

Forschungsbericht

Synthese von 2-Phenylindolizin-Derivaten als Inhibitoren für Hyaluronidasen

Name

Inhalt

1	Einleitung.....	3
1.1	Hyaluronsäure ^{1,2,7}	3
1.2	Hyaluronidasen und deren Inhibition ^{1,2,7}	3
2	Aufgabenstellung.....	4
3	Durchführung, Ergebnisse und Diskussion	5
3.1	Synthesemethoden	5
3.2	Synthese der <i>para</i> -substituierten Bromphenylethanone	5
3.3	Synthese der Indolizine	6
3.3.1	Edukte und Mechanismus	6
3.3.2	Das Mikrowellenverfahren mit 2-Methylisonicotinsäure (1) und CM244-2	8
3.3.3	Das Mikrowellenverfahren mit 2-Methylisonicotinsäurenitril (2) und CM244-2 bzw. CM245	9
3.3.4	Synthese von CM255 aus CM244-2 und 2,4-Dimethylpyridin (Lutidin, 3) in der Mikrowelle.....	9
3.3.5	Synthese von CM250 mittels Schmelzverfahren.....	9
4	Zusammenfassung und Ausblick	10
5	Experimenteller Teil	10
5.1	Synthese der Bromphenylethanone ⁴	10
5.2	Synthese von CM252 ⁴	12
5.3	Veresterung von 2-Methylisonicotinsäure (1) ⁶	12
5.4	Synthese der Indolizine CM250 und CM255	12
5.4.1	Synthese von CM255 mittels Mikrowellenverfahren ⁴	12
5.4.2	Synthese von CM250 mittels Schmelzverfahren ⁵	13
6	Anhang	14
6.1	Namensverzeichnis der Substanzen.....	14
6.2	NMR Abkürzungen	14
6.3	NMR-Spektren der Produkte.....	15
7	Quellen	20

1 Einleitung

1.1 Hyaluronsäure^{1,2,7}

Hyaluronsäure (HA) ist ein bis zu 5000 kDa großes Polysaccharid welches in den verschiedenen Kompartimenten der Extrazellulärmatrix von Wirbeltieren vorkommt. Dieses Glycosaminoglycan wird vom HA-Synthase an Plasmamembranen synthetisiert und setzt sich aus 50 bis 50.000 Disaccharidbausteinen (β -glycosidisch verknüpftem N-Acetyl-D-glucosamin mit D-Glucuronsäure) zusammen. Die unterschiedlichen Längen kommen sowohl durch Synthese als auch durch Abbau zu ebenfalls biologisch aktiven Fragmenten vor und die breite Größenverteilung zieht unterschiedliche biologische Funktionen nach sich.

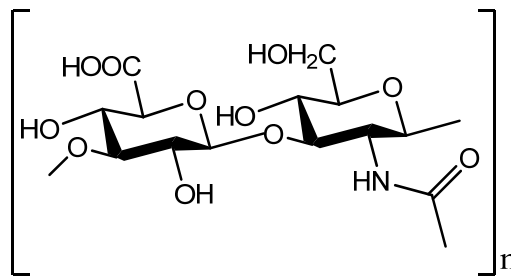


Abbildung 1 Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure

Aufgaben der langkettigen Polymere sind Strukturgebung und Druckschutz des Bindegewebes und Gewährleistung der Gelenkfunktion durch ihr extrem hohes osmotisches Wasserbindungsvermögen. Neben diesen physikalischen Eigenschaften tritt Hyaluronsäure außerdem bei Entzündungsprozessen, Wundheilung und UV-Schutz, Zellmotilität sowie der Angiogenese und Ausbreitung von Tumorgewebe als biochemischer Mediator durch Interaktion mit HA-Zelloberflächenrezeptoren in Erscheinung. Große Fragmente können eine Entzündungsunterdrückung und Hemmung des Tumorwachstums bewirken, werden sie enzymatisch fragmentiert agieren die niedermolekularen Moleküle gegenteilig, also zugunsten des Tumors. Wie die Menge der verschiedenen Komponenten in verschiedenen Geweben reguliert wird ist noch unbekannt.

1.2 Hyaluronidasen und deren Inhibition^{1,2,7}

Partiell abgebaut wird die Hyaluronsäure durch das Enzym Hyaluronidase, eine Glycosidase, die in verschiedenen Organismen in unterschiedlichen Ausführungen zu finden ist. Es gibt also unterschiedliche Hyaluronidasearten, welche sich durch die Fragmente unterscheiden die das Enzym nach der Spaltung hinterlässt.

Die medizinisch-chemische Forschung befasst sich genauer mit den Hyaluronidasen aus Säugetieren, zum Beispiel Hyal 1. Die Fragestellung der Entzündungsunterdrückung und der Hemmung des Tumorwachstums durch HA-Fragmente verursachende Angiogenese steht dabei im Vordergrund, denn das angestrebte Ziel ist, dies mit einer Hemmung des Enzyms und somit einer Verhinderung der Bildung kleinerer Hyaluronsäuremoleküle zu verhindern. Hyaluronidasen sorgen außerdem für einen Abbau der Extrazellulärmatrix und damit dafür, dass sich ein Tumor weiter ausbreiten kann.

Physiologische Hyaluronidaseinhibitoren konnten sowohl im Extrazellulärraum, wo sie wahrscheinlich die extrazelluläre Matrix vor übermäßigem Abbau schützen, als auch in Tumoren

gefunden werden. Dort wurden allerdings unterschiedliche Auswirkungen auf das Tumorwachstum in Abhängigkeit von der Art des Tumors beobachtet.²

Hyaluronidasen wurden auch in Streptokokken gefunden, diese nutzen diese Enzyme um sich den Weg durch die Extrazellulärmatrix ihres Wirtes zu bahnen und erhöhen so ihre Infektiosität. Auf diesem Gebiet wird nach Hyaluronsäureinhibitoren als zukünftige antimikrobielle Wirkstoffe geforscht.³

Um die physiologischen Funktionen der Hyaluronsäuren und Hyaluronidasen genauer zu untersuchen bietet sich an, das Enzym zu hemmen und die Auswirkungen auf Gewebe und Zellen in Assays festzustellen. Am Lehrstuhl pharmazeutische/medizinische Chemie II von Prof. Buschauer an der Universität Regensburg wird an Hyaluronidaseinhibitoren geforscht. Unter anderem wurden verschiedene Indolderivate synthetisiert, die eine gute Hemmwirkung an der bakteriellen Hyaluronidase *SagHyal*₄₇₅₅ aufweisen³. Da Heterozyklen eine enorme strukturelle Vielfalt bieten, liegt es nahe, auf dieser Basis weitere indolverwandte Stammsysteme zu untersuchen, da diese ähnliche elektronische Eigenschaften haben und somit an der Rezeptoren ebenfalls inhibitorisch aktiv sein könnten. Ein Gerüstisomeres des Indols ist das Indolizin (Abbildung 2) welches bei molecular modelling Simulationen (computer-assisted drug design) als Grundstruktur einer weiteren potentiellen Hyaluronidaseinhibitoren-Klasse ermittelt wurde.⁴

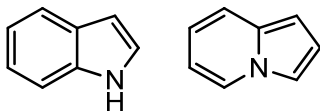


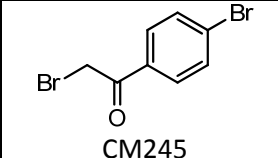
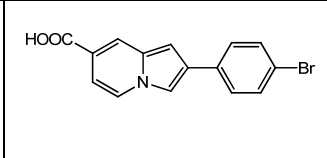
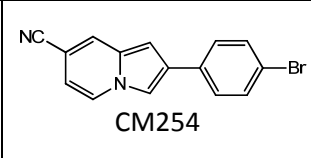
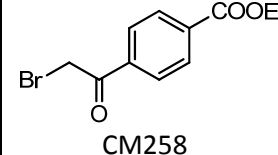
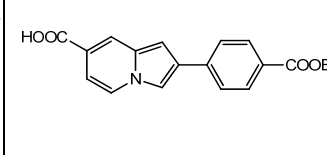
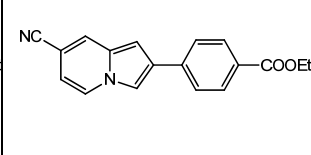
Abbildung 2 Grundgerüst der Indole (rechts) und der Indolizine (links)

2 Aufgabenstellung

Dieses Forschungspraktikum wurde am Lehrstuhl für Pharm./Med. Chemie von Prof. Buschauer an der Universität Regensburg absolviert welche die bakterielle Hyaluronidase untersucht. Arbeitsgruppe beschäftigt sich unter anderem mit der Syntese und Testung von Substanzen, die dieses Enzym hemmen könnten. Zu diesem Zweck werden Bibliotheken von verschiedenen Substanzklassen synthetisiert, die je eine gemeinsame Grundstruktur haben und sich in Seitenketten oder funktionellen Gruppen unterscheiden. In speziellen Assays werden sie auf Inhibition getestet. Dabei haben sich bisher Indole als besonders aktiv erwiesen.³ Aufgabe des Forschungspraktikums war die Synthese einer Reihe von substituierten Indolizinen. Die geplante Substanzbibliothek ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Edukte der oberen Spalte (Pyridinderivate) wurden gekauft, die der ersten Zeile (CM-Substanzen) mussten aus gekauften substituierten Acetophenonen synthetisiert werden.

Tabelle 1: Geplante Indolizin-Substanzbibliothek aus der Kombination von 6 Edukten

Edukte→ ↓	 2-Methylisonicotinsäure	 2-Methylisonicotin-säurenitril	 2,4-Dimethylpyridin (Lutidin)
 CM244-2	 CM252	 CM250	 CM255

 CM245	 CM254	 CM257
 CM258	 CM254	 CM257

3 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesemethoden

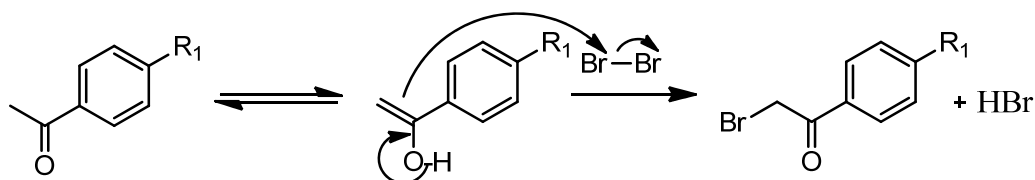
Die an Position 2 bromierten Phenylethanon-Edukte aus Tabelle 1 können durch Bromierung von *para*-substituierten Acetophenonen gewonnen werden. Das Halogenatom stellt in der zweiten Stufe der Indolizinsynthese eine gute Abgangsgruppe dar.

Als zeitsparende und effiziente Methode wird in den letzten Jahren immer mehr das Bestrahlen von Reaktionsgemischen mit Mikrowellen in dicht verschlossenen Gefäßen (Vials) genutzt. Da dabei das Lösungsmittel nicht entweichen kann, ist das Erhitzen über dessen Siedepunkt möglich und die Reaktionszeit kann im Vergleich zum Reflux-Erhitzen im Kolben reduziert werden. Allerdings ist nicht jede chemische Reaktion für eine solche Durchführung geeignet, zum Beispiel mit Gefahrstoffen oder Lösungsmitteln mit niedrigen Siedepunkten als Komponenten.

Alternativen der Indolizinsynthese sind das schon erwähnte konventionelle Reflux-Verfahren und die teilweise lösungsmittelfreie Herstellung in einer Schmelze. Beim Schmelzverfahren wird ausgenutzt, dass sich die Eduktmoleküle dicht beieinander befinden und die applizierte Energie nicht an Lösungsmittelmoleküle abgegeben wird.

3.2 Synthese der *para*-substituierten Bromphenylethanone

Für diese einfache Synthese wurde Brom zum eisgekühlten Reaktionsgemisch gegeben. Methylketone können dadurch sehr leicht bromiert werden, hier sogar ohne Zusätze eines sauren oder basischen Katalysators, denn sobald Bromwasserstoff gebildet wird, fungiert dieser als Autokatalysator durch Protonierung der Edukt-Carbonylgruppe.



Edukte: R₁=

Cl: *para*-Chloracetophenon

Br: *para*-Bromacetophenon

COOEt: Ethyl-*para*-Acetylbenzoat

Produkte: R₁=

Cl (CM244-2)

Br (CM245)

COOEt (CM258)

Abbildung 3 Mechanismus der Synthese der Bromphenylethanone aus *para*-substituierten Acetophenonen

Um die relativ niedrigen Ausbeuten zu steigern könnte die Reaktion in weniger Lösungsmittel und über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Dies stellt kein Problem dar, solange Edukt und Brom in äquivalenten Mengen vorliegen, kommt es zu keinen Nebenreaktionen. Bei einem Brom-Überschuss hingegen tritt eine Zweifachbromierung an der Methylgruppe auf, was beim ersten Ansatz von CM244 gefunden wurde. Versehentlich in zuviel Lösungsmittel gelöst wurde nach 8 Stunden Reaktionszeit keine befriedigende Umsetzung in der DC-Kontrolle gefunden. Daraufhin wurde ein zweites Äquivalent Brom zum Reaktionsgemisch zugesetzt und die Reaktion über Nacht gerührt. Ergebnis ist CM244-1 mit Zweifachbromierung, siehe Abbildung 4.

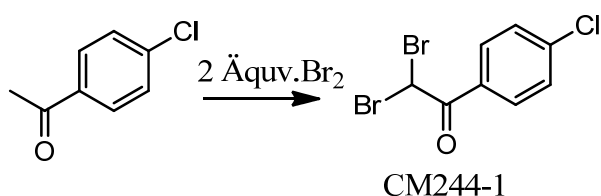


Abbildung 4 Ergebnis der Reaktion mit Bromüberschuss

Diese Substanz wurde bisher nicht für die Indolizinsynthese verwendet. Um CM244-2 zu erhalten wurde das Verfahren mit gleichen Eduktäquivalenten wiederholt.

In Abbildung 5 sind nochmals alle erhaltenen pulverförmigen Produkte der Stufe 1 übersichtshalber aufgeführt. Diese sollten im zweiten Schritt (außer CM244-1) jeweils mit drei Pyridinderivaten zu der Bibliothek mit neun Indolizinen kombiniert werden.

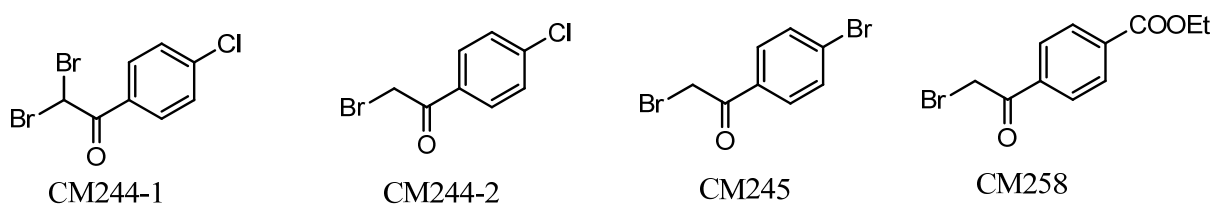


Abbildung 5 Bromierte *para*-substituierte Acetophenone als Ausgangsstoffe für die Indolizinsynthese

3.3 Synthese der Indolizine

3.3.1 Edukte und Mechanismus

Abbildung 6 zeigt die für die nächste Stufe verwendeten Pyridinderivate. 3 ist eine Flüssigkeit, 1 und 2 liegen als kristalline Feststoffe vor.

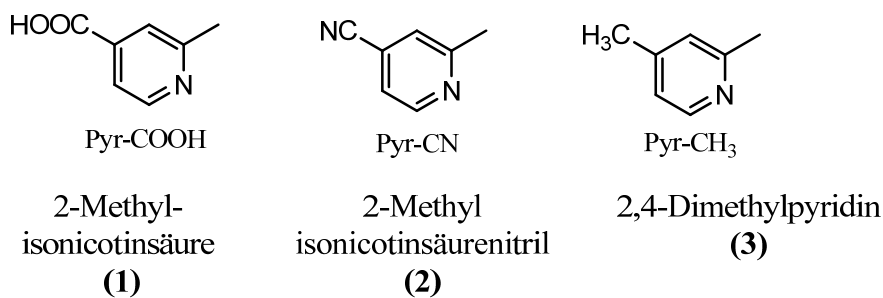
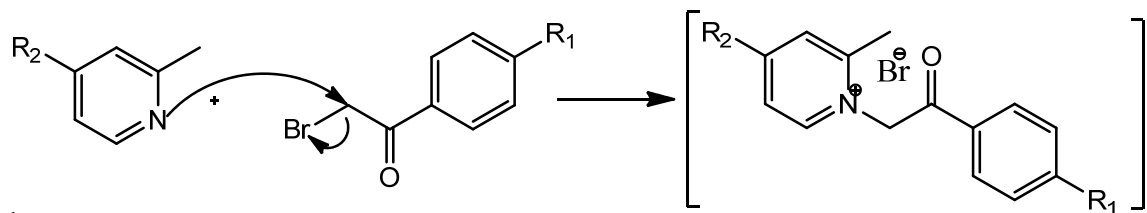


Abbildung 6 Die 3 Pyridinkomponenten als Edukte für die Indolizinsynthese

Es folgt eine Beschreibung des Reaktionsmechanismus. Unter Erhitzen (Mikrowelle, Heizblock) greift das freie Elektronenpaar des Pyridinstickstoffs nucleophil das bromierte Kohlenstoff-Elektrophil an. In dieser S_N2-Reaktion entsteht das wasserlösliche Bromsalz des Adduktes.



Edukte: R₂=
 COOH: 2-Methylisonicotinsäure (1)
 CN: 2-Methylisonicotinsäurenitril (2)
 CH₃: 2,4-Dimethylpyridin (3)

R₁=
 Cl: CM244-2
 Br: CM245
 COOEt: CM258

Abbildung 7 Reaktion der Pyridinderivate mit den Bromphenylethanonen zum Bromsalz

Durch den erhöhten Elektronenzug am positiv geladenen Stickstoff ist die schon vorhandene Basizität der Methylgruppe am Pyridin erhöht. Bei anschließender Behandlung mit einer Base wird dieses sauerste Proton abgespalten, da außerdem das entstehende Zwitterion mesomeriestabilisiert ist und mit seiner ungeladenen Form im Gleichgewicht vorliegt.

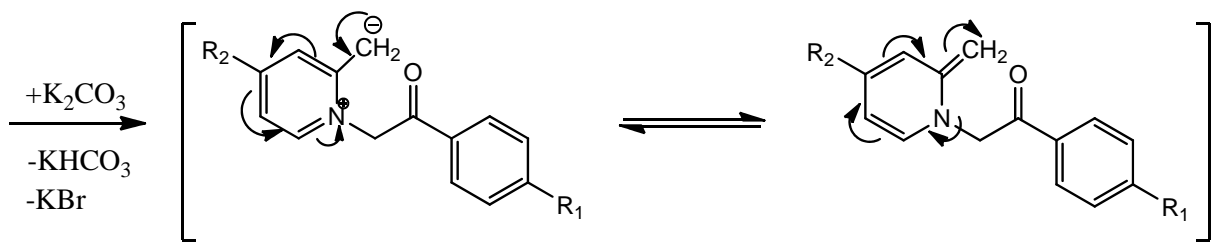


Abbildung 8 Mesomeriestabilisierung des Zwitterions nach Deprotonierung

Im anschließenden Ringschlussprozess erfolgt ein Angriff des Anions am elektrophilen Zentrum der Carbonylgruppe. Sofort erfolgt die Eliminierung der entstandenen Hydroxygruppe als Wasser zum komplett konjugierten System, was die Reaktion vorantreibt. Diese substituierten 2-Phenylindolizine sind die gewünschten Produkte. Während dieser Arbeit wurden zwei davon mit unterschiedlichen Methoden synthetisiert.

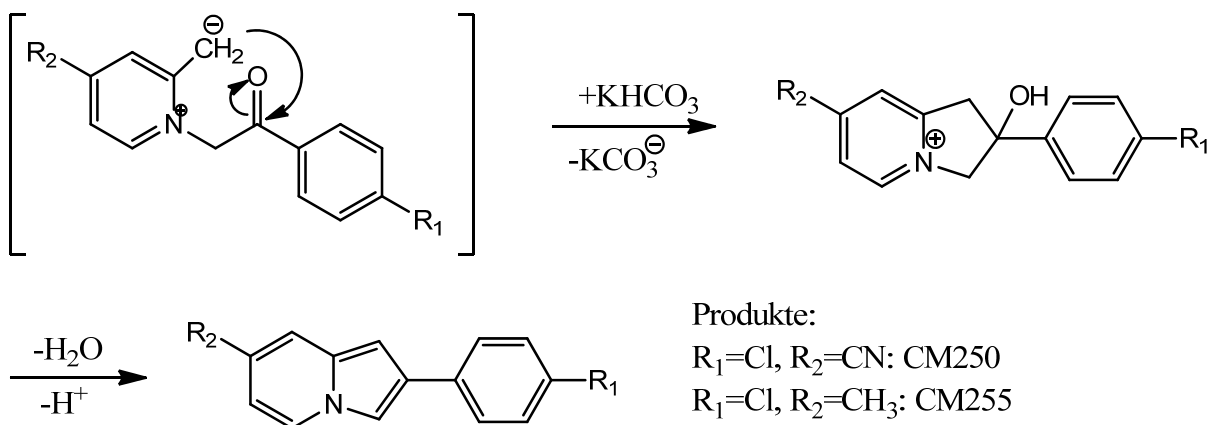


Abbildung 9 Reaktionsfolge zu den Endprodukten

3.3.2 Das Mikrowellenverfahren mit 2-Methylisonicotinsäure (1) und CM244-2

Der erste Ansatz wurde mit CM244-2 und 1 versucht, Zielmolekül war CM252.

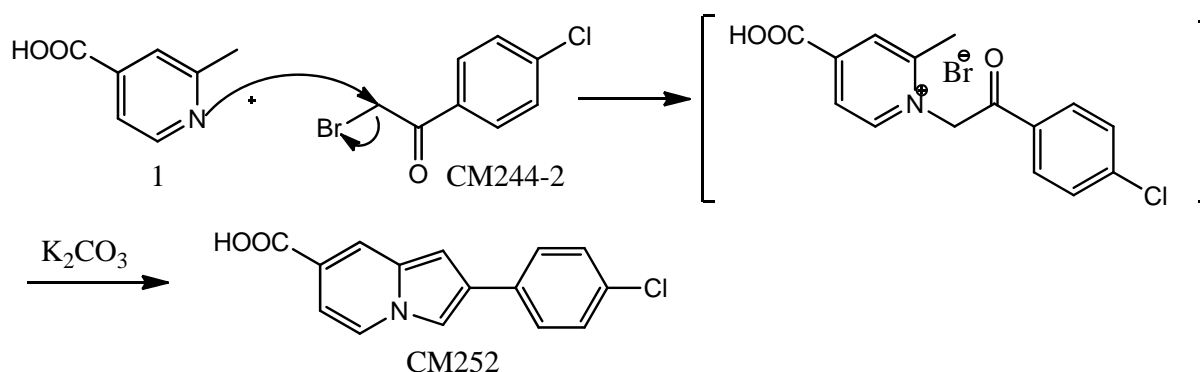


Abbildung 10 Reaktionsfolge für die Synthese von CM252

Dies scheiterte aber schon am Lösen von 1 in für das Mikrowellenverfahren vorgesehenem Aceton. Es wurden daraufhin ausführliche Löslichkeitstests inklusive Erwärmen und Ultraschall mit der Substanz durchgeführt, dabei stellte sich heraus, dass 1 nur in Dichlormethan (welches aufgrund des hohen Dampfdrucks nicht im versiegelten Vial in der Mikrowelle bestrahlt werden kann) oder in einem Methanol-Überschuss bzw. einem Gemisch aus Methanol und Salzsäure löslich ist. Im zweiten Fall ist die Löslichkeit durch Protonierung des Stickstoffs gegeben, wodurch das Molekül aber wahrscheinlich nicht mehr reagieren kann, weil das freie Elektronenpaar nicht mehr zur Verfügung steht, wie im Reaktionsmechanismus Abbildung 7 dargestellt. Daraufhin wurde 1 vorläufig nicht für die Synthese in der Mikrowelle verwendet.

Als alternative Herstellungsmethode wurden die Edukte im Kolben unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Um 1 zu lösen, war ein Überschuss an heißem Methanol nötig, wodurch der Ansatz stark verdünnt wurde. Die Kontroll-DCs zeigten viele kleine Spots aber keine eindeutige Produktzone. Auch wurde kein Niederschlag des Bromsalzes erhalten. Deshalb wurden die Komponenten des Ansatzes komplett mit Säulenchromatographie getrennt. Das Bromsalz-Zwischenprodukt wurde zwar gefunden aber in so geringer Menge dass sich eine weitere Bearbeitung nicht lohnte. Alle anderen Zonen waren Edukte und Nebenprodukte.

Um die Löslichkeit von 1 zu verbessern wurde eine Veresterung durchgeführt, die in Abbildung 11 gezeigt ist. Deren Produkt CM251 wurde in dieser Arbeit nicht weiterverwendet.

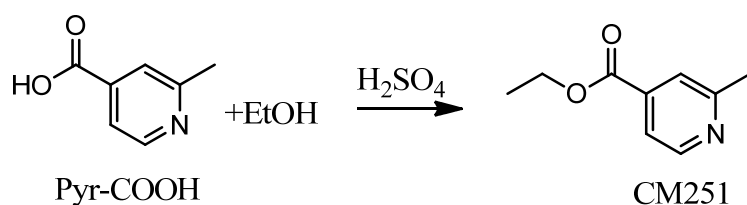


Abbildung 11 Veresterung von Pyr-COOH (2-Methylisonicotinsäure)

Als Lösung für das Problem bietet sich an, die Reaktion in der Mikrowelle trotzdem durchzuführen, da Temperatur, Druck und Rühren des Reaktionsgemisches für eine Erhöhung der Löslichkeit sorgen könnten. Außerdem könnte eine Durchführung im Aceton-Überschuss versucht werden, wodurch die Ausbeute allerdings erheblich sinken würde. Auch das Schmelzverfahren wie in 5.4.2 beschrieben sollte mit den übrigen Edukten versucht werden.

3.3.3 Das Mikrowellenverfahren mit 2-Methylisonicotinsäurenitril (2) und CM244-2 bzw. CM245

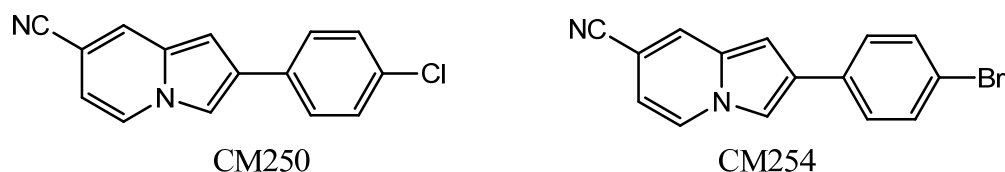


Abbildung 12 Gewünschte Indolizinderivate als Produkte der Synthese von Pyr-CN mit CM244-2 (für CM250) und CM245 (für 254)

Die nächsten Ansätze wurden mit 2 und CM244-2 durchgeführt, wobei sich 2 im Gegensatz zu 1 sehr gut in Wasser löst. Das Stoffgemisch war allerdings während des Verfahrens sehr unbequem zu handhaben. Die Lösungen verfärbten sich schwarz unter Mikrowellenbestrahlung schwarz und abgeschiedener schwarzer Feststoff verklebte am Vial-Rand. Nach erster MW-Bestrahlung zum Salz konnte das Zwischenprodukt nicht oder nur in Spuren gefunden werden und es war auch kein definierter Niederschlag entstanden. Auch nach dreistündiger Mikrowellenbestrahlung hatte sich kein Produkt gebildet, teilweise wurde die Edukte von Stufe 1 wiedergefunden. Diese Reaktion sollte innerhalb von 10 min ablaufen und war somit nicht erfolgreich.

Als CM245 statt CM244-2 verwendet wurde, zeigte das Reaktionsgemisch das gleiche Aussehen und Verhalten, die Reaktion war ebenfalls nicht erfolgreich. Dies und die Tatsache, dass das Mikrowellenverfahren mit CM244-2 und 3 funktioniert (3.3.4), lässt darauf schließen, dass für die Reaktionsbedingungen an die Eigenschaften der Pyridinkomponente angepasst werden muss.

Ursache könnte der negative induktive Effekt der Nitrilgruppe am Pyridin sein, der die Verfügbarkeit des freien Elektronenpaares herabsetzt. Die Synthese des gewünschten Indolizins CM250 aus den Edukten CM244-2 und 2 wurde mittels trockener Schmelze erfolgreich durchgeführt (siehe 3.3.4)

3.3.4 Synthese von CM255 aus CM244-2 und 2,4-Dimethylpyridin (Lutidin, 3) in der Mikrowelle

Deshalb wurde als dritter Pyridin-Reaktionspartner einer mit elektronenschiebender Methylgruppe gewählt (3), die Reaktion funktionierte mit diesen Edukten wie gewünscht, CM244-2 und 3 wurden zu CM255 verknüpft. Lediglich das Bromsalz-Zwischenprodukt konnte nicht in Wasser gelöst sondern nur mithilfe von Ultraschall suspendiert werden. 3 wird ohne Probleme mit den Edukten CM245 und CM258 im Mikrowellenverfahren verknüpft werden können. Ursache ist wie schon gesagt vermutlich die elektronenschiebende Methylgruppe, die die Reaktion im Vergleich zu den stark elektronenziehenden Gruppen in 1 und 2 sehr erleichtert. Dadurch wird die Elektronendichte im freien Stickstoffelektronenpaar erhöht.

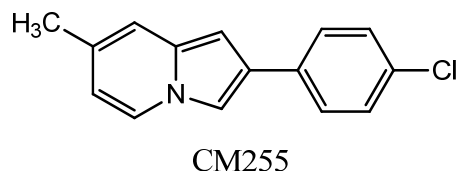


Abbildung 13 Zielmolekül CM255

3.3.5 Synthese von CM250 mittels Schmelzverfahren

Diese Methode wurde mit den Edukten CM244-2 und 2 durchgeführt und hat problemlos funktioniert und lieferte ein sehr reines Produkt. Die Edukte haben unterschiedliche Schmelzpunkte,

es kann deshalb sein, dass das Verfahren nicht für alle Substanzen angewendet werden kann. Als Alternative zum Mikrowellenverfahren sollte es für die fehlenden Produkte mit elektronenziehenden Gruppen am Heterozyklus genutzt werden, vor allem für 1, bei welchem die Löslichkeitsproblematik vorliegt.

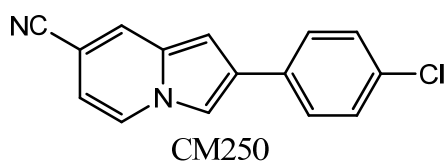


Abbildung 14 Zielmolekül CM250

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zwei der neun Substanzen der gewünschten Indolizin-Bibliothek wurden mit unterschiedlichen Methoden synthetisiert. Nicht alle Edukte stellten sich als für das Mikrowellenverfahren geeignet heraus. Dabei kommt es auf die chemischen Eigenschaften der jeweiligen Pyridinkomponente an, deren Löslichkeit, Schmelzpunkt und Reaktionsfähigkeit ausschlaggebend für die Wahl der Methode ist. Das mit einem elektronenschiebenden Rest versehene Lutidin (3) kann in der Mikrowelle mit den restlichen halogenierten Acetophenonen zur Reaktion gebracht werden. Die Schmelzmethode bietet sich für die beiden Isonicotinsäurederivate mit ihren elektronenziehenden Resten als Alternative an, mit ihr sollten alle restlichen, nicht durch Mikrowellenbestrahlung zugänglichen Produkte hergestellt werden.

Auf diese Weise kann die Indolizin-Bibliothek um Substanzen mit anderen Seitenkettenmodifikationen erweitert werden.

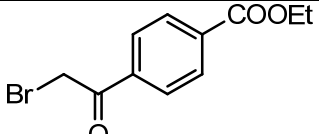
5 Experimenteller Teil

5.1 Synthese der Bromphenylethanone⁴

Einwaagen:

Tabelle 2 Einwaagen für die Bromierung der Acetophenonderivate

Stoffmenge /Einwaage Edukt	Einwaage Br ₂	Produkt	Struktur
<i>para</i> -Chlor-Acetophenon 1,25 mmol/194 mg	188 mg (0,06 ml)	CM244-1	
<i>para</i> -Chlor-Acetophenon 30 mmol/4,64 g	4,79 g (1,54 ml)	CM244-2	
<i>para</i> -Brom-Acetophenon 30 mmol/6 g	4,79 g (1,54 ml)	CM245	

Ethyl- <i>para</i> -Acetylbenzoat 20,8 mmol/4 g	3,4 g (1,1 ml)	CM258	
--	----------------	-------	---

Die jeweiligen Substanzeinwaagen der Ausgangsstoffe wurden in einer Mischung aus 1,7 ml/mmol Dichlormethan und 3,3 ml/mmol Dioxan gelöst und in einem Eisbad auf unter 20 °C gekühlt. Brom wurde tropfenweise mit einer Pipette unter schnellem Rühren zugegeben und bis zur Entfärbung gewartet. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gebracht und über Nacht gerührt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser (200 ml) wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Als Produkt wurde ein weißer Feststoff erhalten. Zur Reinigung wurde das Produkt in 100 % Ethanol umkristallisiert.

Ausbeuten:

Tabelle 3 Ausbeuten der Bromierung der Acetophenone

CM244-1	100 mg	34,4 %
CM244-2	3,92 g	56 %
CM245	5,33 g	64 %
CM258	3,01 g	53,4 %

Analytik:

¹H-NMR von CM244-1: (400Mhz, CDCl₃): δH=8,05 (m, 2H, arom. H), 7,49 (m, 2H, arom. H), 6,60 (s, 1H, CBr₂H)

¹H-NMR von CM244-2: (400Mhz, CDCl₃): δH=7,94 (m, 2H, arom. H), 7,48 (m, 2H, arom. H), 4,41 (s, 2H, CBrH₂)

¹H-NMR von CM245: (400Mhz, CDCl₃): δH=7,85 (m, 2H, arom. H), 7,64 (m, 2H, arom. H), 4,40 (s, 1H, CBrH₂)

¹H-NMR von CM258: (400Mhz, CDCl₃): δH=8,16 (m, 2H, arom. H), 8,04 (m, 2H, arom. H), 4,47 (s, 2H, CBrH₂), 4,42 (q, 2H, ³J_{HH}=7,14 Hz, COOCH₂CH₃), 1,42 (t, 3H, ³J_{HH}=7,14 Hz, COOCH₂CH₃)

DC: Diethylether/Petrolether 1:4, Detektion: Fluoreszenzlösung unter UV-Lampe 254 nm

Tabelle 4 DC-Analytik der Bromphenylethanone

Substanz	Rf-Wert
CM244-1	0,75
CM244-2	0,68
CM245	0,68
CM258	0,49

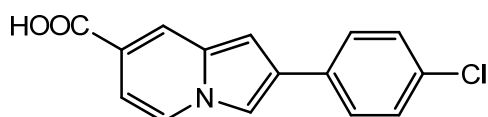
Schmelzpunkt:

Tabelle 5 Schmelzpunkte der Bromphenylethanone

Substanz	Schmelzpunkt [°C]
CM244-1	95
CM244-2	98
CM245	113
CM258	79

5.2 Synthese von CM252⁴

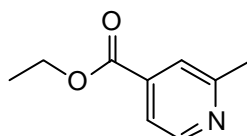
250 mg (1,8 mmol) CM244-2 wurde zusammen mit 2-Methylisonicotinsäure in einem Überschuss Methanol über Nacht unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel auf ein kleineres Volumen reduziert und mit einem Volumenüberschuss Kieselgur vermischt. Die Suspension wurde erneut eingedampft bis ein fließfähiges Pulver erhalten wurde und in eine Hilfssäule überführt. Durch Säulenchromatographie unter der Verwendung eines Petrolether/Diethylethergradienten (Beginn: 0 % Petrolether, Ende: 20 % Petrolether) erfolgte die Auftrennung des Gemisches. Die gefundene Menge Produkt (Bromsalz-Zwischenstufe) war für eine Weiterverarbeitung nicht ausreichend, die Synthese nicht erfolgreich.



5.3 Veresterung von 2-Methylisonicotinsäure (1)⁶

Eine Mischung von 200 mg (1,45 mmol) Ausgangssubstanz in 3 ml (2 ml/mmol) Ethanol 100 % und 0,1 ml (0,05 ml/mmol) konzentrierter Schwefelsäure wurde über Nacht unter Rückflusskühlung erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der restliche Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 20 ml 1 M Na₂CO₃-Lösung aufgenommen. Aus dieser Lösung wurde das Produkt 2x mit Ether extrahiert. Nach dem Abrotieren des Ethers wurde das Produkt als durchsichtige viskose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 0,1 g (41,75 %)



Analytik:

¹H-NMR (400 Mhz, CDCl₃): δH=8,64 (m, 1H, arom. H), 7,71 (m, 1H, arom. H), 7,64 (m, 1H, arom. H), 4,40 (q, 2H, ³J_{HH}=7,14 Hz, COOCH₂CH₃), 2,63 (s, 3H, Pyridin-CH₃), 1,40 (t, 3H, ³J_{HH}=7,14 Hz, COOCH₂CH₃)

DC: Diethylether/Petrolether 1:4, Detektion: Fluoreszenzlösung unter UV-Lampe 254 nm, Rf=0,22

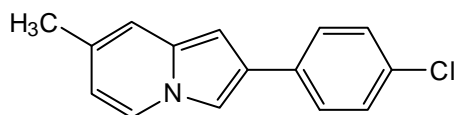
5.4 Synthese der Indolizine CM250 und CM255

5.4.1 Synthese von CM255 mittels Mikrowellenverfahren⁴

Anmerkung: die Flüssigkeit Lutidin ist giftig, flüchtig und von äußerst unangenehmem Geruch, wurde mit einer 1 ml-Spritze und Kanüle entnommen.

460 µl (430 mg, 4 mmol) Lutidin (2,4-Dimethylpyridin) und 933 mg (4 mmol) CM244-2 wurden in 8 ml (2 ml/mmol) Aceton gelöst und in der Mikrowelle für eine Stunde bei 140 °C bestrahlt. Ein grauer Niederschlag wurde erhalten, der abfiltriert und mit Aceton gewaschen wurde. Mithilfe von Ultraschall wurde dieser in heißem Wasser suspendiert und mit 0,42 g (4 mmol) Na₂CO₃ versetzt. Nach 10 min in der Mikrowelle bei 140 °C wurde ein voluminöser grauer Niederschlag erhalten, der alles Wasser aufgesaugt hatte. Dieser wurde in Dichlormethan gelöst, 2x mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Eine dunkelgrau-silbrige, metallartige, leichte Substanz wurde erhalten.

Ausbeute: 0,31 g (32 %)



Analytik:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δH=7,79 (d, 1H, arom. H), 7,55 (m, 2H, arom. H), 7,46 (d, 1H, arom. H), 7,33 (m, 2H, arom. H), 7,08 (s, 1H, arom. H), 6,50 (d, 1H, arom. H), 6,30 (dd, 1H, arom. H), 2,27 (s, 3H, Ar-CH₃)

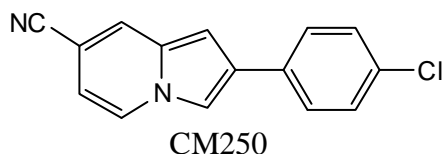
DC: Diethylether/Petrolether 1:4, Detektion: blaue Zonen im sichtbaren Licht, blaue Fluoreszenz unter UV 254 nm, Rf=0,64

Schmelzpunkt: >200 °C (verkohlt zu schwarzem Rückstand)

5.4.2 Synthese von CM250 mittels Schmelzverfahren⁵

410 mg (3,47 mmol) 2-Methyl-Cyanopyridin und 810 mg (3,47 mmol) CM244-2 wurden in einen Rundkolben eingewogen und auf einem Heizblock bei 120-130 °C unter vorsichtigem Rühren geschmolzen. Nach 5-10 min erstarrte die Schmelze zu einer orangegelben Masse. Zur Entfernung von nicht umgesetzten Ausgangsprodukten wurde die nach dem Erkalten pulverisierte Masse je 5x mit einem Überschuss Petrolether ca. 5 min ausgekocht und nach dem Erkalten und Absetzen des Feststoffes der Petrolether-Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Nach dem letzten Aufkochen wurde der Petrolether noch heiß über Vakuum abgesaugt und der gelbe Feststoff mit heißem PE gewaschen. Dieses Pulver wurde in 50 ml (10 ml/mmol) Wasser gelöst, mit einem Überschuss an Na₂CO₃ versetzt und unter Rühren kurz zum Sieden erhitzt. Dabei bildete sich ein voluminöser, rotbrauner Schaum, der nach ein paar Minuten halbfest wurde und bei weiterer Wasserzugabe flockig in Suspension ging. Dieser wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen, danach in DCM gelöst, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert, abschließend am Vakuum getrocknet. Als Produkt wurde ein rotbraunes Pulver erhalten.

Ausbeute: 300 mg (34 %)



Analytik:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δH=9,03 (d, 1H, arom. H), 8,11 (d, 1H, arom. H), 7,76 (m, 2H, arom. H), 7,55 (d, 1H, arom. H), 7,47 (m, 2H, arom. H), 7,00 (s, 1H, arom. H), (dd, 1H, arom. H)

¹³C-NMR (100 MHz, d-DMSO): δC=133.51, 132.60, 132.09, 131.76, 129.69, 128.91, 127.65, 119.52, 117.95, 116.59, 112.07, 99.32, 94.96

DC: Diethylether/Petrolether 1:4, Detektion: blaue Fluoreszenz unter UV 254 nm, Zonen verfärben sich allmählich auch im sichtbaren Licht blau, Rf=0,68

Schmelzpunkt: 192-195 °C

6 Anhang

6.1 Namensverzeichnis der Substanzen

CM244-1	2,2-Dibromo-1-(4-bromophenyl)ethanon
CM244-2	2-Bromo-1-(4-chlorophenyl)ethanon
CM245	2-Bromo-1-(4-bromophenyl)ethanon
CM250	2-(4-Chlorophenyl)-indolizin-7-carbonitril
CM251	Ethyl 2-methylisonicotinat
CM252	2-(4-Chlorophenyl)-indolizin-7-carbonsäure
CM254	2-(4-Bromophenyl)-indolizin-7-carbonitril
CM255	2-(4-Chlorophenyl)-7-methylindolizin
CM258	Ethyl 4-(2-bromoacetyl)benzoat
1	2-Methylisonicotinsäure
2	2-Methylisonicotinsäurenitril
3	2,4-Dimethylpyridin (Lutidin)

6.2 NMR Abkürzungen

Kennzeichnung der NMR-Peaks in den analytischen Daten:

s	Singulett
d	Dublett
dd	Doppeldublett
t	Triplett
m	Multiplett

6.3 NMR-Spektren der Produkte

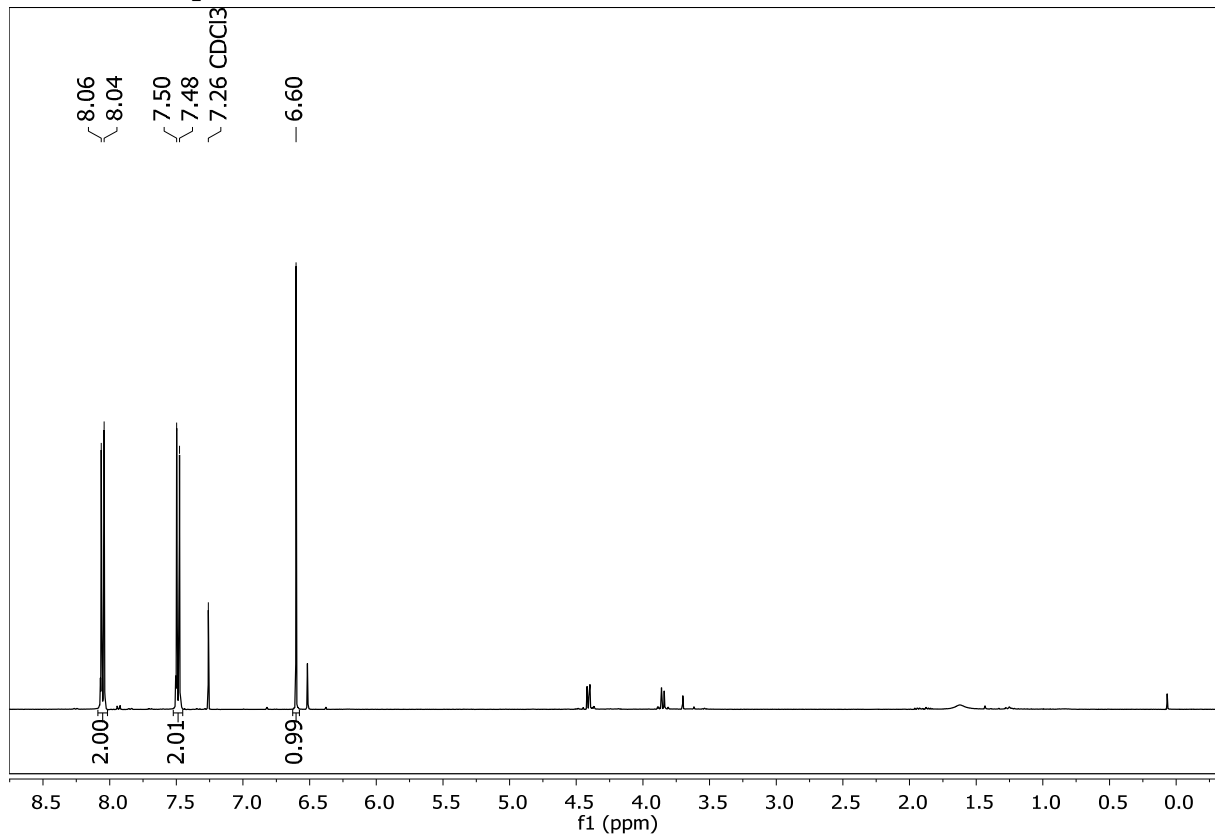


Abbildung 15 ¹H-NMR-Spektrum von CM244-1

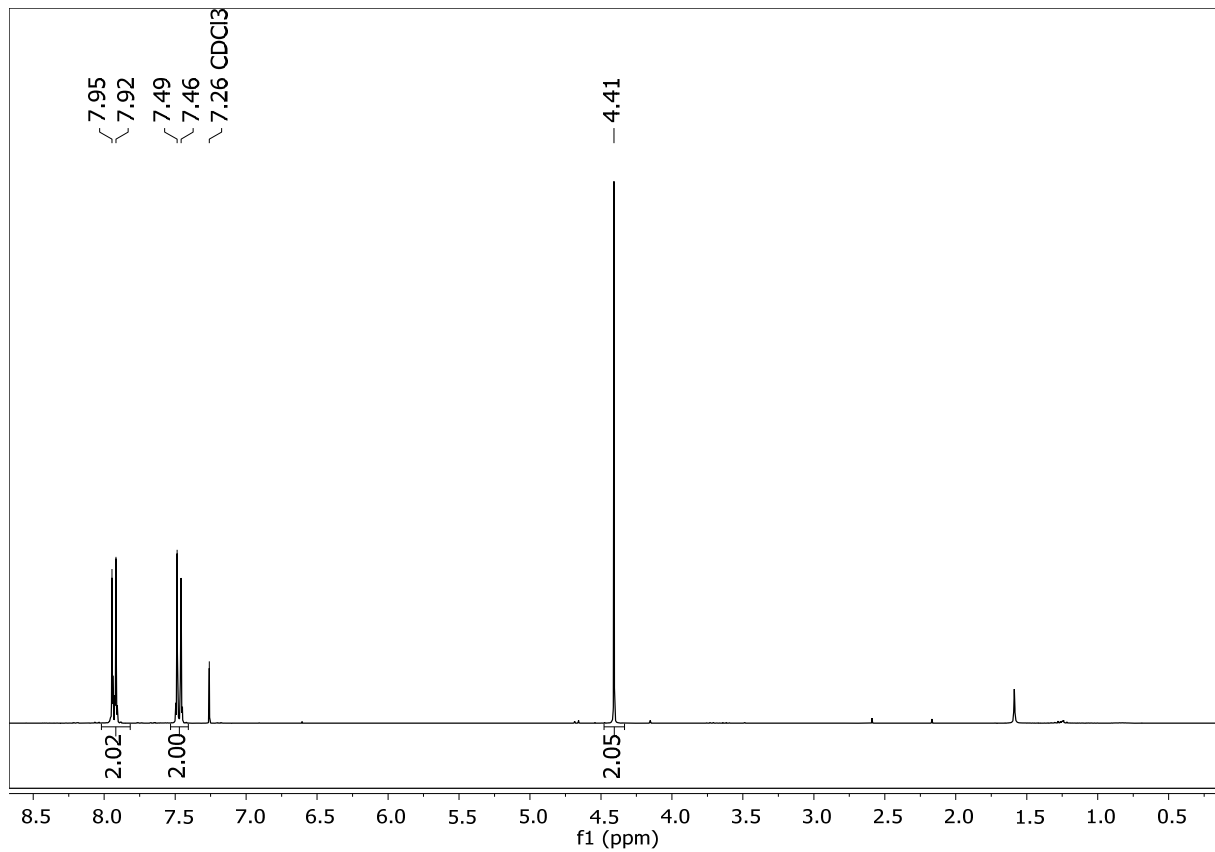


Abbildung 16 ¹H-NMR-Spektrum von CM244-2

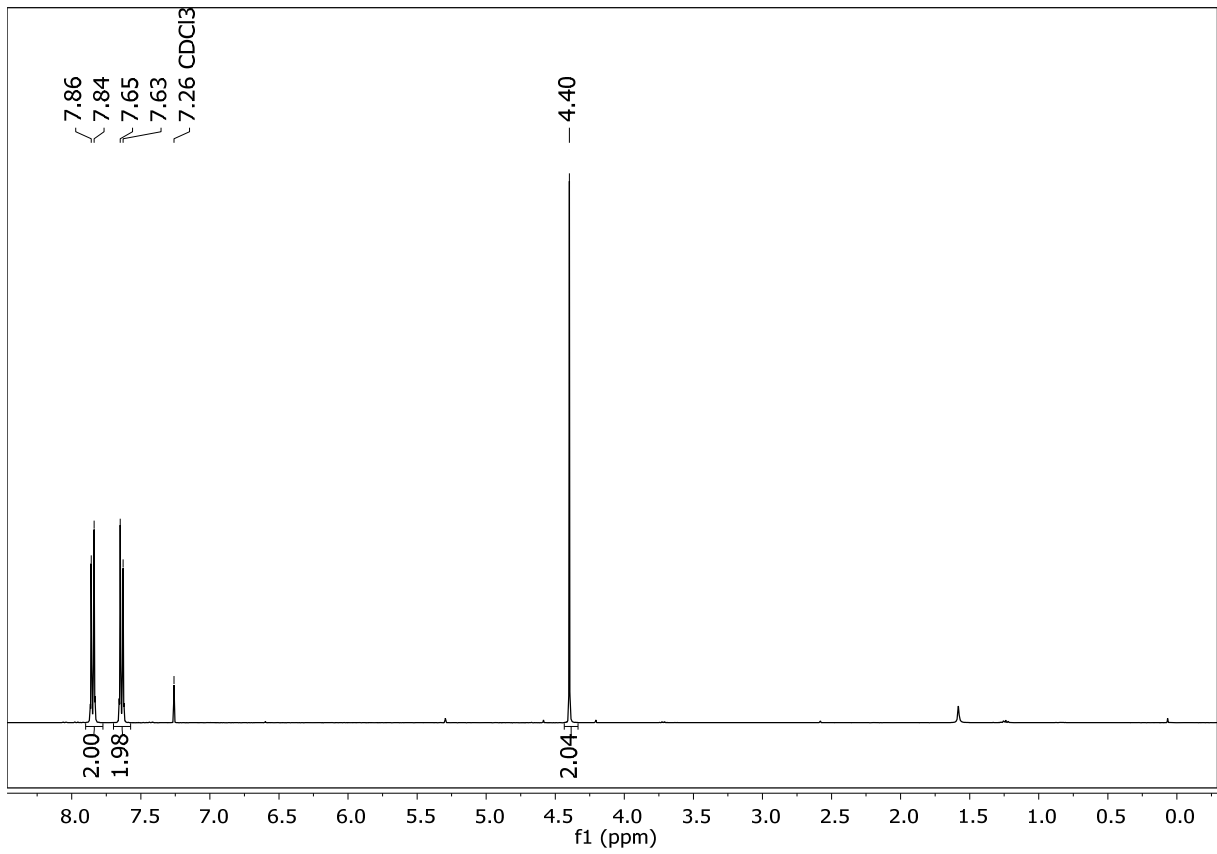


Abbildung 17 ¹H-NMR-Spektrum von CM245

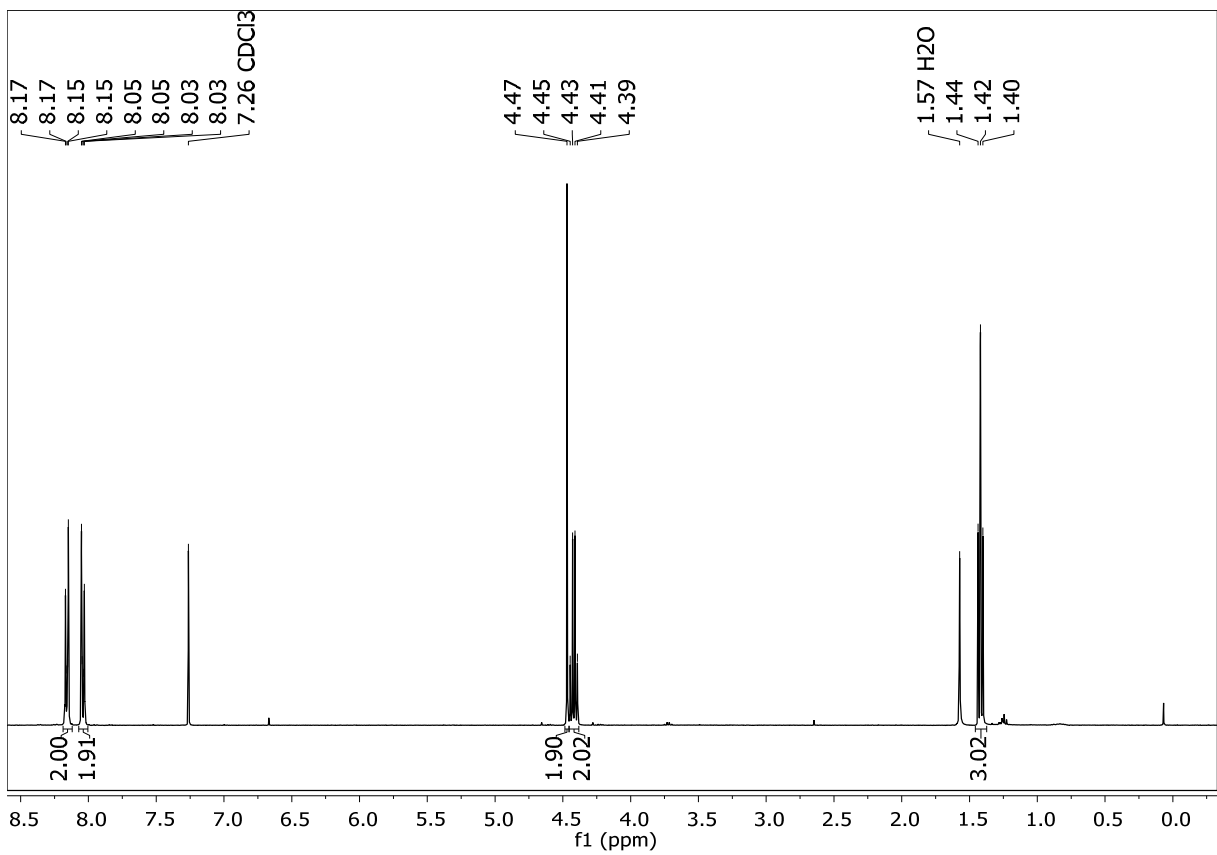


Abbildung 18 ¹H-NMR-Spektrum von CM258

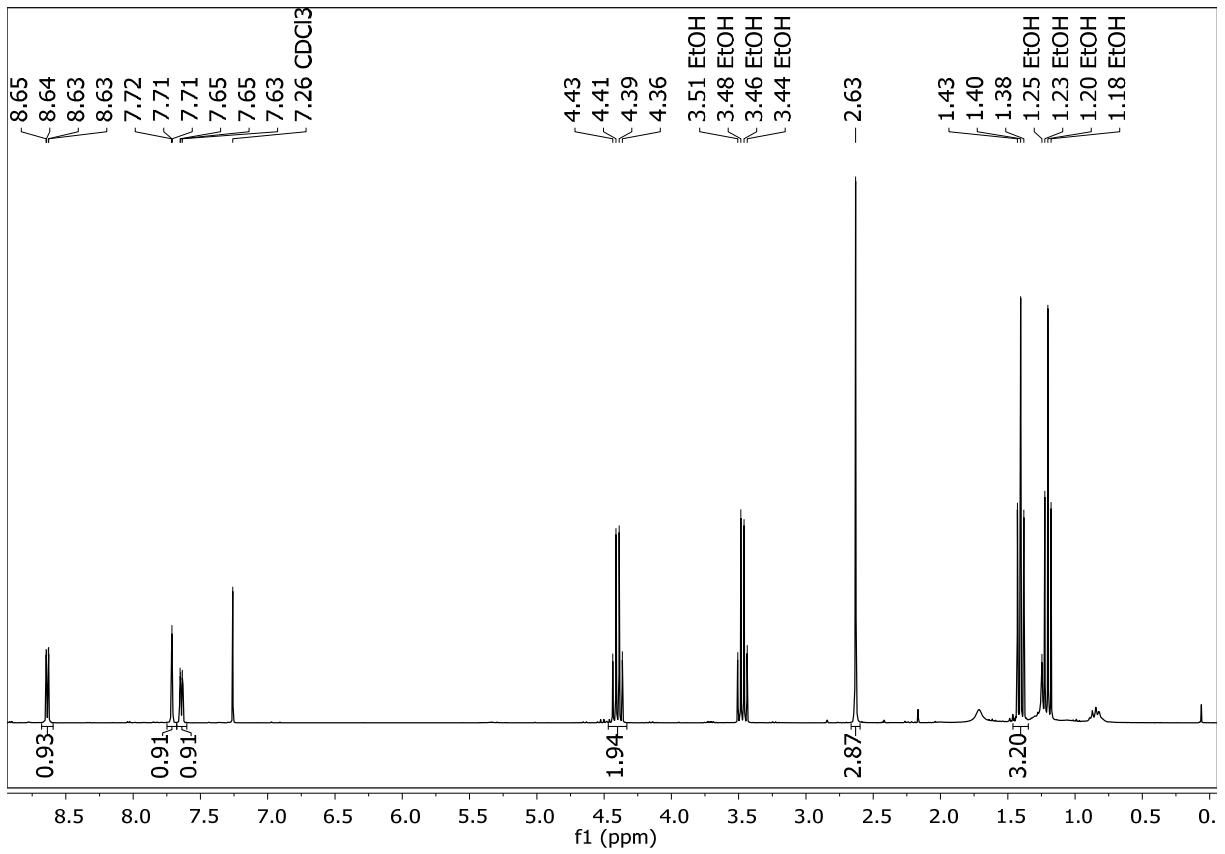


Abbildung 19 ¹H-NMR-Spektrum von CM251

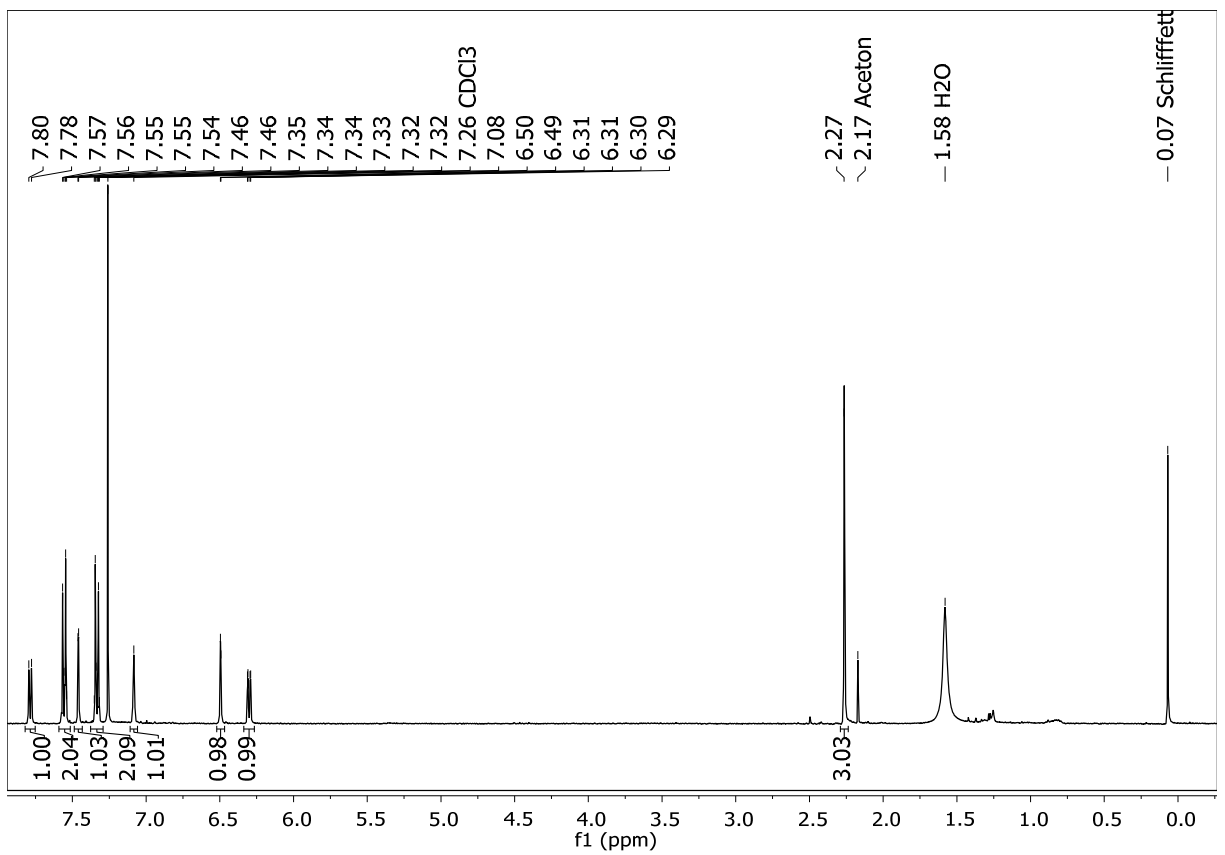


Abbildung 20 ¹H-NMR-Spektrum von CM255

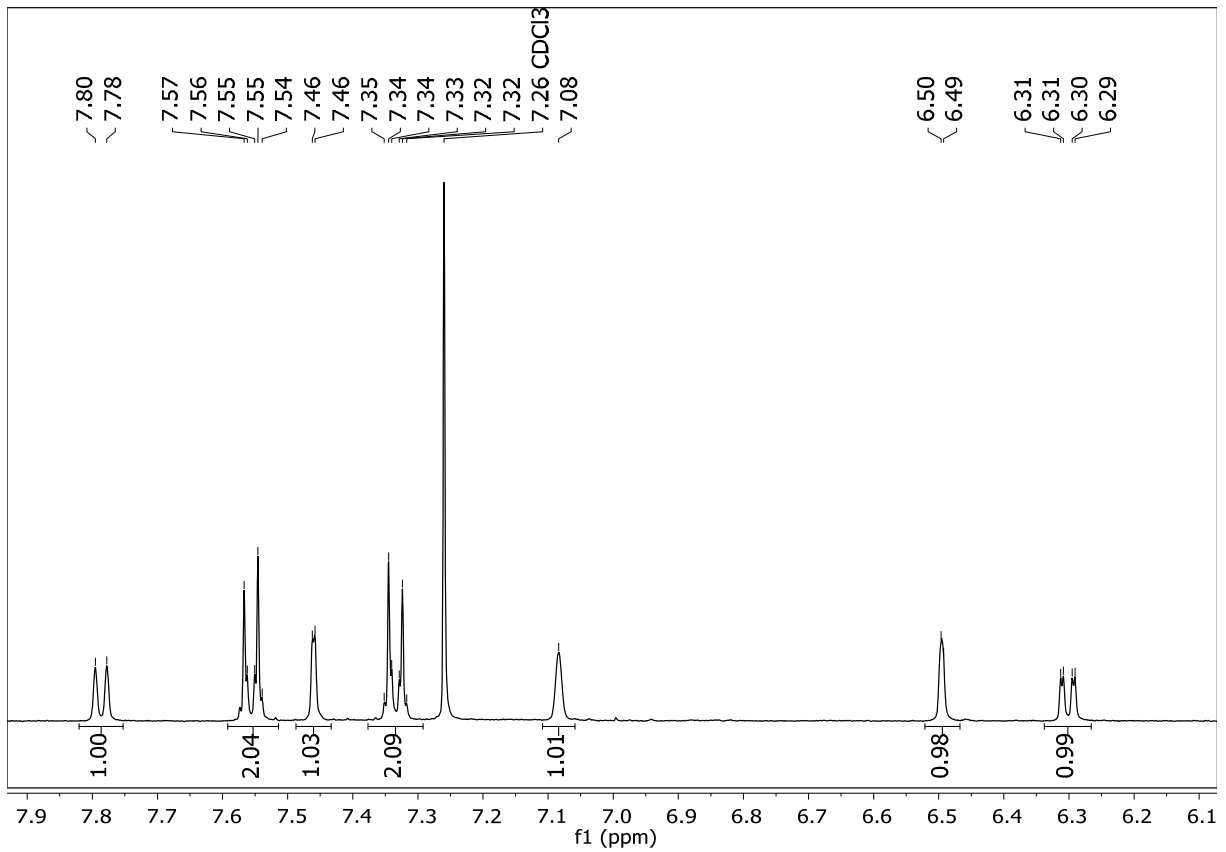


Abbildung 21 ¹H-NMR-Spektrum von CM255, Tieffeld-Vergrößerung

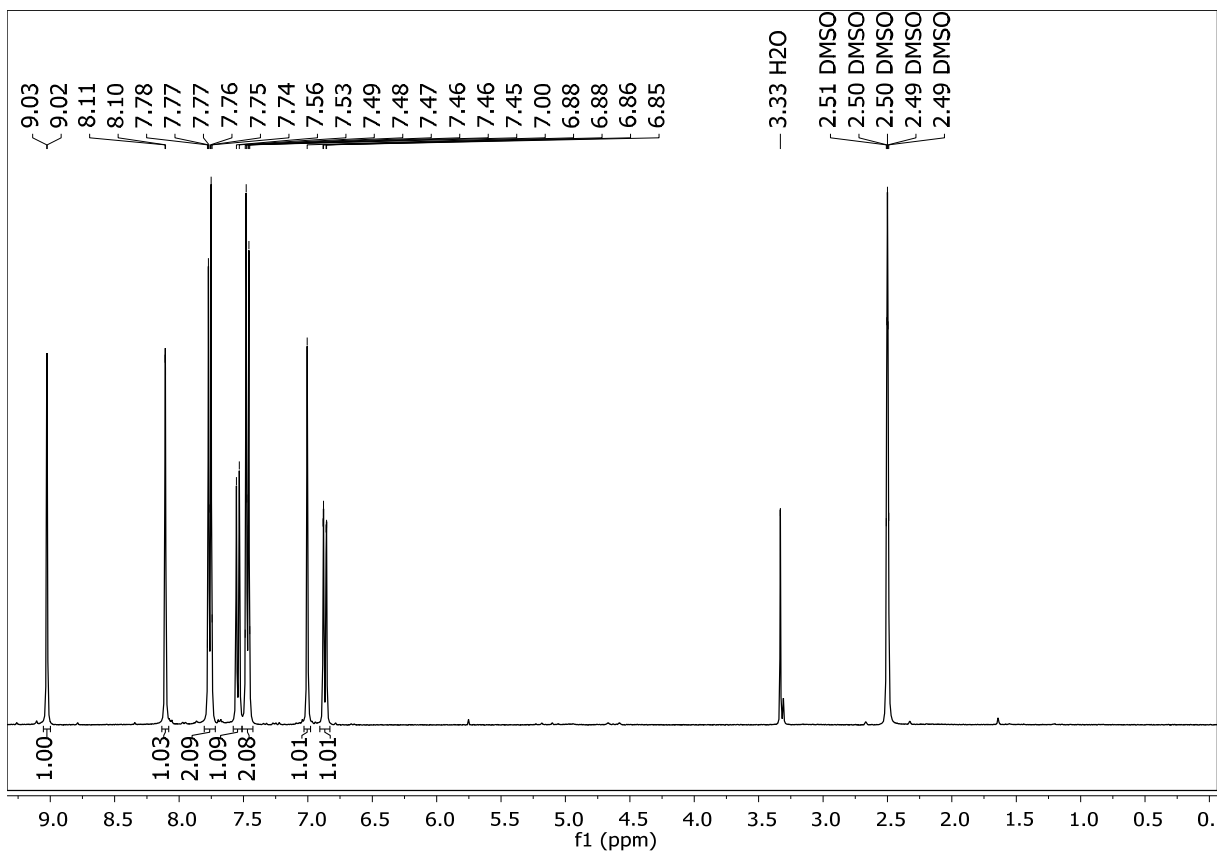


Abbildung 22 ¹H-NMR-Spektrum von CM250

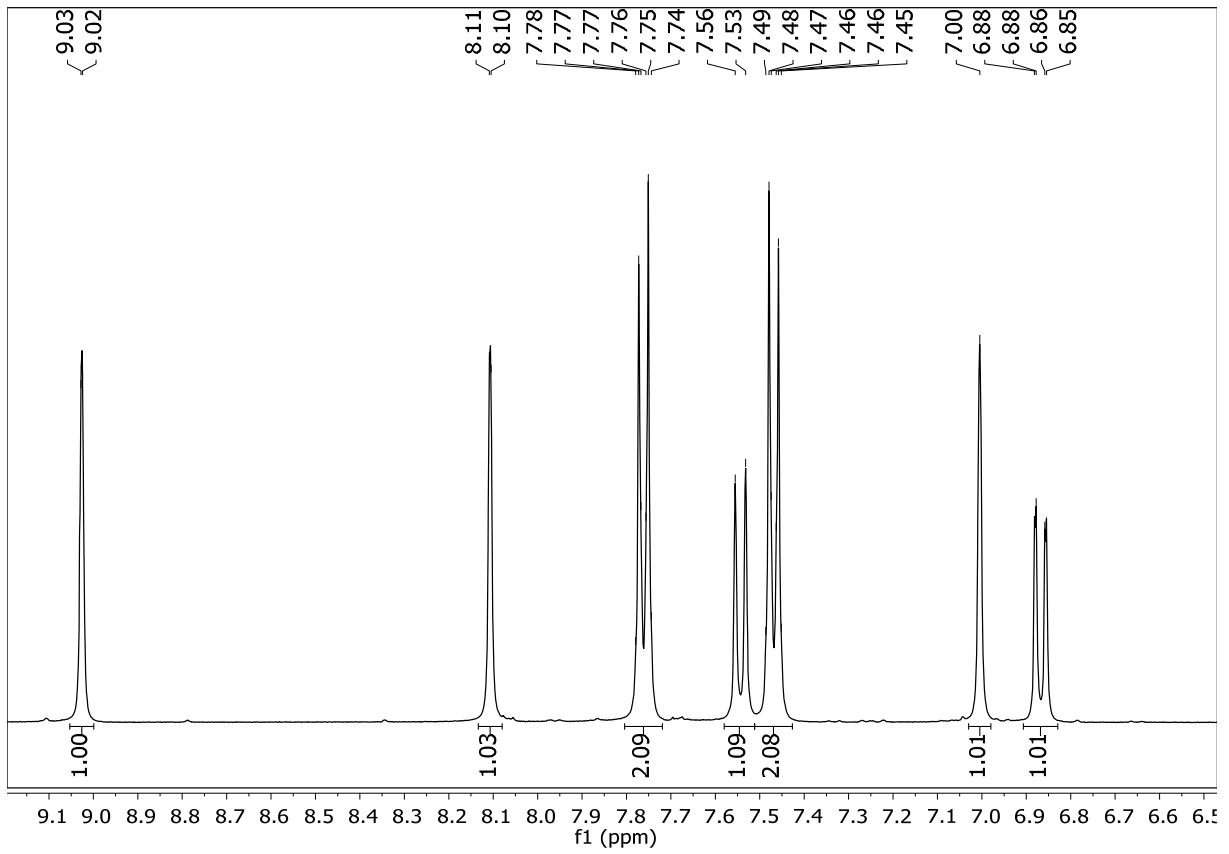


Abbildung 23 ¹H-NMR-Spektrum von CM250, Tiefeldvergrößerung

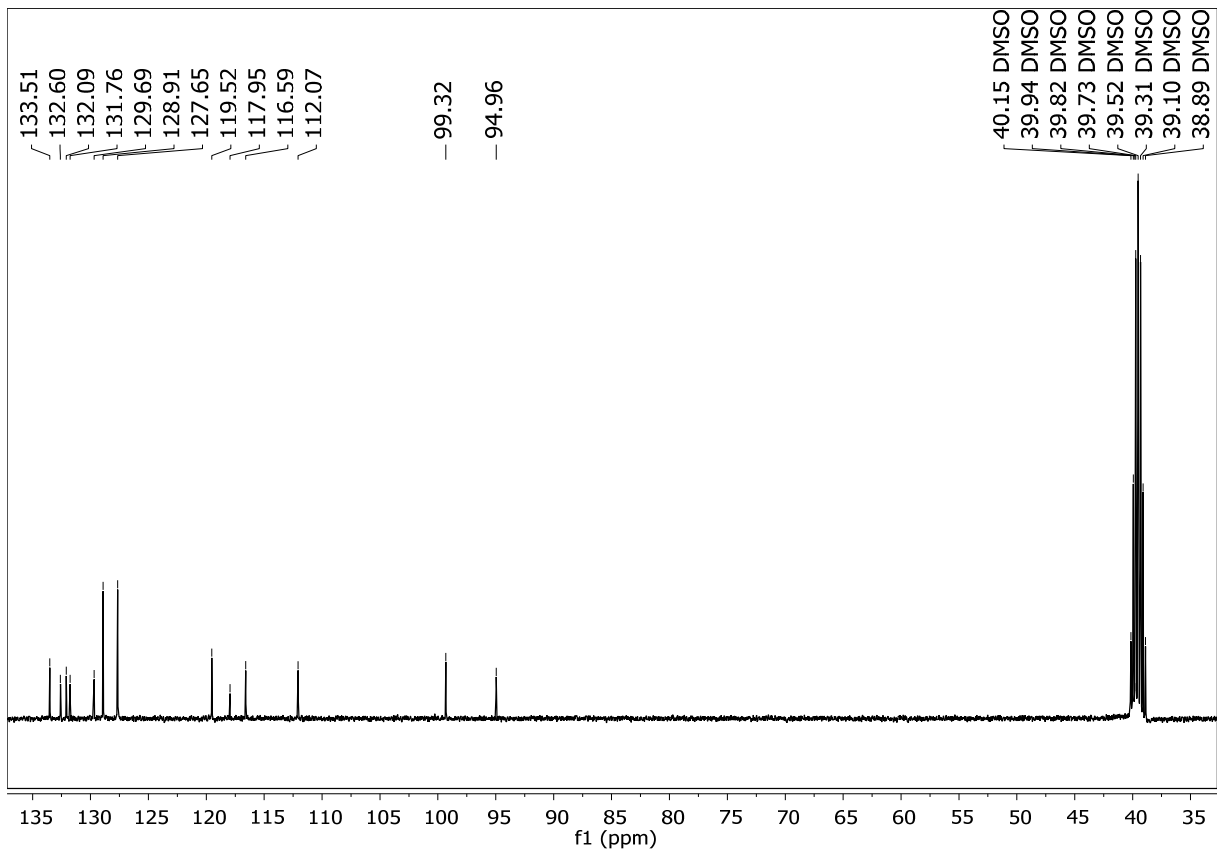


Abbildung 24 ¹³C-NMR-Spektrum von CM250

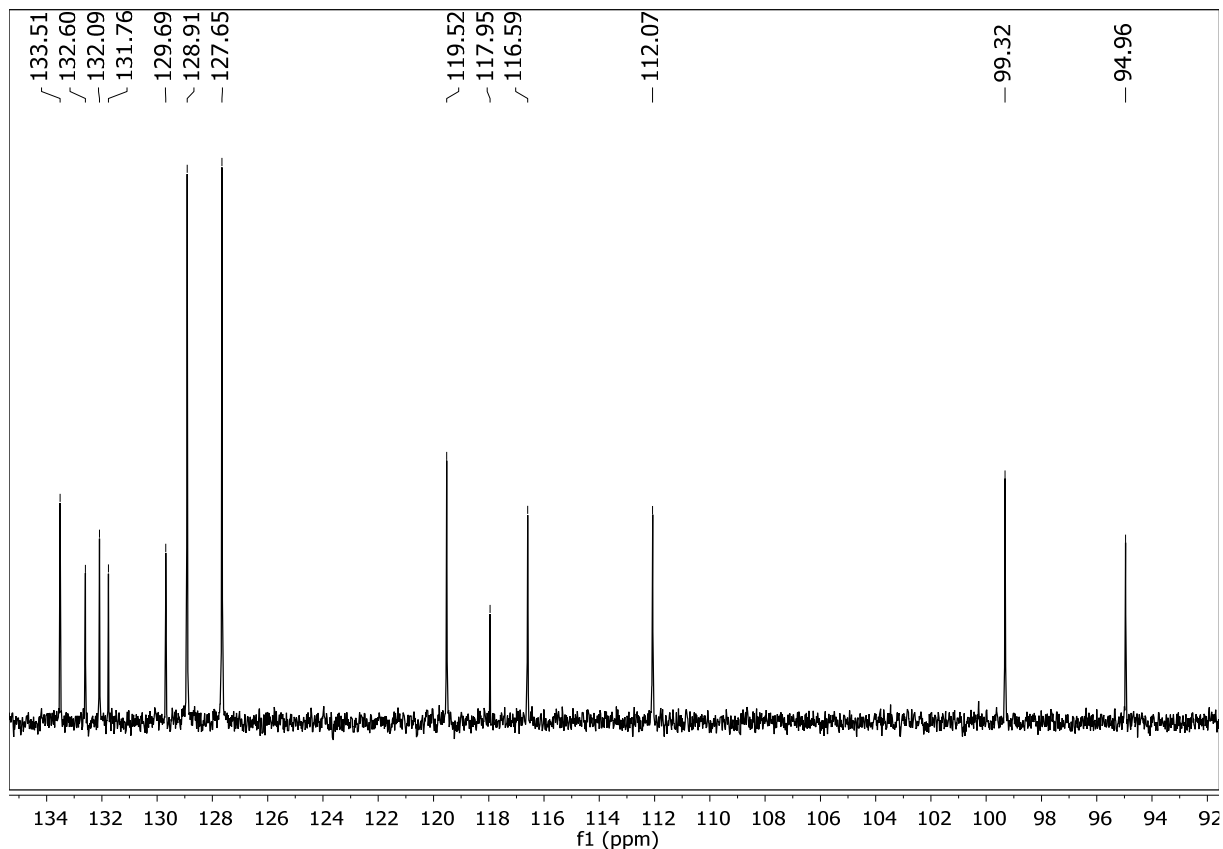


Abbildung 25 ¹³C-NMR-Spektrum von CM250, Tieffeld-Vergrößerung

7 Quellen

1. Stern R., Hyaluronidases in cancer biology, *Seminars in Cancer Biology* 2008, 18, 275–280
2. Mio K., Stern R., Inhibitors of the hyaluronidases, *Matrix Biology* 2002, 21, 31-37
3. Rigden D., Botzki A., Nukui M., Mewbourne R., Lamani E., Braun S., von Angerer E., Bernhardt G., Dove S., Buschauer A., Jedrzejas M., Design of new benzoxazole-2-thione-derived inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyase: structure of a complex with a 2-phenylindole, *Glycobiology*. 2006, 757-765
4. Christian Textor, Dissertation, 2012, S.238-239
5. Dann, O. et al., Trypanocide Diamidine mit drei Ringen in zwei isolierten Ringsystemen. *Liebigs Annalen der Chemie*. **1972**, 760, 37-876. Xu_2012
6. Y. et al., Synthesis and Characterization of Mesogen-Jacketed Liquid Crystalline Polymers through Hydrogen-Binding. *Macromolecules*. **2012**, 45, 2682-2689
7. en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan