± 6,92
18	95,05 ± 21,08	4,95 ± 21,08
Rifampicin	1,86 ± 0,53	98,14 ± 0,53

Wegen der nur geringen Effekte auf das Bakterium und der deutlichen Effekte auf P-GP wurde Verbindung **13** für eine weitere Testung ausgewählt. Hierbei sollte der mögliche Einfluss der Substanz auf die Effluxpumpen Aktivität in Kombination mit subtherapeutischen Konzentrationen der Wirkstoffen Ciprofloxacin, Clofazimin und Isoniazid geprüft werden. Die Konzentration der Verbindung **13** wurde mit 0,3 µg/ml so gewählt, dass ein eigener antimykobakterieller Effekt vernachlässigbar gering bleibt.

Tabelle 39: Effluxpumpen Essay der Verbindung 13 (n = 3)			
Verb.-Nr (Konzentration)	Wachstum Keim + Verb.-Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Hemmung Keim + Verb.-Nr (100 - Wachstum) [%]	Steigerung durch Nr um [%]
13 (5 µg/ml)	53,9 ± 12,4	46,1 ± 12,4	-
13 (1,5 µg/ml)	62,6 ± 30,2	37,4 ± 30,2	-
13 (1 µg/ml)	70,45 ± 10,16	29,55 ± 10,16	-
13 (0,5 µg/ml)	91,24 ± 19,40	8,76 ± 19,40	-
Ciprofloxacin (0,4 µg/ml)	81,49 ± 16,53	18,51 ± 16,53	-
Ciprofloxacin (0,4 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	54,32 ± 5,36	45,68 ± 5,36	33
Clofazimin (0,3 µg/ml)	61,12 ± 7,25	38,88 ± 7,25	-
Clofazimin (0,3 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	40 ± 3,03	60 ± 3,03	35
Isoniazid (0,08 µg/ml)	50,24 ± 9,01	49,76 ± 9,01	-
Isoniazid (0,08 µg/ml) + 13 (0,3 µg/ml)	30,2 ± 5,2	69,8 ± 5,2	40

6.2.3.c. Übersicht Messwerte der 2,6-dimethylsubstituierten Verbindungen

Die Wirkung der synthetisierten Verbindungen wurde alleine (Tabelle 43, S. 161) auf ihre antimykobakterielle Aktivität und in Kombination mit Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol getestet. Mit der Annahme, dass Effluxpumpen modulierende Eigenschaften am stärksten zusammen mit niedrigen Konzentrationen der Referenzsubstanzen zum Tragen kommen, wurden mehrere Versuchsreihen gestartet. Dabei wurde bei Isoniazid im Bereich der halben und einem Viertel MHK gearbeitet, für Rifampicin und Ethambutol bei einem Viertel der MHK. Die synthetisierten Testsubstanzen wurden in einer Richtkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Einstellung der MHK's erfolgte aus Stammlösungen von 0,01 µg/ml (Rifampicin), 0,08 µg/ml (Isoniazid) und 3 µg/ml (Ethambutol). Folgende Daten konnten aus den Messungen mit drei technischen Replikaten erhoben werden.

Rifampicin - Ziel: modulierende Effekte bei ¼ MHK

Tabelle 40: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Rifampicin (RIFA) (n = 3)					
Verb.-Nr (10 µg/ml)	Reihe	Wachstum Keim + RIFA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + RIFA + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Steigerung RIFA durch Nr um [%]
25	MHK _{25%}	83,06 ± 7,91	≥ 100	90,9 ± 4,8	≤ 0
26	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	84,09 ± 7,17	≤ 0
27	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	≥ 100	76,95 ± 7,56	≤ 0
28	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	73,25 ± 7,15	57,04 ± 4,62	23
29	MHK _{25%}	74,14 ± 2,04	≥ 100	76,76 ± 7,56	≤ 0
30	MHK _{25%}	83,06 ± 7,91	83,3 ± 10,8	60,48 ± 3,46	27
31	MHK _{25%}	77,49 ± 2,51	99,57 ± 1,59	72,11 ± 11,23	7
32	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	96 ± 6	≤ 0
34	MHK _{25%}	83,47 ± 6,42	≥ 100	56 ± 11	33
41	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	67,86 ± 9,57	69,03 ± 11,02	15
45	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	≥ 100	62,07 ± 3,98	23
46	MHK _{25%}	77,49 ± 2,51	85,15 ± 6,56	88,19 ± 27,24	≤ 0
47	MHK _{25%}	81,04 ± 7,84	≥ 100	100,35 ± 16,39	≤ 0

Isoniazid - Ziel: modulierende Effekte bei ¼ und ½ MHK

Tabelle 41: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Isoniazid (INH) (n = 3)					
Verb.-Nr (10 µg/ml)	Reihe	Wachstum Keim + INH ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + INH + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Steigerung INH durch Nr um [%]
25	MHK _{25%}	71,01 ± 0,84	99,34 ± 16,17	17,8 ± 2,5	75
	MHK _{50%}	41,35 ± 1,51	≥ 100	37,61 ± 0,98	9
26	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	26,25 ± 2,00	65
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	35,32 ± 5,78	34
27	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	74,74 ± 1,22	20,1 ± 1,8	73
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	83,56 ± 2,72	24,24 ± 3,50	54
28	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	19,79 ± 1,12	73
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	27,56 ± 3,53	48
29	MHK _{25%}	74,24 ± 1,92	≥ 100	11,57 ± 1,34	84
	MHK _{50%}	53,16 ± 7,43	≥ 100	13,39 ± 1,76	75
30	MHK _{25%}	71,01 ± 0,84	77,16 ± 2,91	25,1 ± 1,2	65
	MHK _{50%}	41,35 ± 1,51	83,3 ± 10,8	39,48 ± 1,02	5
31	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	35 ± 2	52
	MHK _{50%}	33,81 ± 0,52	99,57 ± 1,59	33,38 ± 0,46	1
32	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	11,4 ± 1,1	84
	MHK _{50%}	42,1 ± 0,5	≥ 100	42,14 ± 1,73	0
34	MHK _{25%}	72,29 ± 0,66	≥ 100	15,01 ± 0,31	79
	MHK _{50%}	42,1 ± 0,5	≥ 100	40,8 ± 1,5	3
41	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	17,4 ± 1,1	75
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	67,86 ± 9,57	42,75 ± 5,95	2
45	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	31,34 ± 3,26	56
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	≥ 100	36,88 ± 0,39	15
46	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	94,94 ± 4,51	26,14 ± 2,33	63
	MHK _{50%}	33,81 ± 0,52	85,15 ± 6,56	31,01 ± 0,77	8
47	MHK _{25%}	70,99 ± 2,98	≥ 100	23,9 ± 2,8	66
	MHK _{50%}	43,6 ± 0,7	≥ 100	32 ± 1	27

Ethambutol - Ziel: modulierende Effekte bei ¼ MHK

Tabelle 42: Eigene und Effluxpumpen-modulierende Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) mit Ethambutol (EMB) (n = 3)					
Verb.-Nr (10 µg/ml)	Reihe	Wachstum Keim + EMB ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Wachstum Keim + EMB + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Steigerung EMB durch Nr um [%]
25	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	≥ 100	78,07 ± 11,35	17
26	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	55,07 ± 1,99	24
27	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	85,37 ± 2,23	90,72 ± 2,81	≤ 0
28	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	78,24 ± 9,89	95,85 ± 3,50	≤ 0
29	MHK _{25%}	88,91 ± 1,02	86,99 ± 4,83	80,8 ± 1,8	9
30	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	80,3 ± 5,6	80,58 ± 8,96	15
32	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	55,34 ± 2,01	24
34	MHK _{25%}	72,8 ± 11,17	≥ 100	47,65 ± 8,34	35
41	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	77,71 ± 1,18	85,2 ± 0,92	10
45	MHK _{25%}	94,51 ± 2,36	82,71 ± 5,65	70,34 ± 5,08	26

Tabelle 43: Gemittelte antimykobakterielle Effekte 2,6-dimethylsubstituierter Verbindungen (Verb.-Nr) aus den einzelnen Reihen		
Verb.-Nr (10 µg/ml)	Wachstum Keim + Nr ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) [%]	Hemmung Keim + Nr (100 - Wachstum) [%]
25 ^[b]	≥ 100	≤ 0
26 ^[b]	≥ 100	≤ 0
27 ^[c]	90,93 ± 3,35	9,07 ± 3,35
28 ^[c]	≥ 100	≤ 0
29 ^[c]	≥ 100	≤ 0
30 ^[b]	80,25 ± 6,44	19,75 ± 6,44
31 ^[a]	≥ 100	≤ 0
32 ^[a]	≥ 100	≤ 0
34 ^[a]	≥ 100	≤ 0
41 ^[b]	83,86 ± 4,47	16,14 ± 4,47
45 ^[b]	97,31 ± 8,51	2,69 ± 8,51
46 ^[a]	90,05 ± 5,54	9,95 ± 5,54
47 ^[a]	≥ 100	≤ 0
^[a] n = 6; ^[b] n = 9; ^[c] n = 12		

7. Literatur

1. Robert Koch-Institut RKI - Robert Koch.
http://www.rki.de/DE/Content/Institut/Geschichte/robert_koch_node.html. Zugegriffen: 16. August 2017
2. Janin YL (2007) Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg Med Chem* 15(7):2479–2513.
doi:10.1016/j.bmc.2007.01.030
3. World Health Organization (2017) The top 10 causes of death.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Zugegriffen: 15. August 2017
4. World Health Organization (Hrsg) (op. 2016) Global tuberculosis report 2016. World Health Organization, Geneva
5. Robert Koch-Institut (2015) Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2015.
doi:10.17886/rkipubl-2016-011
6. Otto-Knapp R, Schenkel K, Bauer T (2016) Standardtherapie der Tuberkulose. *Internist (Berl)* 57(2):117–125.
doi:10.1007/s00108-016-0031-0
7. Schaberg T (2015) Therapie der Tuberkulose. Was ist gesichert? *Internist (Berl)* 56(12):1379–1388.
doi:10.1007/s00108-015-3759-z
8. Mütterlein R (2012) Resistenzen importiert aus Russland. *Pharmazie in unserer Zeit* 41(1):73–75.
doi:10.1002/pauz.201100455
9. Koch R. (1882) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Medizinische Wochenschrift* 19(15):428–445
10. World Health Organization (2017) What is leprosy? <http://www.who.int/lep/disease/en/>. Zugegriffen: 18. August 2017
11. World Health Organization What is Buruli ulcer? <http://www.who.int/buruli/disease/en/>. Zugegriffen: 18. August 2017
12. Haas W, Brodhun B, Starker A (Hrsg) (2006) Tuberkulose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Bd 35. Robert-Koch-Inst, Berlin
13. Robert Koch-Institut (2013) Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. *Epidemiologisches Bulletin* (2):9–22
14. RKI - Consultant Laboratory for Diagnostic Electron Microscopy of Infectious Pathogens - Mycobacterium tuberculosis.
https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Mycobacterium_tuberculosis_en.html. Zugegriffen: 13. September 2017
15. Hof H, Dörries R, Geginat G (Hrsg) (2014) *Medizinische Mikrobiologie. [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene]*, 5. Aufl. Duale Reihe. Georg Thieme Verlag KG, s.l.
16. Chan VL, Sherman PM, Bourke B (Hrsg) (2006) *Bacterial genomes and infectious diseases*. Humana Press, Totowa, NJ
17. Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie (2014) *Mikroorganismen-Dossiers. Mycobacterium tuberculosis*
18. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS (2006) The resumption of consumption. A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(7):697–714.
doi:10.1590/S0074-02762006000700001
19. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB (2017) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*, 12. Aufl
20. Brennan PJ (1995) The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* 64(1):29–63.
doi:10.1146/annurev.biochem.64.1.29

21. Barry CE, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y (1998) Mycolic acids. Structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research* 37(2-3):143–179.
doi:10.1016/S0163-7827(98)00008-3
22. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans. From biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53(2):391–403.
doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04183.x
23. Bavishi A, Lin L, Choudhary M, Primm TP (2014) Evolution of PE35 and PPE68 Gene Families in Mycobacterium. Roles of Horizontal Gene Transfer and Evolutionary Constraints. *JTR* 02(04):181–198.
doi:10.4236/jtr.2014.24023
24. Robert Koch-Institut (2017) Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. *Epidemiologisches Bulletin* (20):177–186
25. DYLAN T Tuberkulose (TB) - Infektionskrankheiten - MSD Manual Profi-Ausgabe.
<http://www.msmanuals.com/de-de/profi/infektionskrankheiten/mykobakterien/tuberkulose-tb>.
Zugegriffen: 25. August 2017
26. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L (2014) Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* 159(7):1497–1509.
doi:10.1016/j.cell.2014.11.024
27. Grosset J (2003) Mycobacterium tuberculosis in the Extracellular Compartment. An Underestimated Adversary. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3):833–836.
doi:10.1128/AAC.47.3.833-836.2003
28. Podinovskaia M, Lee W, Caldwell S, Russell DG (2013) Infection of macrophages with Mycobacterium tuberculosis induces global modifications to phagosomal function. *Cell Microbiol* 15(6):843–859.
doi:10.1111/cmi.12092
29. Meena LS, Rajni (2010) Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS J* 277(11):2416–2427.
doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07666.x
30. Hestvik ALK, Hmama Z, Av-Gay Y (2005) Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* 29(5):1041–1050.
doi:10.1016/j.femsre.2005.04.013
31. Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, Diel R, Feiterna-Sperling C, Haas W, Hartmann P, Hauer B, Heyckendorf J, Lange C, Nienhaus A, Otto-Knapp R, Priwitzer M, Richter E, Rumetshofer R, Schenkel K, Schoch OD, Schönfeld N, Stahlmann R (2017) S2k-Leitlinie. Tuberkulose im Erwachsenenalter. *Pneumologie* 71(6):325–397.
doi:10.1055/s-0043-105954
32. Abbildungen zu Tuberkulose. <https://www.vfa.de/de/nachrichten/pm20140320>. Zugegriffen: 31. August 2017
33. BERNSTEIN J, LOTT WA, STEINBERG BA, YALE HL (1952) Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am Rev Tuberc* 65(4):357–364
34. Lambert PA (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 92(s1):46S–54S.
doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.7.x
35. Lu H, Tonge PJ (2008) Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Acc Chem Res* 41(1):11–20.
doi:10.1021/ar700156e
36. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA (2010) Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG. Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci* 19(3):458–474.
doi:10.1002/pro.324

37. Palomino JC, Martin A (2014) Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics (Basel)* 3(3):317–340.
doi:10.3390/antibiotics3030317
38. Martins F, Santos S, Ventura C, Elvas-Leitão R, Santos L, Vitorino S, Reis M, Miranda V, Correia HF, Aires-de-Sousa J, Kovalishyn V, Latino DARS, Ramos J, Viveiros M (2014) Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 81:119–138.
doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.077
39. Nayak N, Ramprasad J, Dalimba U (2015) New INH-pyrazole analogs. Design, synthesis and evaluation of antitubercular and antibacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett* 25(23):5540–5545.
doi:10.1016/j.bmcl.2015.10.057
40. Matei L, Bleotu C, Baciu I, Draghici C, Ionita P, Paun A, Chifiriuc MC, Sbarcea A, Zarafu I (2013) Synthesis and bioevaluation of some new isoniazid derivatives. *Bioorg Med Chem* 21(17):5355–5361.
doi:10.1016/j.bmc.2013.06.013
41. Schonell M, Dorken E, Grzybowski S (1972) Rifampin. *Can Med Assoc J* 106(7):783–786
42. Thieme RÖMPP Ansamycine. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-02622>. Zugegriffen: 14. September 2017
43. Prelog V, Oppolzer W (1973) Ansamycine, eine neuartige Klasse von mikrobiellen Stoffwechselprodukten. *Helv. Chim. Acta* 56(7):2279–2287.
doi:10.1002/hlca.19730560716
44. Habermehl G, Hammann P, Krebs HC (2013) *Naturstoffchemie. Eine Einführung*. Springer Berlin Heidelberg
45. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH Pharmazeutische Zeitung online: ABDA-Datenbank: Wenn Arzneistoffe Transportproteine beeinflussen. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2381>. Zugegriffen: 14. September 2017
46. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, Fujiwara P, Grzemska M, Hopewell PC, Iseman MD, Jasmer RM, Koppaka V, Menzies RI, O'Brien RJ, Reves RR, Reichman LB, Simone PM, Starke JR, Vernon AA (2003) American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(4):603–662.
doi:10.1164/rccm.167.4.603
47. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res* 2(3):164.
doi:10.1186/rr54
48. Takayama K, Kilburn JO (1989) Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33(9):1493–1499
49. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013) *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie*, 10. Aufl. WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
50. Kilburn JO, Greenberg J (1977) Effect of Ethambutol on the Viable Cell Count in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11(3):534–540
51. Sarathy JP, Dartois V, Lee EJD (2012) The role of transport mechanisms in mycobacterium tuberculosis drug resistance and tolerance. *Pharmaceuticals (Basel)* 5(11):1210–1235.
doi:10.3390/ph5111210
52. Falzon D, Schünemann HJ, Harausz E, González-Angulo L, Lienhardt C, Jaramillo E, Weyer K (2017) World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur Respir J* 49(3).
doi:10.1183/13993003.02308-2016
53. Chambers HF, Moreau D, Yajko D, Miick C, Wagner C, Hackbarth C, Kocagöz S, Rosenberg E, Hadley WK, Nikaido H (1995) Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(12):2620–2624

54. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Ärzteblatt RD (2009) Tuberkulose: Altes Antibiotikum hilft bei neuen Resistenzen. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/35600>. Zugegriffen: 15. September 2017
55. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH (2016) Pharmazeutische Zeitung online: Tuberkulose: β-Lactame sind doch wirksam. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=64261>. Zugegriffen: 15. September 2017
56. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A (2012) A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother* 67(4):819–831. *doi:10.1093/jac/dkr566*
57. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P (2001) Mechanisms of streptomycin resistance. Selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10):2877–2884. *doi:10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001*
58. Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Imani Fooladi AA, Feizabadi MM (2017) New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacteria*. *Front Microbiol* 8:681. *doi:10.3389/fmicb.2017.00681*
59. Chen J, Zhang S, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y (2017) Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. *doi:10.1093/jac/dkx316*
60. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH Pharmazeutische Zeitung online: Tuberkulose: Schwindsucht ist nicht verschwunden. Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=36930>. Zugegriffen: 21. September 2017
61. Zainuddin ZF, Dale JW (1990) Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids? *Tubercle* 71(1):43–49
62. Ummels R, Abdallah AM, Kuiper V, Aâjoud A, Sparrius M, Naeem R, Spaink HP, van Soolingen D, Pain A, Bitter W (2014) Identification of a novel conjugative plasmid in *mycobacteria* that requires both type IV and type VII secretion. *MBio* 5(5):e01744-14. *doi:10.1128/mBio.01744-14*
63. da Silva PEA, Groll A von, Martin A, Palomino JC (2011) Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63(1):1–9. *doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x*
64. Coelho T, Machado D, Couto I, Maschmann R, Ramos D, Groll A von, Rossetti ML, Silva PA, Viveiros M (2015) Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Front Microbiol* 6:330. *doi:10.3389/fmicb.2015.00330*
65. Louw GE, Warren RM, van Gey Pittius NC, McEvoy CRE, van Helden PD, Victor TC (2009) A balancing act. Efflux/influx in *mycobacterial* drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8):3181–3189. *doi:10.1128/AAC.01577-08*
66. Garima K, Pathak R, Tandon R, Rathor N, Sinha R, Bose M, Varma-Basil M (2015) Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. *Tuberculosis (Edinb)* 95(2):155–161. *doi:10.1016/j.tube.2015.01.005*
67. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(7):3974–3977
68. Nikaido H (1994) Prevention of drug access to bacterial targets. Permeability barriers and active efflux. *Science* 264(5157):382–388. *doi:10.1126/science.8153625*

69. Gupta S, Tyagi S, Almeida DV, Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR (2013) Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 188(5):600–607.
doi:10.1164/rccm.201304-0650OC
70. Pasca MR, Guglielame P, Rossi E de, Zara F, Riccardi G (2005) mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(11):4775–4777.
doi:10.1128/AAC.49.11.4775-4777.2005
71. Viveiros M (2003) Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22(3):274–278.
doi:10.1016/S0924-8579(03)00208-5
72. Narang A, Giri A, Gupta S, Garima K, Bose M, Varma-Basil M (2017) Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol* 6(2):177–183.
doi:10.4103/ijmy.ijmy_26_17
73. Spengler G, Kincses A, Gajdács M, Amaral L (2017) New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* 22(3).
doi:10.3390/molecules22030468
74. Lubelski J, Konings WN, Driessen AJM (2007) Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3):463–476.
doi:10.1128/MMBR.00001-07
75. TCDB » HOME. <http://www.tcdb.org/>. Zugegriffen: 25. September 2017
76. Jagodinsky JC, Akgun U (2015) Characterizing the binding interactions between P-glycoprotein and eight known cardiovascular transport substrates. *Pharmacol Res Perspect* 3(2):e00114.
doi:10.1002/prp2.114
77. Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7:14.
doi:10.12703/P7-14
78. Sharom FJ (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9(1):105–127.
doi:10.2217/14622416.9.1.105
79. Braibant M, Gilot P, Content J (2000) The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 24(4):449–467
80. Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67–113.
doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435
81. ABC-Transportsysteme - Chemgapedia.
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/abc_transporter.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/atp_bp.vscml.html. Zugegriffen: 02. Oktober 2017
82. Davidson AL, Chen J (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 73:241–268.
doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073626
83. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685):537–544.
doi:10.1038/31159
84. Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Schnappinger D, Ehrt S, Liu Y, Heifets L, Pieters J, Schoolnik G, Thompson CJ (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34):12200–12205.
doi:10.1073/pnas.0505446102

85. Kumar N, Radhakrishnan A, Wright CC, Chou T-H, Lei H-T, Bolla JR, Tringides ML, Rajashankar KR, Su C-C, Purdy GE, Yu EW (2014) Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci* 23(4):423–432.
doi:10.1002/pro.2424
86. Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M (2008) Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7):2503–2511.
doi:10.1128/AAC.00298-08
87. Wang K, Pei H, Huang B, Zhu X, Zhang J, Zhou B, Zhu L, Zhang Y, Zhou F-F (2013) The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Curr Microbiol* 66(3):222–226.
doi:10.1007/s00284-012-0215-3
88. Balganes M, Kuruppath S, Marcel N, Sharma S, Nair A, Sharma U (2010) Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(12):5167–5172.
doi:10.1128/AAC.00610-10
89. Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P (2002) Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drxA* and *drxB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 367(Pt 1):279–285.
doi:10.1042/BJ20020615
90. Law CJ, Maloney PC, Wang D-N (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 62:289–305.
doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329
91. Rossi E de, Aínsa JA, Riccardi G (2006) Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance. An unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 30(1):36–52.
doi:10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x
92. Saier MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS (1999) The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1(2):257–279
93. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60(4):575–608
94. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(2):123–132.
doi:10.1038/nrm.2015.25
95. Rossi E de, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PAE, Martín C, Aínsa JA, Gugliera P, Riccardi G (2002) The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* 8(11):714–724
96. Slotboom DJ (2014) Structural and mechanistic insights into prokaryotic energy-coupling factor transporters. *Nat Rev Microbiol* 12(2):79–87.
doi:10.1038/nrmicro3175
97. Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, Hasnain SE (2004) *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection* 32(2):109–111.
doi:10.1007/s15010-004-3097-x
98. Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, Wang H (2008) Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist* 14(1):7–11.
doi:10.1089/mdr.2008.0772
99. Dinesh N, Sharma S, Balganes M (2013) Involvement of efflux pumps in the resistance to peptidoglycan synthesis inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(4):1941–1943.
doi:10.1128/AAC.01957-12

100. Aínsa JA, Blokpoel MCJ, Ota I, Young DB, Smet KAL de, Martín C (1998) Molecular Cloning and Characterization of Tap, a Putative Multidrug Efflux Pump Present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 180(22):5836–5843
101. Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, Romano MI, Martín C, Cataldi A, Aínsa JA (2001) Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3):800–804.
doi:10.1128/AAC.45.3.800-804.2001
102. Farrow MF, Rubin EJ (2008) Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein. *J Bacteriol* 190(5):1783–1791.
doi:10.1128/JB.01046-07
103. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W (2017) Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(8).
doi:10.1128/AAC.00940-17
104. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ (2008) Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta* 1778(9):1814–1838.
doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.015
105. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M (2012) Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 12(4):695–700.
doi:10.1016/j.meegid.2011.08.009
106. Rodrigues L, Villellas C, Bailo R, Viveiros M, Aínsa JA (2013) Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(2):751–757.
doi:10.1128/AAC.01482-12
107. Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M (2012) Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7(4):e34538.
doi:10.1371/journal.pone.0034538
108. Rossi E de, Branzoni M, Cantoni R, Milano A, Riccardi G, Ciferri O (1998) mmr, a *Mycobacterium tuberculosis* Gene Conferring Resistance to Small Cationic Dyes and Inhibitors. *J Bacteriol* 180(22):6068–6071
109. Nikaido H, Takatsuka Y (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* 1794(5):769–781.
doi:10.1016/j.bbapap.2008.10.004
110. Domenech P, Reed MB, Barry CE (2005) Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun* 73(6):3492–3501.
doi:10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005
111. Pérez J, Garcia R, Bach H, Waard JH de, Jacobs WR, Av-Gay Y, Bubis J, Takiff HE (2006) *Mycobacterium tuberculosis* transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. *Biochem Biophys Res Commun* 348(1):6–12.
doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.164
112. Li G, Zhang J, Guo Q, Jiang Y, Wei J, Zhao L-L, Zhao X, Lu J, Wan K (2015) Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One* 10(2):e0119013.
doi:10.1371/journal.pone.0119013
113. Gupta AK, Reddy VP, Lavania M, Chauhan DS, Venkatesan K, Sharma VD, Tyagi AK, Katoch VM (2010) jefA (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian J Med Res* 132:176–188
114. Li X-Z, Zhang L, Nikaido H (2004) Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(7):2415–2423.
doi:10.1128/AAC.48.7.2415-2423.2004

115. Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F, Bellinzoni M, Rossi E de, Riccardi G (2004) Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(8):3175–3178.
doi:10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004
116. Hao P, Shi-Liang Z, Ju L, Ya-Xin D, Biao H, Xu W, Min-Tao H, Shou-Gang K, Ke W (2011) The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in China. *Folia Microbiol (Praha)* 56(6):549–553.
doi:10.1007/s12223-011-0080-7
117. Gupta AK, Chauhan DS, Srivastava K, Das R, Batra S, Mittal M, Goswami P, Singhal N, Sharma VD, Venkatesan K, Hasnain SE, Katoch VM (2006) Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *J Commun Dis* 38(3):246–254
118. Balganes M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV, Sharma U (2012) Efflux pumps of Mycobacterium tuberculosis play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(5):2643–2651.
doi:10.1128/AAC.06003-11
119. Thieme RÖMPP Inhibitoren. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-09-00684>. Zugegriffen: 06. November 2017
120. Thieme RÖMPP Hemmung. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-08-00846>. Zugegriffen: 06. November 2017
121. Pagès J-M, Amaral L (2009) Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them. Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1794(5):826–833.
doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.011
122. Poole K, Lomovskaya O (2006) Can efflux inhibitors really counter resistance? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3(2):145–152
123. Louw GE, Warren RM, van Gey Pittius NC, Leon R, Jimenez A, Hernandez-Pando R, McEvoy CRE, Grobbelaar M, Murray M, van Helden PD, Victor TC (2011) Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis through efflux. *Am J Respir Crit Care Med* 184(2):269–276.
doi:10.1164/rccm.201011-1924OC
124. Rayasam GV, Balganesh TS (2015) Exploring the potential of adjunct therapy in tuberculosis. *Trends Pharmacol Sci* 36(8):506–513.
doi:10.1016/j.tips.2015.05.005
125. Amaral L, Martins M, Viveiros M (2007) Phenothiazines as anti-multi-drug resistant tubercular agents. *Infect Disord Drug Targets* 7(3):257–265
126. Amaral L, Molnar J (2012) Why and How the Old Neuroleptic Thioridazine Cures the XDR-TB Patient. *Pharmaceuticals (Basel)* 5(9):1021–1031.
doi:10.3390/ph5091021
127. Martins M, Schelz Z, Martins A, Molnar J, Hajös G, Riedl Z, Viveiros M, Yalcin I, Aki-Sener E, Amaral L (2007) In vitro and ex vivo activity of thioridazine derivatives against Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29(3):338–340.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.10.013
128. Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L (2003) Clinical Concentrations of Thioridazine Kill Intracellular Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3):917–922.
doi:10.1128/AAC.47.3.917-922.2003
129. Rodrigues L, A. Ainsa J, Amaral L, Viveiros M (2011) Inhibition of Drug Efflux in Mycobacteria with Phenothiazines and Other Putative Efflux Inhibitors. *PRI* 6(2):118–127.
doi:10.2174/157489111796064579

130. Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ (2010) *Medizinische Chemie. Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie*; 191 Tabellen, 2. Aufl. Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart
131. Amaral L, Engi H, Viveiros M, Molnar J (2007) Review. Comparison of multidrug resistant efflux pumps of cancer and bacterial cells with respect to the same inhibitory agents. *In Vivo* 21(2):237–244
132. Machado D, Pires D, Perdigão J, Couto I, Portugal I, Martins M, Amaral L, Anes E, Viveiros M (2016) Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 11(2):e0149326.
doi:10.1371/journal.pone.0149326
133. Adams KN, Szumowski JD, Ramakrishnan L (2014) Verapamil, and its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs. *J Infect Dis* 210(3):456–466.
doi:10.1093/infdis/jiu095
134. Nikaido H, Zgurskaya HI (2001) AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(2):215–218
135. Goldmann S, Stoltefuss J (1991) 1,4-Dihydropyridines. Effects of Chirality and Conformation on the Calcium Antagonist and Calcium Agonist Activities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30(12):1559–1578.
doi:10.1002/anie.199115591
136. Yoshinari T, Iwasawa Y, Miura K, Takahashi I, Fukuroda T, Suzuki K, Okura A (1989) Reversal of multidrug resistance by new dihydropyridines with lower calcium antagonistic activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 24(6).
doi:10.1007/BF00257444
137. Tanabe H, Tasaka S, Ohmori H, Gomi N, Sasaki Y, Machida T, Iino M, Kiue A, Naito S, Kuwano M (1998) Newly synthesized dihydropyridine derivatives as modulators of P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Bioorg Med Chem* 6(11):2219–2227.
doi:10.1016/S0968-0896(98)00170-9
138. Zhou X-F, Zhang L, Tseng E, Scott-Ramsay E, Schentag JJ, Coburn RA, Morris ME (2005) New 4-aryl-1,4-dihydropyridines and 4-arylpiperidines as P-glycoprotein inhibitors. *Drug Metab Dispos* 33(3):321–328.
doi:10.1124/dmd.104.002089
139. Tasaka S, Ohmori H, Gomi N, Iino M, Machida T, Kiue A, Naito S, Kuwano M (2001) Synthesis and structure–activity analysis of novel dihydropyridine derivatives to overcome multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett* 11(2):275–277.
doi:10.1016/S0960-894X(00)00651-X
140. Desai B, Sureja D, Naliapara Y, Shah A, Saxena AK (2001) Synthesis and QSAR Studies of 4-Substituted phenyl-2,6-dimethyl-3, 5-bis-N-(substituted phenyl)carbonyl-1,4-dihydropyridines as potential antitubercular agents. *Bioorg Med Chem* 9(8):1993–1998.
doi:10.1016/S0968-0896(01)00141-9
141. Mahnam K, Sadeghi A, Mohammadpour M, Fassihi A (2012) Theoretical studies of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxamides as possible inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase. *Monatsh Chem* 143(1):19–27.
doi:10.1007/s00706-011-0542-2
142. Amini M., Navidpour L., Shafiee A. (2008) Synthesis and antitubercular activity of new N,N-diaryl-4-(4,5-dichloroimidazole-2-yl)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxamides. *DARU* 1(16):9–12
143. Fassihi A, Azadpour Z, Delbari N, Saghale L, Memarian HR, Sabet R, Alborzi A, Miri R, Pourabbas B, Mardaneh J, Mousavi P, Moeinifard B, Sadeghi-Aliabadi H (2009) Synthesis and antitubercular activity of novel 4-substituted imidazolyl-2,6-dimethyl-N3,N5-bisaryl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44(8):3253–3258.
doi:10.1016/j.ejmech.2009.03.027
144. Manvar AT, Pissurlenkar RRS, Virsodia VR, Upadhyay KD, Manvar DR, Mishra AK, Acharya HD, Parecha AR, Dholakia CD, Shah AK, Coutinho EC (2010) Synthesis, in vitro antitubercular activity and 3D-QSAR study of 1,4-dihydropyridines. *Molecular diversity* 14(2):285–305.
doi:10.1007/s11030-009-9162-8

145. Iman M, Davood A, Dehqani G, Lotfinia M, Sardari S, Azerang P, Amini M (2015) Design, Synthesis and Evaluation of Antitubercular Activity of Novel Dihydropyridine Containing Imidazolyl Substituent. *Iran J Pharm Res* 14(4):1067–1075
146. Zandhaghghi M, Hadizadeh F, Soleimanpour S, Meshkat Z, Rezaee SA, Derakhshan M, Ghazvini K (2017) In vitro bactericidal activities of two novel dihydropyridine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dev Ctries* 11(06):453.
doi:10.3855/jidc.7966
147. Khoshneviszadeh M, Edraki N, Javidnia K, Alborzi A, Pourabbas B, Mardaneh J, Miri R (2009) Synthesis and biological evaluation of some new 1,4-dihydropyridines containing different ester substitute and diethyl carbamoyl group as anti-tubercular agents. *Bioorg Med Chem* 17(4):1579–1586.
doi:10.1016/j.bmc.2008.12.070
148. Trivedi A, Dodiya D, Dholariya B, Kataria V, Bhuvu V, Shah V (2011) Synthesis and biological evaluation of some novel 1,4-dihydropyridines as potential antitubercular agents. *Chem Biol Drug Des* 78(5):881–886.
doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01233.x
149. Sonali R. Deshmane*, Deepak K. Landge, Rohan V. Bamane, Trupti S. Chitre, Sumit B. Kamble (2013) SYNTHESIS, DOCKING AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 1,4-DIHYDROPYRIDINE DERIVATIVES. *Heterocyclic Letters* (3):61–68
150. Kaatz GW (2005) Bacterial efflux pump inhibition. *Curr Opin Investig Drugs* 6(2):191–198
151. Li X-Z, Nikaido H (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. An update. *Drugs* 69(12):1555–1623.
doi:10.2165/11317030-000000000-00000
152. Poole K (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 56(1):20–51.
doi:10.1093/jac/dki171
153. Spies FS, da Silva PEA, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A (2008) Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(8):2947–2949.
doi:10.1128/AAC.01570-07
154. Beyer C (1891) Ueber den Mechanismus der Hantzsch'schen Pyridinsynthesen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 24(1):1662–1670.
doi:10.1002/cber.189102401283
155. Eisner U, Kuthan J (1972) Chemistry of dihydropyridines. *Chem. Rev.* 72(1):1–42.
doi:10.1021/cr60275a001
156. Chekavichus BS, Sausin' A, Dubur GY (1982) Effect of substituents in the dihydropyridine ring on the reactivity of the ester group of 3,5-dialkoxycarbonyl-1,4-dihydropyridines. *Chem Heterocycl Compd* 18(8):818–823.
doi:10.1007/BF00506586
157. Chennat T, Eisner U (1975) A new synthesis of 1,4-dihydropyridines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (10):926.
doi:10.1039/p19750000926
158. Yang J, Wang C, Xie X, Li H, Li Y (2010) Acid-Catalyzed Cascade Reactions of Enaminones with Aldehydes. C-H Functionalization To Afford 1,4-Dihydropyridines. *Eur. J. Org. Chem.* 2010(22):4189–4193.
doi:10.1002/ejoc.201000607
159. Sueki S, Takei R, Abe J, Shimizu I (2011) Ytterbium-catalyzed synthesis of dihydropyridines. *Tetrahedron Letters* 52(34):4473–4477.
doi:10.1016/j.tetlet.2011.06.070
160. Kikuchi S, Iwai M, Fukuzawa S-i (2007) A Novel and Facile Method for the Synthesis of 2,3-Disubstituted Quinolines by a Three-Component Coupling Reaction. *Synlett* 2007(17):2639–2642.
doi:10.1055/s-2007-991058
161. Sausin' A, Chekavichus BS, Lusic VK, Dubur GY (1980) 1-aryl- and 1-benzyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridines. *Chem Heterocycl Compd* 16(4):377–385.
doi:10.1007/BF00552778

162. Katritzky AR, Ostercamp DL, Yousaf TI (1986) The mechanism of the hantzsch pyridine synthesis. A study by ¹⁵N and ¹³C NMR spectroscopy. *Tetrahedron* 42(20):5729–5738.
doi:10.1016/S0040-4020(01)88178-3
163. Kozlov NS, Kiseleva SA, Buzykin BI (1974) Reaction of aromatic Azomethines with Benzoylacetone. *ZHURNAL ORGANICHESKOI KHIMII* 10(7):1487–1493
164. Mestrelab Reasearch S.L (2012) MestReNova. Mestrelab Reasearch S.L
165. Trivedi A, Gowda NS, Naliapara Y, Sridhar MA, Shashidhara Prasad J, Shah A (2011) Synthesis, Characterization, Crystal and Molecular Structure Analysis of 2,6-Dimethyl-3-Acetyl-5-Carbomethoxy-4-Phenyl-1,4-Dihydropyridine. *J Chem Crystallogr* 41(6):774–778.
doi:10.1007/s10870-010-9972-7
166. Shishkin OV (1996) Conformational flexibility of the 1,4-dihydropyridine ring in calcium channel agonists and antagonists molecules. *Journal of Molecular Structure* 385(3):209–214. *doi:10.1016/S0022-2860(96)09332-5*
167. Mishnev AF, Shvets AE, Bleidelis YY, Dubur GY, Sausin' A, Lusia VK (1977) Molecular and crystal structures and chemical properties of 2,6-dimethyl-4-phenyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine. *Chem Heterocycl Compd* 13(9):991–995.
doi:10.1007/BF00472454
168. Rajesh K, Vijayakumar V, Narasimhamurthy T, Suresh J, Tiekink ERT (2010) Dimethyl 4-(3-hydroxy-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3,5-dicarboxyl-ate. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online* 66(Pt 4):o985.
doi:10.1107/S1600536810011268
169. Hilgeroth A Untersuchungen zur inter- und intramolekularen Interaktion zwischen 1,4-Dihydropyridin- und 1,4-Benzochinonstruktur. Düsseldorf, Univ., Diss., 1994
170. Sueki S, Takei R, Zaito Y, Abe J, Fukuda A, Seto K, Furukawa Y, Shimizu I (2014) Synthesis of 1,4-Dihydropyridines and Their Fluorescence Properties. *Eur. J. Org. Chem.* 2014(24):5281–5301.
doi:10.1002/ejoc.201402426
171. Melchior DL, Sharom FJ, Evers R, Wright GE, Chu JWK, Wright SE, Chu X, Yabut J (2012) Determining P-glycoprotein-drug interactions: evaluation of reconstituted P-glycoprotein in a liposomal system and LLC-MDR1 polarized cell monolayers. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65(2):64–74.
doi:10.1016/j.vascn.2012.02.002
172. Protein BLAST: search protein databases using a protein query.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. Zugegriffen: 08. Januar 2018
173. Crowle AJ, Douvas GS, May MH (1992) Chlorpromazine. A drug potentially useful for treating mycobacterial infections. *Chemotherapy* 38(6):410–419
174. Rathelot P, Azas N, El-Kashef H, Delmas F, Di Giorgio C, Timon-David P, Maldonado J, Vanelle P (2002) 1,3-Diphenylpyrazoles. Synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37(8):671–679.
doi:10.1016/S0223-5234(02)01388-0
175. Sigma-Aldrich (2012) Safety Data Sheet. 1,3-Diphenyl-1H-pyrazole-4-carboxaldehyde
176. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 88(6):526–544.
doi:10.1016/j.tube.2008.02.004
177. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, Binz T, Wegner A, Tallam A, Rausell A, Buttini M, Linster CL, Medina E, Balling R, Hiller K (2013) Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(19):7820–7825.
doi:10.1073/pnas.1218599110

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertationsschrift wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Ort, Datum

Fabian Lentz

Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten

Fabian Georg Goswin Lentz
Kölnerstraße 50, 54584 Jünkerath
* 28.10.1990 (Gerolstein)
männlich, deutsch, ledig

Werdegang

1997 - 2001	Grundschule Graf-Salentin in Jünkerath
2001 - 2010	Regino-Gymnasium Prüm mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife März 2010
2010 - 2014	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1. und 2. Staatsexamen
November 2014 - April 2015	Pharmazeutisches Praktikum an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Mai 2015 - Oktober 2015	Pharmazeutisches Praktikum in der Phoenix Apotheke Silberhöhe, Halle (Saale)
27.11.2015	3. Staatsexamen mit Erhalt der Approbation als Apotheker
Seit Dezember 2015	Promotion im Fachbereich pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Seit Januar 2016	Marien Apotheke, Jünkerath

Publikationen

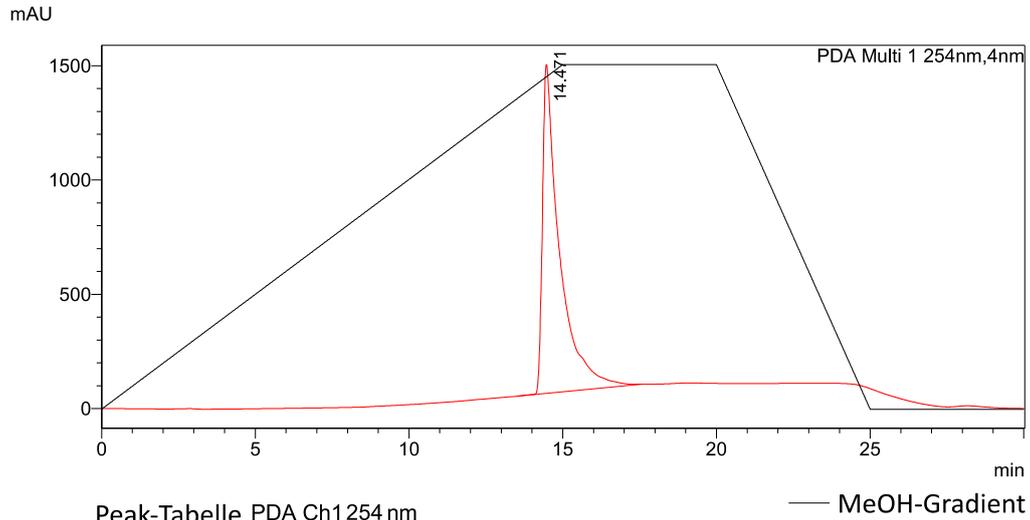
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26 (2016), 5896 - 5898
„Discovery of novel N-phenyl 1,4-dihydropyridines with a dual mode of antimycobacterial activity“
Lentz, Fabian; Hemmer, Marc; Reiling, Norbert; Hilgeroth, Andreas

Anhang

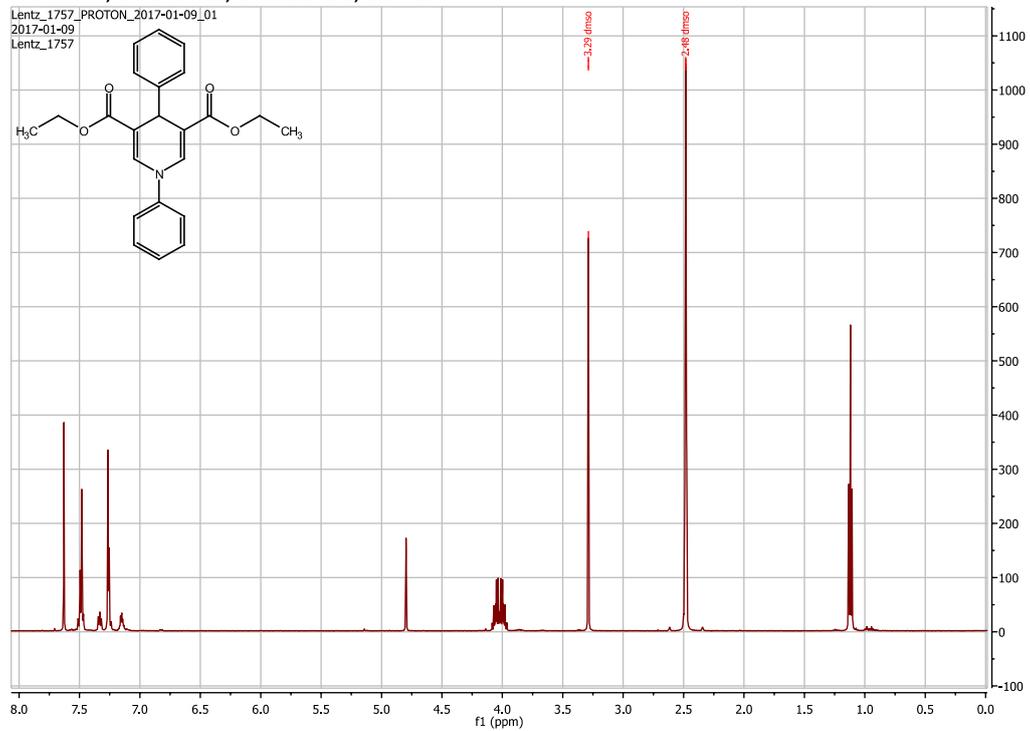
HPLC- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen, die auf ihre Wirksamkeit untersucht wurden

Verbindung Nr 1

HPLC-Chromatogramm (Flussrate: 0,5 ml/min)

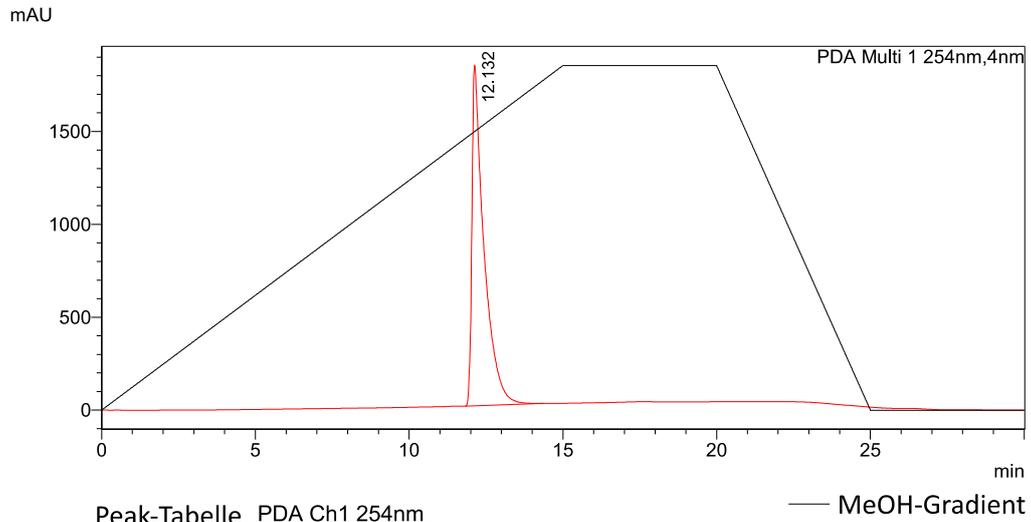


$^1\text{H-NMR}$; 500 MHz; DMSO-d_6 ; 27 °C



Verbindung Nr 2

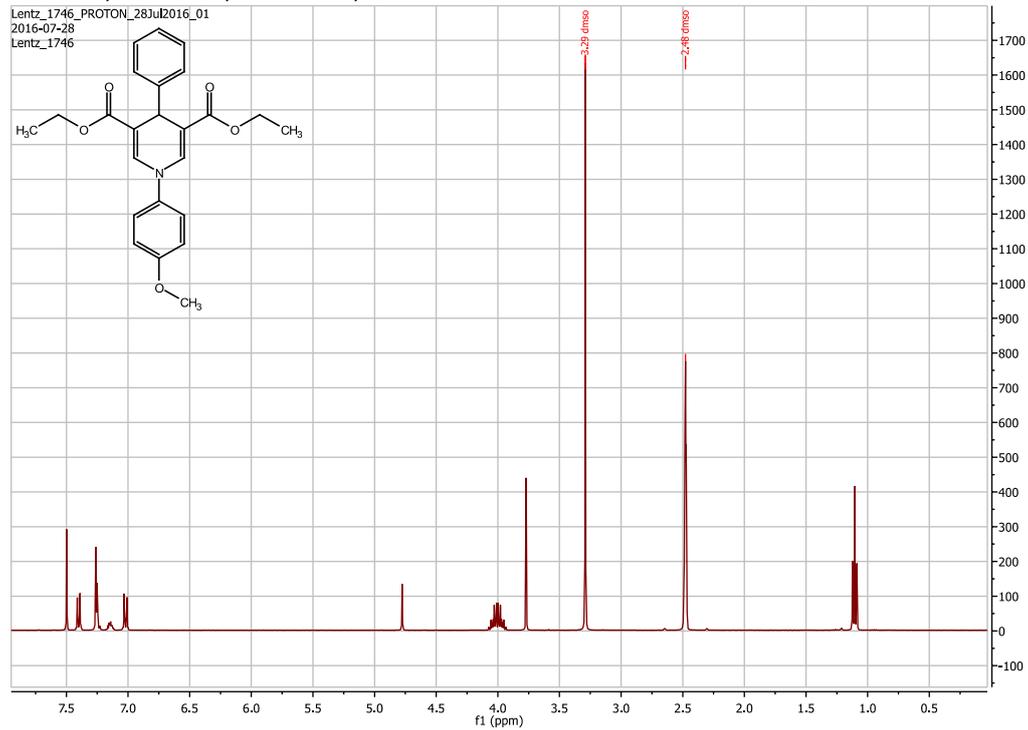
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

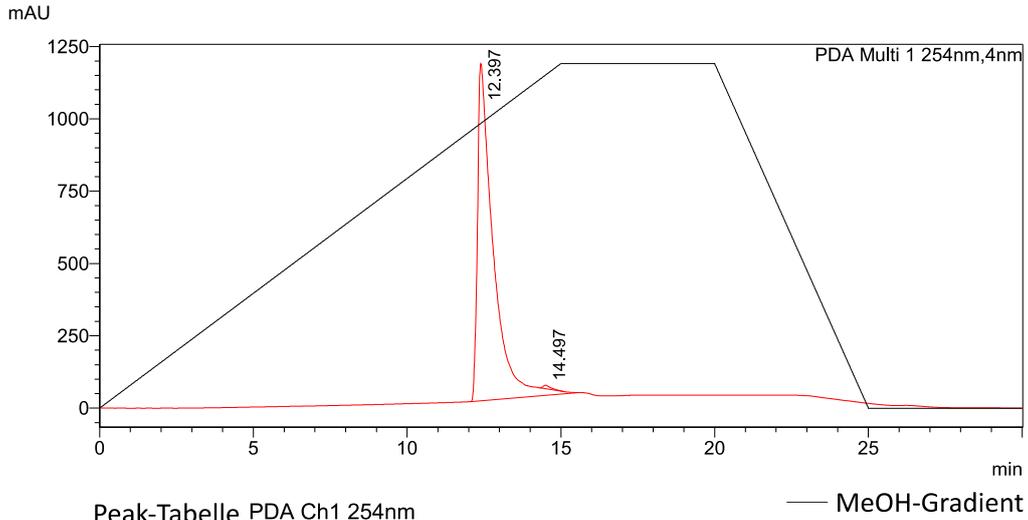
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.132	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 3

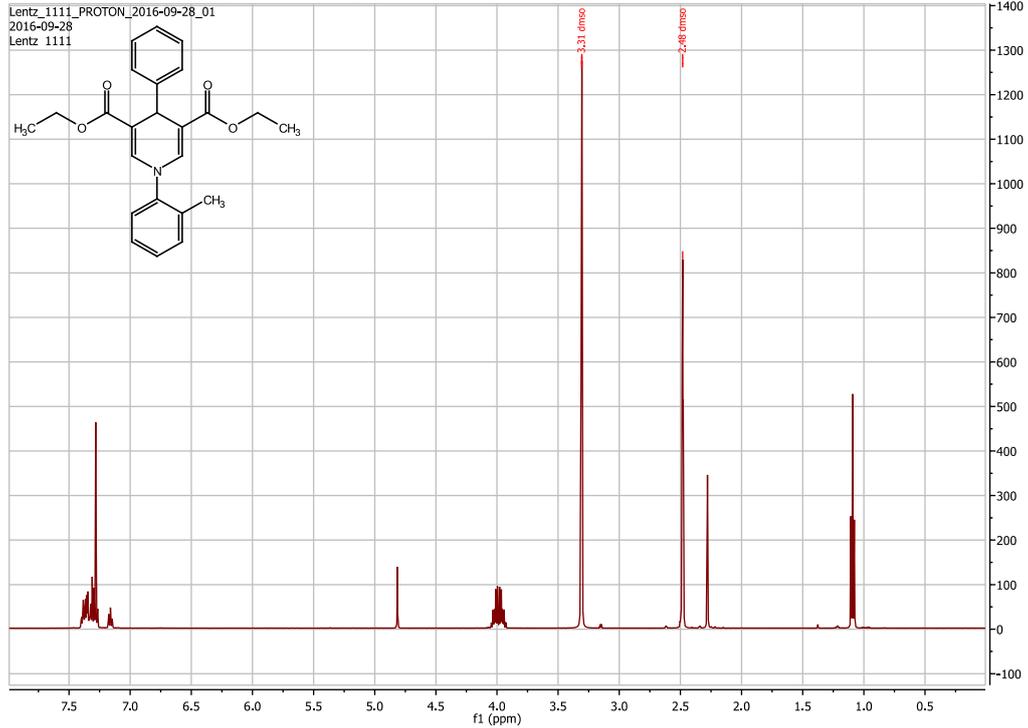
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

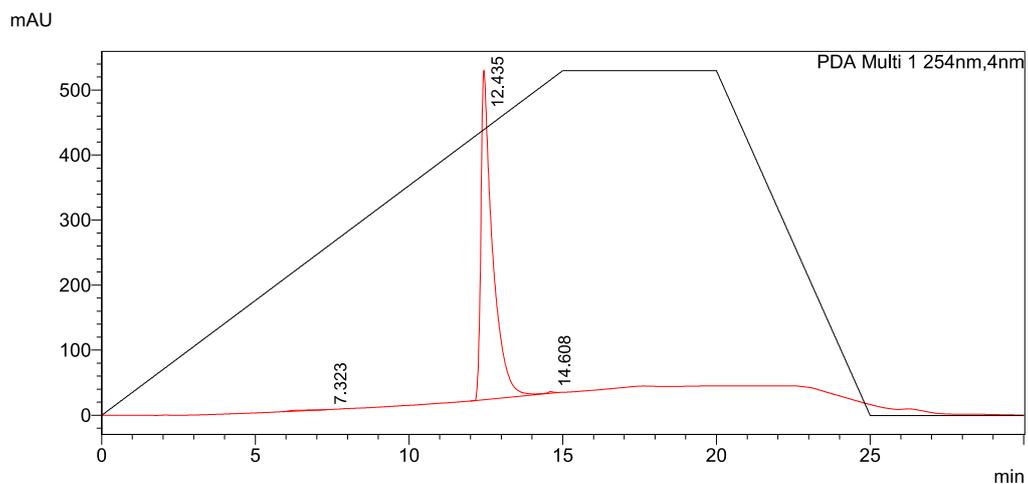
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.397	99.507
2	14.497	0.493
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 4

HPLC-Chromatogramm

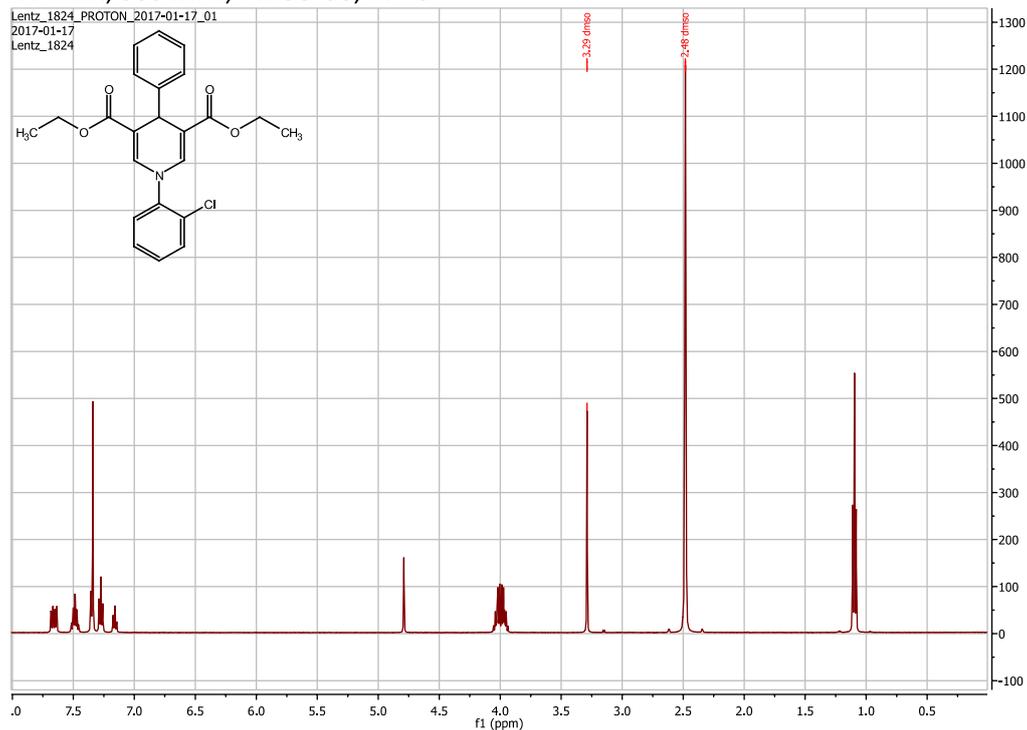


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	7.323	0.361
2	12.435	99.318
3	14.608	0.321
Total		100.000

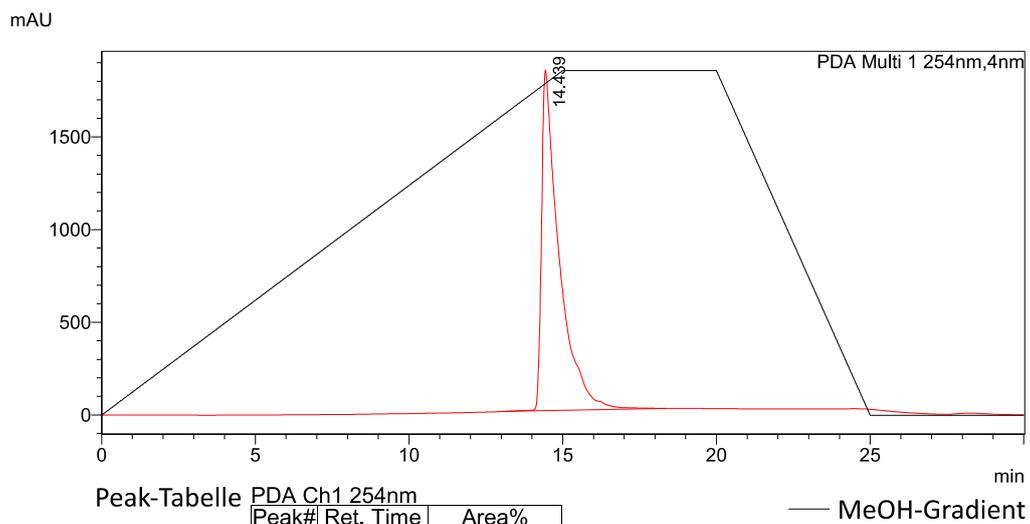
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C

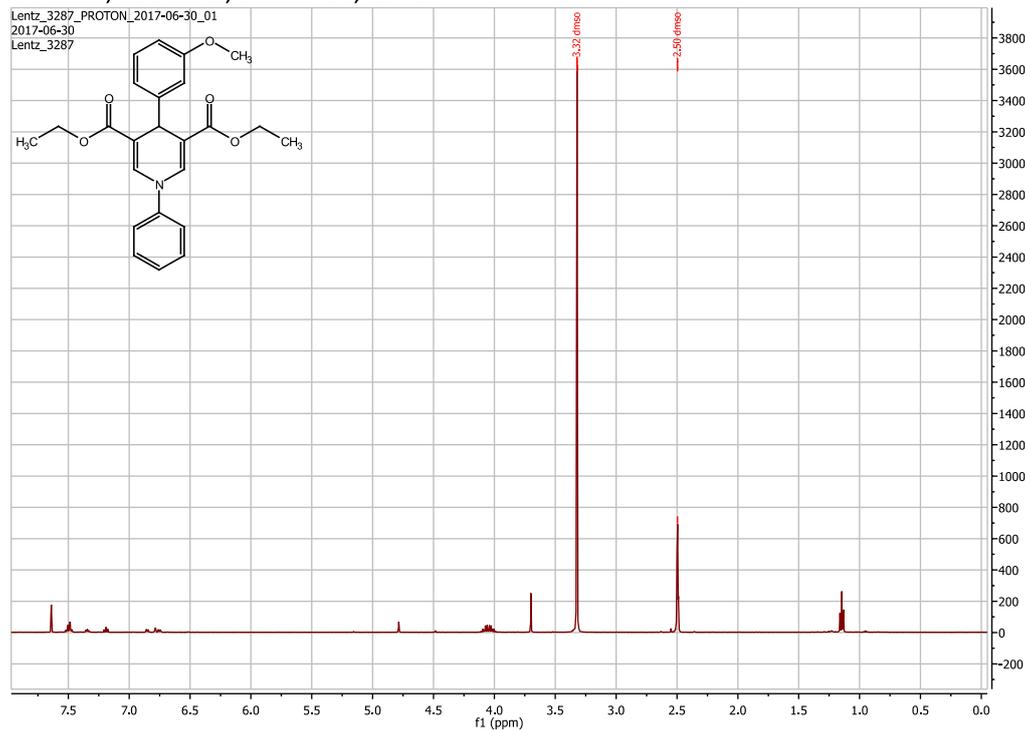


Verbindung Nr 5

HPLC-Chromatogramm (Flussrate: 0,5 ml/min)

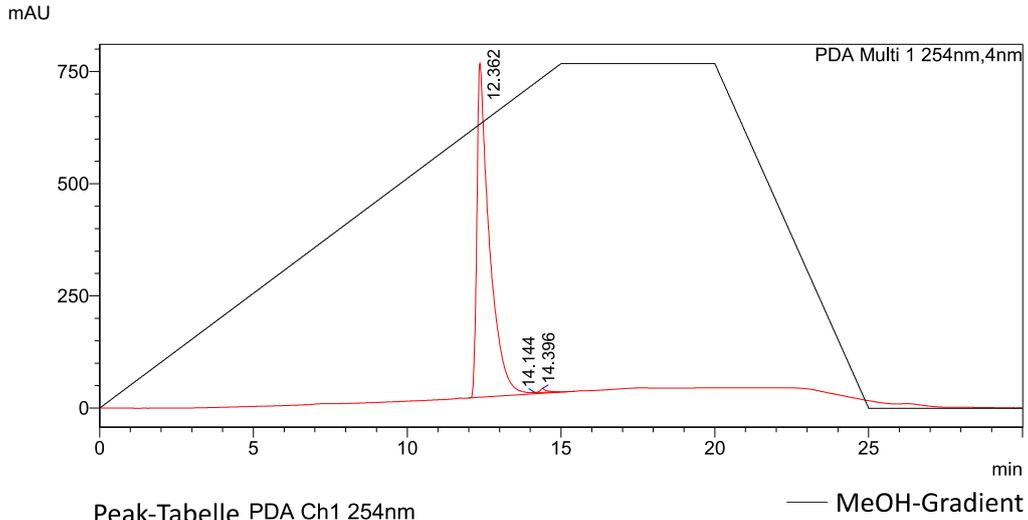


$^1\text{H-NMR}$; 500 MHz; DMSO- d_6 ; 27 °C



Verbindung Nr 7

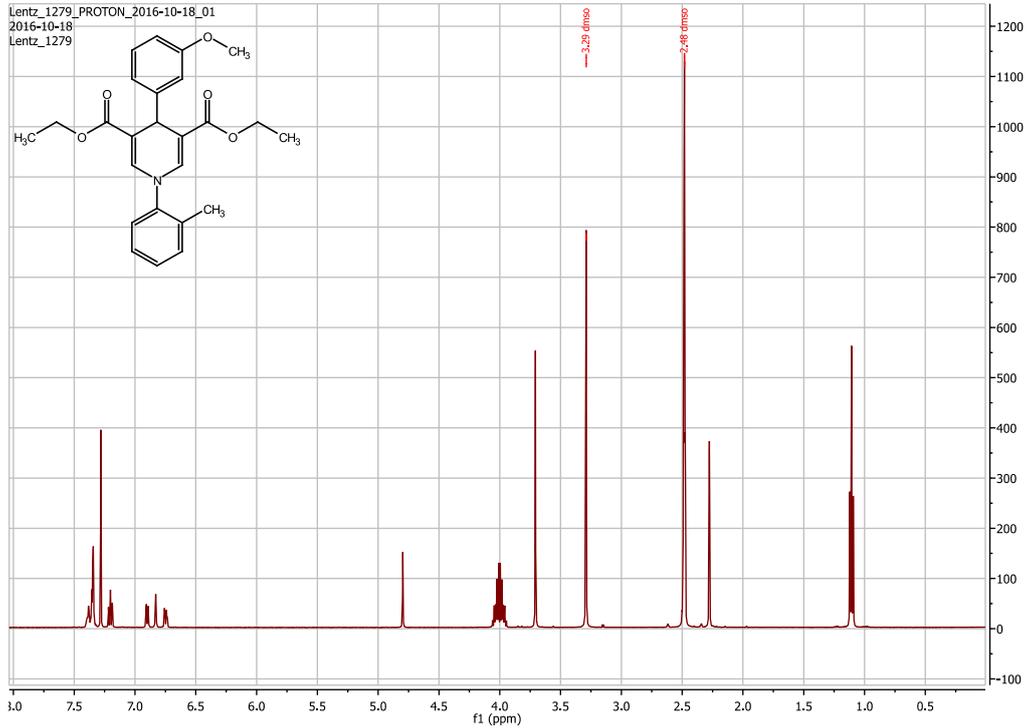
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

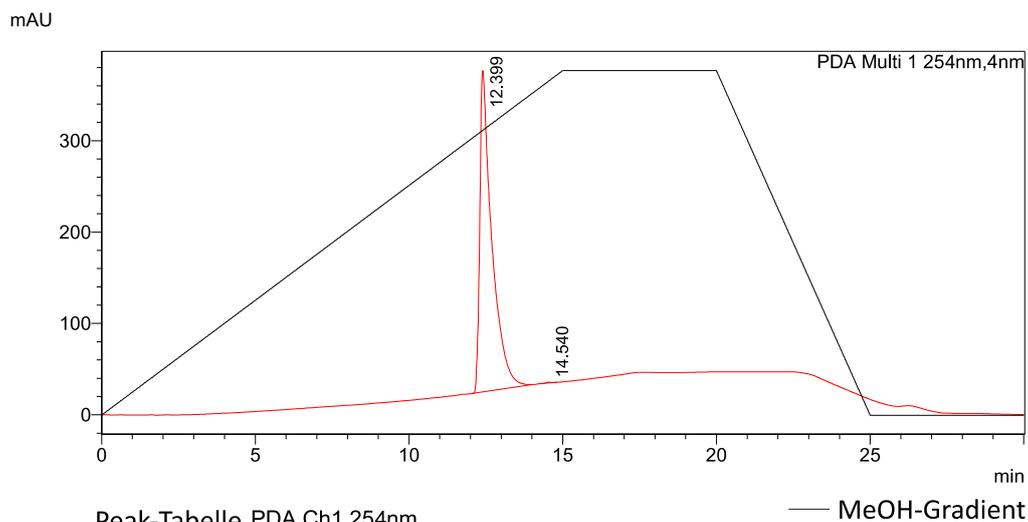
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.362	99.444
2	14.144	0.013
3	14.396	0.542
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 8

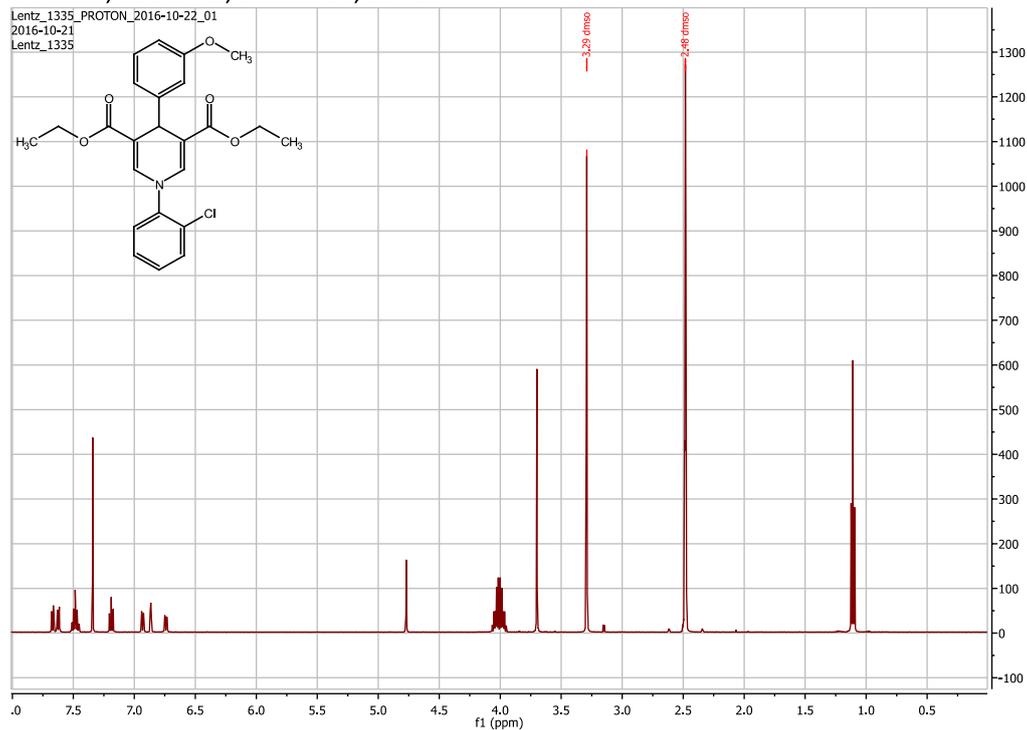
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

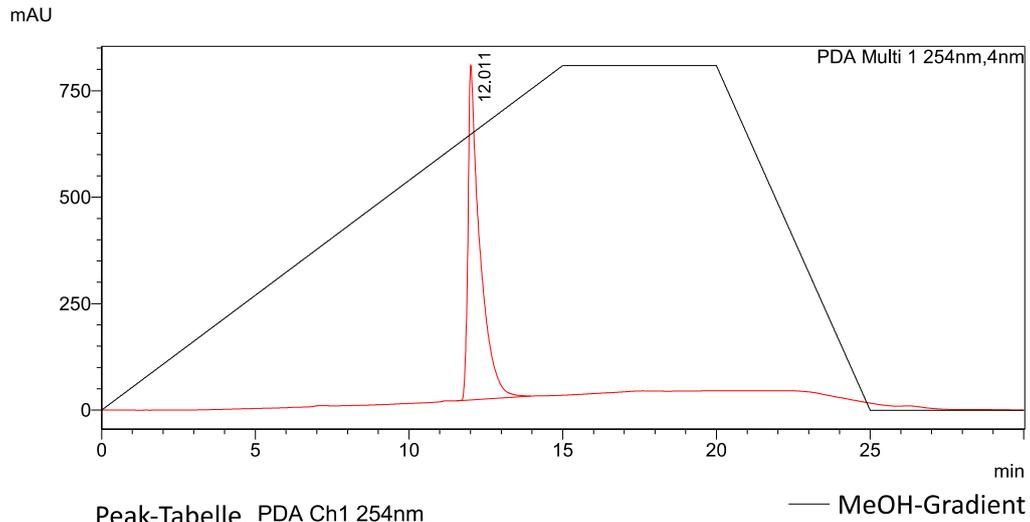
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.399	99.899
2	14.540	0.101
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 9

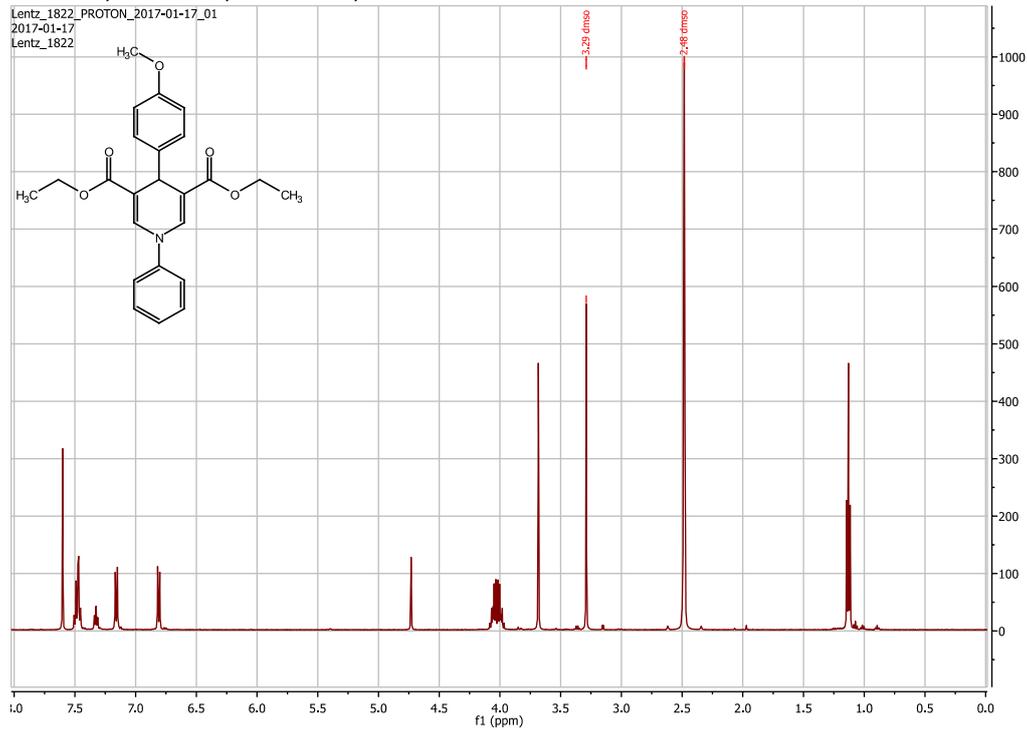
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

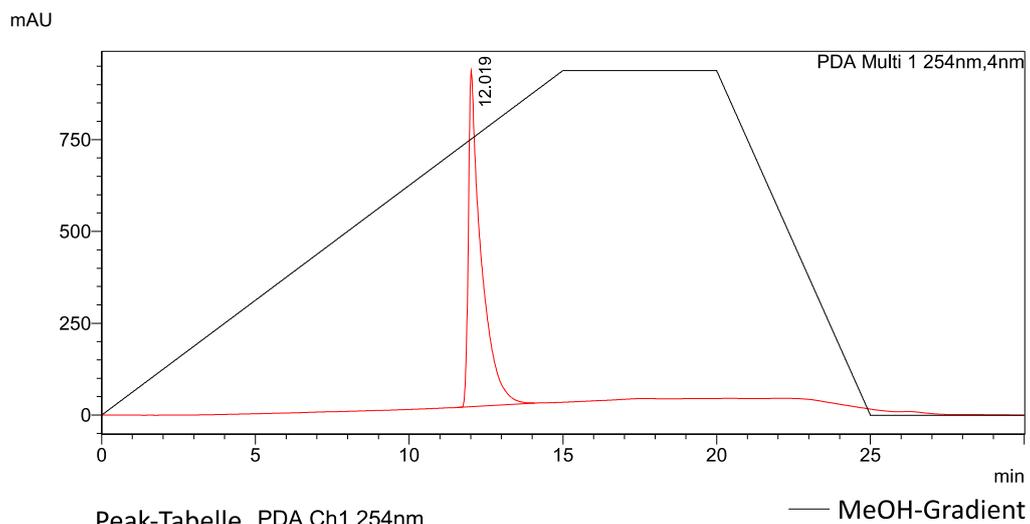
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.011	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 10

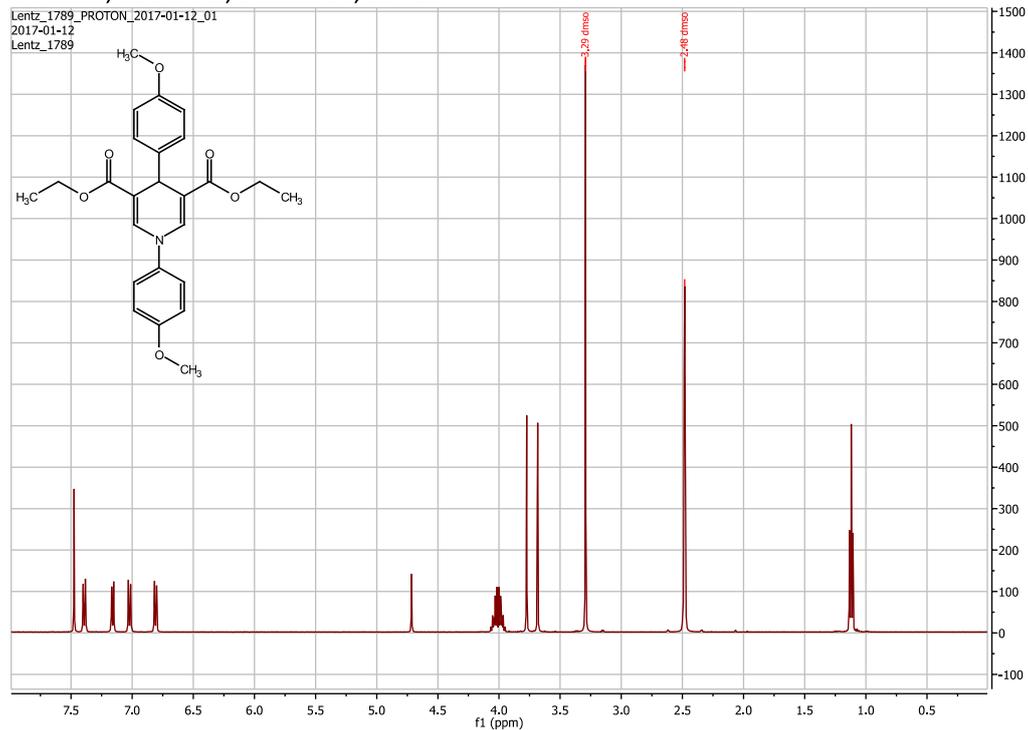
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

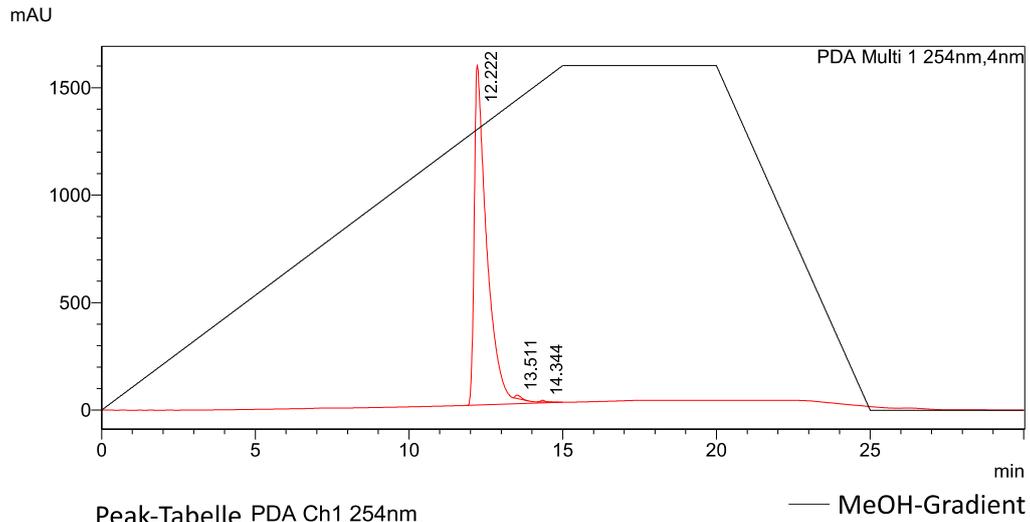
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.019	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 11

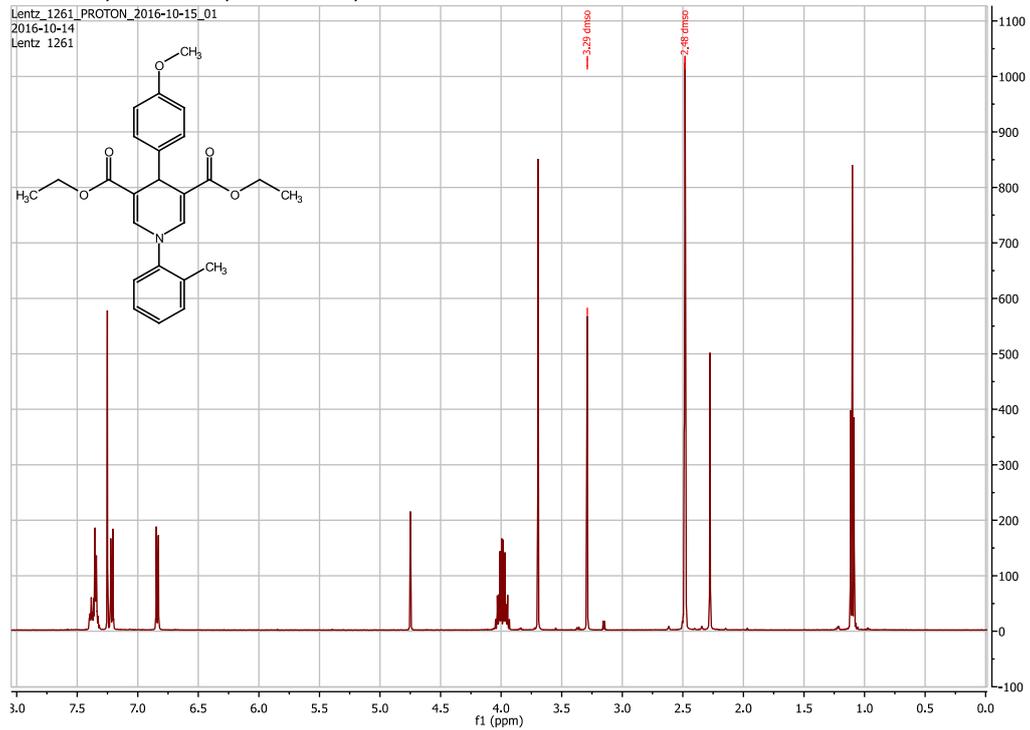
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

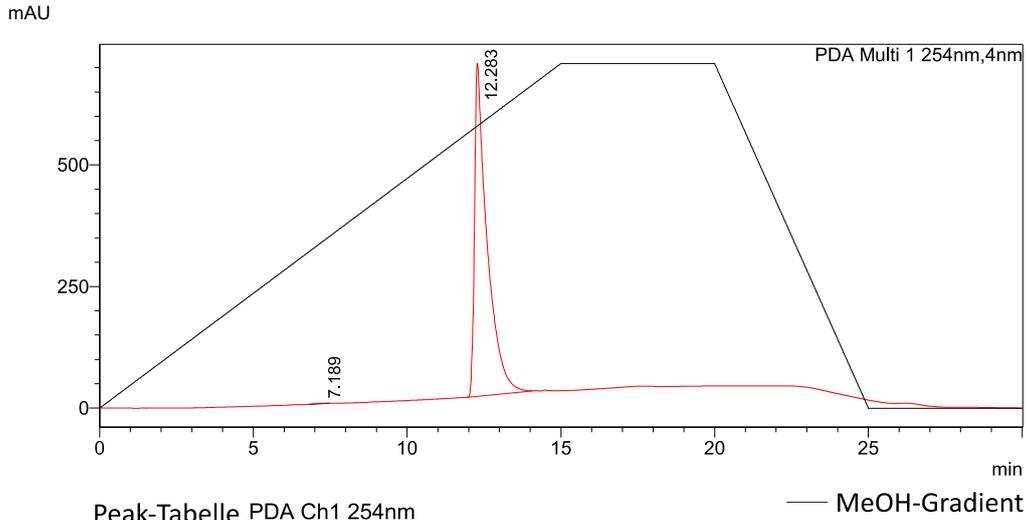
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.222	99.364
2	13.511	0.444
3	14.344	0.193
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 12

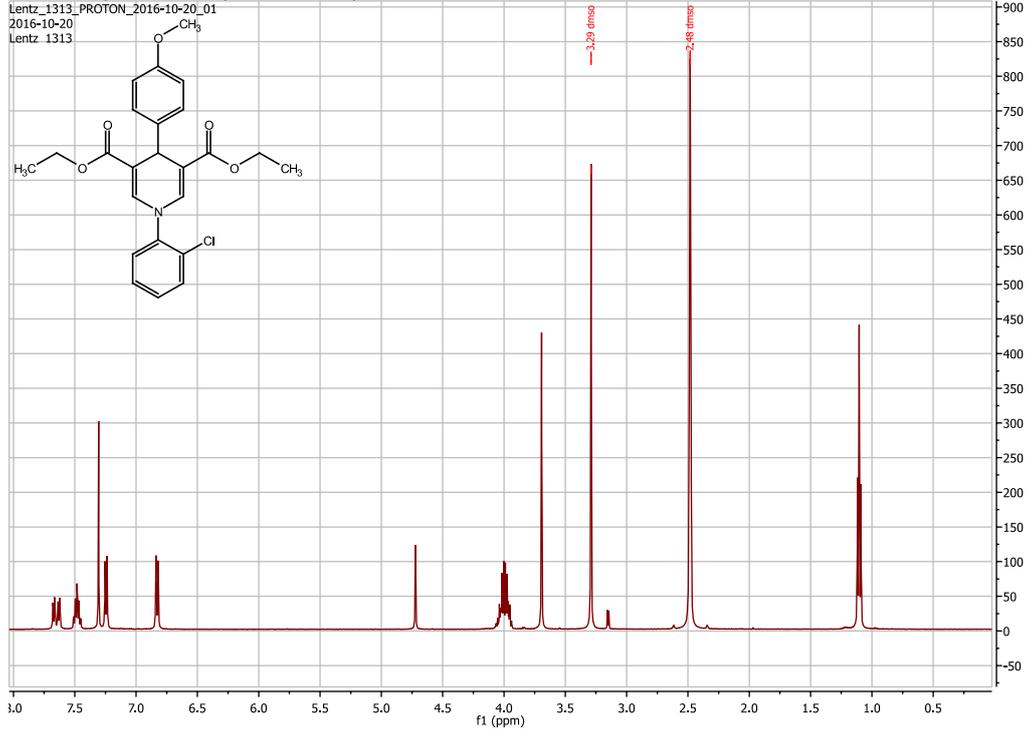
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

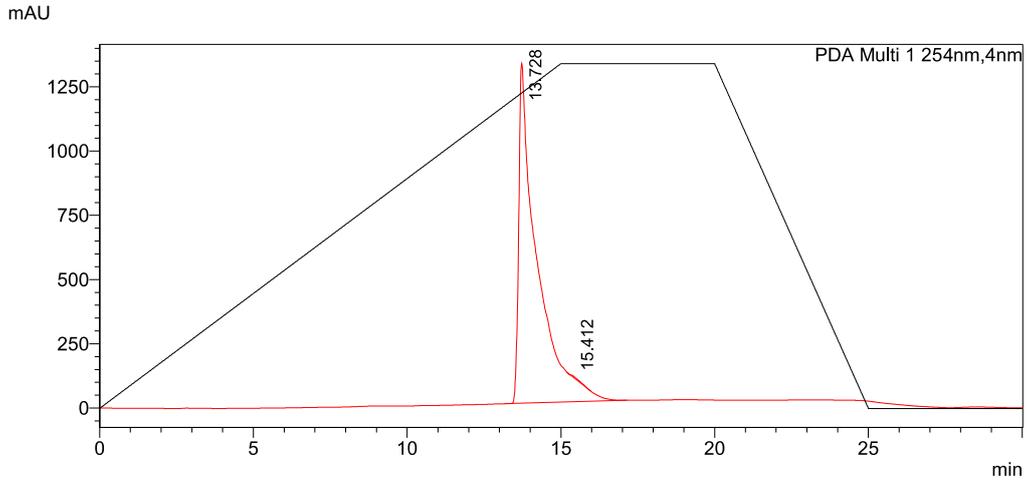
Peak#	Ret. Time	Area%
1	7.189	0.150
2	12.283	99.850
Total		100,000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 13

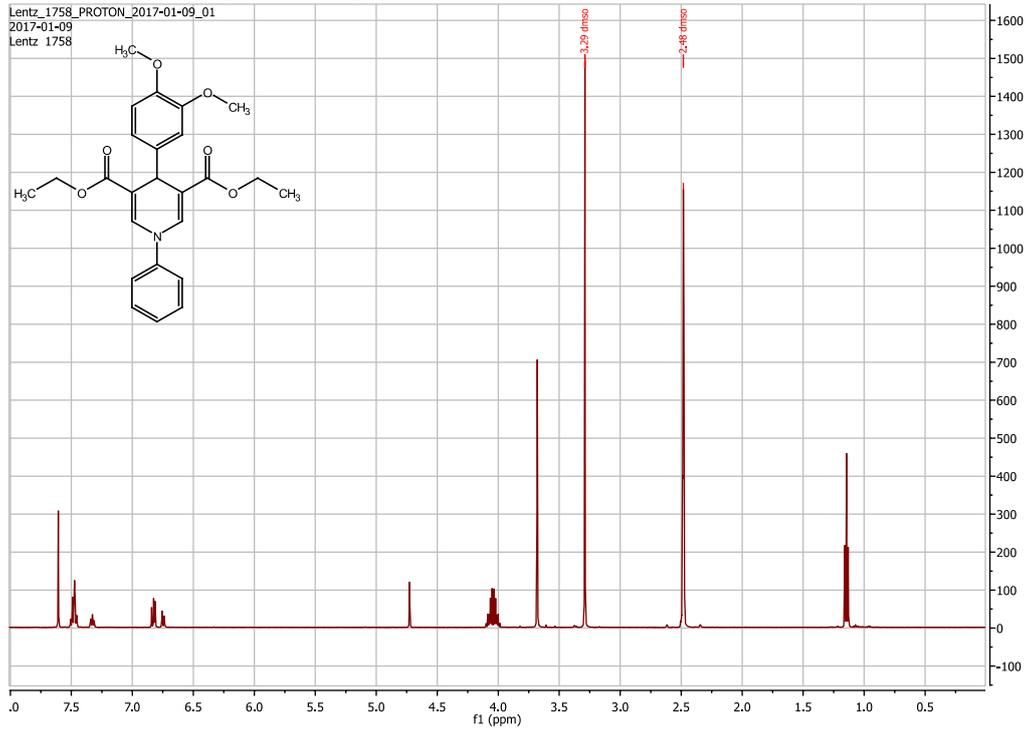
HPLC-Chromatogramm (Flussrate: 0,5 ml/min)



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

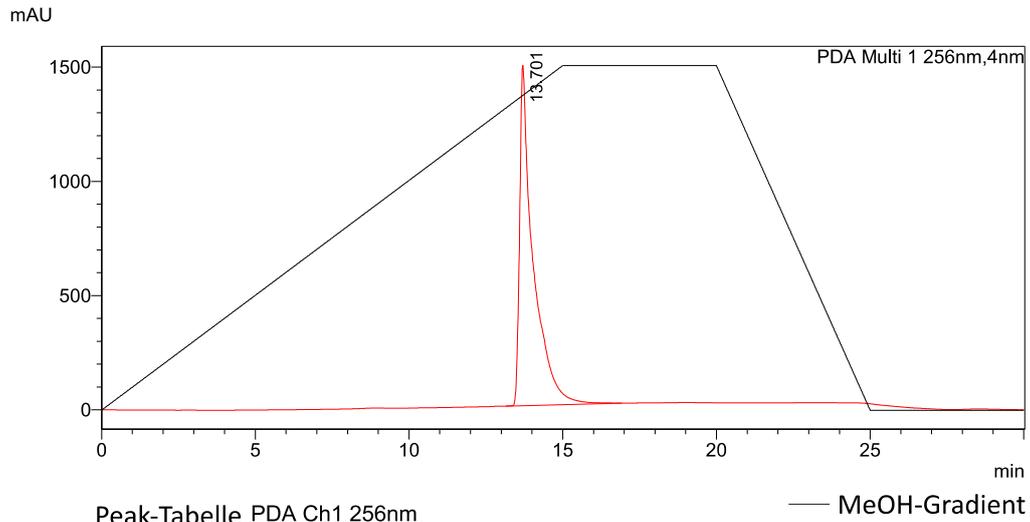
Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.728	99.835
2	15.412	0.165
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 14

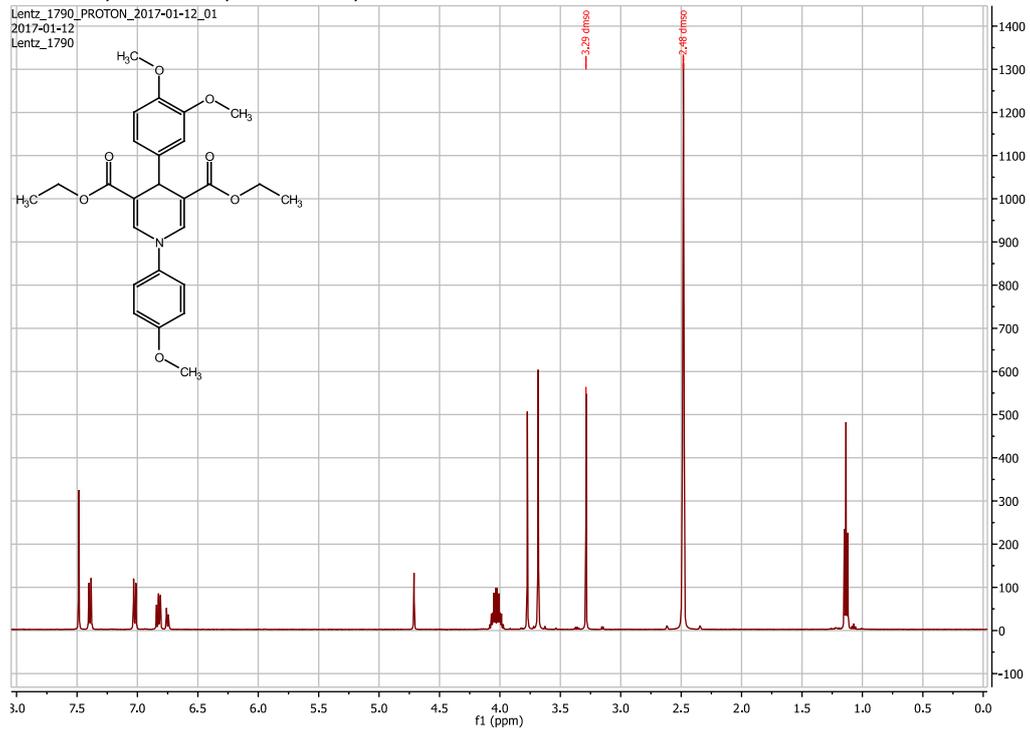
HPLC-Chromatogramm (Flussrate 0,5 ml/min)



Peak-Tabelle PDA Ch1 256nm

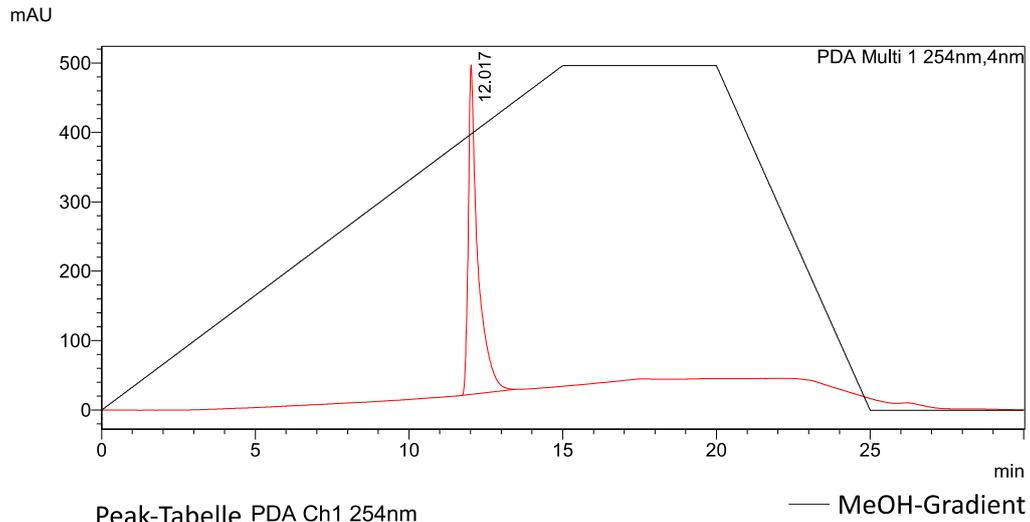
Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.701	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 15

HPLC-Chromatogramm

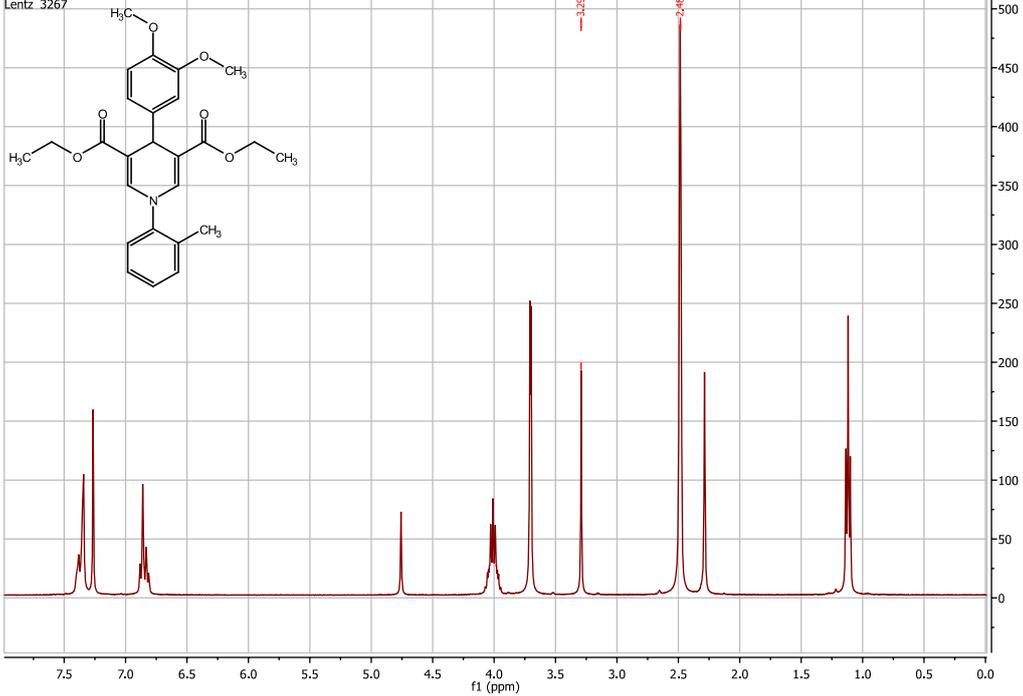


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.017	100.000
Total		100.000

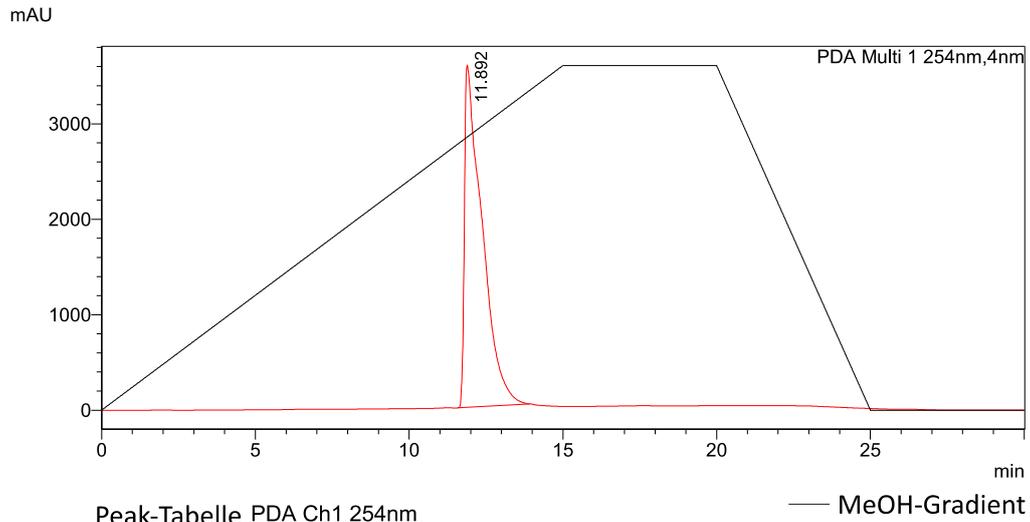
¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C

Lentz_3267_PROTON_11Oct2016_01
2016-10-11
Lentz_3267



Verbindung Nr 16

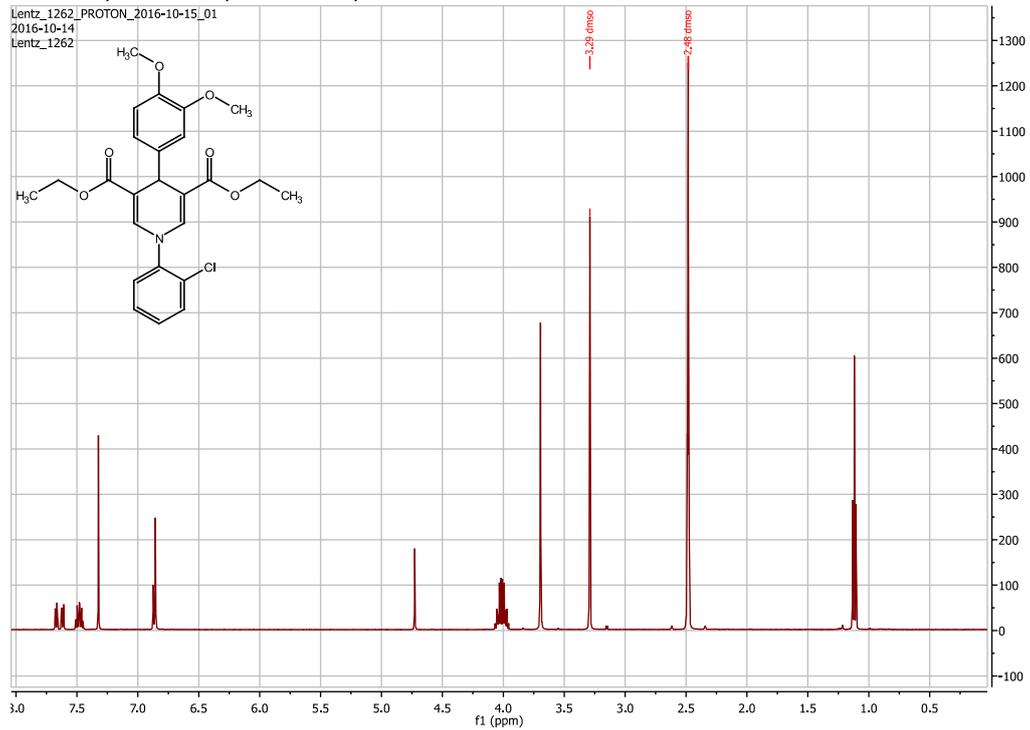
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

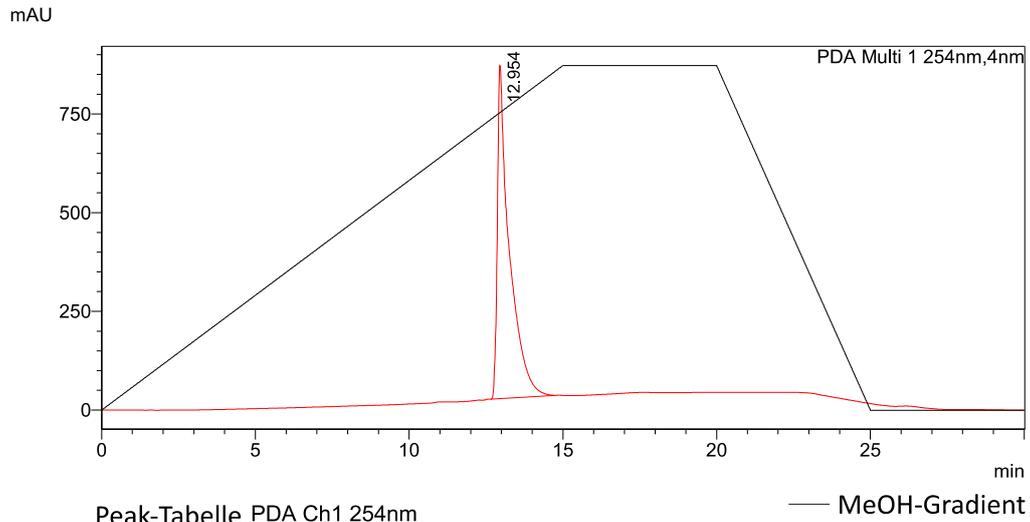
Peak#	Ret. Time	Area%
1	11.892	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 17

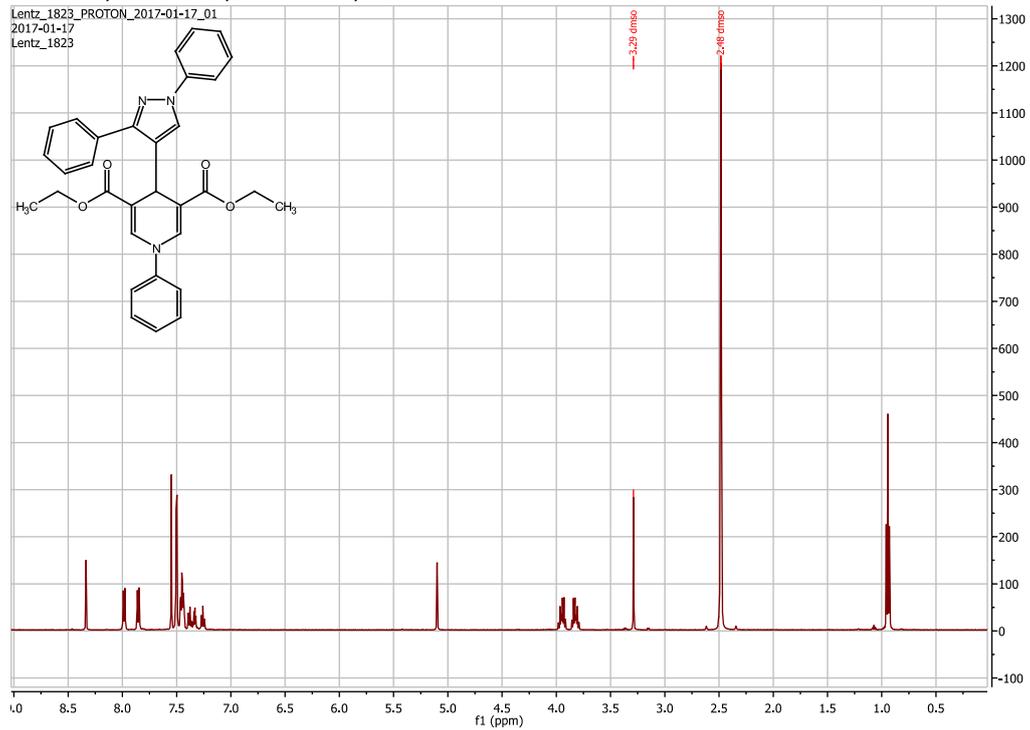
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

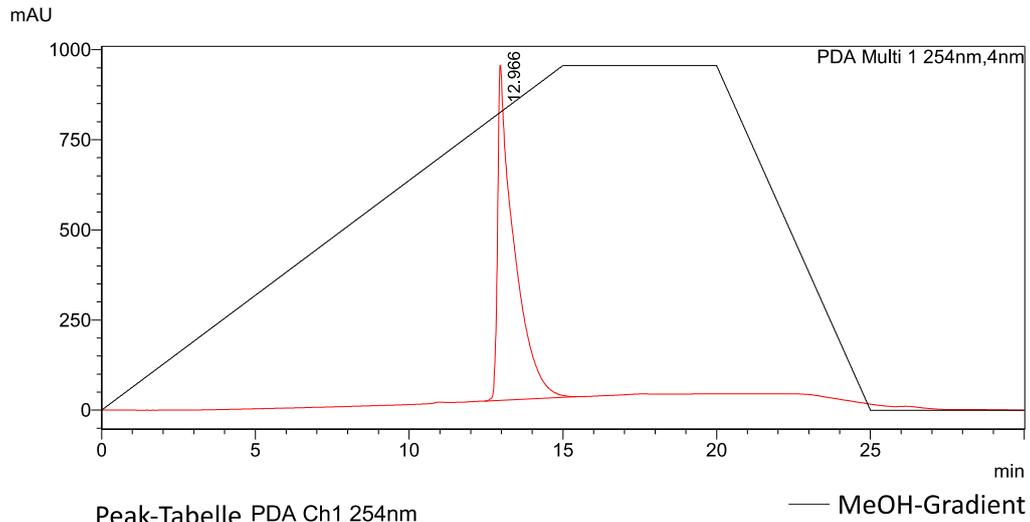
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.954	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 18

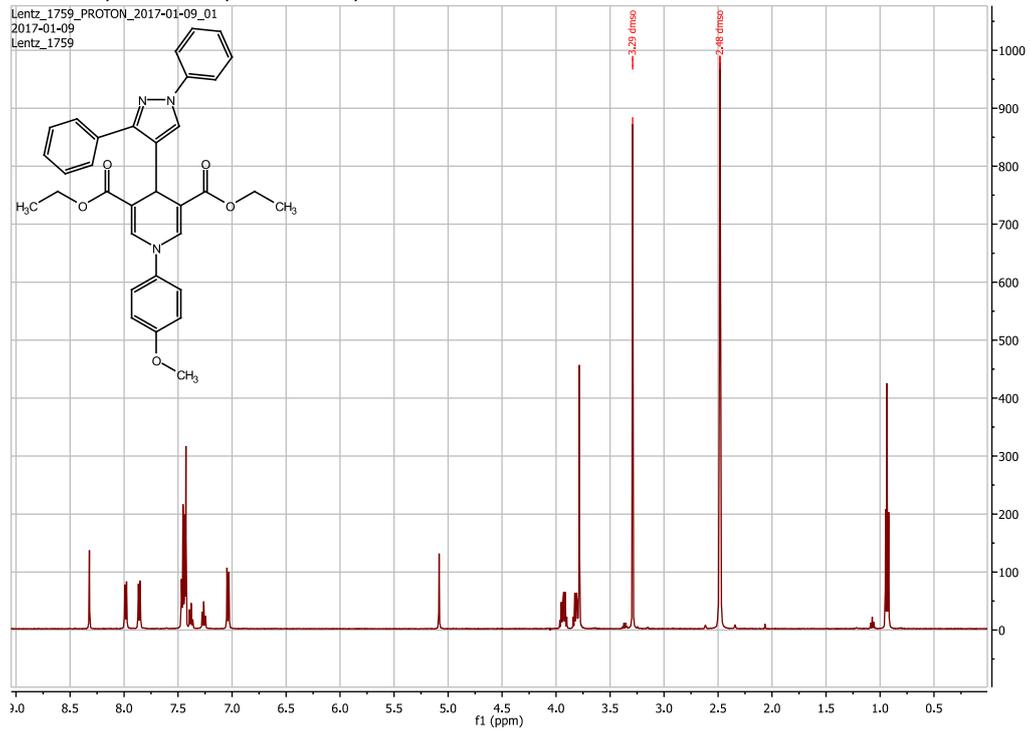
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

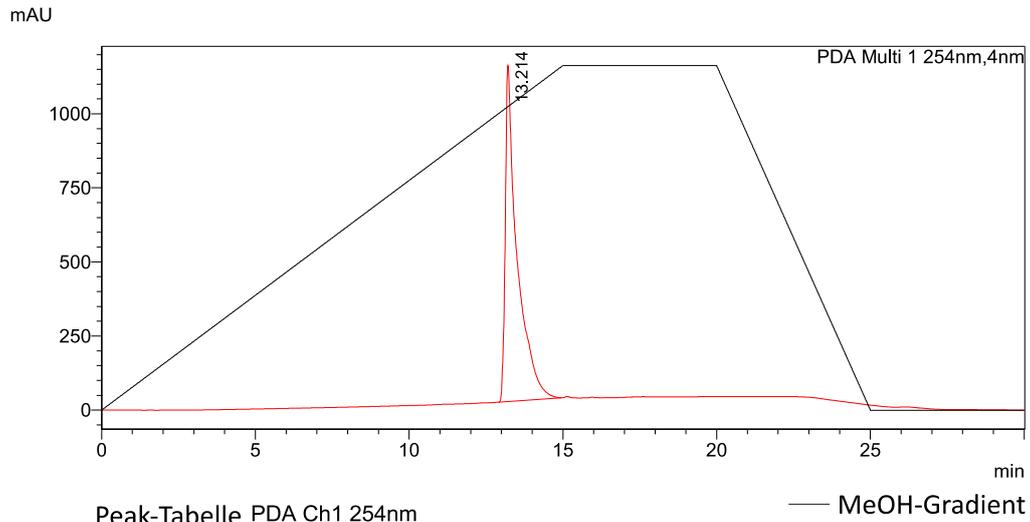
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.966	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 19

HPLC-Chromatogramm

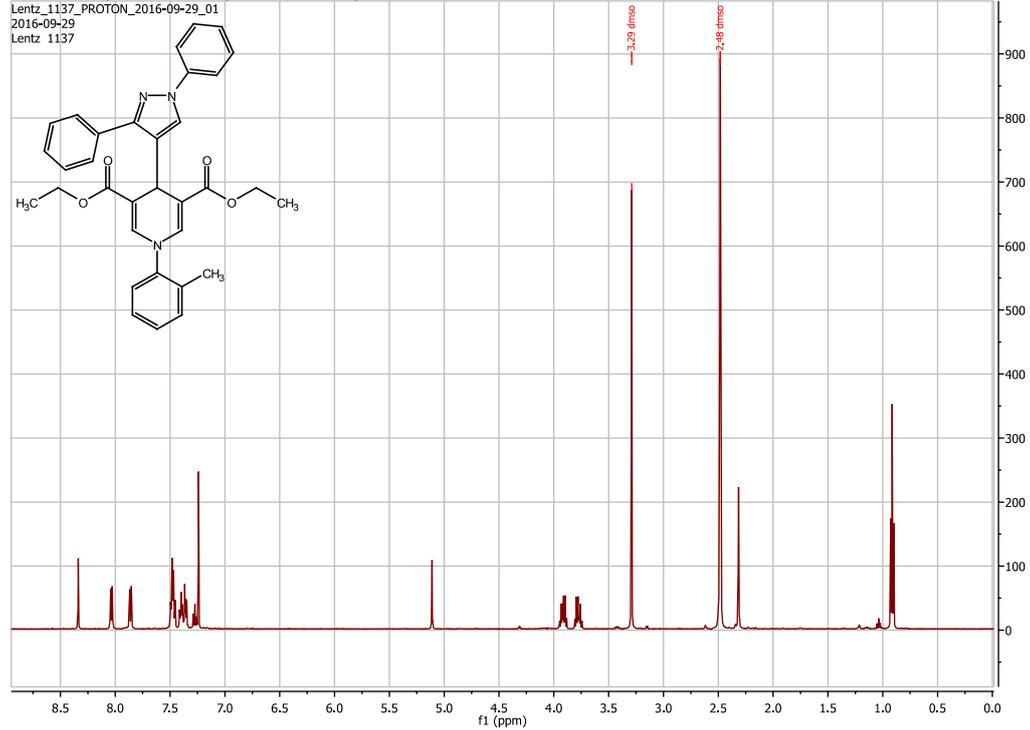


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.214	100.000
Total		100.000

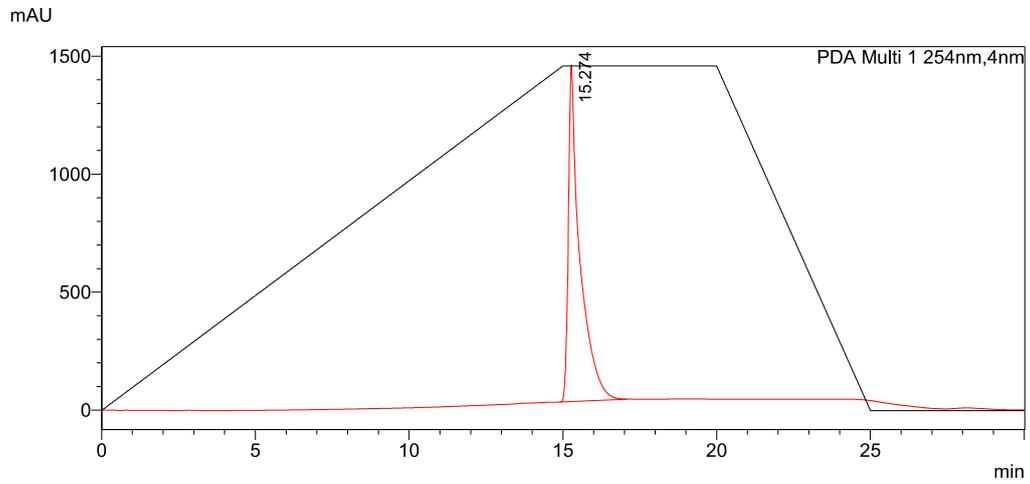
¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C

Lentz_1137_PROTON_2016-09-29_01
2016-09-29
Lentz_1137



Verbindung Nr 20

HPLC-Chromatogramm

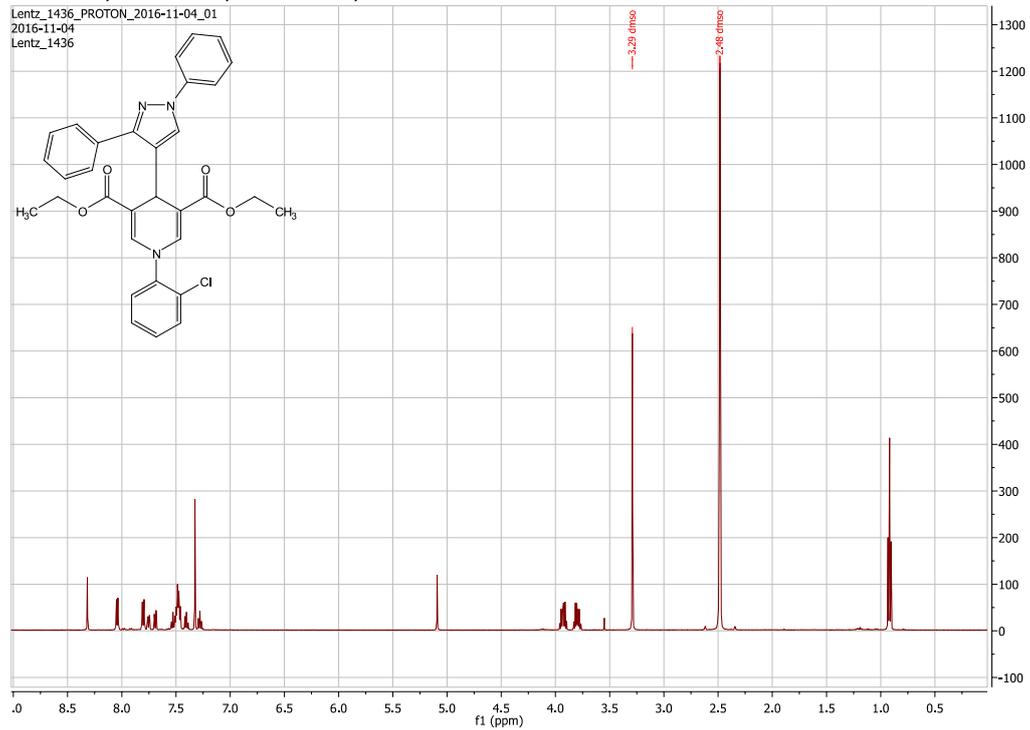


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	15.274	100.000
Total		100.000

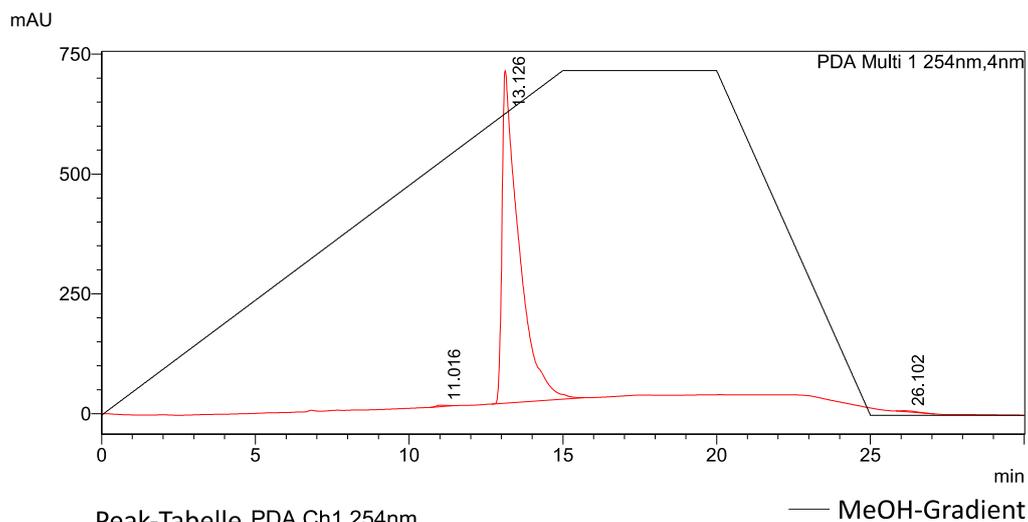
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 21

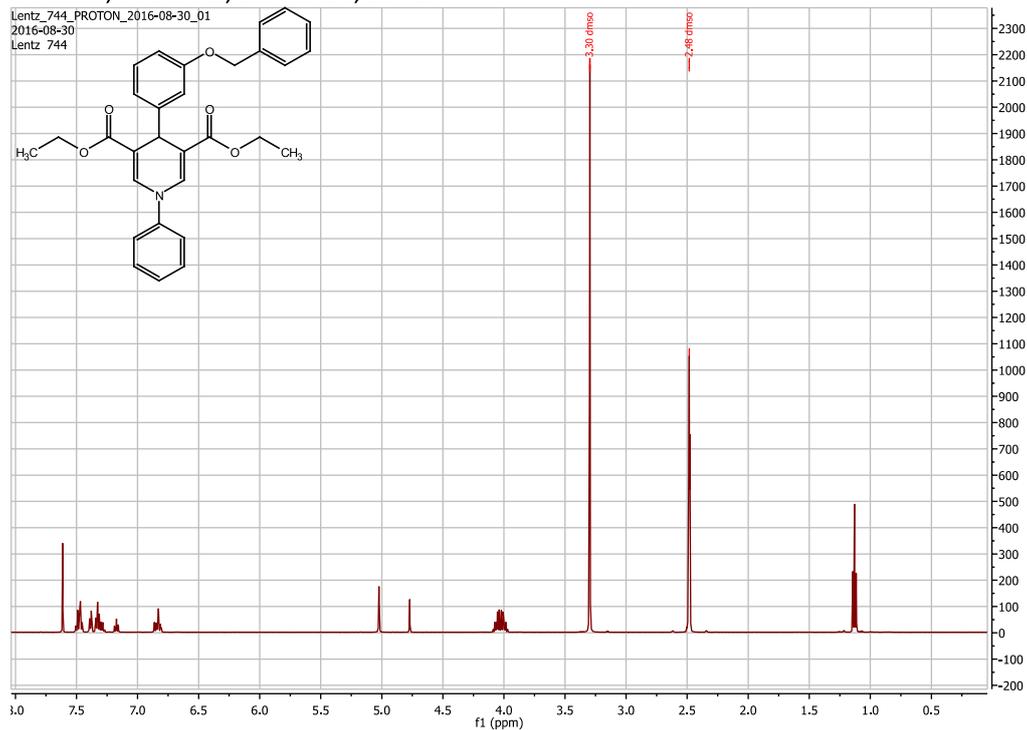
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

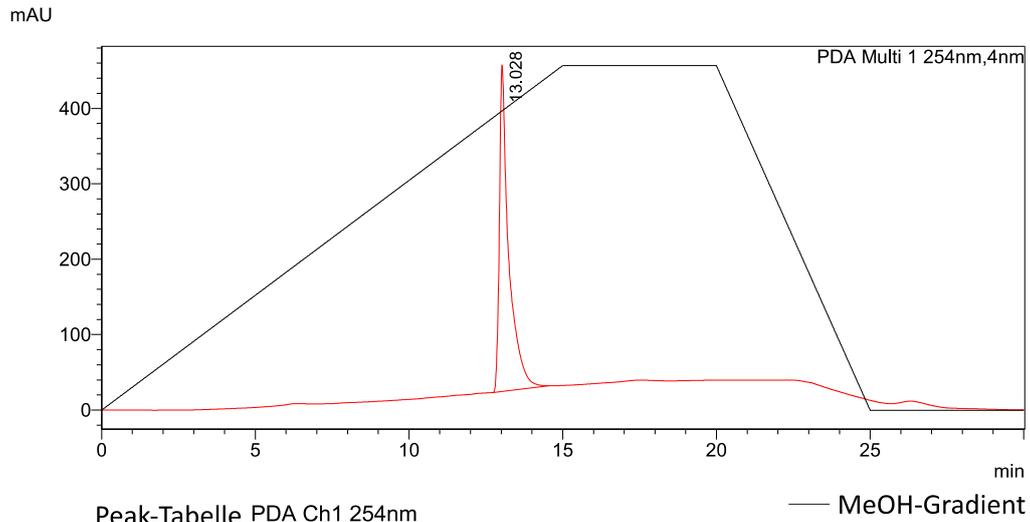
Peak#	Ret. Time	Area%
1	11.016	0.245
2	13.126	99.448
3	26.102	0.307
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 22

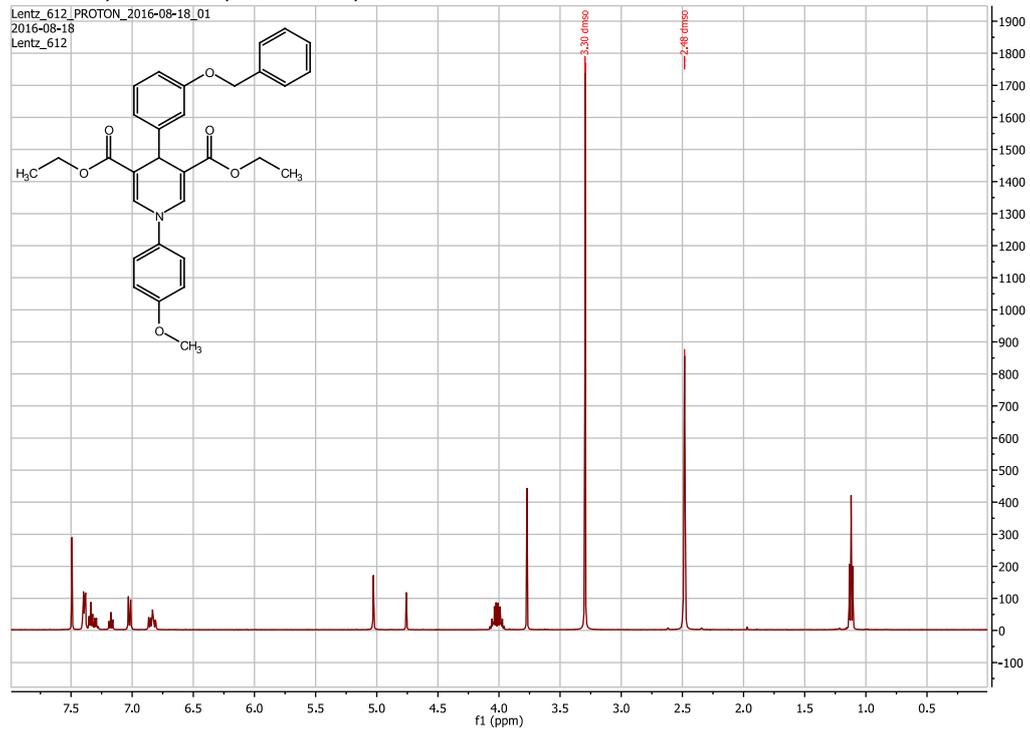
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

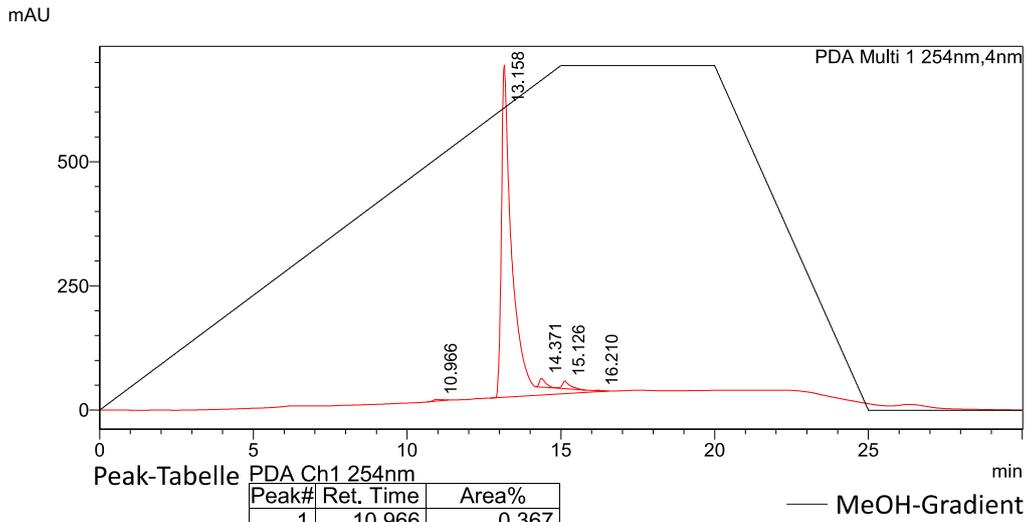
Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.028	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



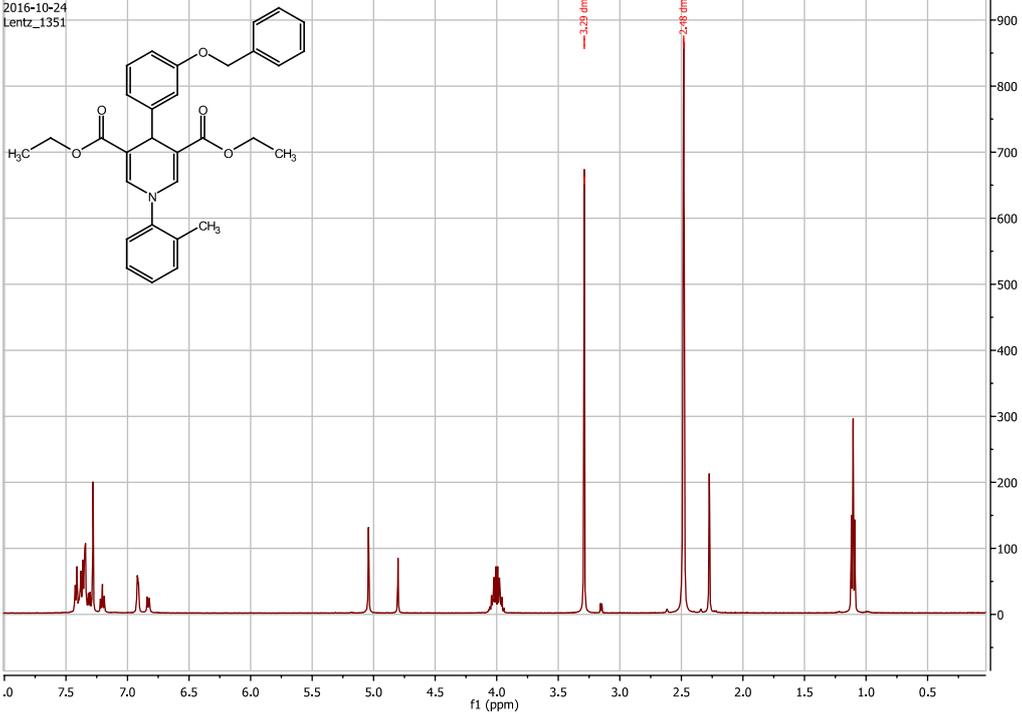
Verbindung Nr 23

HPLC-Chromatogramm



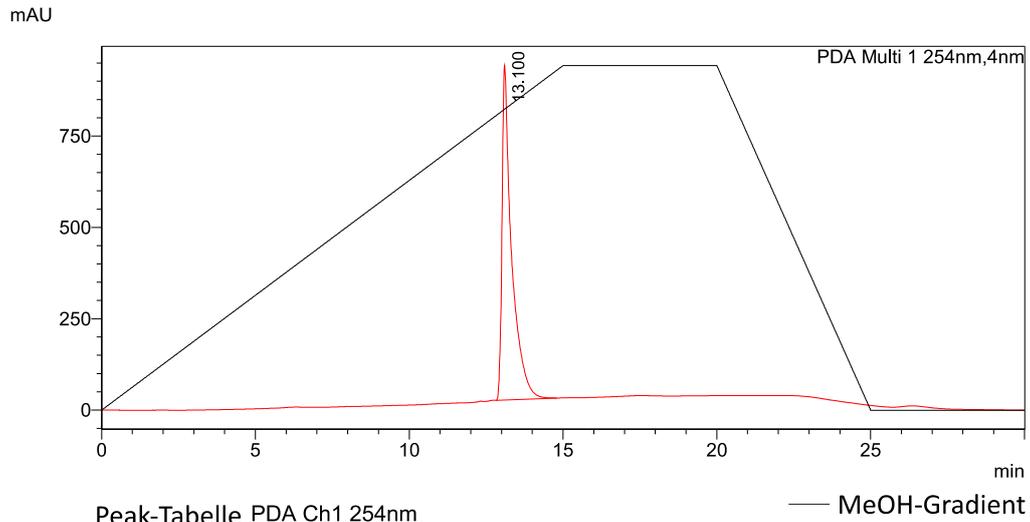
¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C

Lentz_1351_PROTON_2016-10-24_01
2016-10-24
Lentz_1351



Verbindung Nr 24

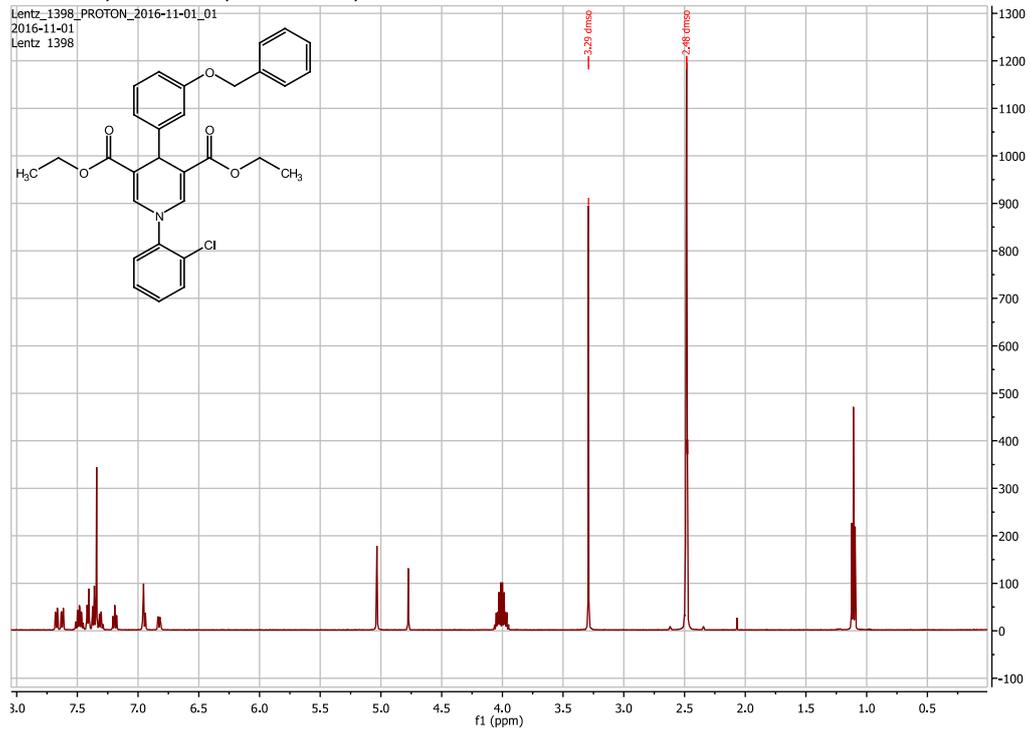
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

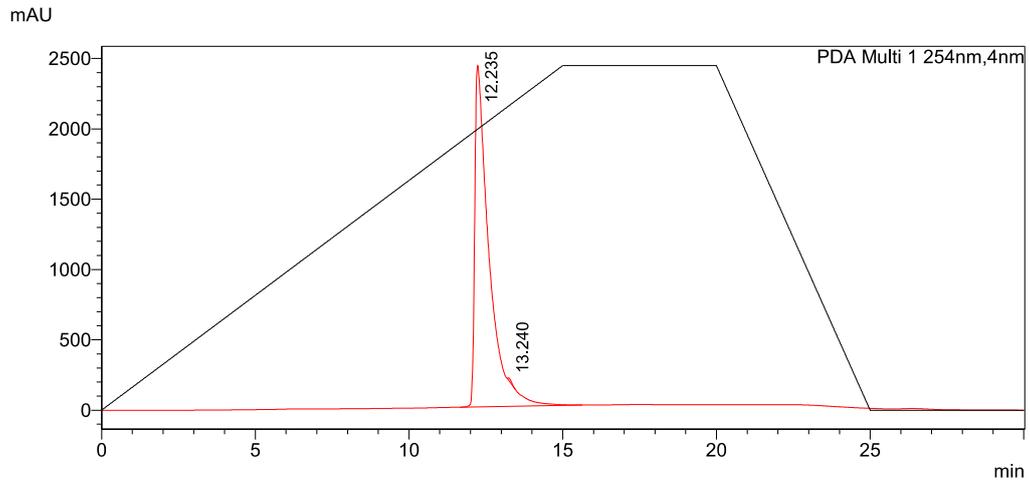
Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.100	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 25

HPLC-Chromatogramm

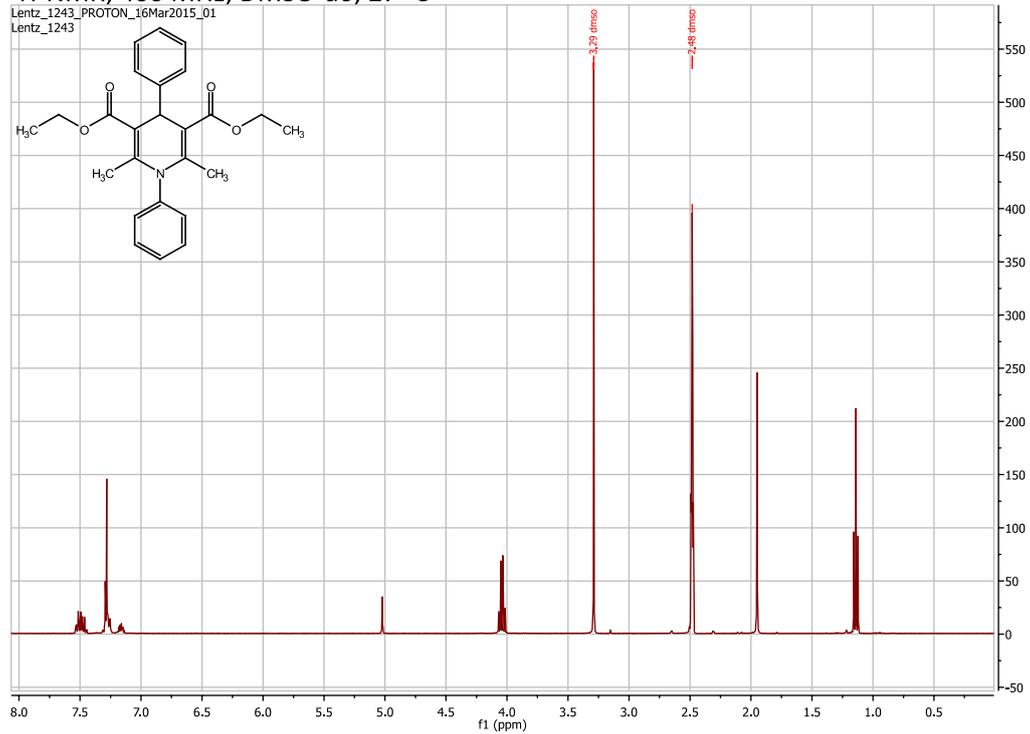


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.235	99.812
2	13.240	0.188
Total		100.000

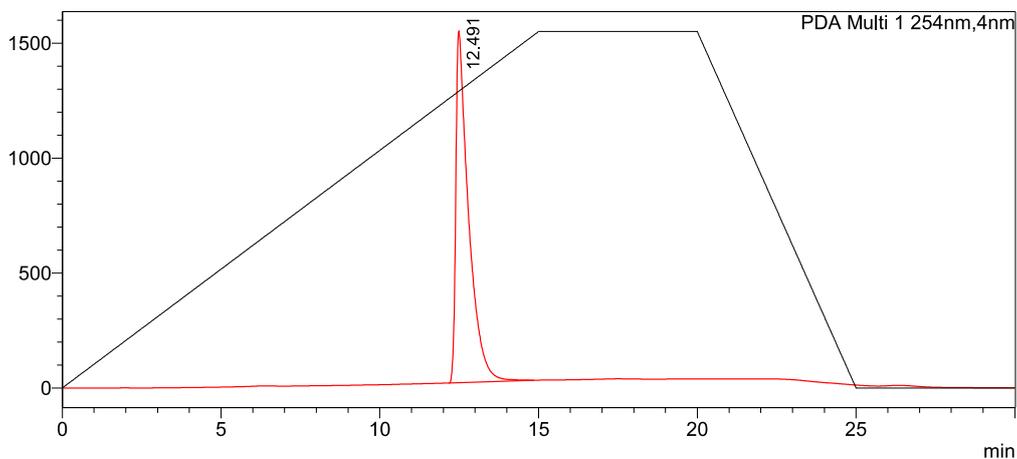
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 26

HPLC-Chromatogramm

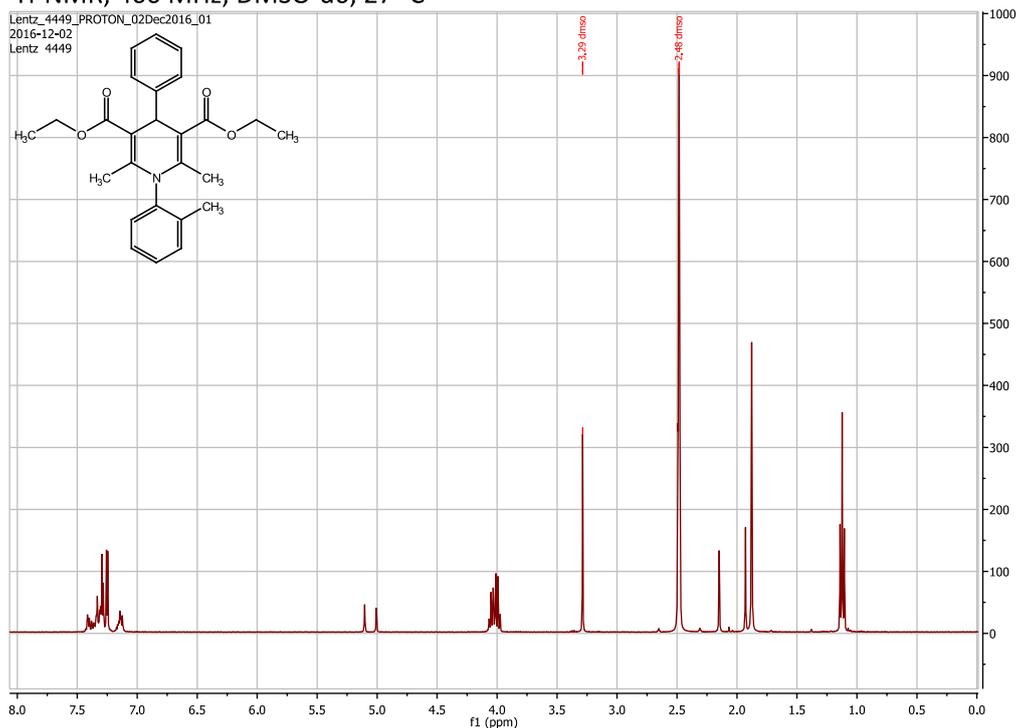


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.491	100.000
Total		100.000

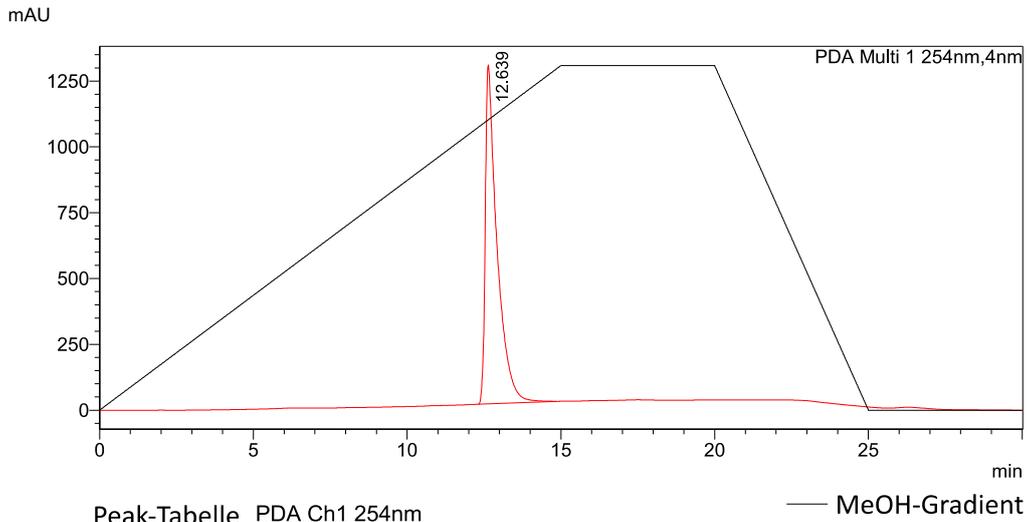
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 27

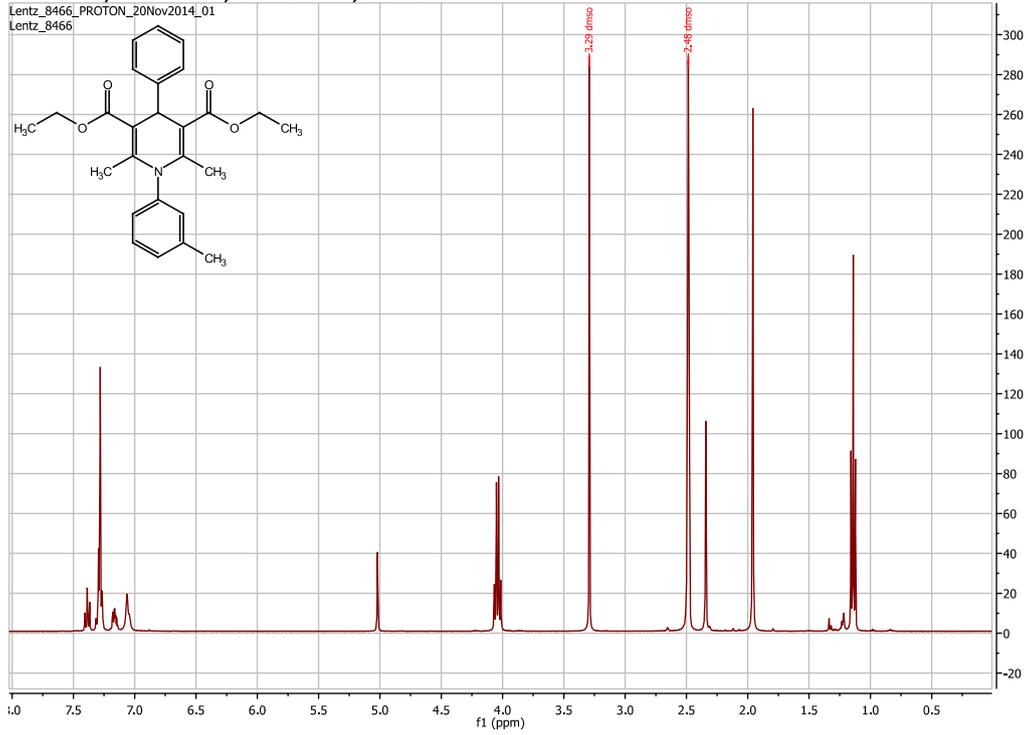
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

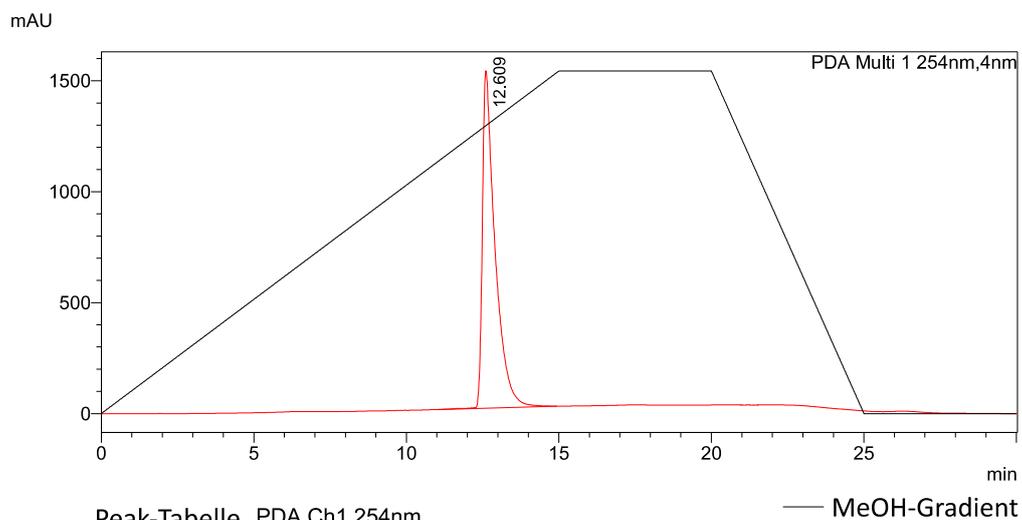
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.639	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 28

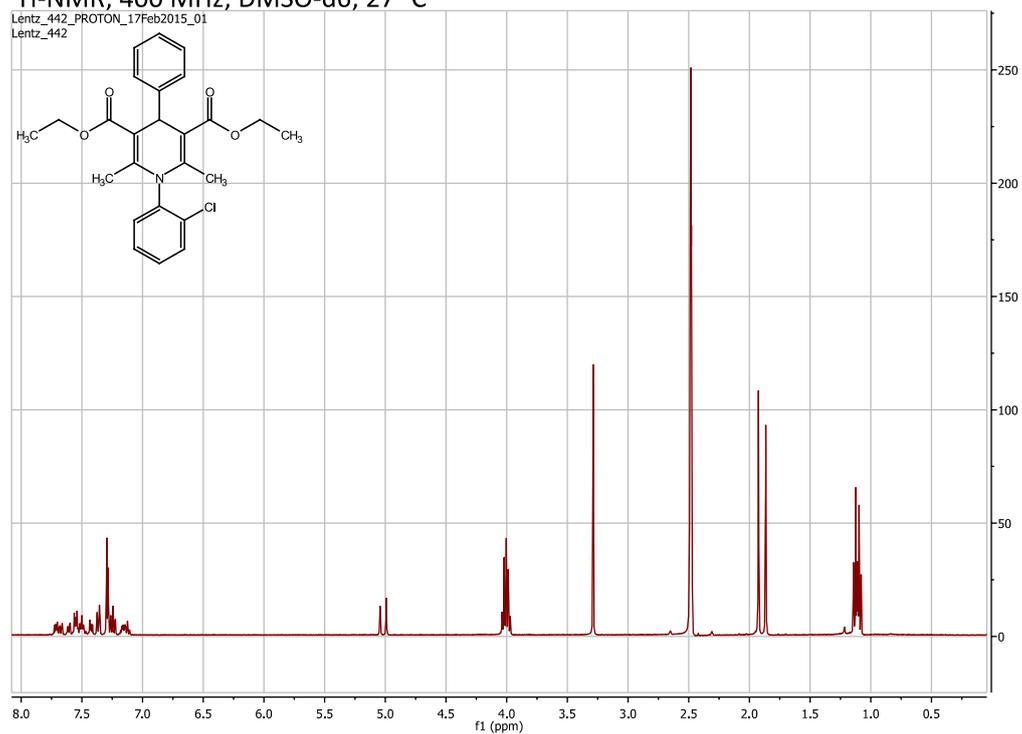
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

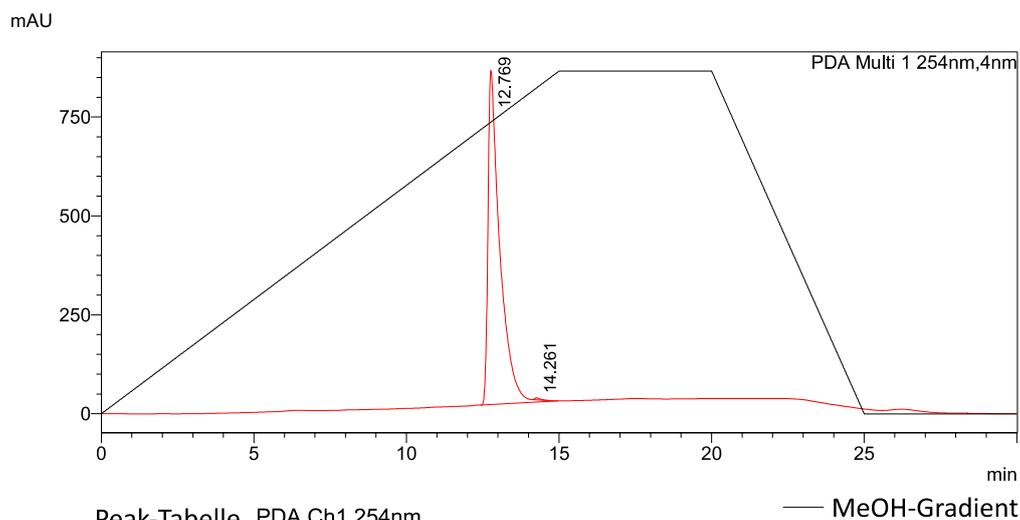
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.609	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 29

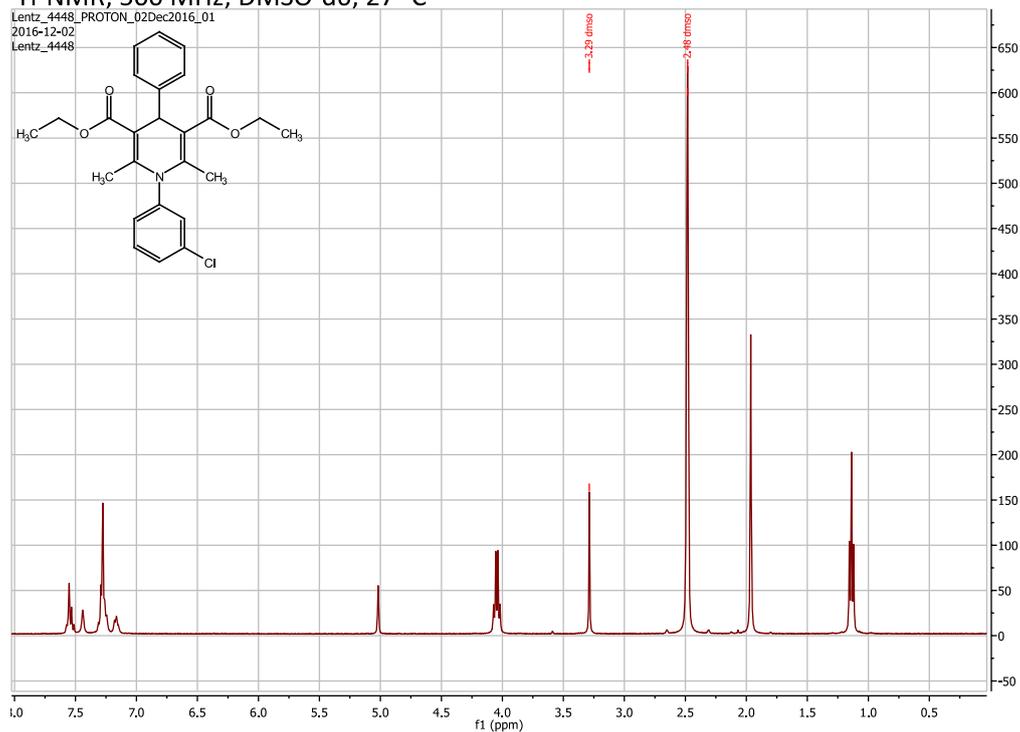
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

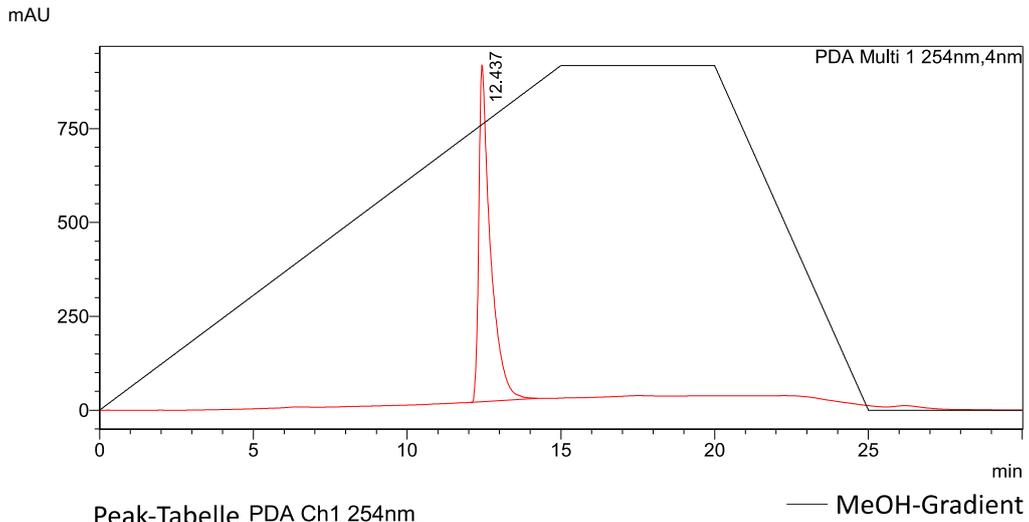
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.769	99.705
2	14.261	0.295
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 30

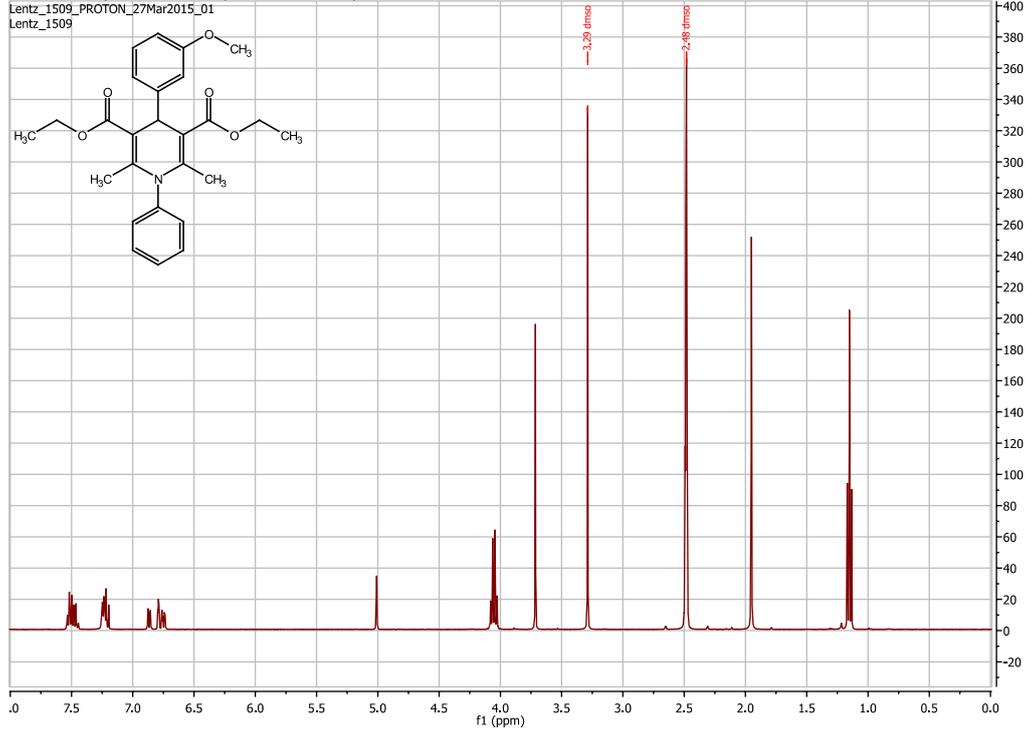
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

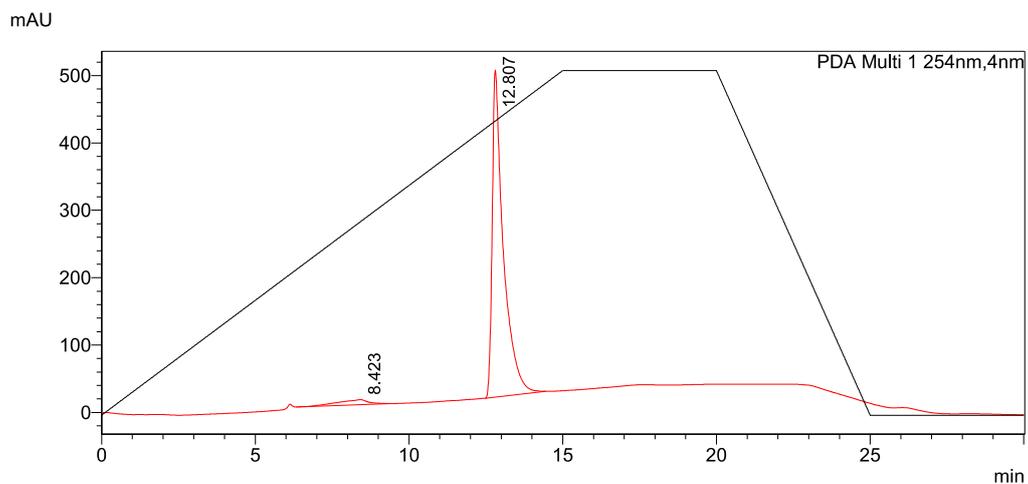
Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.437	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 31

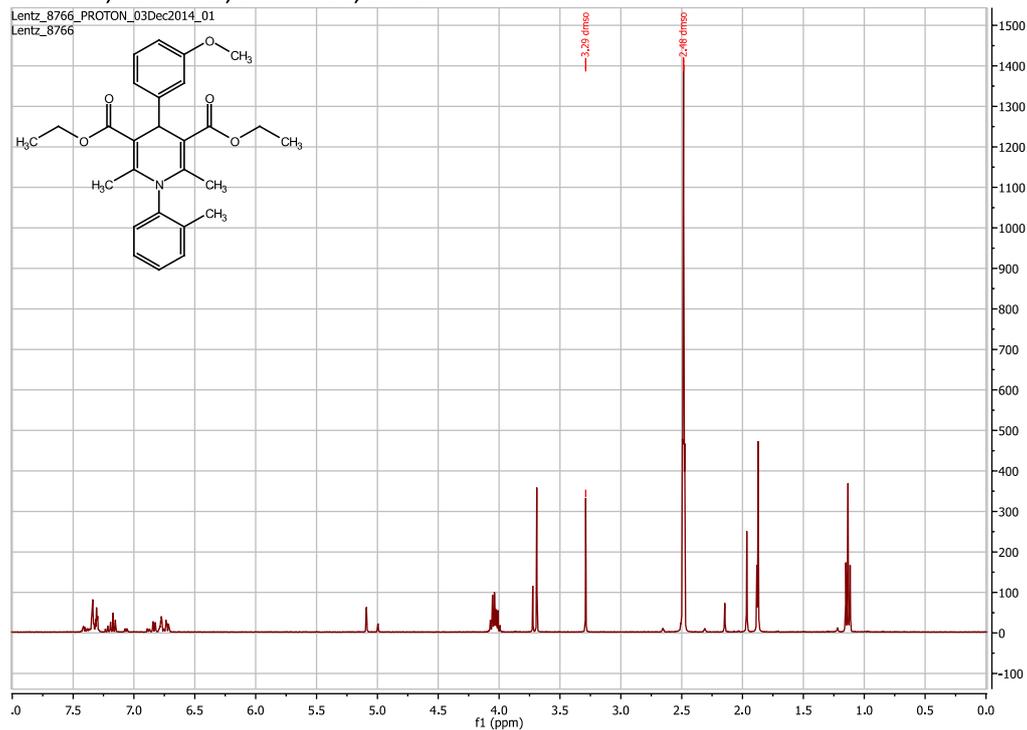
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

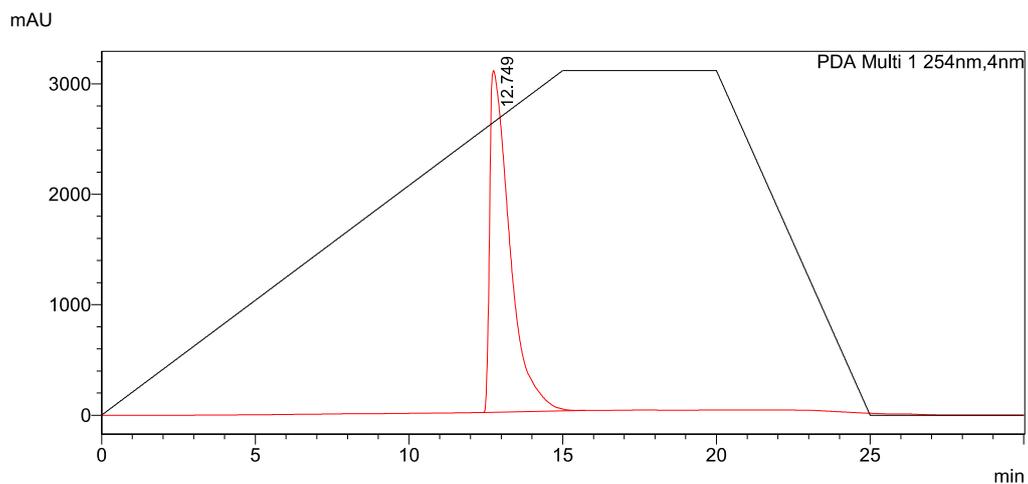
Peak#	Ret. Time	Area%
1	8.423	4.275
2	12.807	95.725
Total		100.000

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 32

HPLC-Chromatogramm

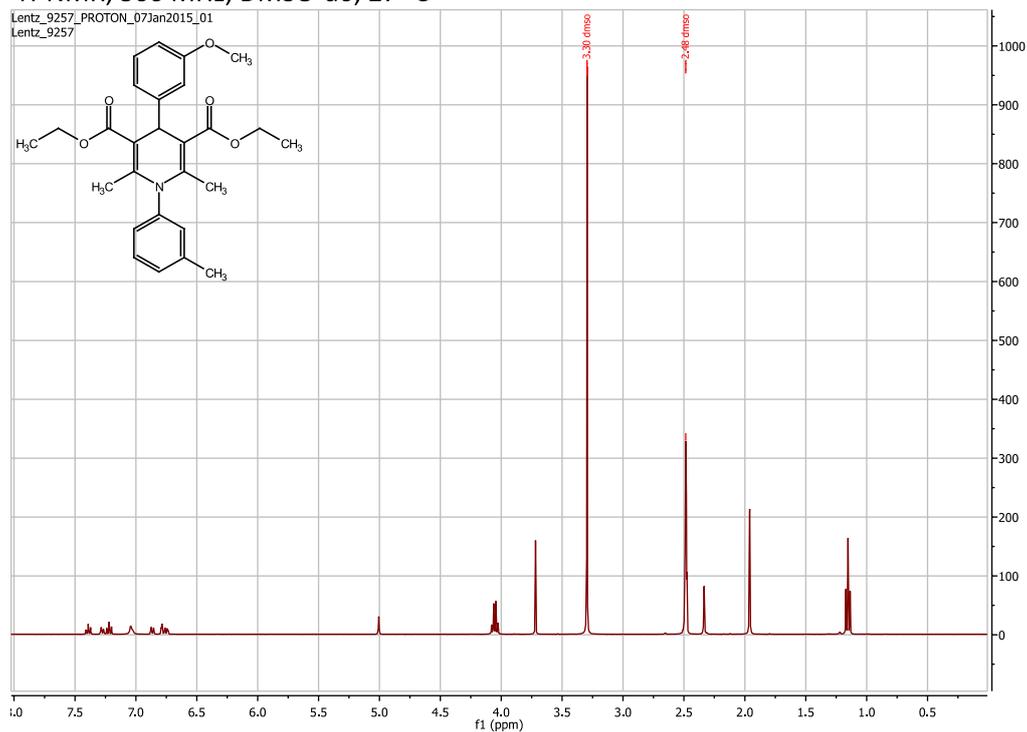


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.749	100.000
Total		100.000

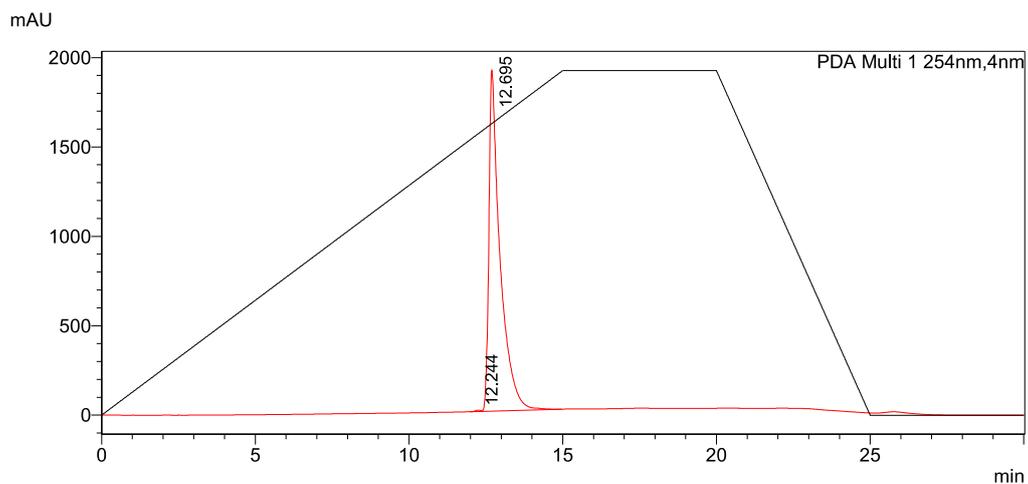
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 34

HPLC-Chromatogramm

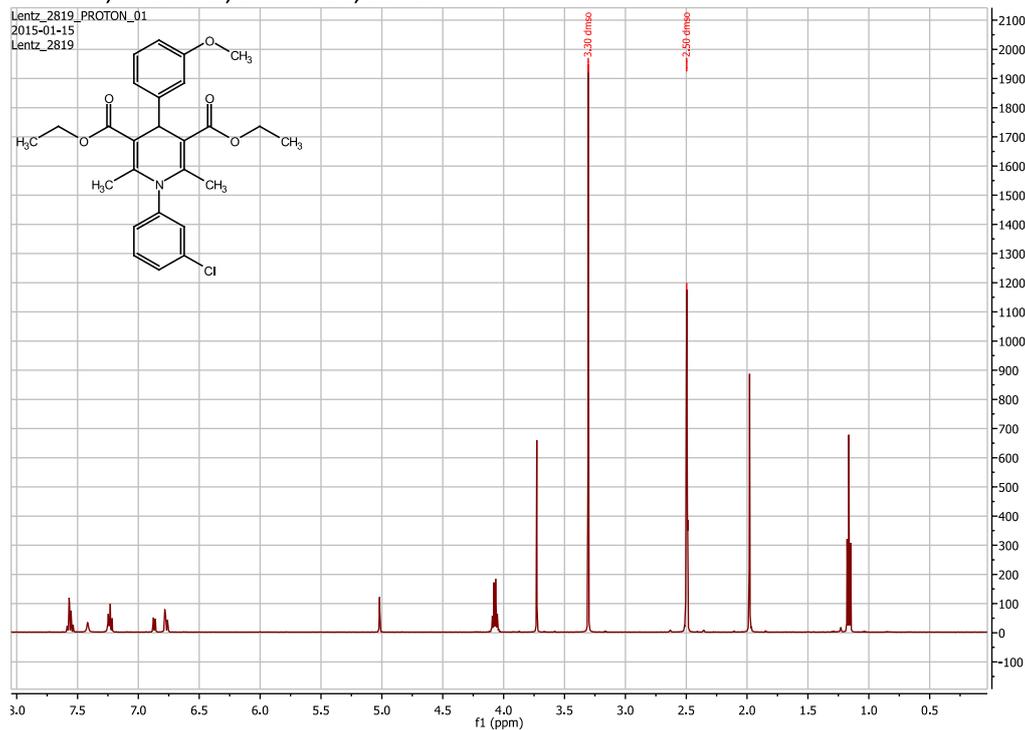


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	12.244	0.199
2	12.695	99.801
Total		100,000

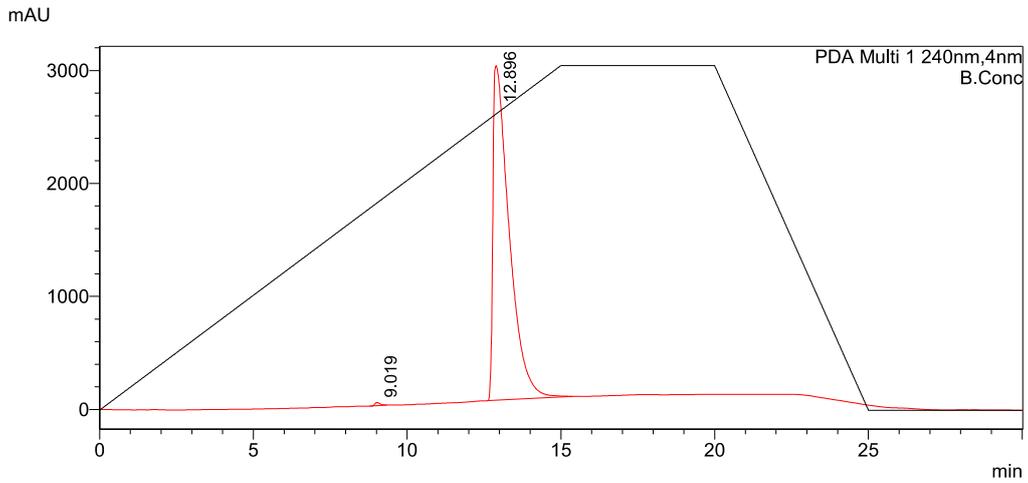
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 500 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 41

HPLC-Chromatogramm

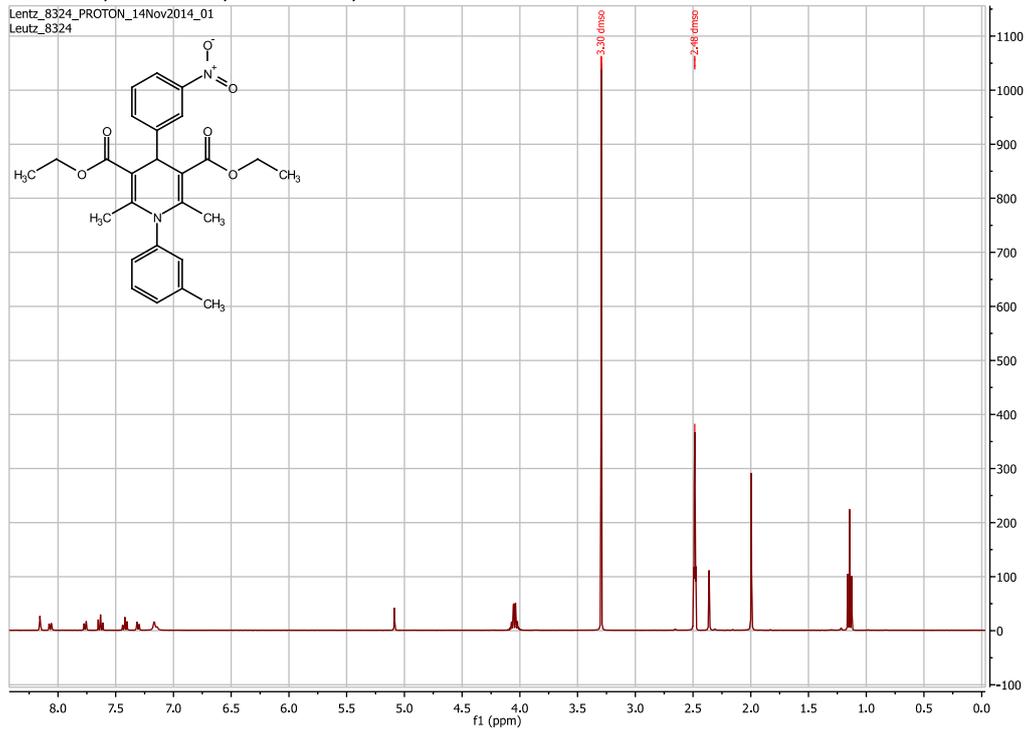


Peak-Tabelle

Peak#	Ret. Time	Area%
1	9.019	0.294
2	12.896	99.706
Total		100.000

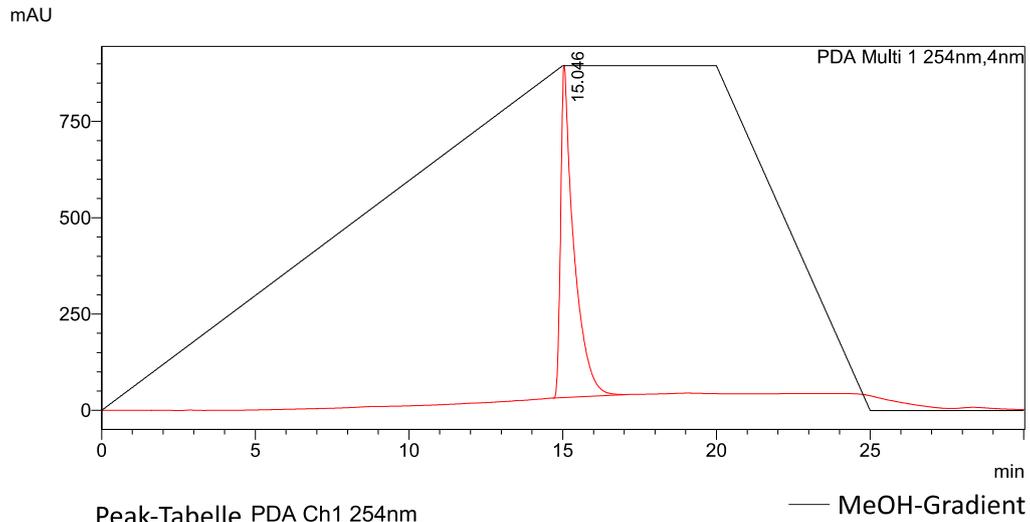
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 45

HPLC-Chromatogramm (Flussrate: 0,5 ml/min)

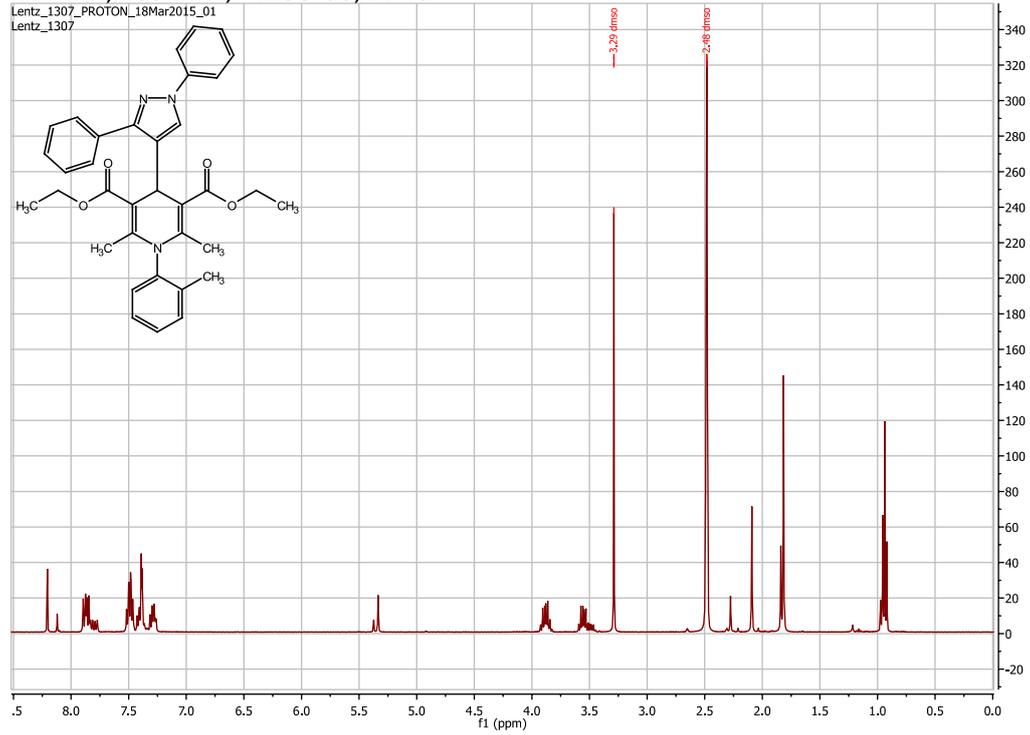


Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	15.046	100.000
Total		100.000

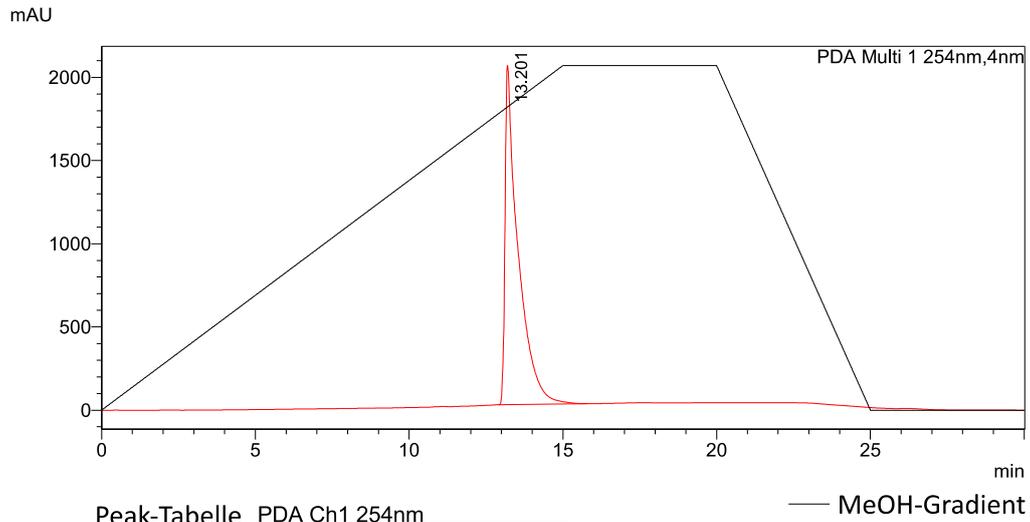
— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 46

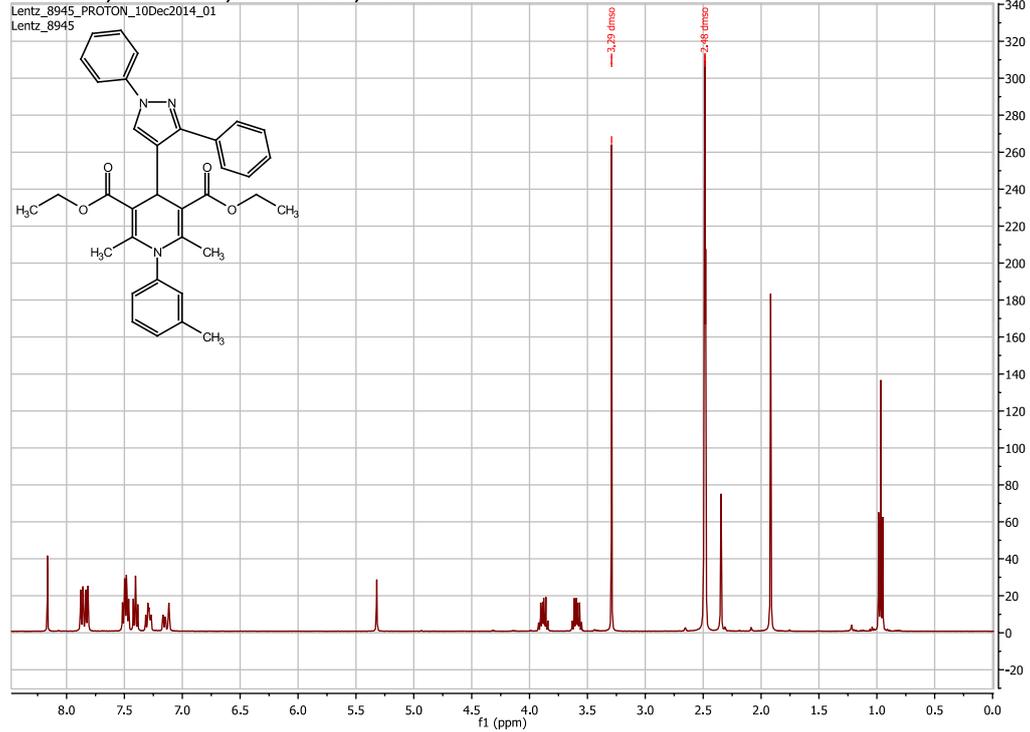
HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 254nm

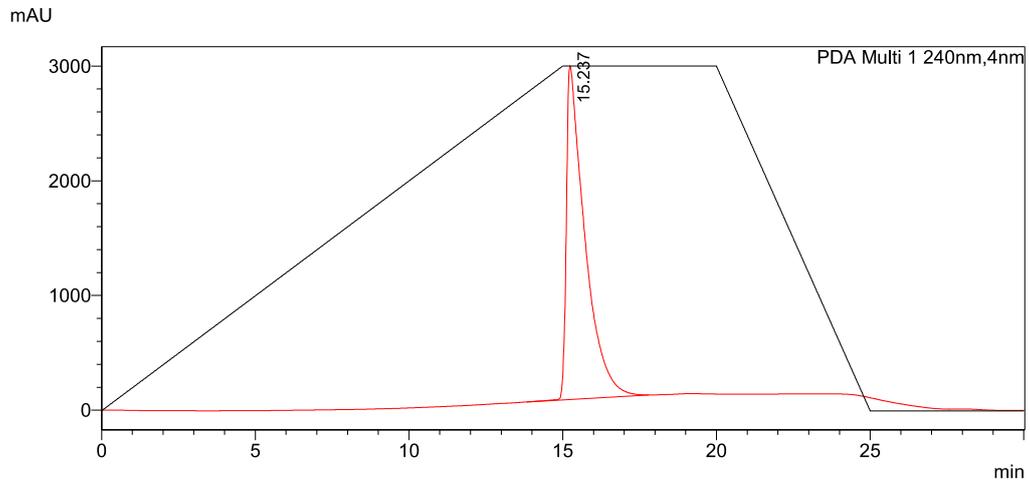
Peak#	Ret. Time	Area%
1	13.201	100.000
Total		100.000

¹H-NMR; 400 MHz; DMSO-d₆; 27 °C



Verbindung Nr 47

HPLC-Chromatogramm



Peak-Tabelle PDA Ch1 240nm

Peak#	Ret. Time	Area%
1	15.237	100.000
Total		100.000

— MeOH-Gradient

¹H-NMR; 400 MHz; CDCl₃; 27 °C

