

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Medizinalchemische Entwicklung von
Wirkstoffkandidaten für die Therapie nikotinerger
Fehlfunktionen nach Nervenkampfstoffvergiftungen**

vorgelegt von

Sebastian Helge Rappenglück

aus Starnberg, Deutschland

2019

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Professor Dr. Klaus T. Wanner betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 01.02.2019

(Sebastian Rappenglück)

Dissertation eingereicht am:	01.02.2019
1. Gutachter:	Prof. Dr. Klaus T. Wanner
2. Gutachter:	Prof. Dr. Franz F. Paintner
Mündliche Prüfung am:	01.03.2019

– meiner Frau Carina –

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2013 bis August 2017 am
Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-
Universität München auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr. Klaus T. Wanner

Für die hervorragende und sehr engagierte Betreuung und Förderung
meiner Arbeit sowie die ausgezeichneten Forschungsbedingungen danke ich
Herrn Professor Dr. Klaus T. Wanner sehr herzlich.

Herrn Professor Dr. Franz F. Paintner danke ich herzlich
für die Übernahme des Koreferats.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. T. Wanner danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und dafür, dass er mir stets den Freiraum gewährte, auch meine eigenen Ideen und Lösungsvorschläge umzusetzen.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der analytischen Abteilung am Department Pharmazie für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren.

Die Jahre im AK Wanner waren eine großartige Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnern werde. Bedanken möchte ich mich deshalb bei allen Mitarbeitern, insbesondere bei meinen Laborkollegen Michael Böck, Simone Huber und den Mitstreitern aus unseren Nachbarlaboren: Krisztián Tóth, Heinrich „Dihydro“ Rudy, Janina Andreß, Maren Schaarschmidt, Tobias Hauke, Patrick Neiens, Mark Währa und Sonja Sichler. Bessere Weggefährten wie euch hätte man sich nicht wünschen können. Danke auch an Sonja für die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung unserer Publikationen sowie für die super Zeit am IPT. An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich noch einmal bei Jörg Pabel und Lars Allmendinger bedanken. Zum einen für eure wertvollen Ratschläge, zum anderen aber auch für eure Unterstützung bei meiner Arbeit und die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Bacheloranten Jürgen Gabriel, der mir mit seiner engagierten Arbeit geholfen hat, mein Dissertationsprojekt weiter voranzubringen.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Oberfeldapotheker Karin Niessen. Danke dass du mit so viel Herzblut hinter diesem Forschungsprojekt gestanden hast.

Ein besonderer Dank geht an meine lieben Eltern, meine Großeltern und meinen Bruder Simon. Danke für eure uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen, die vielen schönen Momente, die wir zusammen erlebt haben und erleben werden, sowie dafür, dass wir immer füreinander da sind.

Mein letzter Dank gilt zwei ganz besonderen Menschen in meinem Leben – meiner Frau Carina und unserem Sohn Jonas. Danke mein Schatz, für dein Verständnis, deine bedingungslose Liebe, sowie für bisher wunderschöne 14 Jahre. Du hast mir so viel geschenkt, dass es sich nicht in Worte fassen lässt. Ich liebe dich!

Die vorliegende kumulative Dissertation basiert auf folgenden Publikationen:

Erste Publikation:

S. Rappenglück, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, Regioselective and Transition-Metal-Free Addition of *tert*-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives: A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-*tert*-Butylpyridine Derivatives, *Synthesis* **2017**, 49 (17), 4055–4064.

Copyright Georg Thieme Verlag KG. Reproduced with permission.

Zweite Publikation:

S. Rappenglück, S. Sichler, G. Höfner, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. F. Paintner, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *ChemMedChem*. **2018**, 13, 1806–1816.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Dritte Publikation:

S. Rappenglück, S. Sichler, G. Höfner, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. F. Paintner, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *ChemMedChem* **2018**, 13, 2653–2663.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Modified version. Reproduced with permission.

Teile dieser Arbeit wurden ebenfalls auf wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt:

„Entwicklung neuer Modulatoren für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor zur Therapie von Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen“, S. Rappenglück, S. Sichler, K. T. Wanner, 12. Tagung über Iminiumsalze, Goslar, Deutschland, 14.09.2015 – 17.09.2015.

„Synthese neuer Modulatoren für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor zur Therapie von Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen“, S. Rappenglück, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, K. T. Wanner, 47. Jahreskongress der DGWMP, Neu-Ulm, Deutschland, 06.10.2016 – 08.10.2016.

“Synthesis of New Modulators of the nAChR for the Therapy of Poisoning by Organophosphorus Compounds”, S. Rappenglück, G. Höfner, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, 16th Medical Chemical Defense Conference, Munich, Germany, 05.04.2017 – 06.04.2017.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Entwicklung von phosphororganischen Verbindungen als Nerven- kampfstoffe und Pestizide	3
1.1.1	G-Kampfstoffe und Pestizide	3
1.1.2	V-Kampfstoffe	5
1.1.3	GV- und Novichok-Kampfstoffe	6
1.2	Die phosphororganische Vergiftung	7
1.2.1	Das cholinerge System	8
1.2.2	Hemmung der Acetylcholinesterase und die Folgen für das cholinerge System	9
1.2.3	Aktuelle therapeutische Maßnahmen und ihre Limitationen	10
1.3	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor als pharmakologisches Target	13
1.3.1	Struktur der nAChR	13
1.3.2	Die funktionellen Zustände des nAChR und ihre Rolle in der nikotineren Neurotransmission	15
1.3.3	Die Wirkung einer Nervenkampfstoffvergiftung auf den nAChR	17
1.4	Bispyridiniumsalze als potentielle Antidote zur Therapie einer Nervenkampfstoffvergiftung	17
1.4.1	Historischer Hintergrund und die Entdeckung des desensitisierten nAChR als Target für Bispyridiniumverbindungen	18
1.4.2	Die therapeutisch wirksamste Bispyridiniumverbindung MB327	19
1.4.3	Über den Wirkmechanismus von therapeutisch aktiven Bispyridinium- verbindungen am nAChR	21
1.4.4	Struktur-Wirkungsbeziehungen von MB327 homologen Bispyridinium- verbindungen am nAChR	23
2	Ziele der Arbeit	26
2.1	Forschungsvorhaben zur gezielten Entwicklung von Antidoten zur Be- handlung von Nervenkampfstoffvergiftungen	26
2.1.1	Das rationale Design neuer Bispyridinium Resensitizer der nAChR	27
2.2	Synthese potentieller Resensitizer	29
2.3	Synthese zweier deuterierter MB327-Analoga für die Entwicklung von MS-Bindungsassays	31

3	Veröffentlichungen	33
3.1	Erste Publikation: <i>Regioselective and Transition-Metal-Free Addition of tert-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives: A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-tert-Butylpyridine Derivatives</i>	33
3.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
3.1.2	Darstellung des Eigenanteils	34
3.2	Zweite Publikation: <i>Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor</i>	60
3.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
3.2.2	Darstellung des Eigenanteils	61
3.3	Dritte Publikation: <i>Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor</i>	102
3.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	102
3.3.2	Darstellung des Eigenanteils	104
4	Nicht veröffentlichte Experimente	138
4.1	Die Suche nach einer geeigneten Synthesestrategie für die effiziente Darstellung von 4-tert-Butylpyridinderivaten	138
4.1.1	Die <i>N</i> -Acylpyridiniumstrategie	140
4.1.1.1	Literaturbekannte Beispiele zur Einführung eines <i>tert</i> -Butylrests in Pyridinderivate mittels <i>N</i> -Acylpyridiniumionen	141
4.1.1.2	Untersuchungen zur Addition von <i>tert</i> -Butylmetallverbindungen an <i>N</i> -Acylpyridiniumionen	143
4.1.1.3	Die Oxidation des <i>N</i> -Acetyl-4- <i>tert</i> -butyldihydropyridins 62	150
4.1.2	Die <i>N</i> -Silylpyridiniumstrategie	151
4.1.2.1	Literaturbekannte Beispiele zur Einführung eines <i>tert</i> -Butylrests in Pyridinderivate mittels <i>N</i> -Silylpyridiniumionen	152
4.1.2.2	Untersuchungen zur Addition von <i>tert</i> -Butylmetallverbindungen an <i>N</i> -Silylpyridiniumionen	153
4.2	Synthese von symmetrischen Bispyridiniumverbindungen mit 1,3-Diodpropan	156
4.3	Alkylierung von (<i>S</i>)-Nicotin mit Propan-1,3-bistriflat (89)	158
4.4	Die Synthese des Triflat-Analogons von MB327 sowie des Diodids von PTM0002	159
4.5	Experimental Part	161
4.5.1	Methods	161
4.5.2	General Procedures	164

4.5.3	Experimental Procedures	168
5	Zusammenfassung	186
5.1	Die Synthese kommerziell nicht erhältlicher Pyridin-Bausteine	186
5.2	Synthese der potentiellen Resensitizer	189
5.2.1	Zielverbindungen mit symmetrischer Struktur	190
5.2.1.1	Synthesen	190
5.2.1.2	Biologische Prüfung	192
5.2.2	Zielverbindungen mit nicht-symmetrischer Struktur	193
5.2.2.1	Synthesen	193
5.2.2.2	Biologische Prüfung	197
5.3	Synthese deuterierter MB327-Analoga für die Entwicklung von MS-Bindungsassays	198
5.4	Ausblick und Weiterentwicklung der Leitstruktur	198
6	Verzeichnis der synthetisierten PTM Substanzen	200
7	Abkürzungsverzeichnis	208
8	Literaturverzeichnis	213

1 Einleitung

Der erste großflächige Einsatz von über 113000t der verschiedensten chemischen Kampfstoffe wie S-Lost, Chlorgas oder Phosgen erfolgte im ersten Weltkrieg (1914–1918) mit schätzungsweise 1.2 Millionen Verwundeten und über 91000 gefallenen Soldaten.¹ Auch in den darauffolgenden Jahrzehnten wurden chemische Kampfstoffe von verschiedenen Nationen regelmäßig eingesetzt, z. B. von Spanien im Rifkrieg (1921–1926),¹ von Italien während des Abessinienkriegs (1935–1936),¹ durch Japan massiv im zweiten japanisch-chinesischen Krieg (1937–1945)¹ oder durch Ägypten im jemenitischen Bürgerkrieg (1963–1971).² Der letzte große Einsatz von chemischen Kampfstoffen in einem zwischenstaatlichen Konflikt mit nahezu 100000 Toten erfolgte auf Seiten des Iraks gegen den Iran im ersten Golfkrieg von 1980–1988.³

Bereits einige Jahre vor Beginn des ersten Weltkriegs setzten die Briten im Burenkrieg zwischen 1899 und 1902 Pikrinsäure freisetzende Lyditte-Geschosse ein,⁴ deren unmenschliche Wirkung im Jahr 1907 zu einer Ergänzung der Haager Landkriegsordnung von 1899 um das Verbot des Einsatzes von giftigen Waffen und Geschossen führte.⁵ Allerdings vermochten weder die Haager Landkriegsordnung noch das am 17. Juni 1925 unterzeichnete Genfer Protokoll zur Ächtung und zum „Verbot von „erstickenden, giftigen oder ähnlichen Gasen sowie von bakteriologischen Mitteln im Kriege“ diesen Einsatz auch wirklich zu verhindern.⁶

Erst die veränderte geostrategische Lage nach dem Fall des Eisernen Vorhangs sowie der mittlerweile gesunkene strategische Wert der C-Waffen ermöglichte ein wirksames und umfassendes internationales Verbot durch das Inkrafttreten des UN-Chemiewaffenabkommens am 29. April 1997.^{7,8} Mit der Unterzeichnung der Konvention durch 192 Vertragsstaaten⁹ kann die Gefahr eines Einsatzes von chemische Waffen in einem zwischenstaatlichen Konflikt mittlerweile als relativ unwahrscheinlich angesehen werden.⁷

Die Attentate mit den Nervenkampfstoffen VX auf Kim Jong-nam am 13.02.2017¹⁰ und Novichok auf Sergej Skripal am 04.03.2018¹¹ sowie der wiederholte Einsatz von chemischen Kampfstoffen in dem seit 2011 andauernden Bürgerkrieg in der Arabischen Republik Syrien zeigen jedoch, dass sich der Schwerpunkt der Bedrohungslage in den letzten Jahrzehnten hin zu gezielten Tötungen, innerstaatlichen Konflikten und dem Einsatz von chemischen Kampfstoffen durch terroristische

Gruppierungen verschoben hat.¹² Die Bedrohung durch chemische Waffen ist demnach auch im Jahr 2018 alles andere als eine rein abstrakte Gefahr.

Mit dem massiven Sarin-Angriff auf Ghouta, bei dem je nach Quelle 281 bis 1500 Menschen ums Leben gekommen sind,¹³ hat der Einsatz von C-Waffen ein seit dem ersten Golfkrieg (1980–1988) nicht mehr gekanntes Ausmaß angenommen. Der letzte durch die OPCW (*Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*) offiziell bestätigte Zwischenfall, ebenfalls mit dem Nervengas Sarin, fand am 4. April 2017 in Chan Schaichun in der syrischen Provinz Idlib statt und kostete nach Aussagen der BBC über 80 Menschen das Leben.¹⁴

Der in Syrien mehrfach nachgewiesene Kampfstoff Sarin¹⁵ gehört zur Gruppe der hoch toxischen Nervenkampfstoffe und ist wie die meisten Vertreter seiner Klasse verhältnismäßig leicht und kostengünstig herzustellen. Gerade vor dem Hintergrund einer terroristischen Bedrohung ist das Gefährdungspotential das daher von Nervenkampfstoffen sowohl für Soldaten als auch für Zivilpersonen ausgeht enorm. Wie gravierend die Auswirkungen eines solchen terroristischen Anschlags sein können, zeigte die Freisetzung von Sarin durch die fanatische religiöse Sekte Ōmu Shinrikyō 1994 in Matsumoto und 1995 in der U-Bahn Tokios mit insgesamt 20 Todesopfern und mehreren tausend Verletzten.^{16,17} Von allen chemischen Kampfstoffen, die sich im Wesentlichen in Hautkampfstoffe, Lungenkampfstoffe, Blutkampfstoffe, Psychokampfstoffe, Augen-, Nasen- und Rachenkampfstoffe sowie Nervenkampfstoffe unterteilen lassen,¹⁸ besitzen letztere deshalb das höchste Gefährdungspotential.

Eng verwandt mit den Nervenkampfstoffen sind Pestizide auf Basis von phosphororganischen Verbindungen. Viele dieser Pflanzenschutzmittel besitzen zwar eine im Verhältnis deutlich reduzierte, aber immer noch beträchtliche Toxizität. In westlichen Ländern oftmals nicht mehr zugelassen, geht von ihnen vor allem in Entwicklungsländern eine nicht unerhebliche Gefahr für die Gesundheit der Bevölkerung aus. So rechnen konservative Schätzungen allein jährlich weltweit mit bis zu 250000 Pestizidsuiziden.^{19,20} Die Zahl der schweren unbeabsichtigten Vergiftungen mit Pestiziden beläuft sich nach einer WHO Studie von 1990 sogar auf über eine Million.²¹

1.1 Die Entwicklung von phosphororganischen Verbindungen als Nervenkampfstoffe und Pestizide

Nervenkampfstoffe und Pestizide gehören allgemein zur Klasse der phosphororganischen Verbindungen. Erstere lassen sich zusätzlich in die G-Kampfstoffe (German-Agents) der ersten Generation, V-Kampfstoffe (Venomous-Agents) der zweiten Generation sowie GV-Kampfstoffe der dritten Generation und die Novichok Kampfstoffe der vierten Generation unterteilen.

1.1.1 G-Kampfstoffe und Pestizide

Die ersten Nervenkampfstoffe wurden in den 30iger Jahren des 20. Jahrhunderts auf der Suche nach synthetischen Insektiziden von dem deutschen Chemiker Dr. Gerhard Schrader in den Laboratorien der I. G. Farben entdeckt.²² Viele der damals gängigen und nur durch Isolierung aus Pflanzen zu gewinnenden Insektizide wie Nikotin, Rotenon und Pyrethrin mussten teuer nach Deutschland importiert werden.²³ Eine der wenigen zur damaligen Zeit verfügbaren synthetischen Insektizide waren die 1932 von Murphy und Peet beschriebenen Thiocyanate.²⁴ Die Forschung nach neuen synthetischen Alternativen und damit verbunden eine Reduktion der Abhängigkeit des Deutschen Reiches von Importen erschien für die I. G. Farben daher als lohnenswerte Investition.²³ Die zunächst auf Anregung von Otto Bayer angestrebte Synthese von Pflanzenschutzmitteln auf Basis organischer Säurefluoride erwies sich allerdings als nicht zielführend, so dass sich Schrader Ende 1936 anderen Arbeitsgebieten, darunter der Synthese von Phosphorsäureesteramiden als Weichmacher für Kunststoffe zuwandte.²⁵

Um nach eigener Aussage „nichts zu versäumen, wurden die neu synthetisierten Substanzen“ zusätzlich „auf ihre insektizide Wirkung hin untersucht“.²⁵ Hierbei fanden Schrader und seine Kollegen eine überraschend starke kontaktinsektizide Wirkung für „Phosphorsäureesteramide mit einem sauren Substituenten“ und stellten als Resultat erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit der heute immer noch gültigen und als Schrader-Formel (**1**) bekannten Struktur auf (Abbildung 1).²⁵ Hiernach besitzen alle phosphororganischen Verbindungen eine kontaktinsektizide Wirkung, bei welcher das elektrophile Phosphor-Zentralatom eine PO Doppelbindung, zwei

basische Substituenten R^1 und R^2 sowie eine elektronenziehende gute Abgangsgruppe X aufweist.²⁶

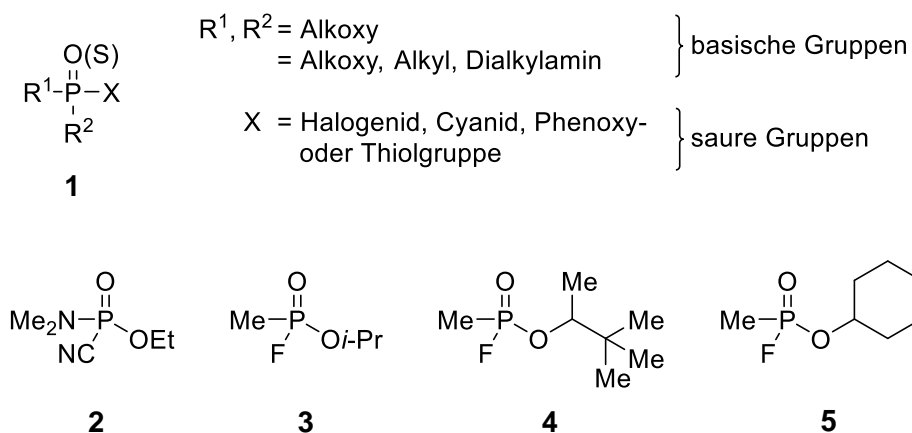


Abbildung 1: Strukturformel nach Schrader (1) sowie der wichtigsten G-Kampfstoffe Tabun (2), Sarin (3), Soman (4) und Cyclosarin (5).

Auf der Suche nach neuen Pflanzenschutzmitteln auf Basis von Phosphorsäureestern wurde die Verbindungsklasse systematisch durchgearbeitet und hierbei 1936 das Phosphoramidat Tabun (2) und 1938 das Phosphonat Sarin (3) synthetisiert.¹

Beide Verbindungen waren aufgrund ihrer hohen Toxizität für Warmblüter als Insektizide ungeeignet und mussten deshalb dem Heereswaffenamt gemeldet werden (Tabun: LD_{50} perkutan = 14–21 mg kg^{-1} , Sarin: LD_{50} perkutan = 24 mg kg^{-1}).^{27,28} Dort wurde das Potential der neuen Verbindungsklasse als chemischer Kampfstoff schnell erkannt. Gezielte Versuche zur Chemiewaffenforschung am Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung durch Richard Kuhn und Konrad Henkel führten im Frühjahr 1944 zu der Synthese des Pinakolyolphosphonats Soman (4), welches „sämtliche zuvor hergestellten Verbindungen in ihrer Wirkung übertraf“ (Soman: LD_{50} perkutan = 15 mg kg^{-1}).^{28,29} Mit Cyclosarin (5) wurde während des 2. Weltkriegs schließlich der letzte Vertreter dieser Stoffreihe gefunden.³⁰ Alle G-Kampfstoffe (Abbildung 1) sind bei Raumtemperatur (20 °C) klare Flüssigkeiten mit einem relativ hohen Dampfdruck von $3,7 \cdot 10^{-2}$ (Tabun) bis zu 2.1 mmHg (Sarin) und einer im Vergleich zu den V-Kampfstoffen geringeren Hydrolysebeständigkeit mit Halbwertszeiten von 8.5 (Tabun) bis zu 83 h (Soman) bei 20 °C und pH 7. G-Kampfstoffe werden deshalb primär als nicht persistente Kampfmittel mit einer hohen Inhalationstoxizität angesehen.³¹

Schrader gelang es hingegen die Warmblüttoxizität der phosphororganischen Verbindungen durch den Austausch der Phosphorsäuregrundstruktur durch Thiophosphorsäure deutlich zu senken, ohne die kontaktinsektizide Wirkung zu verlieren (Abbildung 2).³²

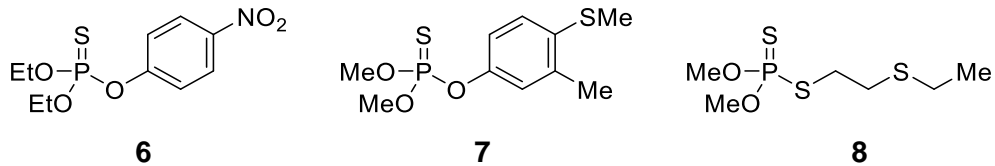


Abbildung 2: Von Schrader entwickelte Pestizide Parathion (**6**), Fenthion (**7**) und Disyston (**8**).

Seine Arbeiten führten schließlich zu der Synthese prominenter und kommerziell erfolgreicher Pflanzenschutzmittel wie z. B. Parathion (**6**), Fenthion (**7**) oder Disyston (**8**).^{33,34,35}

1.1.2 V-Kampfstoffe

Nach den oben genannten Kampfstoffen der ersten Generation, begründete Dr. Ranajit Ghosh, Chemiker bei Imperial Chemical Industries (ICI), im Jahr 1952 mit dem Phosphorsäurethioester Amiton (**9**, Abbildung 3) eine neue Generation von phosphororganischen Nervenkampfstoffen. Das als Oxalat vermarktete Amiton war ursprünglich als Ersatz für das Insektizid DDT gedacht und 1955 von ICI zu diesem Zweck patentiert worden.^{36,37,38} Strukturell und hinsichtlich seiner Toxizität ähnelt es den 1957 von dem schwedischen Chemiker Tammelin beschriebenen Dialkoxy- und Alkoxymethylphosphorylthiocholinen **10** und wird deshalb auch als Tammelinscher Ester bezeichnet.³⁹ Gegenüber den von G. Schrader entwickelten Systox-Verbindungen (z. B. Disyston, **8**) wiesen die Tammelinschen Ester eine gesteigerte Toxizität auf. Dies konnte auf den Tetraalkylammoniumrest und die daraus resultierende strukturelle Verwandtschaft der Tammelinschen Ester **10** mit dem natürlichen Substrat der AChE, Acetylcholin, zurückgeführt werden (vgl. Kapitel 1.2.2).³⁴

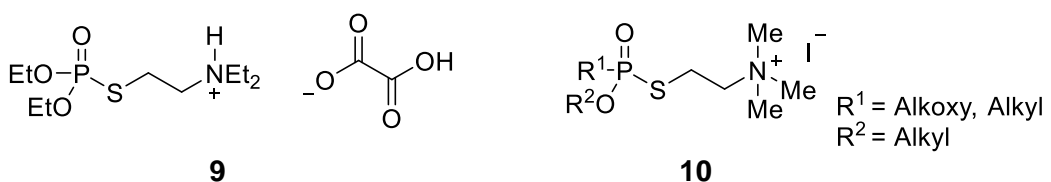


Abbildung 3: Amiton (**9**) und Tammelinsche Ester **10** als Vorgänger der V-Kampfstoffe.

Wegen seiner enormen Toxizität wurde es jedoch schon nach kurzer Zeit wieder vom Markt genommen.^{40,41} Alle Unterlagen und Daten zu den neu synthetisierten Tammelinschen Estern wurden daraufhin an die Forschungseinrichtung der Britischen Armee in Porton Down übergeben und von dort an die entsprechenden Institute in den Vereinigten Staaten und Kanada weitergeleitet.⁴² Das im Nachhinein als erster Vertreter der zweiten Nervenkampfstoffgeneration bezeichnete Amiton (VG, **9**) war somit der Startschuss für die Entwicklung der V-Agents (Abbildung 4).

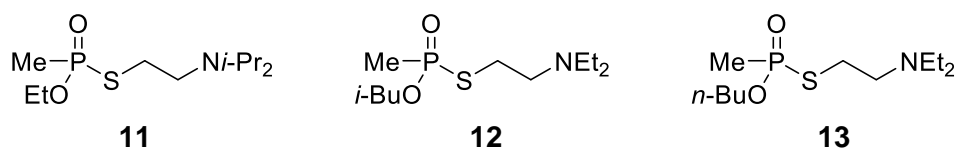


Abbildung 4: Die V-Kampfstoffe VX (**11**), VR (**12**) und CVX (**13**).

Mit Hinblick auf die in der Vergangenheit als waffenfähige chemische Kampfmittel genutzten Verbindungen sind vor allem das in den USA entwickelte VX (**11**) sowie seine in der Alkylsubstitution leicht unterschiedlichen sowjetischen und chinesischen Pendanten VR (**12**) und CVX (**13**) relevant.^{43,44,45}

Im Gegensatz zu den flüchtigen G-Kampfstoffen sind V-Stoffe bei Raumtemperatur viskose ölige Flüssigkeiten mit einer bis zu 300fach gesteigerter perkutaner Toxizität (VX: LD₅₀ perkutan = 0,07 mg kg⁻¹),^{12,28} niedrigerem Dampfdruck (VX: 7·10⁻⁴ mmHg bei 20 °C) und höherer Hydrolysestabilität (G-Stoffe: 8,5–83 h bei 20 °C und pH 7, V-Stoffe 400–1000 h).³¹ Durch diese Kombination sind sie äußerst beständig und können ganze Landstriche über einen Zeitraum von mehreren Tagen und Wochen kontaminieren.⁴⁶

1.1.3 GV- und Novichok-Kampfstoffe

Mit den Kampfstoffen der dritten Generation war beabsichtigt die hohe Inhalationstoxizität der G-Stoffe mit der Persistenz und perkutanen Toxizität der V-Stoffe zu kombinieren. Die unzureichende Lagerungsstabilität der hochreaktiven Verbindungen, wie dem Phosphoramidat **14** (Abbildung 5),⁴⁴ verhinderte allerdings eine Verwendung als Kampfstoff. Das bisher letzte Kapitel der Forschung an neuen Nervenkampfstoffen wurde vermutlich gegen Ende des kalten Krieges in der Sowjetunion aufgeschlagen. Nach Aussage des ehemaligen sowjetischen Wissenschaftlers Mirzayanov wurde in der Sowjetunion der 80iger Jahre und nach

dem Fall des Eisernen Vorhangs auch noch in Russland an einer neuen vierten Generation von binären Nervenkampfstoffen gearbeitet.⁴⁷ Bei binären Kampfstoffen erfolgt die Bildung des Nervengifts aus zwei im Verhältnis deutlich weniger toxischen Vorstufen erst am Einsatzort. Es wird vermutet, dass zu den im staatlichen Forschungsinstitut für organische Chemie und Technology (GosNIIOKhT) entwickelten Novichok Kampfstoffen sowohl Dihalognoximphosphate mit der Grundstruktur **15** als auch Phosphonate mit einer zu **A232 (16)** analogen Struktur gehören und in ihrer Toxizität VX um das bis zu 10fache übertreffen.^{48,49}

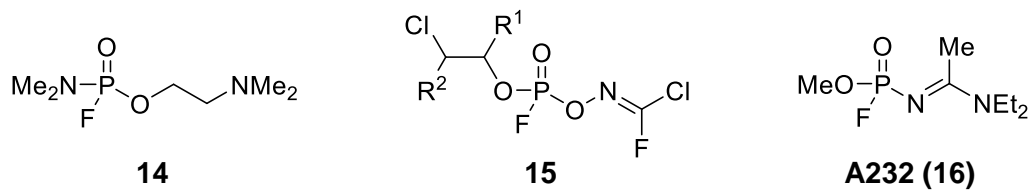


Abbildung 5: Kampfstoffe der dritten (**14**) und vierten Generation (**15, 16**). Die Reste R^1 und R^2 sind nicht näher spezifiziert.

Ein interessantes und zugleich besorgniserregendes Detail ist, dass es sich bei **15** nicht mehr wie bei den G- und V-Kampfstoffen um Organophosphonate sondern um Organophosphate handelt. Letztere finden breite Anwendung in der chemischen Industrie, so dass die für den Einsatz der binären Novichok Kampfstoffe benötigten Chemikalien vielfach nicht dem Chemiewaffenkontrollgesetz unterliegen würden.⁴⁷ Eine wirkungsvolle Kontrolle der Einhaltung des UN-Chemiewaffenabkommens von 1997 durch die OPCW wäre folglich deutlich erschwert.

1.2 Die phosphororganische Vergiftung

Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen und Pestiziden (OP) mit der Formel **1** (Abbildung 1) weisen ein äußerst breites Spektrum an Symptomen auf, welche je nach Schwere der Vergiftung von einer leichten Miosis, über eine verstärkte Sekretion der Speichel- und Schleimdrüsen bis hin zu Herzrhythmusstörungen, Krämpfen und im Endstadium zu einer Atemlähmung reichen können.^{50,51} Grund hierfür ist ihre massive Wirkung auf das cholinerge System, dessen Funktion von fundamentaler Bedeutung für das komplette Nervensystem ist.

1.2.1 Das cholinerge System

Das cholinerge System umfasst alle neuronalen Strukturen mit dem Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), den nikotinischen (nAChR) und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) sowie den Enzymen Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) und Acetylcholinesterase (AChE).⁵²

Cholinerg innervierte Rezeptoren befinden sich im zentralen und peripheren Nervensystem und steuern sowohl vegetative Erfolgsorgane (z. B. Bronchien, Herzmuskel, glatte Muskulatur, Pupillen, Drüsen, Gefäße) als auch die somatisch vermittelte Reizübertragung an der neuromuskulären Endplatte (Abbildung 6).⁵⁰ ACh wird in der Präsynapse aus Cholin und Acetyl-CoA in einer durch die ChAT katalysierten Reaktion synthetisiert, in Transporter-vesikeln gespeichert, und zur Auslösung eines Reizes an der präsynaptischen Endigung freigesetzt (Abbildung 7).⁵³ An der postsynaptischen Nervenzelle aktiviert ACh entweder G-Proteine nach Bindung an metabotrope muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) oder ionotrope nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR).

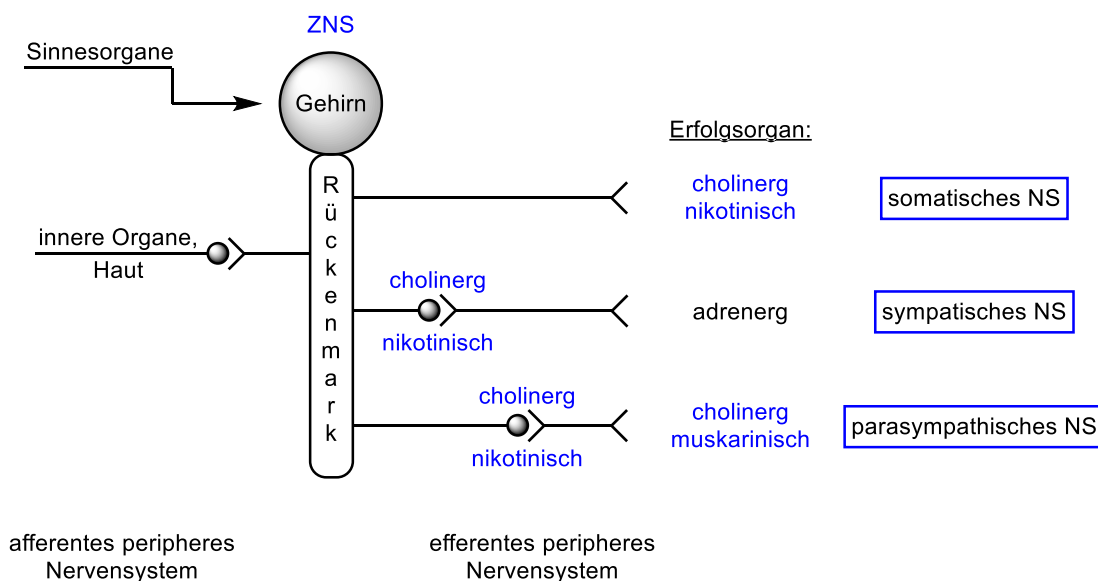


Abbildung 6: Schematische Darstellung des cholinergen Systems (blau) als Teil des humanen Nervensystems.^{50,54}

Nach dem Auslösen des Aktionspotentials wird ACh durch die AChE hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte Cholin und Acetat wieder in das präsynaptische Neuron aufgenommen.

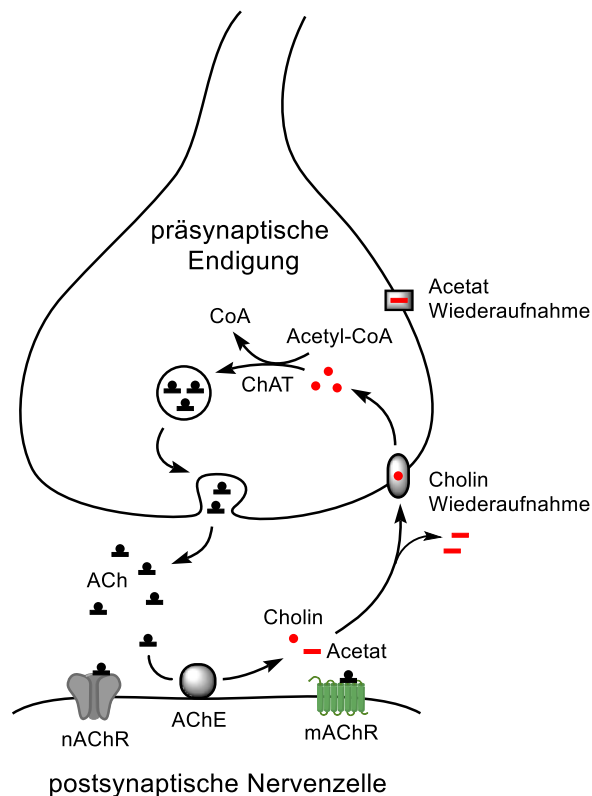


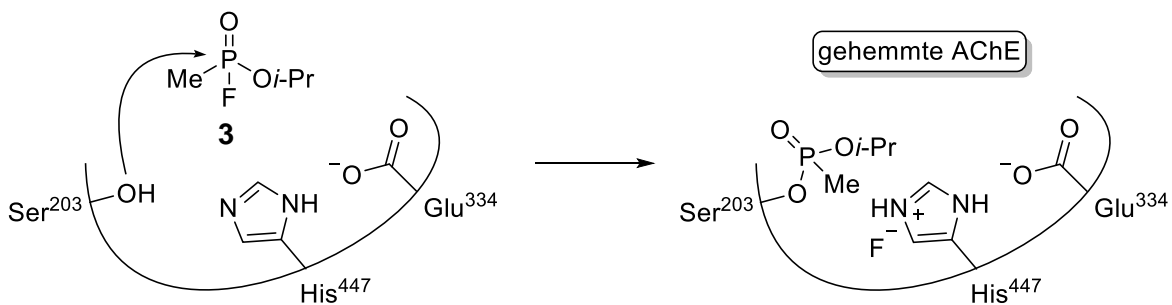
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der cholinergen Synapse.⁵⁵

Die AChE ist eines der Schlüsselenzyme im cholinergen System und reguliert die Konzentration des Neurotransmitters ACh im synaptischen Spalt durch einen enorm schnellen Hydrolyseprozess von ca. 5000 Molekülen Acetylcholin pro AChE und Sekunde.⁵³ Dies ist nötig um die Signaltransduktion ausreichend schnell terminieren zu können.

1.2.2 Hemmung der Acetylcholinesterase und die Folgen für das cholinerge System

Die akute toxische Wirkung phosphororganischer Verbindungen liegt in ihrer Eigenschaft als Serinesteraseinhibitoren begründet und beruht im Wesentlichen auf der Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) durch Phosphorylierung des katalytisch wirksamen Serin-Restes im aktiven Zentrum des Enzyms (Schema 1).^{56,57} In Folge der Hemmung der AChE und dem Verlust der Hydrolyseaktivität kommt es zu einem unkontrollierten Anstieg der ACh-Konzentration im synaptischen Spalt. Die daraus resultierende Übererregung der postsynaptischen nikotinischen (nAChR) und muskarinischen (mAChR) Acetylcholinrezeptoren im somatischen, autonomen und

zentralen Nervensystem ergibt eine äußerst komplexe Vergiftungssymptomatik und wird als akute cholinerge Krise bezeichnet.⁵⁰



Schema 1: Mechanismus der Hemmung der Acetylcholinesterase durch Phosphorylierung des katalytisch aktiven Serin-Restes durch z. B. Sarin (**3**).⁵⁸

Lebensbedrohlich sind hierbei vor allem die auf die Übererregung folgende Unterbrechung der Signaltransmission an der neuromuskulären Endplatte (neuromuskuläre Blockade) mit der Gefahr einer peripheren Atemlähmung sowie ACh-vermittelte Störungen des GABAergen und Glutamatergen Systems im ZNS. Diese können zu epileptoformen Krämpfen, komatösen Zuständen und im schlimmsten Fall zu einer zentralen Atemlähmung führen.⁵¹

1.2.3 Aktuelle therapeutische Maßnahmen und ihre Limitationen

Im Mittelpunkt der Behandlung von phosphororganischen Vergiftungen steht die Therapie der akuten cholinergen Krise.⁵⁹ Diese setzt je nach Art der OP-Verbindungen und Aufnahme in den Körper binnen weniger Minuten bis zu einigen Stunden ein und bedarf einer schnellen notfallmedizinischen Versorgung. Hierzu wird eine Kombination aus Atropin (**17**) zur Antagonisierung der Effekte an den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren und Oximen wie Obidoxim (**18**) oder Pralidoxim (**19**) zur Wiederherstellung der Acetylcholinesterasefunktion gegeben (Abbildung 8).^{60,61} Auf diese Weise können muskarinerg vermittelte Symptome wie z. B. eine Miosis, die Hypersekretion der Speichel- und Schleimdrüsen, Herzrhythmusstörungen und teilweise auch Auswirkungen auf das ZNS gelindert werden. Zusätzlich können noch Antikonvulsiva zur weiteren Reduktion der ACh-vermittelten Effekte im ZNS,^{62,63,64} sowie reversible Inhibitoren der AChE wie Pyridostigminbromid (**20**) oder Physostigmin (**21**) verabreicht werden. Letztere sind in der Lage, sofern rechtzeitig gegeben, die Ausweitung der cholinergen Krise einzudämmen, indem sie der AChE

ermöglichen, sich nach Absinken der Giftkonzentration im Blut wieder selbst regenerieren zu können.^{65,66,67}

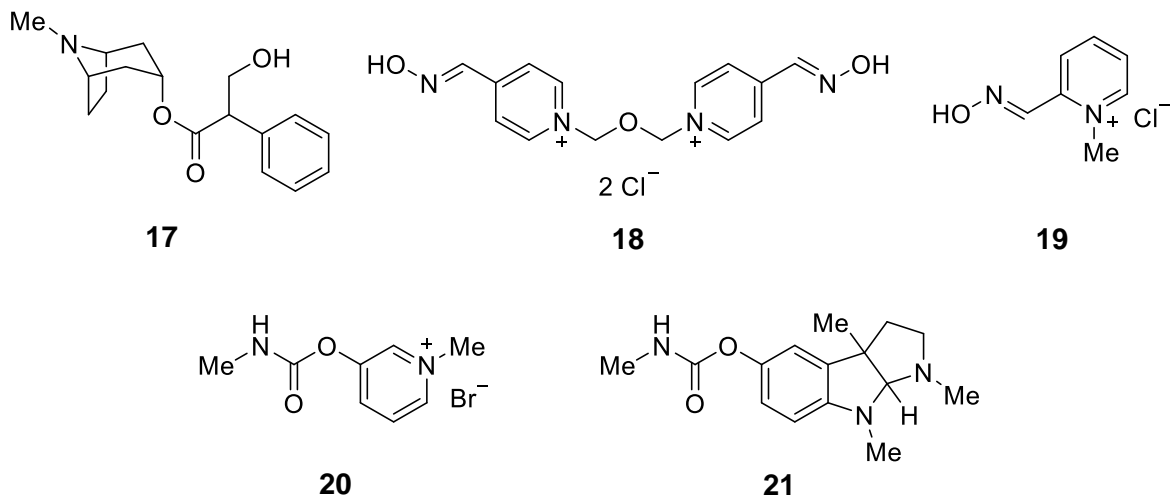
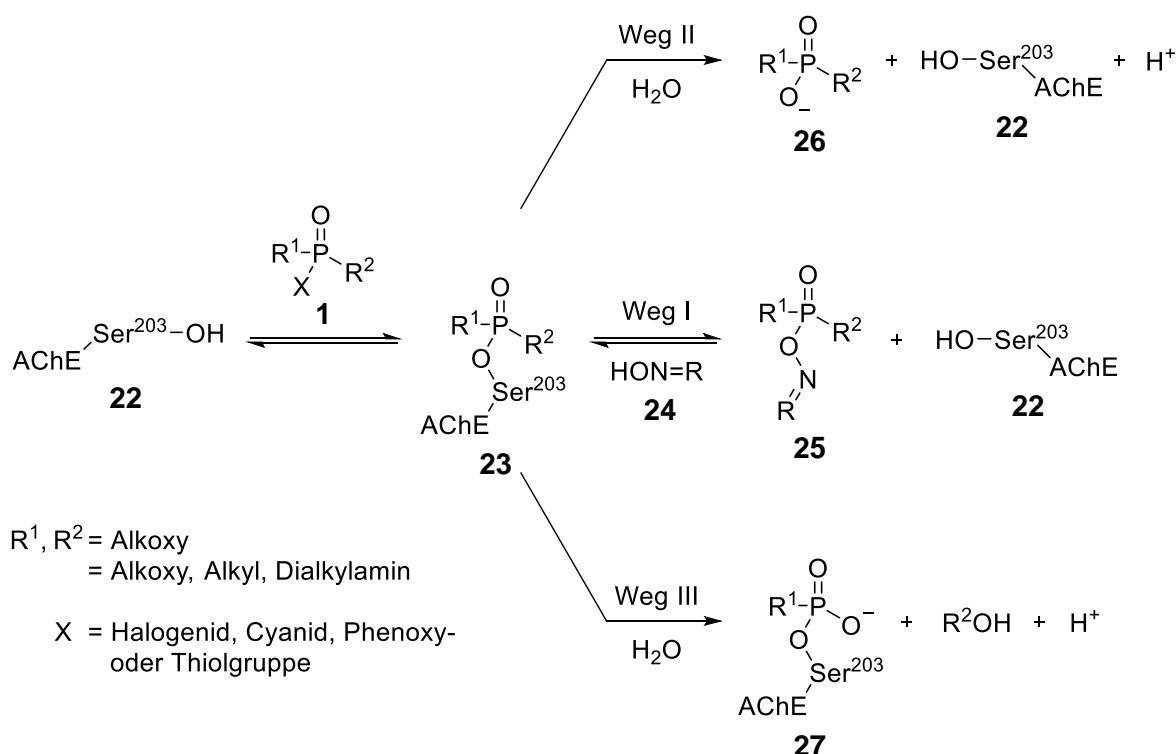


Abbildung 8: Struktur von Atropin (**17**), Obidoxim (**18**), Pralidoxim (**19**) sowie Pyridostigminbromid (**20**) und Physostigmin (**21**).

Problematisch ist hingegen das Fehlen einer adäquaten Therapie der durch eine Inhibierung der nikotinischen Signaltransmission hervorgerufenen Symptome. Hält die Übererregung durch die hohe Konzentration an ACh zu lange an, verlieren die Rezeptoren ihre Funktion und die Reizweiterleitung kommt zum Erliegen. Eine der Folgen ist die bereits erwähnte Lähmung der Atemmuskulatur. Eine Antagonisierung der Effekte an den nAChR mit einem kompetitiven Antagonisten, analog der Atropin-Therapie der mAChR, ist in der Praxis aufgrund des schmalen therapeutischen Fensters nicht möglich. Im Fall der nAChR bestehen große Schwierigkeiten dabei, die Dosis so einzustellen, dass einerseits die Übererregung ausreichend gedämpft aber andererseits keine neuromuskuläre Blockade durch eine zu starke Antagonisierung herbeigeführt wird, welche eigentlich verhindert werden soll.^{68,69}

An diesem Punkt kommt die Oximtherapie zum Tragen. Mit der Reaktivierung (Schema 2, Weg I) der durch Organophosphonate oder Organophosphate (**1**) inaktivierten AChE **23** mittels Oxime (**24**) und dem Freisetzen des funktionsfähigen Enzyms **22** unter Bildung des Phosphonats **25** wird beabsichtigt, die Konzentration an Acetylcholin im synaptischen Spalt soweit abzusenken, dass im Idealfall sowohl mAChR als auch nAChR vermittelte Symptome einer Übererregung gelindert werden.^{70,71,72} Die Wirkung der Oximtherapie wird allerdings dadurch begrenzt, dass nicht alle Enzym-Gift-Komplexe reaktivierbar sind, wie zum Beispiel im Fall der Vergiftung mit Tabun. Zudem unterliegt der reaktivierbare Enzym-Gift-Komplex **23** einer spontanen Dealkylierung

zum irreversibel gehemmten AChE-Phosphor-Komplexe **27** (Weg III).^{73,74} Durch die zusätzliche negative Ladung ist die Elektrophilie des Phosphor Zentralatoms des dealkylierten AChE-Phosphor-Komplexes **27** so gering, dass er von der nukleophilen Oxim-Gruppe nicht mehr angegriffen und die AChE somit nicht mehr reaktiviert werden kann. Die Halbwertszeit des AChE-Gift Komplexes **23** bis zum Eintritt der Dealkylierung ist abhängig von dem Organophosphat bzw. -phosphonat und beträgt im Fall von Sarin 3 h, während bei einer Soman-Vergiftung nur 2–3 Minuten zur Verfügung stehen.⁷⁵ Durch das kurze Zeitfenster ist vielfach keine effektive Oximtherapie mehr möglich.



Schema 2: Oxim induzierte Reaktivierung (I), Spontanhydrolyse (II) und Alterung (III) einer durch Organophosphonate oder Organophosphate (**1**) gehemmten AChE (**23**).

Neben der Reaktivierung durch Oxime, unterliegt der Enzym-Gift-Komplex in einigen Fällen (z. B. VR, VX, Butylsarin oder Paraoxon) zusätzlich einer spontanen Reaktivierung durch Hydrolyse (Weg II) unter Freisetzung der funktionsfähigen AChE **22** und des Phosphonats **26**. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Spontanhydrolyse sehr gering (VR: $t_{1/2} = 18$ h) und die im Fall einer Vergiftung im Körper anfallende Giftkonzentration im Verhältnis zu hoch, so dass dieser Weg keine therapeutische Relevanz besitzt.⁷⁵

Das aktuelle Behandlungsregime weist folglich mehrere Schwachstellen und Limitationen auf. Zum einen wirken für die Therapie zugelassene Oxime wie

Pralidoxim oder Obidoxim nicht zuverlässig bei allen Nervenkampfstoffvergiftungen, zum anderen lindert Atropin ausschließlich muskarinerg vermittelten Symptome. Somit bleibt die Übererregung und in letzter Konsequenz der Funktionsverlust der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren vielfach untherapiert und stellt größte Herausforderungen an die Behandlung von OP-vergifteten Patienten. Trotz intensiver Forschung konnten seit der Entdeckung von Obidoxim und Pralidoxim vor über 60 Jahren keine signifikant wirksameren Oxime gefunden werden.^{74,75,76} Die Wiederherstellung der nikotinerger Neurotransmission als zentrales und größtes Problem einer Nervenkampfstoffvergiftung erfordert deshalb gänzlich neue therapeutische Ansätze. Als eine besonders vielversprechende Möglichkeit erscheint es, die nAChR-Funktion durch eine gezielte Modulation des Rezeptors mit neuen Therapeutika wiederherzustellen. Eine solche Therapie wäre unabhängig von den eingesetzten Nervenkampfstoffen und den durch Alterung der phosphorylierten AChE hervorgerufenen Problemen und würde somit die therapeutische Lücke der aktuellen Atropin-Oximtherapie schließen.

1.3 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor als pharmakologisches Target

1.3.1 Struktur der nAChR

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandgesteuerte Ionenkanäle und gehören wie die 5-HT₃-, GABA_A- oder Glycin-Rezeptoren zur „Cys-Loop“ Superfamilie. Die nAChR bestehen aus fünf kreisförmig angeordneten Untereinheiten (Abbildung 9).^{77,78} Jede Untereinheit besitzt eine große extrazelluläre Domäne, welche überwiegend aus β -sheets besteht, eine Transmembrandomäne mit jeweils vier membrandurchspannenden α -Helices sowie eine kleine, mehrheitlich aus α -Helices aufgebaute, intrazelluläre Domäne. Der Transport der Ca²⁺, Na⁺ oder K⁺ Ionen erfolgt über die wassergefüllte konisch zulaufende Kavität im Inneren des Rezeptors.^{77,79} Für die humanen nAChR sind mit α 1–7, α 9–10, β 1–4, γ , δ und ϵ bisher 16 verschiedene Untereinheiten identifiziert worden.⁸⁰ Die Rezeptoren können entweder aus identischen (Homomer) oder unterschiedlichen (Heteromer) Untereinheiten aufgebaut sein, deren Zusammenstellung maßgeblich die Pharmakologie des Rezeptors beeinflusst.⁸⁰ So lassen sich die homomeren (α 7)₅-nAChRs beispielsweise vorwiegend im zentralen Nervensystem und die heteromeren Rezeptoren vom Typ

($\alpha 1-\epsilon-\alpha 1-\delta-\beta$) ausschließlich an der neuromuskulären Endplatte finden.^{81,82} Die bislang einzige Strukturanalyse eines nAChR gelang Unwin im Jahr 2005 durch Analyse von 395 Elektronenmikroskopie Aufnahmen mit einer Auflösung von 4 Å des ($\alpha 1-\gamma-\alpha 1-\delta-\beta$) aus dem Elektroplox des *Torpedo marmorata*.⁸³

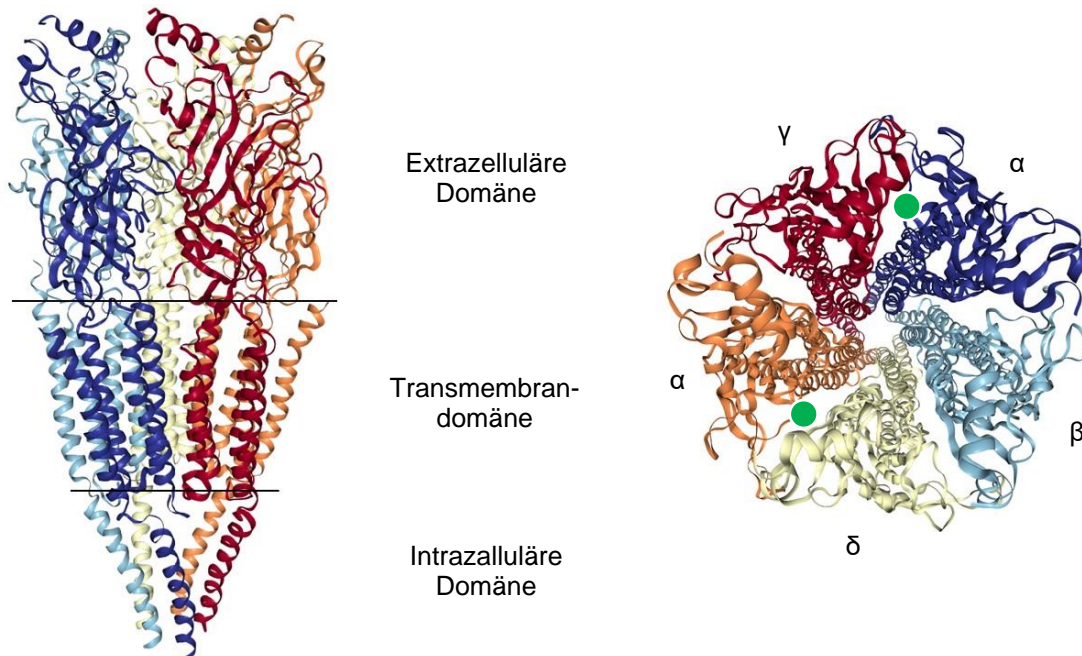


Abbildung 9: 3D-Struktur des $\alpha 1-\gamma-\alpha 1-\delta-\beta$ -nAChR nach Unwin et al. aus dem Elektroplox des kalifornischen Zitterrochens *Torpedo marmorata*,⁸³ erstellt mit dem NGL-Viewer der Protein Data Bank PDB.^{84,85} Die ACh-Bindungsstellen zwischen der α - γ und der α - δ Untereinheit sind durch grüne Kreise markiert.⁸⁶

Dieser ist strukturell eng verwandt zu dem humanen Muskeltyp-nAChR ($\alpha 1-\epsilon-\alpha 1-\delta-\beta$) und deshalb ein geeignetes Modellsystem für die Entwicklung von Assays zur biologischen Prüfung oder für Molecular Modeling Studien.⁸⁶ Die Bindungsstellen der allosterischen Agonisten wie Acetylcholin, Epibatidin oder Nikotin sind für alle nAChR Subtypen relativ gut konserviert und befinden sich in einer hydrophoben aromatischen Kavität (reich an Tyr- und Trp-Seitenketten) der extrazellulären Domäne an der Grenze zwischen der α -Untereinheit und seiner benachbarten γ , ϵ oder δ Untereinheit.^{83,87,88} Die Anzahl der ACh-Bindungsstellen richtet sich somit nach den α -Untereinheiten. Für den nAChR des *Torpedo marmorata* sind diese jeweils zwischen der α - γ und der α - δ Untereinheit lokalisiert und für den humanen Muskeltyp-nAChR zwischen der α - ϵ und der α - δ Untereinheit.⁸³ Die Stabilisierung der positiv geladenen Agonisten erfolgt aufgrund der großen Anzahl an hydrophoben Seitenketten vorwiegend durch π -Kation, Dipol-Kation, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Wechselwirkungen.^{89,90,91}

1.3.2 Die funktionellen Zustände des nAChR und ihre Rolle in der nikotinergen Neurotransmission

Für den nAChR werden vier funktionelle Zustände beschrieben, die alle miteinander im Gleichgewicht stehen und in Abhängigkeit von der Konzentration des Neurotransmitter Acetylcholin vorliegen.⁹²

Hierbei wird zwischen dem geschlossenen Zustand, dem offenen Zustand nach Bindung von ACh, sowie dem desensitisierten Zustand unterschieden, welcher unter Normalbedingungen von ca. 10–20% der nAChR eingenommen wird.^{93,94} Im Gegensatz zum geschlossenen Zustand, ist der Ionenkanal im desensitisierten Zustand trotz der Bindung von ACh geschlossen und damit nicht durch Agonisten aktivierbar. Die Desensitisierung tritt entweder schnell innerhalb weniger Millisekunden in Gegenwart sehr hoher ACh-Konzentrationen ($\mu\text{M}/\text{mM}$ -Bereich) oder langsam nach längerem Einwirken niedrigerer ACh-Konzentrationen (nM -Bereich) ein (Abbildung 10).

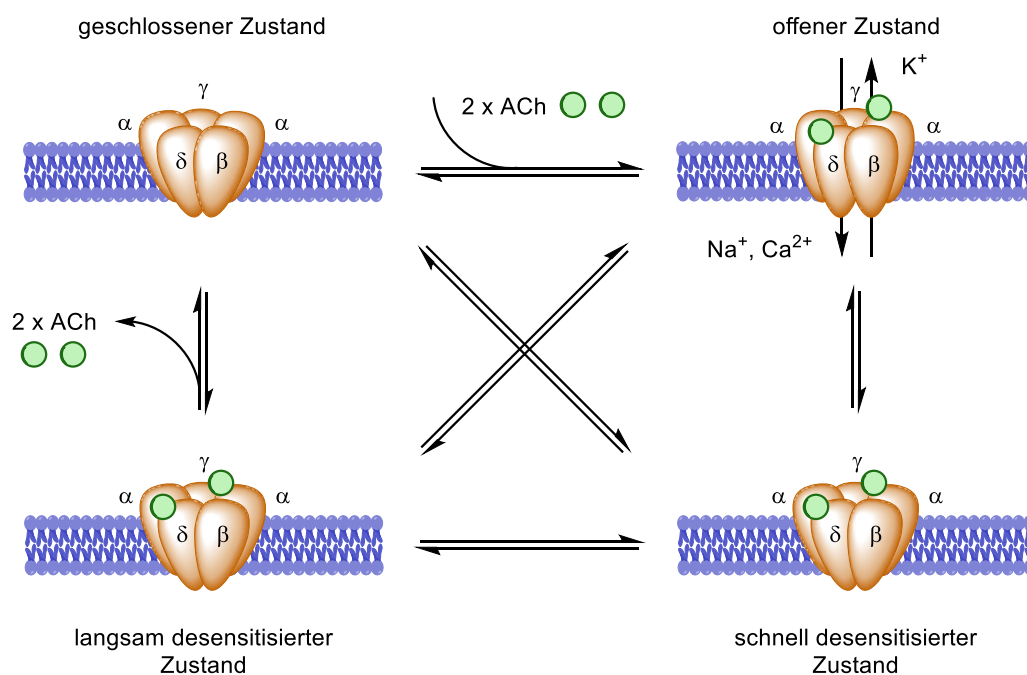


Abbildung 10: Grafische Darstellung der vier postulierten funktionellen Zustände des nAChR.

Wird die ACh-Konzentration im synaptischen Spalt durch Hydrolyse wieder reduziert, erfolgt die Dissoziation des Neurotransmitters von dem desensitisierten Rezeptor und damit die Wiederherstellung der Funktionalität.^{95,96,97,99} Wie der Prozess der Zustandsänderung abläuft, und ob der Rezeptor erst in den geschlossenen aber aktivierbaren oder direkt in den offenen Zustand übergeht ist nicht geklärt. Das

populäre Kooperativitätsmodell von Monod, Wyman und Changeux wird dem nAChR nicht vollständig gerecht, weshalb mehrere konkurrierende Zustandsmodelle existieren.^{93,98,99,100} Allein der Vorgang der Desensibilisierung ist äußerst komplex und ausgesprochen subtypenselektiv.^{95,101,102,103}

So konnten für die in HEK-Zellen exprimierten murinen Muskeltyp-nAChR beispielsweise fünf verschiedene Zwischenzustände beim Übergang in den desensibilisierten Zustand beobachtet werden.¹⁰⁴ Die Untersuchung der Desensibilisierung ist deshalb auch über 60 Jahre nach der ersten umfassenden Beschreibung durch Katz und Thesleff Gegenstand aktueller Forschung.⁹³

Fluoreszenzspektroskopische Kinetik-Experimente mit dem ACh-Derivat DC6C am nAChR des *Torpedo californica* im Jahr 2006 ergaben, entgegen dem MWC-Modell, dass der Übergang aus dem offenen in den desensibilisierten Zustand mit einer deutlichen Änderung der Bindungsaffinität von ACh zur α - γ , nicht aber zur α - δ Bindungsstelle verbunden ist.¹⁰⁵ Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Bindung an die α - γ Bindungsstelle die Triebkraft für die Desensibilisierung liefert und mit einer Konformationsänderung der beiden Untereinheiten einhergehen muss. Vier Jahre später konnten Yamodo et al. mit Hilfe von zeitaufgelösten Photolabeling Studien zeigen, dass der Übergang von dem schnell desensibilisierten in den langsam desensibilisierten Zustand zusätzlich mit einer deutlichen Konformationsänderung der δ Untereinheit verbunden ist.¹⁰⁶ Im Gegensatz zu der Desensibilisierung ist der Übergang von dem geschlossenen in den offenen Zustand deutlich besser untersucht und zweifelsfreier belegt.^{77,107,108} Die Öffnung der Kanalpore erfolgt nach Bindung von Acetylcholin an den geschlossenen Rezeptor und wird durch eine Konformationsänderung der transmembranständigen und zum Kanalinneren zeigenden α -Helices in jeder der fünf Untereinheiten initiiert. Dies hat eine subtile Rotationsbewegung im gesamten Rezeptor entlang der Längsachse zur Folge, sodass sich die Kanalpore minimal von ca. 6–8 Å auf etwa 7.2–10 Å im offenen Zustand vergrößert.^{107,108,109,110} Trotz der nur leichten Rotation, hat die Änderung der Rezeptorstruktur Auswirkungen auf die orthosterische Bindungsstelle und damit auf die Affinität des Neurotransmitters,¹¹¹ welche im offenen Zustand um den Faktor 1500–5000 über der im geschlossenen Zustand liegt.¹¹² In Konsequenz dissoziiert ACh bevorzugt von dem geschlossenen und nicht von dem offenen Zustand. Erfolgt die Dissoziation nicht schnell genug, kann sich der Rezeptor erneut öffnen. Im Mittel treten deshalb mehrere Öffnungs-Zyklen pro ACh-Bindung auf.¹¹³

1.3.3 Die Wirkung einer Nervenkampfstoffvergiftung auf den nAChR

Im Normalzustand bei funktionierender AChE befindet sich die postsynaptische nAChR Population in einem Gleichgewicht aus geschlossenem, offenem und desensitisiertem Zustand. Bei einer durch Nervenkampfstoffe gehemmten AChE führt die schnell steigende ACh-Konzentration zunächst zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts hin zum offenen Zustand mit den Symptomen einer Übererregung des cholinergen Systems. Eine Eigenschaft des nAChR ist, dass der offene Zustand metastabil und in Gegenwart von ACh energetisch deutlich ungünstiger als der desensitisierte Zustand ist.¹¹⁴ Dies hat zur Folge, dass sich das Gleichgewicht bei anhaltend hoher ACh-Konzentration immer mehr in Richtung des desensitisierten Zustands verschiebt, so dass die nikotinerge Reizweiterleitung sukzessive reduziert wird und schlussendlich komplett zum Erliegen kommt. Ohne ein Absinken der Konzentration an ACh im synaptischen Spalt ist eine Resensitisierung auf physiologischem Weg nicht mehr möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass verschiedene Nervenkampfstoffe den Übergang in die Desensitisierung durch eine allosterische Modulation der nAChR zusätzlich fördern können.^{115,116,117}

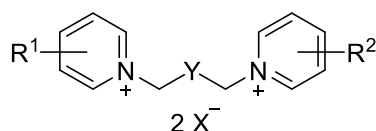
Für die Therapie einer akuten Vergiftung erscheinen deshalb vor allem solche Verbindungen als geeignet, welche die Desensitisierung der nAChR in Gegenwart hoher Konzentrationen an ACh wieder aufheben können und somit eine Wiederherstellung der nikotinerger Neurotransmission ermöglichen.

1.4 Bispyridiniumsalze als potentielle Antidote zur Therapie einer Nervenkampfstoffvergiftung

Die Entdeckung der therapeutischen Wirkung von Bispyridiniumverbindungen bei Nervenkampfstoffvergiftungen war ein Zufallsbefund auf der Suche nach neuen Reaktivatoren der AChE. Als fast 25 Jahre später die Identifizierung der desensitisierten nAChR der Skelettmuskulatur als Wirkort der Bispyridiniumverbindungen gelang, war der Grundstein für die Entwicklung einer neuen Klasse von Antidotem gelegt.

1.4.1 Historischer Hintergrund und die Entdeckung des desensitisierten nAChR als Target für Bispyridiniumverbindungen

Bereits in den frühen 1970er Jahren unternommene *in-vivo* Studien an Mäusen zeigten für Bispyridiniumsalze (BP) wie **SAD-128** oder **HS-8** überraschend einen therapeutischen Effekt in Form einer gesteigerten Überlebensrate bei Soman oder Paraoxon Vergiftungen im Vergleich zu einer Oximtherapie.¹¹⁸ Der beobachtete „schützende Effekt“ bei OP-Vergiftungen warf rasch Fragen nach dem Wirkort und dem zu Grund liegenden Mechanismus auf.¹¹⁸ Denn, obwohl die damals neu getesteten Verbindungen strukturell über das bisquaternäre Pyridiniumsystem eng mit Oximen wie z. B. Obidoxim (**18**), **HI-6** oder **TMB-4** verwandt sind (Abbildung 11), war erwartet worden, dass sie wegen der fehlenden Oxim-Funktion keine Wirkung zeigen.



R ¹	R ²	Y	X	Klasse	Verbindung
4- <i>t</i> -Bu	4- <i>t</i> -Bu	O	Cl	BP	SAD-128
3-CONH ₂	3-CONH ₂	O	Cl	BP	HS-8
4-CH=NOH	4CH=NOH	O	Cl	Oxim	Obidoxim (18)
2-CH=NOH	4-CONH ₂	O	Cl	Oxim	HI-6
4-CH=NOH	4CH=NOH	CH ₂	Br	Oxim	TMB-4

Abbildung 11: Strukturen therapeutisch aktiver Bispyridiniumverbindungen (BP) und Oxime.

Zum damaligen Zeitpunkt ging man davon aus, dass ein therapeutischer Effekt ausschließlich durch eine Reaktivierung der AChE erreicht werden könne. Ebenso konnte ein Abbau der Organophosphate durch die Bispyridiniumverbindungen ausgeschlossen werden.¹¹⁹ Oldiges und Schöne schrieben in ihrer 1970 erschienenen Arbeit zu Pyridiniumsalzen als Antidote bei Soman- und Paraoxonvergiftungen deshalb: „Offenbar wird das Reaktionsgeschehen im Organismus durch diese Substanzen an noch unbekanntem Angriffspunkten beeinflusst“.¹¹⁸ Lange Zeit wurde vermutet, dass die sogenannte „Schutzwirkung“ auf eine Wechselwirkung mit den nAChR zurückzuführen ist.^{120,121,122} Ein direkter Zusammenhang zwischen der therapeutischen Wirksamkeit einzelner Bispyridiniumverbindungen *in-vivo* und der postulierten Bindung an den nAChR sollte allerdings erst viele Jahre später gelingen. Im Jahr 1988 fanden Alkondon und Albuquerque durch Patch-Clamp

Einzelkanalmessungen an präparierten Muskelfasern des Leopardfrosches *Rana pipiens* den Nachweis für die Wechselwirkung der Bispyridiniumverbindungen mit dem Muskeltyp-nAChR.¹²³ Durch einen Vergleich der ACh-vermittelten Stromantworten in Abwesenheit sowie in Gegenwart von **SAD-128** konnte beobachtet werden, dass die Zugabe des Bispyridiniumsalzes zu einem Flackern des Rezeptors führte. Statt einer einzigen Stromantwort wurde mit steigender **SAD-128** Konzentration ein immer länger andauernder sehr schneller Wechsel zwischen dem geöffneten und dem geschlossenen Zustand detektiert, so dass angenommen wurde, dass es sich bei **SAD-128** um einen Kanalblockers des nAChR handeln könnte. Fünf Jahre später konnte Tattersall für **SAD-128** und drei weitere Bispyridiniumverbindungen schließlich zeigen, dass die Wiederherstellung der Muskelfunktion *in-vitro* mit der Burst-Dauer und der Anzahl der Öffnungszyklen korreliert. Seitdem gilt der desensitisierte Muskeltyp-nAChR als Target der Bispyridiniumverbindungen als gesichert.¹²⁴ Eine Wechselwirkung mit den neuronalen nAChR des ZNS kann aufgrund der beiden quarternären Stickstoffatome und der daraus resultierenden hohen Polarität der Bispyridiniumverbindungen nahezu ausgeschlossen werden, da diese nicht in der Lage sein sollten, die Blut-Hirn-Schranke in einem signifikanten Ausmaß zu überwinden.

1.4.2 Die therapeutisch wirksamste Bispyridiniumverbindung MB327

Neben den bereits erwähnten Verbindungen **SAD-128** und **HS-8** (Abbildung 11), sind das 4-*tert*-butylsubstituierte symmetrische Bispyridiniumdiiodid **MB327**, bzw. sein Dimethansulfonat Analogon **MB399** (Abbildung 12), eine der *in-vivo* und *in-vitro* für die Therapie von Nervenkampfstoffvergiftungen wirkungsvollsten und am besten untersuchten Bispyridiniumsalze.

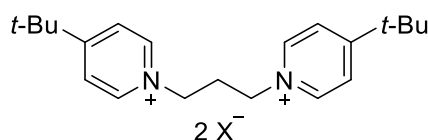


Abbildung 12: Struktur der Bispyridiniumsalze **MB327** bzw. **MB399**.

Im Gegensatz zu dem ebenfalls 4-*tert*-butylsubstituierten **SAD128** sind bei **MB327** die beiden Pyridiniumringe nicht über einen Methoxymethyl- sondern über einen Propan-1,3-diyl-Linker verbunden. Dies führt dazu, dass **MB327** ($ED_{50} = 6.2 \mu\text{mol kg}^{-1}$) *in-vivo* bei Mäusen eine 3,5-fach höhere Effektivität bei der Behandlung von Somanvergiftungen besitzt als **SAD128** ($ED_{50} = 21.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$).¹²²

Des Weiteren bescheinigten *in-vitro* Studien dem Bispyridiniumsalz die für die Behandlung von Nervenkampfstoffvergiftungen benötigte Wirkung am humanen Muskeltyp-nAChR. So wurde bei elektrophysiologischen Messungen von Soman vergifteten Skelettmuskelpräparationen in Gegenwart von 100–200 μM **MB327** eine partielle Wiederherstellung der vor der Vergiftung maximal möglichen Muskelkraft von bis zu 40% gemessen.¹²⁵

Um die therapeutische Wirksamkeit bei einer Nervenkampfstoffvergiftung vollumfänglich beurteilen zu können, stellten Turner und Timperley et al. das Bispyridiniumsalz **MB399** dem etablierten Oxim **HI-6** in einer *in-vivo* Studie an Meerschweinchen gegenüber.^{126,127} Beide Verbindungen wurden in einer Konzentration von jeweils $19.3 \mu\text{mol kg}^{-1}$ eine Minute nach der Injektion von Soman, Sarin oder Tabun als Teil einer Kombinationstherapie zusammen mit dem mAChR Antagonisten Hyoscin und dem reversiblen AChE-Inhibitor Physostigmin verabreicht. Die Überlebensrate wurde 6 h nach Injektion der Nervenkampfstoffe bestimmt. Wenig überraschend, war diese bei der kurzen Latenzzeit von nur einer Minute und einer dementsprechend kaum ins Gewicht fallenden Alterung der AChE mit dem Oxim **HI-6** auf einem hohen Niveau und hing, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, wesentlich von dem Organophosphonat bzw. Phosphoramidat ab (Sarin: 100%, Soman: 88%, Tabun: 15%). Im Gegenzug dazu zeigte **MB399** eine konstante Überlebensrate von 50–75%. Gerade der deutlich gesteigerte Therapieerfolg im Fall von Tabun (**MB399**: 60%, **HI-6**: 15%) unterstreicht in bemerkenswert deutlichem Maße die Wirksamkeit der Bispyridiniumverbindung **MB399** aber auch ganz allgemein das Potential, welches die Therapie der desensitisierten nAChR bietet. Die Autoren konstatierten allerdings auch, dass bereits eine moderate Anhebung der Dosierung mit schweren Nebenwirkungen verbunden war. Führt eine Erhöhung der verabreichten Dosis an **MB399** von 19.3 auf $33 \mu\text{mol kg}^{-1}$ noch zu einer Steigerung der Überlebensrate von 75 auf 100%, so konnten bei einer nur leicht höheren Dosis bereits erste Beeinträchtigungen der Atemmuskulatur und ab $60 \mu\text{mol kg}^{-1}$ eine tödliche Atemlähmung diagnostiziert werden.¹²⁸ Die Ursache hierfür ist noch unbekannt. Zwar konnte für das zu **MB399**

strukturell identische Bispyridiniumsalz **MB327** *in-vitro* eine schwache inhibitorische Wirkung der AChE nachgewiesen werden, mit einem IC_{50} von $600 \mu\text{M}$ liegt diese aber weit oberhalb der in der Studie eingesetzten Dosierungen. Von einem direkten Zusammenhang zwischen der *in-vivo* beobachteten Beeinträchtigung der Atemmuskulatur und der *in-vitro* gefundenen Hemmwirkung auf die AChE kann daher nicht ausgegangen werden.

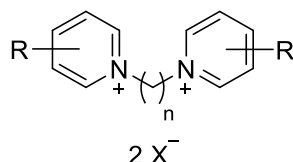
Festzuhalten bleibt, dass *in-vivo* als auch *in-vitro* Tests dem Bispyridiniumsalz einen signifikanten therapeutischen Effekt bescheinigen. Sie zeigen aber auch sehr deutlich, dass die Wirkstärke von **MB327** für eine Anwendung am Menschen unzureichend und das therapeutische Fenster für eine Therapie zu klein ist. Die Ergebnisse bestätigen auch, dass eine auf die Therapie der desensitisierten Muskeltyp-nAChR abzielende Behandlung unabhängig von den eingesetzten Nervenkampfstoffen zum Erfolg führen kann und somit die therapeutische Lücke am nAChR, welche insbesondere im Fall von Soman- oder Tabun-Vergiftungen besteht, therapierbar ist.

1.4.3 Über den Wirkmechanismus von therapeutisch aktiven Bispyridiniumverbindungen am nAChR

Mit der Identifizierung des nAChR als Target der Bispyridiniumverbindungen (vgl. Kapitel 1.4.1) und dem in Kapitel 1.4.2 beschriebenen Nachweis ihrer therapeutischen Wirkung stellte sich letztlich die Frage nach dem Wirkmechanismus und dem Wirkort der bisquarternären Salze am Rezeptor. Um die Wechselwirkung therapeutisch aktiver Bispyridiniumverbindungen wie **MB770**, **MB456**, **MB442**, **MB583**, **MB327** und **MB424** (Tabelle 1) mit der orthosterischen Bindungsstelle des nAChR zu überprüfen, führten Niessen et al. [^3H]Epibatidin Bindungsstudien am nAChR des *Torpedo californica* durch.¹²⁹ Für alle der sechs genannten Bispyridiniumsalze konnte *in-vitro* im Konzentrationsbereich von 30 bis $100 \mu\text{M}$ ein therapeutischer Effekt bei Soman vergifteten Muskelpräparationen nachgewiesen werden.¹²⁹ Wie die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen,¹²⁹ korreliert die Affinität der Bispyridiniumverbindungen zur orthosterischen Bindungsstelle des nAChR nicht mit ihrer *in-vitro* beobachteten pharmakologischen Aktivität. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass Bispyridiniumsalze wie **MB327** ihre therapeutische Wirkung am nAChR über einen kompetitiven Mechanismus ausüben.

Basierend auf *in-vitro* Testergebnisse von **MB327** wurden unabhängig voneinander zwei verschiedene Modelle zum Wirkmechanismus vorgeschlagen, welche im Folgenden kurz gegenübergestellt werden.

Tabelle 1: Affinitäten der pharmakologisch aktiven Bispyridiniumsalze **MB770**, **MB456**, **MB442**, **MB583**, **MB327** und **MB424** zur orthosterischen Bindungsstelle des nAChR aus dem *Torpedo californica* nach Niessen et al.¹²⁹



BP-Salz	R	n	X ⁻	K _i (μmol L ⁻¹)
MB770	2-Ph	3	I ⁻	15.8 ± 3.7
MB456	3-Br	3	Br ⁻	39.8 ± 18.9
MB442	H	5	I ⁻	199.5 ± 61.7
MB583	4- <i>t</i> -Bu	2	I ⁻	n.b.
MB327	4- <i>t</i> -Bu	3	I ⁻	n.b.
MB424	4-CF ₃	3	I ⁻	n.b.

n.b.: Keine Affinität messbar.

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 erwähnt, ließen Patch-Clamp Einzelkanalaufzeichnungen des Muskeltyp-nAChR den Schluss zu, dass Bispyridiniumsalze die Charakteristika von Kanalblockern besitzen und so eine Desensibilisierung der Rezeptoren in Gegenwart hoher Agonistkonzentrationen verhindern.^{123,124} Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete Wirkung besteht in der von Niessen et al. vorgeschlagenen Wirkung als positive allosterische Modulatoren vom Typ II (PAM II).¹³⁰ Während allosterische Modulatoren vom Typ I den Effekt des orthosterisch gebundenen Agonisten verstärken, sind Modulatoren vom Typ II zusätzlich in der Lage den Übergang aus dem desensibilisierten in den geöffneten Zustand zu ermöglichen.¹³¹ Zellfreie elektrophysiologische Messungen am nAChR des *Torpedo californica* welche mit dem Bispyridiniumsalz **MB327** auf der SURFE²R (surface electronic event reader) Plattform durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass **MB327** sowohl präventiv eine Agonist vermittelte Desensibilisierung zu verhindern als auch die Rezeptorfunktion nach erfolgter Desensibilisierung in Gegenwart pathophysiologisch hoher Agonistkonzentrationen wiederherzustellen vermag. **MB327** zeigt somit alle Eigenschaften eines PAM II Modulators.¹³⁰ Eine Aktivierung des Rezeptors alleine durch **MB327** im

Sinne eines allosterischen Agonisten, d. h. in Abwesenheit des orthosterisch bindenden Agonisten ACh, konnte ausgeschlossen werden. Gerade die Fähigkeit zur Resensitisierung der desensitisierten nAChR, wie sie nur ein PAM II Modulator besitzt, ist für die Entwicklung wirkungsvoller Antidote äußerst wertvoll.

Die Identifizierung der Bindungsstellen der therapeutisch wirksamen Bispyridiniumverbindungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Kürzlich veröffentlichte *in-silico* Studien lassen vermuten, dass **MB327** im Kanallinneren zwischen den α - γ Untereinheiten der extrazellulären Domäne und den β - δ Untereinheiten der Transmembrandomäne interkaliert (vgl. Kapitel 2.1.1).¹³²

1.4.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen von **MB327** homologen Bispyridiniumverbindungen am nAChR

Struktur-Wirkungsbeziehungen tragen maßgeblich zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur einer Substanz und ihrer biologischen Wirkung bei und sind elementarer Bestandteil jeder Entwicklung von Arzneistoffen. So ermöglichen diese beispielsweise die zielgerichtete Optimierung von Wirkstoffkandidaten oder Rückschlüsse auf die chemische Beschaffenheit unbekannter Bindungsstellen.

Im speziellen Fall der Bispyridiniumverbindungen und ihrer Wechselwirkung mit den nAChR sind valide Struktur-Wirkungsbeziehungen leider nur unzureichend in der Literatur publiziert. Dies liegt zum einen an dem Fehlen geeigneter Hochdurchsatz-Screeningmethoden und computerchemischen Modellsystemen, zum anderen aber auch an der viel zu geringen Anzahl der mit den verfügbaren Methoden getesteten Verbindungen. Belastbare Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich daher ausschließlich für eine homologe Reihe 4-*tert*-butylsubstituierter Bispyridiniumverbindungen (**28**, **MB327** und **MB583**) mit unterschiedlich langen Alkyllinkern ($n = 1-6$) finden (Abbildung 13).

So zeigten Muskelkraftmessungen an Soman vergifteten Ratten-Diaphragmen für diese Gruppe von Bispyridiniumverbindungen eine Abhängigkeit des Resensitisierungspotentials von der Linkerlänge. Während Salze mit einem Ethan-1,2-diyl- ($n = 2$, **MB583**) und Propan-1,3-diyl-Linker ($n = 3$, **MB327**) bei einer Konzentration von 300 μM ein deutliches Resensitisierungspotential von 21 (**MB583**) bzw. 26% (**MB327**) zeigten, blieben Verbindungen mit $n = 1$ oder $n = 4-6$ wirkungslos.¹³³

Im Gegenzug erhöhte sich mit zunehmender Länge der Linker die Wirkung der Bispyridiniumsalze als Antagonisten der orthosterischen Bindungsstelle des nAChR. Die mittels [³H]Epibatidin Radioliganden-Bindungsassays ermittelten K_i -Werte der in Abbildung 13 dargestellten 4-*tert*-butylsubstituierten Bispyridiniumsalze und weiterer Homologe mit Linkern der Länge $n = 7-10$ zur orthosterischen Bindungsstelle des nAChR aus dem *Torpedo californica* lagen zwischen $31.6 \mu\text{M}$ ($n = 5$) und $7.9 \mu\text{M}$ ($n = 10$). Therapeutisch wirksame Verbindungen mit Linkern der Länge $n = 2$ und $n = 3$ zeigten, wie bereits in Kapitel 1.4.3 erwähnt, keine nennenswerte Affinität zur orthosterischen Bindungsstelle.¹³⁴

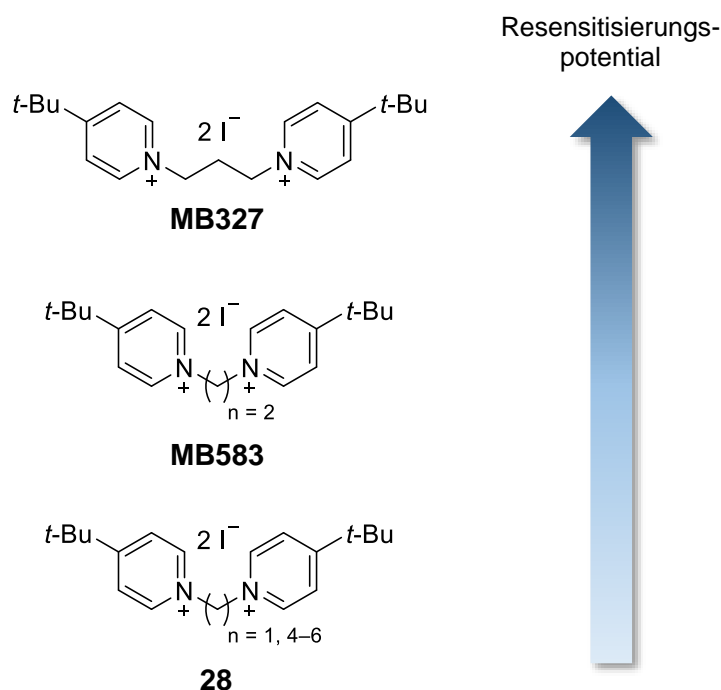


Abbildung 13: Qualitativer Vergleich des Resensitierungspotentials von **MB327** mit seinem homologen Bispyridiniumverbindungen **MB583** und **28**.

Für die im Ratten-Diaphragma-Assay wirksamen Verbindungen **MB583** ($n = 2$) und **MB372** ($n = 3$) sowie für **MB781** ($n = 4$) wurde das Resensitierungspotential zusätzlich mittels funktionaler Messungen auf der SURFE²R Plattform am nAChR des *Torpedo californica* untersucht. In Gegenwart von 10 mM Carbachol zeigten die Bispyridiniumsalze nur begrenzt ein zu dem Diaphragma-Assay verwandtes Wirksamkeitsprofil. Hiernach besitzt **MB327** ($n = 3$) bei einer äquimolaren Konzentration von 10 mM ein etwa doppelt so hohes Resensitierungspotential auf die desensitisierten nAChR (417 zu 199–213%) als seine Ethan-1,2-diyl ($n = 2$, **MB583**) und Butan-1,4-diyl Analoga ($n = 4$, **MB781**).¹³⁰ Dass **MB781** im SURFE²R-Assay eine zu **MB583** vergleichbare Wirkung erzielt, in den Diaphragma-Assays hingegen

wirkungslos bleibt, könnte mit den unterschiedlichen nAChR Subtypen in den beiden Assays erklärt werden (SURFE²R-Assay: *Torpedo*-nAChR mit $\alpha 1-\gamma-\alpha 1-\delta-\beta$; Diaphragma-Assay: Ratten-nAChR mit $\alpha 1-\epsilon-\alpha 1-\delta-\beta$). Die in Abbildung 13 skizzierten rein qualitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen für 4-*tert*-butylsubstituierte Bispyridiniumsalze mit Alkylkern der Länge $n = 1-10$ spiegeln den Forschungsstand zur Beginn dieser Arbeit wieder und lassen keine Rückschlüsse auf empfehlenswerte strukturelle Modifikationen zu, welche eine Steigerung des Resensitisierungspotentials von **MB327** bewirken könnten. Dies verdeutlicht einmal mehr, wie dringend Hochdurchsatz-Screeningmethoden, neue Bibliotheken an strukturell diversen Bispyridiniumverbindungen und eine Korrelation der experimentell ermittelten Daten über die unterschiedlichen Testsysteme hinweg für die Entwicklung neuer Resensitizer benötigt werden.

2 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit war Teil eines interdisziplinären Forschungsprojekts (vgl. Kapitel 2.1) mit dem Ziel der Entwicklung und Synthese neuer Wirkstoffe zur Behandlung von Nervenkampfstoffvergiftungen. Hierzu war geplant das für den Einsatz am Menschen nicht ausreichend wirksame Bispyridiniumsalz **MB327** schrittweise strukturell zu modifizieren und die neu synthetisierten Verbindungen hinsichtlich ihrer Affinität zur Bindungsstelle von **MB327** am nAChR des *Torpedo californica* zu charakterisieren. Um die institutsübergreifende Zuordnung der substanzspezifischen Daten aus der pharmakologischen und pharmakokinetischen Prüfung zu erleichtern, sollten alle Zielverbindungen mit einer spezifischen PTM Nummer katalogisiert werden (Pharmacy and Toxicology Munich). Anhand der Testergebnisse aus der biologischen Prüfung sollte untersucht werden, wie sich strukturelle Veränderungen auf die Affinität von **MB327** zum nAChR auswirken und welche Wechselwirkungen für die Bindung von entscheidender Bedeutung sind. Ziel war es, eine solide Basis für die Entwicklung von Struktur-Wirkungsbeziehungen und für die Synthese optimierter Wirkstoffkandidaten zu legen. Zusätzlich war die Synthese zweier deuterierter Analoga von **MB327** mit einer Differenz von mindestens vier Deuteriumatomen beabsichtigt, welche als MS-Marker bzw. Kompetitor in der Entwicklung der ebenfalls im Forschungsvorhaben verankerten MS-Bindungsassays eingesetzt werden sollten. Hinsichtlich der Syntheserouten war angestrebt, ein besonderes Augenmerk auf eine hohe Modularität, kurze Synthesewege und eine bestmögliche Toleranz unterschiedlicher funktioneller Gruppen zu legen, um so eine möglichst große Produktvielfalt zu erreichen.

2.1 Forschungsvorhaben zur gezielten Entwicklung von Antidoten zur Behandlung von Nervenkampfstoffvergiftungen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, war die Suche nach Antidoten zur Therapie von Nervenkampfstoffvergiftungen in der Vergangenheit geprägt durch Zufall und Irrtum. Nahezu alle gefundenen Medikamente basieren entweder auf Naturstoffen (Atropin, Hyoscin, Physostigmin) oder auf zufällig entdeckten Wirkstoffen (Oxime). Was lange Zeit fehlte, war das Wissen um die

Wechselwirkung von Wirkstoffen mit Biomolekülen auf molekularem Level, die Technik um diese gezielt überprüfen zu können sowie die Identifizierung von geeigneten Targets, deren Modulation den gewünschten therapeutischen Nutzen erzielt. So existierten bisher beispielsweise keine aussagekräftigen Struktur-Wirkungsbeziehungen auf deren Basis das Bispyridiniumsalz **MB327** zielgerichtet hätte optimiert werden können (vgl. Kapitel 1.4.4). Es verwundert folglich nicht, dass der Kern des Therapieregimes, bestehend aus der Gabe von Atropin in Kombination mit einem Oxim, seit der Entdeckung der Oxime als Reaktivatoren der gehemmten AChE in den 1950iger Jahren nahezu unverändert blieb.

2.1.1 Das rationale Design neuer Bispyridinium Resensitizer der nAChR

An dieser Stelle setzt das im Folgenden vorgestellte Forschungsvorhaben des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr und des Arbeitskreises von Prof. Dr. K. T. Wanner am Department Pharmazie der LMU München an. Ziel des Projekts war das rationale Design neuer Resensitizer des nAChR mit dem in Kapitel 1.4 vorgestellten Bispyridiniumsalz **MB327** als Leitstruktur. Die neuen Substanzen sollten damit helfen, der Entwicklung von Antidoten zur Behandlung von Nervenkampfstoffvergiftungen am nAChR einen Schritt näher zu kommen. Als Modellsystem für den Muskelytp-nAChR wurde der nAChR des *Torpedo californica* ausgewählt, welcher zu einem hohen Grad homolog zum humanen Muskelytp-nAChR ist und ein hierfür allgemein gebräuchliches Modellsystem darstellt.^{135,136}

Entsprechend der an das rationale Wirkstoffdesign gestellten Anforderungen umfasste das Forschungsvorhaben die Synthese neuer Wirkstoffe, deren biologische Prüfung sowie Molecular Modeling Studien am nAChR. Die einzelnen Arbeitsfelder sollten sich als Teil eines iterativen Design Cyclus gegenseitig ergänzen und so zu der Optimierung der Leitstruktur und zur Identifizierung neuer Wirkstoffkandidaten beitragen (Abbildung 14). Hierzu zählten:

- Die Entwicklung von MS-Bindungsassays auf der Basis von Filtration, Zentrifugation bzw. Gleichgewichtsdialyse mit dem Ziel der Affinitätsbestimmung neu synthetisierter Substanzen am nAChR (biologische Prüfung),
- die Entwicklung eines Pharmakophormodells und die Durchführung von *in-silico*-Screening-Experimenten (Molecular Modeling),

- die Synthese neuer Wirkstoffe desensibilisierter neuromuskulärer nikotinischer Acetylcholinrezeptoren mit **MB327** als Leitstruktur (diese Arbeit),
- sowie die pharmakologische Untersuchung der neu synthetisierten Substanzen am Ratten-Diaphragma-Modell und mit Patch-Clamp-Methoden (biologische Prüfung).

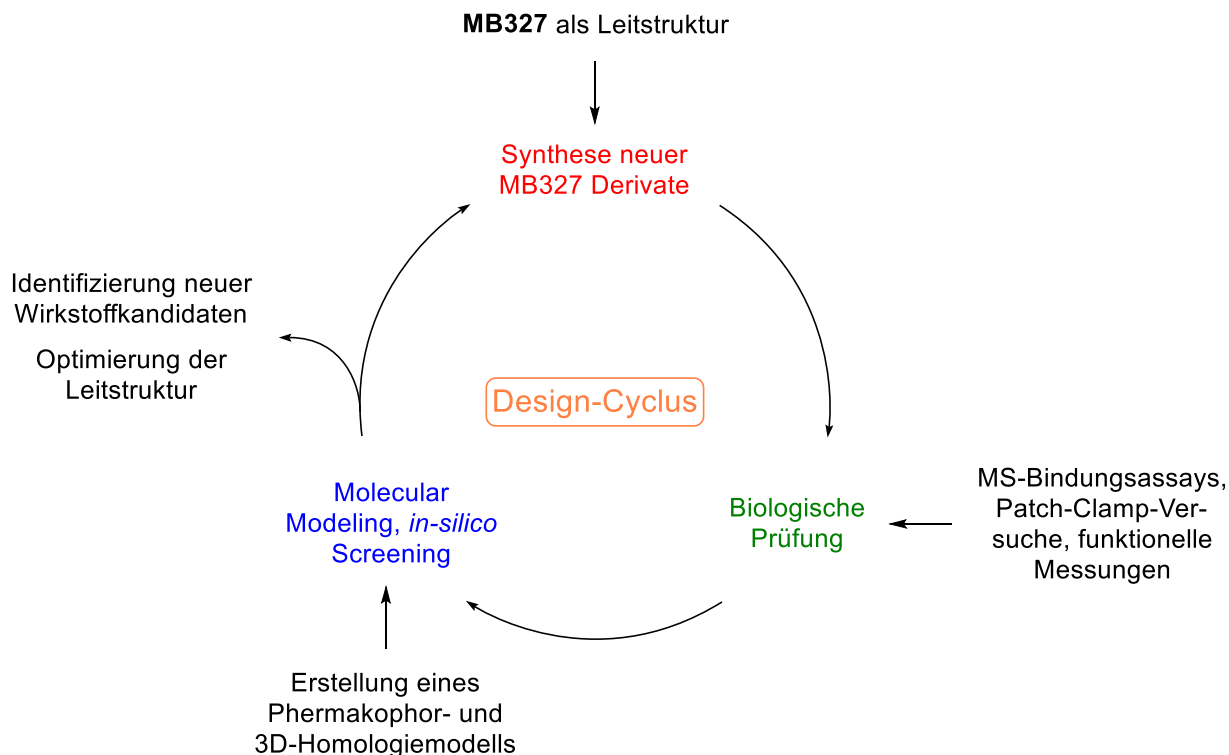


Abbildung 14: Rationales Wirkstoffdesign mit **MB327** als Leitstruktur

Die mittels der neu entwickelten MS-Bindungsassays bestimmten Affinitäten der synthetisierten Verbindungen sollten zum Aufbau von Struktur-Affinitätsbeziehungen sowie zur Erstellung eines Pharmakophormodells im Sinne des ligandbasierten Designs verwendet werden. Für das strukturbasierte Wirkstoffdesign sollten 3D-Homologie Modelle des nAChR erstellt werden, welche die computergestützte Suche nach potentiellen Bindungsstellen der Bispyridiniumsalze ermöglichen. Die Ergebnisse aus dem Molecular Modeling sowie der biologischen Prüfung (MS-Bindungsassay, Patch-Clamp-Versuche, funktionelle Messungen auf der SURFE²R Plattform – letztere war nicht explizit Teil des Projekts) sollten wiederum die Basis für weitere Optimierungen der Leitstruktur sowie für das *in-silico*-Screening von virtuellen Datenbanken nach neuen interessanten Wirkstoffkandidaten bilden.

2.2 Synthese potentieller Resensitizer

Mit Hinblick auf die zu erstellenden Struktur-Affinitätsbeziehungen, sollten die ersten Zielstrukturen dazu dienen, den Einfluss von einzelnen Strukturelementen auf die Bindungsaffinität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zielverbindungen in vier Gruppen mit je einem charakteristischen Strukturmerkmal unterteilt. Die einfachsubstituierten Bispyridiniumverbindungen des Typs I (**29**) und II (**30**) sollten hierbei mit unterschiedlichen lipophilen (Me, *i*-Pr, *t*-Bu) und hydrophilen (OMe, NMe₂, *N*-Methylpyrrolidin) Substituenten versehen werden, um die Auswirkungen von Sterik, Ringposition und H-Brücken-Bindungen auf die Bindungsaffinität zu untersuchen. Verbindungen vom Typ III (**31**) wurden direkt von **MB327** abgeleitet und sollten neben der 4-*tert*-Butylgruppe einen zusätzlichen lipophilen oder hydrophilen Substituenten (z. B. Ph, CN, OMe, COOEt, Cl) in 3-Position besitzen. Mit der vierten Verbindungsklasse (Typ IV, **32**) war angestrebt, die strukturelle Vielfalt über Bispyridiniumsalze hinaus zu erweitern, indem neue Heterocyklen wie Imidazol, Thiazol, Pyrazin oder Isoquinolin eingeführt werden sollten.

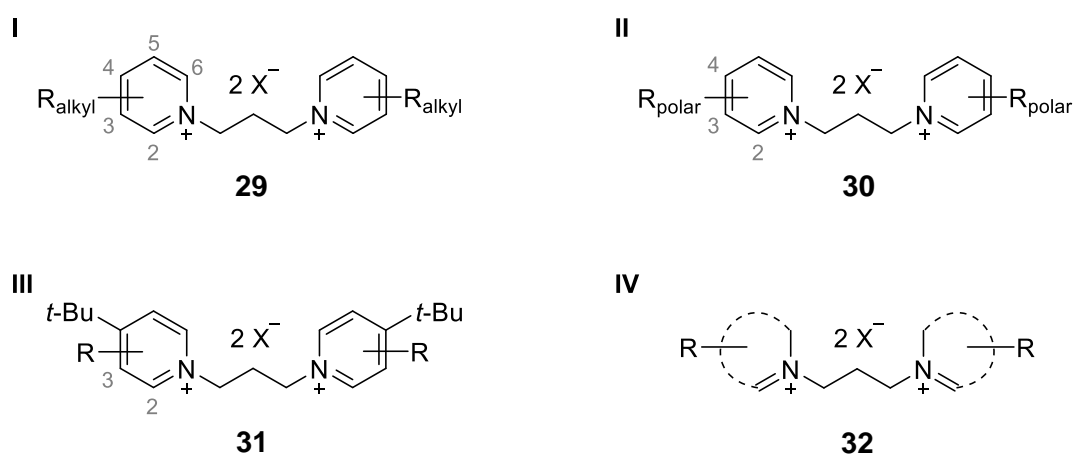
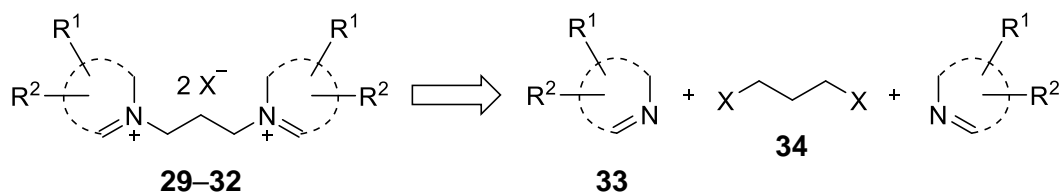


Abbildung 15: Von der Leitstruktur **MB327** abgeleitete Zielstrukturen potentieller Resensitizer.

Bei den Zielverbindungen **29–32** handelt es sich um bisquaternäre Salze mit zwei identischen N-Heterocyclen auf beiden Seiten des Propan-1,3-diyl-Linkers. Diese weisen eine C₂-Symmetrieachse auf und werden deshalb im Folgenden als symmetrische Salze bezeichnet. Als solche sollten sie durch eine N-Alkylierung der entsprechenden aromatischen N-Heterocyclen **33** mit einem Propan-1,3-diyl-Biselektrophil (**34**) zugänglich sein (Schema 3).^{137,138} Ziel war es deshalb, geeignete

Biselektrophile und Reaktionsbedingungen zu identifizieren, welche die Alkylierung des in Abbildung 16 gezeigten Spektrums an N-Heterocyclen ermöglichen. Hierzu zählen die Pyridinderivate **35–37** sowie Isoquinolin (**38**), 2-*tert*-Butylpyrazin (**39**), 1,3-Thiazol (**40**), *N*-Methyl- (**41a**) und *N-tert*-Butylimidazol (**41b**). Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Synthese der für die Darstellung der Bispyridiniumsalze **31** benötigten und in der Literatur kaum bekannten 2- und 3-substituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivate **37**. Hierbei galt es, eine effiziente, ökonomische und ein breites Produktspektrum liefernde Synthesemethode zu finden.



Schema 3: Syntheschema zur Darstellung der potentiellen Resensitizer **29–32**.

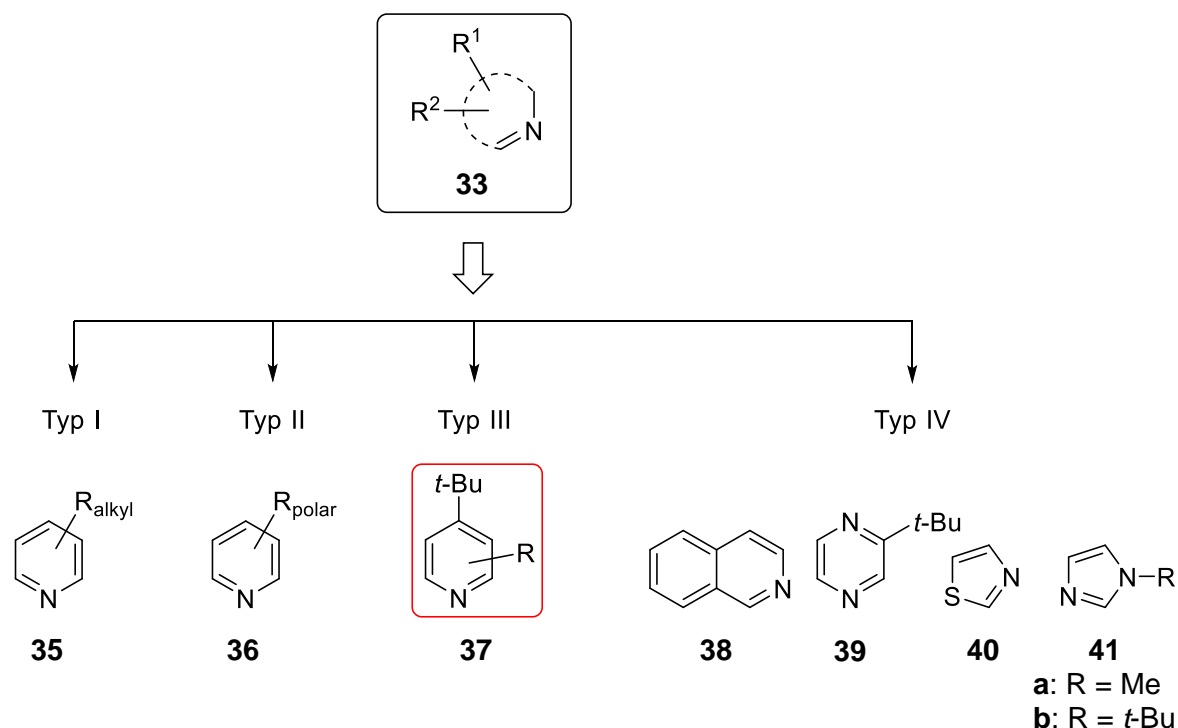


Abbildung 16: Für die Synthese der Zielverbindungen **29–32** vorgesehene N-Heterocyclen **35–41**.

Im Anschluss an die Arbeiten zu den bisquaternären Verbindungen **29–32** sollten auf Basis der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Erkenntnisse aus dem Molecular Modeling sowie aus der biologischen Prüfung der Verbindungen **29–32** neue und potentiell wirksamere Resensitizer entwickelt werden (Abbildung 17).

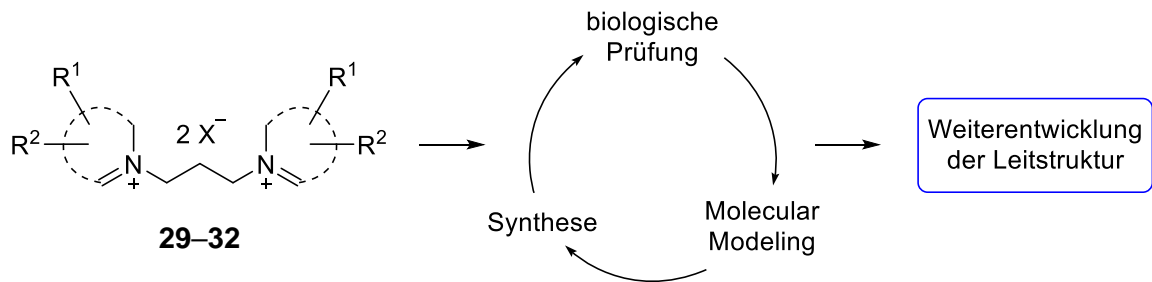
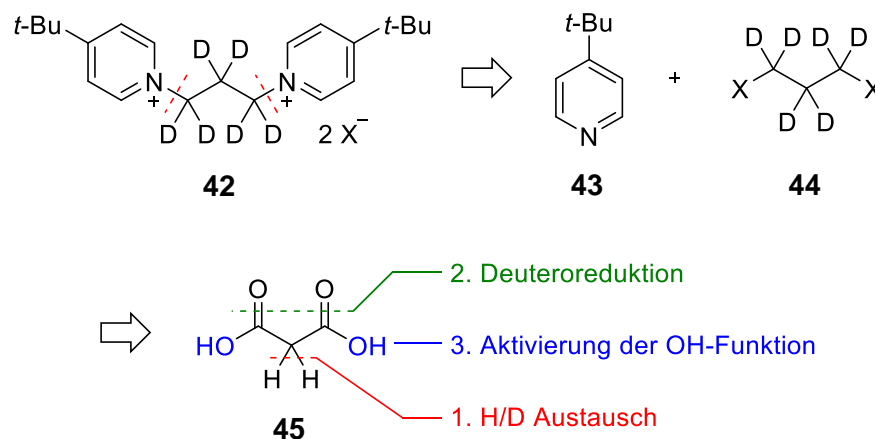


Abbildung 17: Geplante Entwicklung neuer Resensitizer im Sinne des rationalen Wirkstoffdesigns.

2.3 Synthese zweier deuterierter MB327-Analoga für die Entwicklung von MS-Bindungsassays

Zusätzlich zu den bereits genannten Arbeiten erforderte die Entwicklung von MS-Bindungsassays für die MB327-Bindungsstelle zwei deuterierte **MB327**-Analoga mit einer Massendifferenz von mindestens vier Deuteriumatomen. Aus synthetischen Gesichtspunkten erschien es naheliegend und praktikabel, die Deuteriummarkierungen einmal über den Linker (d_6 -Derivat, Schema 4) und einmal über die *tert*-Butylgruppe der beiden Heterocyclen (d_{18} -Derivat) einzuführen.

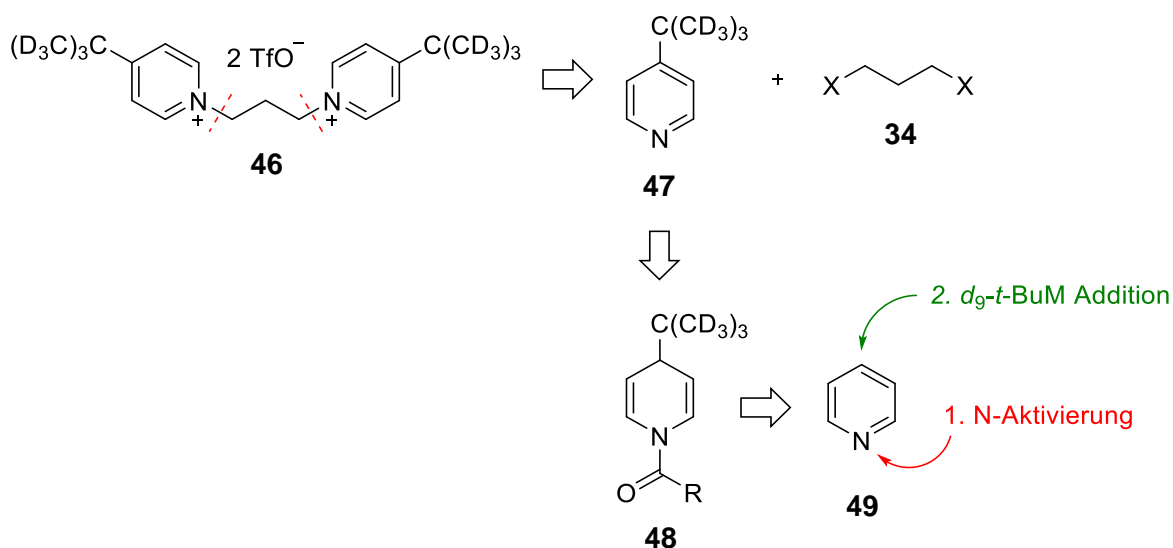


Schema 4: Retrosynthese des d_6 -MB327-Analogons **42**.

Retrosynthetisch sollte sich das d_6 -MB327-Analogon **42** aus 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) sowie dem d_6 -Propan-1,3-diyl-Biselektrophil **44** erhalten lassen, welches wiederum auf Malonsäureethylester (**45**) als Ausgangssubstanz zurückgeführt werden kann. Vorgesehen war deshalb die Transformation von **45** in das d_6 -Biselektrophil **44** mittels eines basenunterstützten H/D Austauschs der aziden C2-Protonen,^{139,140} gefolgt von

einer Reduktion des 1,3-Diketons mit einem Überschuss LiAlD_4 sowie der abschließenden Transformation der freien Alkoholgruppen in reaktive Alkyltriflate, -tosylate oder Alkylhalogenide.^{141,142,143}

Für die Synthese des d_{18} -Derivats **46** erschien das Einführen der Deuteriummarkierung über einen perdeuterierten *tert*-Butylrest als die Methode der Wahl. Wie in Schema 5 gezeigt, sollte hierzu d_9 -4-*tert*-Butylpyridin (**47**) in einer zweistufigen Additions-Oxidations Sequenz aus Pyridin (**49**) synthetisiert werden. Nach Aktivierung von **49** mit einem Säurechlorid und Abfangreaktion des resultierenden *N*-Acylpyridiniumions mit einem d_9 -*tert*-Butylmetallorganyl sollte **47** nach Oxidation des d_9 -1,4-Dihydropyridins **48** erhalten werden können.^{144,145}



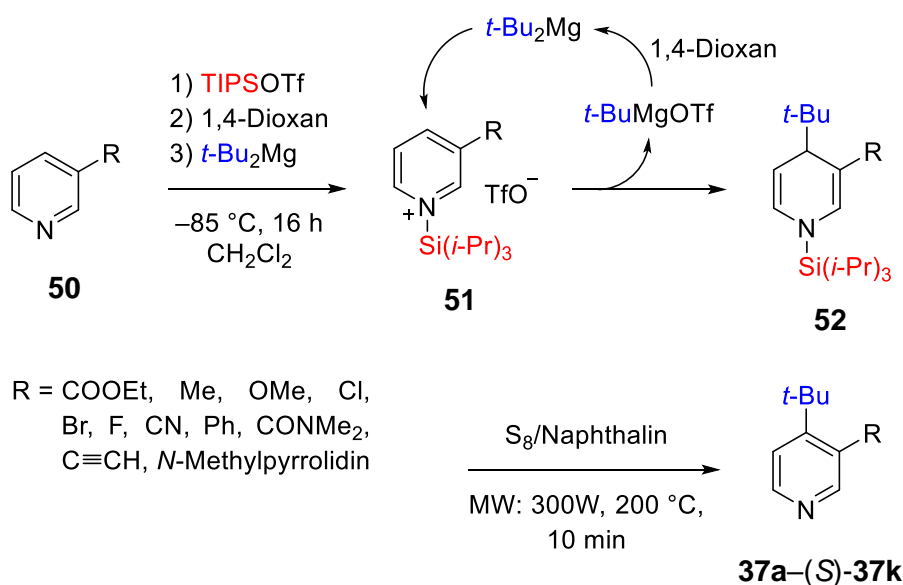
Schema 5: Retrosynthese des d_{18} -MB327-Analogons **46**.

3 Veröffentlichungen

3.1 Erste Publikation: *Regioselective and Transition-Metal-Free Addition of tert-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives: A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-tert-Butylpyridine Derivatives*

3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Pyridinderivate stellen eine der am weitest verbreiteten Grundstrukturen in der medizinischen Chemie dar. So lassen sich *tert*-butylsubstituierte Pyridinderivate unter anderem in Antagonisten des TRPV1 Kanals, in Modulatoren der Cannabinoid-Rezeptoren sowie in Inhibitoren der Bruton-Tyrosin-Kinase finden, welche von großem Interesse für die Schmerz- bzw. Krebstherapie sind.^{146,147,148} Zahlreiche von der Firma Bayer spezifisch für Therapie von Prostatakrebs patentierte C17,20-Lyase-Inhibitoren besitzen 3,4-disubstituierte Pyridine als gemeinsames Strukturmotiv, darunter auch Vertreter mit einer *tert*-Butylgruppe in 4-Position.¹⁴⁹ Mit dieser Veröffentlichung wurde erstmals eine chemo- und regioselektive Methode zur Synthese von 3-substituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivaten (**37a**–(*S*)–**37k**) vorgestellt, die eine breite Auswahl synthetisch wichtiger funktioneller Gruppen toleriert, darunter einen Alkylarylether, einen Ester, ein Amid, diverse Halogenide, ein Nitril, ein terminales Alkin und ein tertiäres Amin (Schema 6).



Schema 6: Verfahren zur Synthese von 3-substituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivaten.

Im ersten Schritt wurden die in 3-Position substituierten Pyridinderivate **50** mit TIPSOTf aktiviert und die resultierenden *N*-Silylpyridiniumionen **51** selektiv bei $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ in CH_2Cl_2 von Di-(*tert*-butyl)magnesium in 4-Position angegriffen. Um eine bestmögliche Regioselektivität zu gewährleisten wurde der Reaktion 1,4-Dioxan zugesetzt, so dass das Schlenk-Gleichgewicht des nach der Addition *in situ* aus Di-(*tert*-butyl)magnesium entstehenden *tert*-Butylmagnesiumtriflats wieder auf die Seite der selektiveren Diorganomagnesiumverbindung zurückgeschoben wird.

Im zweiten Schritt wurden die mit Ausbeuten zwischen 43 und 95% isolierten *N*-Silyl-1,4-dihydropyridine **52** mit Schwefel in Naphthalin bei $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Labormikrowelle oder mit Pd/C bei RT zu den entsprechenden 3-substituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivaten **37a**–(*S*)-**37k** oxidiert. Die Ausbeuten der Oxidationsreaktion beliefen sich auf 34 bis 97%. Hervorzuheben ist die Möglichkeit die *N*-Silyl-1,4-dihydropyridine **52** vor der Oxidation säulenchromatographisch aufzureinigen zu können, so dass eine komplizierte Abtrennung von Nebenprodukten mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften nach der Oxidation entfällt.

3.1.2 Darstellung des Eigenanteils

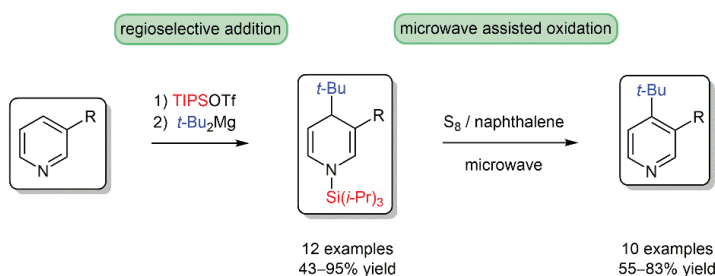
Alle vorgestellten Synthesen, die analytische Charakterisierung der Verbindungen sowie die Erstellung des Manuskripts wurden von mir durchgeführt. Die technische Durchführung der MS- und NMR-Messungen wurde von der Abteilung des Departments Pharmazie übernommen. Als Ideengeber wirkte K. T. Wanner. Die Korrektur des Manuskripts übernahmen K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann und K. T. Wanner.

Regioselective and Transition Metal Free Addition of *tert*-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives – A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-*tert*-Butylpyridine Derivatives

Sebastian Rappenglück^a
 Thomas Seeger^b
 Karin V. Niessen^b
 Franz Worek^b
 Horst Thiermann^b
 Klaus T. Wanner^{*a}

^a Ludwig-Maximilians-Universität München, Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, Butenandtstr. 5-13, Haus C, 81377 Munich, Germany. Fax: +49(89)218077247; email: klaus.wanner@cup.uni-muenchen.de

^b Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany.



Received:
 Accepted:
 Published online:
 DOI:

Abstract A variety of 3,4-disubstituted pyridine derivatives with a *tert*-butyl group in 4-position were synthesized in a transition metal free two-step reaction sequence from 3-substituted pyridine precursors. Highly regioselective addition of *t*-Bu₂Mg to TIPS-activated pyridines and an efficient microwave assisted aromatization with sulfur as oxidant afforded the desired 3,4-disubstituted pyridine derivatives in moderate to excellent yields, tolerating many functional groups such as an esters, amide, halide, nitrile or alkyne present in 3-position.

Key words 3,4-disubstituted pyridines, 4-*tert*-butylpyridine, N-activation, 1,4-dihydropyridine, heterocycles, diorganomagnesium, nucleophilic addition, microwave

Pyridines represent important building blocks in organic synthesis and are widely used in medicinal chemistry.^{1,2} As a substructure of a more complex molecule they are very common in many natural products, biologically active compounds including drugs, and as key substrates for multicomponent reactions.³ Pyridine derivatives exhibiting a *tert*-butyl group are not as widely distributed as the former, but are still found in pharmaceutical compounds such as anti-inflammatory agents,⁴ cancer therapeutics⁵ or nervous system agents.⁶ Notably, 3,4-disubstituted pyridine derivatives with a *tert*-butyl group in 4-position can be found in many C12,20-lyase inhibitors developed for prostate cancer therapy.⁷

Well-known methods for the functionalization of pyridine derivatives such as cross-coupling reactions⁸ or C-H activations⁹ suffer from β -H elimination and homocoupling

side reactions if tertiary alkyl lithium or alkylmagnesium reagents are employed.¹⁰ Thus, *de novo* synthesis or two step-reactions comprising the addition of nucleophiles to *N*-acylpyridinium ions and subsequent oxidation are often the methods of choice.¹¹ Though the latter strategy is of high value in synthetic organic chemistry, it is less suited for the synthesis of 4-*tert*-butyl substituted pyridine derivatives,⁷ as the addition of *tert*-butyl nucleophiles to *N*-acylpyridinium ions as well as the subsequent rearomatization are often of low yields.¹² Recently, Knochel et al. reported a regioselective synthesis of 4-substituted pyridine derivatives including 4-(*tert*-butyl)nicotinonitrile, employing pyridine derivatives activated by BF₃·OEt₂ and Grignard reagents in combination with LiCl or organozinc reagents as nucleophiles.¹³ This method, however, requires pyridine derivatives with an electron withdrawing group in C-3 position. In addition, this approach suffers from the low stability of the formed dihydropyridine intermediates precluding a purification by chromatography which can thus be only accomplished on the stage of oxidized end product. This may be tedious if starting material with similar physicochemical properties is still present. Alternatively, as described by Ready et al., lithium reagents may be added to 4-pyridineboronic esters to afford 4-substituted pyridines, such as 4-*tert*-butylpyridine.¹⁴ Though highly attractive, this route suffers from the limited availability of boronic esters.

The regioselective trapping reactions of *N*-silylpyridinium ions with diorganomagnesium reagents represent an efficient approach to 4,4-disubstituted *N*-silyl-1,4-dihydropyridines¹⁵ and dihydronicotines¹⁶ as previously reported by us.

Based on these results, we envisaged that a related approach might allow a highly efficient and versatile access to 4-*tert*-butyl substituted pyridine derivatives exhibiting both, electron withdrawing and donating groups in 3-position. Herein, we wish to report on the successful implementation of this plan.

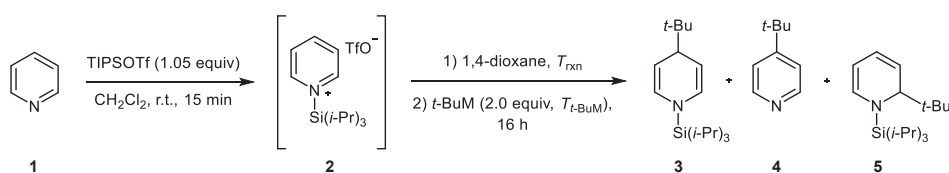
For studying the first step, the addition reaction for the introduction of a substituent in 4-position, unsubstituted pyridine (**1**) was used as model system as it is devoid of any electron donating or withdrawing effects. For initial experiments, the reaction conditions published for the preparation of 4,4-dihydropyridines were used.^{15,16} Thus, pyridine was first treated with 1.0 equivalents of TIPSOTf (15 minutes at r.t. in CH₂Cl₂) and subsequently with 2.0 equivalents of *t*-BuMgCl (Table 1, entry 2) or *t*-Bu₂Mg (Table 1, entry 1) at -78 °C. This afforded 1,4-dihydropyridine **3** and traces of its oxidation product 4-*tert*-butylpyridine (**4**) in a combined yield of 31% and 82%, respectively. As expected from previous results, the dialkylmagnesium reagent proved to provide far better yields than the Grignard reagent.^{15,16} Interestingly, in case of the addition of *t*-BuMgCl, the yield increased from 31% to 41% when the reaction temperature was lowered from -78 °C to -85 °C and the Grignard reagent has been cooled to -85 °C prior addition (Table 1, entry 3).

Due to the high susceptibility of 1,4-dihydropyridine **3** to oxidation, in any case the product obtained after aqueous workup was contaminated with 4-*tert*-butylpyridine (**4**), the amount of which varied with each reaction. Moreover, even in dihydropyridine **3** purified by LC small amounts of the product **4** were constantly present. Accordingly, the yield of the purified product did not appropriately reflect the outcome of the reaction. Therefore, to determine regioselectivities and yields in every case, the amount of the products 1,2-

dihydropyridine (**5**), 1,4-dihydropyridine (**3**) and 4-*tert*-butylpyridine (**4**) was quantified directly out of the crude material obtained after aqueous workup by ¹H NMR spectroscopy employing 2,4,6-collidine as internal standard and the ¹³C-¹H satellite peak integration technique developed by Claridge for the assessment of product ratios.¹⁷ Due to the high regioselectivity of the trapping reactions, the amount of 1,2-dihydropyridine **5** present in the crude reaction product did not suffice for a reliable NMR spectroscopic characterization of **5**. Therefore, the trapping reaction of TIPSOTf activated pyridine with *t*-BuMgCl was performed in THF at 0 °C resulting in lower regioselectivity and thus giving isomer **5** in sufficient amounts (Table 1, entry 9).

To avoid the separate preparation of the diorganomagnesium reagent that had given far superior results than the readily available Grignard reagent, next the use of *in situ* generated diorganomagnesium was investigated. Thus, to a solution of the pyridinium ion **2** at -85 °C, first 4.4 equivalents 1,4-dioxane and subsequently 4.0 equivalents of precooled *t*-BuMgCl were added (Table 1, entry 4). In that case, the combined yield for **3** and **4** rose to 88%, thus being almost identical to the result obtained for the conventional trapping reaction of **2** with *t*-Bu₂Mg at -85 °C, which had afforded the desired products, compounds **3** and **4**, in 90% yield (Table 1, entry 5). A higher amount of dioxane, in turn, did not appear useful as it negatively influenced the homogeneity of the reaction mixture. Furthermore, 1,4-dioxane was also found to improve the combined yield for **3** and **4** for the trapping reaction of **2** with prior prepared dialkylmagnesium from 90% to 97% (compare Table 1, entries 5 and 6). In this case 2.2 equivalents dioxane proved to be sufficient.

Table 1 Trapping reaction of **2** with *tert*-butyl magnesium reagents at different reaction conditions.



Entry	T _{rxn} (°C)	T _{t-BuMg} (°C)	t-BuM (2.0 equiv)	1,4-dioxane (equiv)	3:4:5 ^{a)}	Yield 3 / 4 (%) ^{b)}
1	-78	r.t.	<i>t</i> -Bu ₂ Mg in THF / Et ₂ O (1:1)	---	---	(82) ^{b)}
2	-78	r.t.	<i>t</i> -BuMgCl in Et ₂ O	---	---	(31)
3	-85	-85	<i>t</i> -BuMgCl in Et ₂ O	---	---	(41)
4	-85	-85	<i>t</i> -BuMgCl in Et ₂ O ^{d)}	4.4	---	(88)
5	-85	-85	<i>t</i> -Bu ₂ Mg in THF / Et ₂ O (1:1)	---	96.4:2.9:0.7	(90)
6	-85	-85	<i>t</i> -Bu ₂ Mg in THF / Et ₂ O (1:1)	2.2	96.5:3.1:0.4	(97)
7	-85	-85	<i>t</i> -Bu ₂ Mg in THF	2.2	95.3:3.5:1.2	(90)
8	-85	-85	<i>t</i> -Bu ₂ Mg in Et ₂ O	2.2	98:2:0 9:1:0	(98) 94
9	0	r.t.	<i>t</i> -BuMgCl in Et ₂ O ^{f)}	---	78:9:13	(20) ^{e)}

^{a)} Yield and product ratio of **3**, **4** and **5** in the crude material were determined by ¹H NMR spectroscopy with 2,4,6-collidine as internal standard. Yield after aqueous workup is given in parentheses. ^{b)} Combined yield from two experiments because yields were strongly varying. ^{c)} Not determinable. ^{d)} 4.0 equivalents were used. ^{e)} CH₂Cl₂ was replaced by THF after N-activation. ^{f)} 1.2 equivalents *t*-BuMgCl were used.

Once additional 1,4-dioxane is present in the reaction mixture, it is likely to assume that the Schlenk equilibrium between the Grignard and the diorganomagnesium species is continuously driven towards the latter, thus leading to an improved yield. Finally, the influence of the composition of the solvent containing *t*-Bu₂Mg was studied. Interestingly, when Et₂O/THF (1:1, Table 1, entries 1, 5 and 6) was replaced by pure THF the yield decreased from 97% to 90% and the regioselectivity from 99.6:0.4 to 98.8:1.2 (Table 1, entry 7). In contrast, Et₂O turned out to be far more favorable for the dialkylmagnesium addition reaction, affording the desired 1,4-dihydropyridine **3** in almost quantitative yield of 98% according to NMR analysis with no 2-isomer **5** being detectable (Table 1, entry 8). After purification by flash chromatography, the 1,4-dihydropyridine **3** and its oxidation product **4** could finally be isolated in an excellent combined yield of 94%. Clearly, the *in situ* generation of the dialkylmagnesium reagent with 1,4-dioxane is a very efficient and labor saving approach, allowing the use of commercially available Grignard reagents. But as the combined application of prior formed dialkylmagnesium reagent and dioxane had led to better results with regard to yield and regioselectivity, it was used in all further addition reactions with the pyridinium salts.

In the next step, a mild and efficient method for the oxidation of the 4-*tert*-butyl-*N*-silyl-1,4-dihydropyridines had to be established. For that purpose both, air labile dihydropyridine **3** and literature known air stable dihydropyridine **7**¹⁶ were selected as model compounds and were subjected to oxidation reactions with DDQ,¹⁸ MnO₂,¹⁹ Pd/C, Pd/C with TBAF, *o*-chloranil,²⁰ SeO₂²¹ and S₈/naphthalene (Table 2).²¹ Reaction of dihydropyridine **3** and dihydropyridine **7** with DDQ afforded the corresponding 4-*tert*-butyl substituted oxidation products,

pyridine derivative **4** and nicotinate **8**, in very low to moderate yields of only 13% (Table 2, entry 1) and 41% (Table 2, entry 7), respectively. With Pd/C at ambient air, 1,4-dihydropyridine **3** was easily oxidized under mild conditions, to give the aromatic compound **6** (81%, Table 2, entry 2) whereas dihydropyridine **7** turned out to be inert under these conditions (Table 2, entry 4), which was also true when SeO₂ was applied to the latter (Table 2, entry 10). In addition, only small traces of pyridine derivative **8** were found if the oxidation of 1,4-dihydropyridine **7** was attempted with MnO₂ at room temperature (Table 2, entry 5). Astonishingly, if for the reaction of **7** with MnO₂ in CH₂Cl₂ the temperature was raised to 60 °C by microwave irradiation¹⁹ (Table 2, entry 6) the *tert*-butyl group was lost leading to ethyl nicotinate as final product. To a lesser extent of 16%, loss of the *tert*-butyl group was also observed if **7** was reacted with *o*-chloranil in CH₂Cl₂ at 60 °C (Table 2, entry 8). Reaction with Pd/C and TBAF for desilylation (Table 2, entry 9) gave again only ethyl nicotinate. Because of the lability of the *tert*-butyl group observed for the oxidation reactions we tested a sulfur mediated aromatization, a promising alternative, though known procedures using sulfur in boiling xylene²² or toluene²³ suffer from very long reaction times of up to 3 days.

Most to our delight, oxidation of **7** with sulfur in naphthalene under microwave heating to 200 °C led to a complete conversion within 10 minutes affording the desired 4-*tert*-butyl substituted nicotinate **8** in an excellent yield of 96% (Table 2, entry 11). In the same way, also **3** could be smoothly transformed into **4** and was isolated as hydrochloride **6** in 90% yield (Table 2, entry 3).

Table 2 Oxidation reactions of 4-*tert*-butyl-*N*-silyl-1,4-dihydropyridines **3** and **7** under various conditions.

Entry	Dihydropyridine	Oxidant (equiv)	Solvent	T (°C)	T (min)	Product No.	Yield (%)
1	3	DDQ (1.1)	CH ₂ Cl ₂	RT	30	4	13
2	3	Pd/C (0.05)	1,4-dioxane	RT	16 h	6	81
3	3	S ₈ (1.1)	naphthalene	200 ^{a)}	10	6	90
4	7	Pd/C (0.05)	1,4-dioxane	RT	16 h	8	educt ^{b)}
5	7	MnO ₂ (5.0)	no solvent	RT	16 h	8	traces
6	7	MnO ₂ (10)	CH ₂ Cl ₂	60 ^{c)}	180	8	--- ^{e)}
7	7	DDQ (1.5)	CH ₂ Cl ₂	RT	60	8	41
8	7	<i>o</i> -chloranil (2.0)	CH ₂ Cl ₂	50	60	8	29 ^{d)}
9	7	Pd/C (0.05), TBAF (2.0)	1,4-dioxane	RT	16 h	8	--- ^{e)}
10	7	SeO ₂ (1.4)	THF	RT	16 h	8	educt ^{b)}
11	7	S ₈ (1.1)	naphthalene	200 ^{a)}	10	8	96

^{a)} Microwave assisted reaction, MW: 300 W. ^{b)} Starting material was completely recovered. ^{c)} Microwave assisted reaction, MW: 100 W. ^{d)} Contaminated with 16% ethyl nicotinate, because the *tert*-butyl group was lost during the oxidation. ^{e)} Full conversion to ethyl nicotinate.

Table 3 Substrate scope of the activation, trapping and oxidation routine in the synthesis of 4-*tert*-butylpyridine derivatives.

Entry	Educt		Product		
	No.		No. (Yield %) ^{a)}	Yield (%) ^{b)}	
1	9a		7 (86) ^{d)}	8	83
2	9b		10b (89)	11b	78
3	9c		10c (93)	11c	64
4	9d		10d (78)	11d	69
5	9e		10e (95)	11e	72
6	9f		10f (43)	11f	30
7	9g		10g (86)	11g	47 ^{d)}
8	9h		10h (88)	11h	75
9	9i		10i (74)	11i	50 ^{e)}
10	9j		10j (89)	11j	31 ^{f)}
11	rac-9k		rac-10k (81)	rac-11k	62 ^{g,h)}

^{a)} Yield of 1,4-dihydropyridine (DHP) was determined by ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude material after aqueous workup with 2,4,6-collidine as internal standard. ^{b)} Overall yield for both steps. ^{c)} Yield according to literature known procedure; 52%.^{16, d)} Isolated as hydrochloride. ^{e)} N-activation with 2.0 equiv TIPSOTf.^{25 f)} Oxidation with Pd/C at room temperature. ^{g)} Trapping reaction with 1.1 equiv *t*-Bu₂Mg. ^{h)} Oxidation reaction at 120 °C.

In both cases no side product formation was observed. As compared to the conventional sulfur mediated oxidations, the herein reported method using microwave for heating represents a valuable alternative.

The above mentioned optimized method for the addition of diorganomagnesium reagents to TIPSOTf activated pyridines and oxidation of the resulting *N*-silyl-1,4-dihydropyridines to the respective aromatic compounds was finally applied to the synthesis of a series of 3-substituted 4-*tert*-butylpyridine derivatives (Table 3). Thus, for the addition of a *tert*-butyl residue, pyridine derivatives **9a–j** and **rac-9k**²⁴ (Table 3, entries 1–11) were activated by treatment with 1.05 equivalents TIPSOTf (2.0 equivalents in case of **9i**)²⁵ and subsequently treated with 2.0 equivalents of *t*-Bu₂Mg in CH₂Cl₂ at –85 °C after prior addition of 2.2 equivalents 1,4-dioxane. Resulting 1,4-dihydropyridines **7**, **10b–j** and **rac-10k** were finally oxidized to the corresponding 3-substituted 4-*tert*-butylpyridine derivatives **8**, **11b–i** and **rac-11k** with sulfur in naphthalene under microwave heating or in case of ethynyl substituted pyridine **11j** with Pd/C at ambient air.

The synthesis of the intermediate 1,4-dihydropyridines (**7**, **10b–j** and **rac-10k**) was found to be highly regioselective and independent from the electron withdrawing or electron donating nature of the C-3 substituent. In consequence, 1,4-addition products were strongly favored. Also, *t*-Bu₂Mg did obviously not react with any of the functional groups present in the pyridine starting material, resulting mostly in good to excellent yields of the trapping product (74–95%). An exception was 3-cyanopyridine (**9f**, Table 3, entry 6) as the yield for the addition product **10f** amounted only to 43%. In addition, variation of the amount of TIPSOTf or *t*-Bu₂Mg from 1.0 to 2.0 equivalents applied in the reaction for both reagents did not lead to any improvement. Synthesis of literature known dihydropyridine **7** (Table 3, entry 1) was achieved in 86% yield (lit.: 52%),¹⁶ showing a significant improvement to our previously reported trapping reaction.

High chemoselectivity was also observed for the transformation of *rac*-nicotine (**rac-9k**, Table 3, entry 11) into the 1,4-dihydropyridine **rac-10k** in 81% yield. Moreover, no silylation of the *N*-methylpyrrolidine ring followed by a ring opening was observed.²⁶ The next step, the sulfur mediated oxidation proceeded smoothly within 10 minutes at 200 °C in a microwave reactor for the 3-substituted 1,4-dihydropyridines bearing an ester (**7**, Table 3, entry 1), a methyl (**10b**, Table 3, entry 2), a methoxy (**10c**, Table 3, entry 3), a chloride (**10d**, Table 3, entry 4), a bromide (**10e**, Table 3, entry 5), a nitrile (**10f**, Table 3, entry 6), a phenyl (**10h**, Table 3, entry 8) or an amide group in 3-position (**10i**, Table 3, entry 9) providing the respective aromatic pyridine derivatives in 68–96% yield. In contrast, in case of the oxidation of 3-fluoro substituted dihydropyridine **10g** (Table 3, entry 7) the yield of the oxidation product **11g** amounted to only 55% as partial decomposition occurred. Notably, dihydropyridine **rac-10k** (Table 3, entry 11) decomposed at 200 °C, but underwent a complete oxidation within 10 minutes at a distinctly reduced temperature, i.e. 120 °C, with sulfur and naphthalene yielding racemic 4-*tert*-butylnicotine **rac-11k** in a good yield of 77%.

As dihydropyridine **10j** (Table 3, entry 10) appeared to be labile in the presence of sulfur and naphthalene at 120 °C or 200 °C,

obviously due to the ethynyl group in 3-position, the oxidation was carried out under very mild conditions. Treatment of dihydropyridine **10j** with Pd/C at room temperature and ambient air (for method development see Table 2, entry 2) finally yielded 4-(*tert*-butyl)-3-ethynylpyridine (**11j**) in 35%.

In conclusion, we developed a new transition metal free method for the synthesis of 3,4-disubstituted pyridine derivatives with a *tert*-butyl group in 4-position and a set of different substituents in 3-position. To the best of our knowledge, this is the first study focused on the introduction of a *tert*-butyl group into the 4-position of pyridine derivatives. Distinct advantages of our method are the high chemoselectivity and the excellent C-4 regioselectivity of the addition reaction. The method also benefits from the possibility to purify the *N*-silyl-1,4-dihydropyridine intermediates if necessary prior to oxidation to the aromatic compounds which proceeds very smoothly as well. Also many synthetically important functional groups such as an alkylarylether, ester, amide, halide, nitrile, alkyne, and tertiary amine are well tolerated by this methodology, which may be useful for further functionalization reactions. To explore the full potential of this method, further studies with regard to the applicability of a more diverse set of diorganomagnesium reagents such as diaryl-, secondary, and primary dialkylmagnesium compounds are underway.

Anhydrous reactions were carried out in vacuum-dried glassware under argon atmosphere. Microwave reactions were performed in sealed glass vials using a CEM Discover SP microwave synthesizer. THF, Et₂O, 1,4-dioxane and CH₂Cl₂ were distilled prior to use under nitrogen atmosphere and dried according to standard procedures.²⁷ All other chemicals were used as purchased from commercial sources. TLC was carried out using plates purchased from Merck (silica gel 60 F₂₅₄ on aluminum sheet). Flash chromatography (FC) was carried out using Merck silica gel 60 (40–63 μm mesh size) as stationary phase or activated basic alumina Brockmann I (150 μm mesh size) from Sigma-Aldrich, which was adjusted to the given activity grade.²⁸ Melting points were determined with a BÜCHI 510 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectroscopy was performed using an FT-IR Spectrometer 1600 and Paragon 1000 (PerkinElmer); oils were measured as film and solid samples as KBr pellets, all given in cm⁻¹. High-resolution (HR) mass spectrometry was performed on a Finnigan MAT 95 (EI) and Finnigan LTQ FT (ESI). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker BioSpin Avance III HD (400 or 500 MHz) using TMS as internal standard and integrated with MestReNova (Version 10.0.2-15465), Mestrelab Research S.L. 2015.

Preparation of di-*tert*-butylmagnesium solution²⁹

Commercially available *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O) was diluted with THF or Et₂O at room temperature to afford a 1 M solution, which was carefully treated with 1,4-dioxane (1.2 equiv). The resulting suspension was stirred overnight at room temperature, centrifuged and the clear and colorless supernatant was transferred via cannula into a Schlenk flask. The concentration was determined by titration according to Chong's procedure.³⁰

Synthesis of 4-*tert*-butylpyridines – General Procedure

Trapping Reaction (GPa)

TIPSOTf (1.05 equiv) was added to a solution of the corresponding pyridine derivative (1.0 equiv) in CH₂Cl₂ (6 mL/mmol) and the resulting mixture was stirred at r.t. for 15 min. The solution was cooled to –85 °C, treated with 1,4-dioxane (2.2 equiv) and after 5 min a –85 °C cold solution of *t*-Bu₂Mg (2.0 equiv) was added via transfer cannula. The

reaction mixture was quenched after 16 h by the addition of water (6 mL/mmol) and saturated aqueous NaCl (10 mL/mmol). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL/mmol), the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (15 mL/mmol), dried over Na₂SO₄ and the solvents were removed under reduced pressure. Quantitative analysis of the crude product by ¹H NMR spectroscopy using 2,4,6-collidine as internal standard revealed the amounts of the corresponding dihydropyridine and of its oxidation product. The crude material was then purified by FC to yield the corresponding 4-*tert*-butyl-1,4-dihydropyridine as intermediate product.

Oxidation Reaction (GP_B)

Sulfur (1.1 equiv) and naphthalene (15 equiv) were added to the corresponding 4-*tert*-butyl-1,4-dihydropyridine and the resulting mixture was stirred at 200 °C under microwave conditions (300 W) for 10 minutes. The resulting residue was dissolved in Et₂O (15 mL/mmol) and the organic phase was washed with NaOH (2 x 15 mL/mmol). The combined aqueous layers were re-extracted with Et₂O (15 mL/mmol) and the combined organic layers were extracted with 2 M HCl (3 x 10 mL/mmol). The acidic aqueous layers were washed with Et₂O (15 mL/mmol) and the pH was adjusted to 9–10 by addition of K₂CO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL/mmol) and the combined organic layers were dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by FC.

4-(*tert*-Butyl)-1-(triisopropylsilyl)-1,4-dihydropyridine (3) and 4-(*tert*-butyl)pyridine (4)

Prepared according to GP_A from **1** (79 mg, 1.0 mmol, 81 μL) in CH₂Cl₂ (6 mL) with TIPSOTf (0.32 g, 1.0 mmol, 0.28 mL), 1,4-dioxane (0.19 g, 2.2 mmol, 0.19 mL, 2.2 Åq.) and *t*-Bu₂Mg (0.35 M solution in Et₂O, 2.0 mmol, 5.7 mL). Reaction time: 2 h. Quantitative analysis revealed 279 mg (95%) of **3** and 4 mg (3%) of **4**. Purification of the crude material by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane) afforded **3** together with traces of its oxidation product **4**.

Yield: 263 mg (94%)*; colorless oil; *R*_f = 0.95 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1).

IR (Film): 3055, 2948, 2867, 1669, 1606, 1463, 1388, 1360, 1290, 1130, 1090, 1017, 988, 883, 854, 788, 713, 687 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.83 (s, 9 H, C(CH₃)₃, **3**), 1.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 18 H, CH(CH₃)₂, **3**), 1.19–1.27 (m, 3 H, CH(CH₃)₂, **3**), 1.32 (s, 0.1 x 9 H, CH₃, **4**), 2.66 (t, *J* = 4.2 Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, **3**), 4.50–4.53 (m, 2 H, NCHCH, **3**), 6.04–6.08 (m, 2 H, NCH, **3**), 7.27–7.28 (m, 0.1 x 2 H, NCHCH, **4**), 8.50–8.51 (m, 0.1 x 2 H, NCH, **4**) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ = 11.39 (CH(CH₃)₂, **3**), 17.84 (CH(CH₃)₂, **3**), 26.05 (C(CH₃)₃, **3**), 30.51 (C(CH₃)₃, **4**), 34.65 (C(CH₃)₃, **4**), 36.12 (C(CH₃)₃, **3**), 43.40 (CC(CH₃)₃, **3**), 101.18 (NCHCH, **3**), 120.71 (NCHCH, **4**), 130.07 (NCH, **3**), 149.67 (NCH, **4**), 159.91 (NCHCHCH, **4**) ppm.

* According to ¹H NMR spectroscopy, isolated product after flash chromatography contained 250 mg (85%) of **3** and 13 mg (9%) of **4**.

4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium chloride (6)

Prepared according to GP_B from a mixture of **3** and **4** (282.6 mg; 0.28 g, 0.96 mmol of **3** and 2.6 mg, 19 μmol of **4**)* with sulfur (35 mg, 1.1 mmol) and naphthalene (1.9 g, 15 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1) afforded **4** as a colorless liquid, which was treated with 2 M HCl in Et₂O (2.00 mL, 4.00 mmol) to yield the corresponding hydrochloride **6**.

Yield: 0.15 g (90%); colorless hygroscopic solid.

IR (KBr): 2970, 1637, 1606, 1504, 1464, 1378, 1273, 1211, 1122, 1066, 1005, 929, 823, 741, 714 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.44–1.45 (m, 9 H, (CH₃)₃), 7.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, NCHCH), 8.72–8.76 (m, 2 H, NCH) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 30.16 ((CH₃)₃), 36.73 (C(CH₃)₃), 123.97 (NCHCH), 140.32 (NCH), 171.89 (NCHCHC) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* [M - Cl]⁺ calcd for C₉H₁₄N: 136.1121; found: 136.1121.

*Determined by ¹H NMR with 2,4,6-collidine as internal standard prior to the synthesis.

4-(*tert*-Butyl)-3-methylpyridine (11b)

According to GP_A a solution of **9b** (93 mg, 1.0 mmol, 97 μL) in CH₂Cl₂ (6 mL) was treated with TIPSOTf (0.32 g, 1.0 mmol, 0.28 mL), 1,4-dioxane (0.19 g, 2.2 mmol, 0.19 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.43 M solution in Et₂O, 2.0 mmol, 4.7 mL). Quantitative analysis revealed 260 mg (85%) of dihydropyridine **10b** and 6 mg (4%) of the oxidation product **11b**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10b** was performed according to GP_B with sulfur (35 mg, 1.1 mmol) and naphthalene (1.9 g, 15 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1) afforded **11b**.

Yield: 116 mg (78%); colorless oil; *R*_f = 0.46 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1).

IR (Film): 3102, 2966, 2874, 1590, 1539, 1485, 1461, 1403, 1380, 1365, 1308, 1260, 1240, 1201, 1174, 1102, 1084, 1037, 1022, 995, 929, 852, 829, 798, 755, 694 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.40 (s, 9 H, (CH₃)₃), 2.49–2.51 (m, 3 H, CH₃), 7.21 (d, *J* = 5.3 Hz, 1 H, NCHCH), 8.28–8.30 (m, 1 H, NCHC(CH₃)), 8.32–8.34 (m, 1 H, NCHCH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 20.01 (CCH₃), 29.89 (C(CH₃)₃), 35.78 (C(CH₃)₃), 120.55 (NCHCH), 131.34 (NCHCCH₃), 147.75 (NCHCH), 152.94 (NCHC(CH₃)), 156.55 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calcd for C₁₀H₁₅N: 149.1199; found: 149.1198.

4-(*tert*-Butyl)-3-methoxyppyridine (11c)

According to GP_A a solution of **9c** (108 mg, 963 μmol, 100 μL) in CH₂Cl₂ (6 mL) was treated with TIPSOTf (319 mg, 1.01 mmol, 280 μL), 1,4-dioxane (187 mg, 2.12 mmol, 180 μL) and *t*-Bu₂Mg (0.45 M solution in Et₂O, 1.93 mmol, 4.28 mL). Quantitative analysis revealed 227 mg (73%) of dihydropyridine **10c** and 32 mg (20%) of the oxidation product **11c**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10c** was performed according to GP_B with sulfur (34.0 mg, 1.06 mmol) and naphthalene (1.85 g, 14.4 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1) afforded **11c**.

Yield: 102 mg (64%); colorless liquid; *R*_f = 0.22 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1).

IR (Film): 3105, 3056, 2999, 2959, 2914, 2869, 2840, 1590, 1546, 1488, 1463, 1416, 1393, 1362, 1305, 1262, 1239, 1214, 1190, 1171, 1103, 1087, 1025, 933, 892, 850, 828, 800, 695 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (s, 9 H, (CH₃)₃), 3.94 (s, 3 H, OCH₃), 7.15 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, NCHCH), 8.17 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, NCHCH), 8.21 (s, 1 H, NCHCOCH₃) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.90 (C(CH₃)₃), 34.79 (C(CH₃)₃), 55.68 (OCH₃), 121.04 (NCHCH), 133.96 (NCHCOCH₃), 142.73 (NCHCH), 146.64 (CC(CH₃)₃), 154.73 (NCHCOCH₃) ppm.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calcd for C₁₀H₁₅NO: 165.1148; found: 165.1155.

4-(*tert*-Butyl)-3-chloropyridine (11d)

According to GP_A a solution of **9d** (0.29 g, 2.5 mmol, 0.25 mL) in CH₂Cl₂ (15 mL) was treated with TIPSOTf (0.83 g, 2.6 mmol, 0.73 mL), 1,4-dioxane (0.49 g, 5.5 mmol, 0.47 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.43 M solution in Et₂O, 5.0 mmol, 12 mL). Quantitative analysis revealed 641 mg (78%) of dihydropyridine **10d**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10d** was performed according to GP_B with sulfur (88 mg, 2.8 mmol) and naphthalene (4.8 g, 38 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 3:1) afforded **11d**.

Yield: 291 mg (69%); clear brownish liquid; R_f = 0.50 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 3:1).

IR (Film): 3038, 3000, 2963, 2874, 1580, 1482, 1471, 1398, 1366, 1289, 1259, 1199, 1135, 1090, 1042, 932, 831, 748, 685 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.47 (s, 9 H, (CH₃)₃), 7.30 (d, J = 5.3 Hz, 1 H, NCHCH), 8.38 (d, J = 5.2 Hz, 1 H, NCHCH), 8.49 (s, 1 H, NCHCCI) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.68 (C(CH₃)₃), 36.09 (C(CH₃)₃), 122.19 (NCHCH), 131.52 (NCHCCI), 147.89 (NCHCH), 151.28 (NCHCCI), 155.20 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₉H₁₂ClN: 169.0653; found: 169.0651.

3-Bromo-4-(*tert*-butyl)pyridine (11e)

According to GP_A a solution of **9e** (0.32 g, 2.0 mmol, 0.19 mL) in CH₂Cl₂ (12 mL) was treated with TIPSOTf (0.66 g, 2.1 mmol, 0.58 mL), 1,4-dioxane (0.39 g, 4.4 mmol, 0.38 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.45 M solution in Et₂O, 4.0 mmol, 8.9 mL). Quantitative analysis revealed 708 mg (95%) of dihydropyridine **10e**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10e** was performed according to GP_B with sulfur (71 mg, 2.2 mmol) and naphthalene (3.8 g, 30 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 4:1) afforded **11e**.

Yield: 308 mg (72%); clear colorless liquid; R_f = 0.38 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 4:1).

IR (Film): 3082, 3038, 2998, 2967, 2873, 1579, 1481, 1467, 1397, 1365, 1288, 1257, 1229, 1197, 1130, 1088, 1025, 1016, 931, 918, 831, 747, 732, 680 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.50 (s, 9 H, (CH₃)₃), 7.32 (d, J = 5.2 Hz, 1 H, NCHCH), 8.41 (d, J = 5.3 Hz, 1 H, NCHCH), 8.67 (s, 1 H, NCHCBr) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.74 (C(CH₃)₃), 36.65 (C(CH₃)₃), 121.10 (NCHCBr), 122.76 (NCHCH), 148.37 (NCHCH), 154.21 (NCHCBr), 156.57 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₉H₁₂BrN: 213.0148; found: 213.0140.

4-(*tert*-Butyl)pyridine-3-carbonitrile (11f)

According to GP_A a solution of **9f** (0.21 g, 2.0 mmol) in CH₂Cl₂ (12 mL) was treated with TIPSOTf (0.66 g, 2.1 mmol, 0.58 mL), 1,4-dioxane (0.39 g, 4.4 mmol, 0.38 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.46 M solution in Et₂O, 4.0 mmol, 8.7 mL). Quantitative analysis revealed 276 mg (43%) of dihydropyridine **10f**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1). Oxidation of dihydropyridine **10f** was performed according to GP_B with sulfur (71 mg, 2.2 mmol) and naphthalene (3.8 g, 30 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/EtOAc = 1:1) afforded **11f**.

Yield: 96 mg (30%); yellow solid; MP 38–39 °C; R_f = 0.31 (SiO₂, *n*-pentane/EtOAc = 1:1).

IR (KBr): 3043, 2986, 2972, 2878, 2224, 1584, 1541, 1485, 1468, 1403, 1373, 1266, 1236, 1207, 1189, 1107, 1071, 981, 942, 930, 842, 788, 764, 695 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (s, 9 H, (CH₃)₃), 7.40 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, NCHCH), 8.68 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, NCHCH), 8.82 (s, 1 H, NCHCCN) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 29.36 (C(CH₃)₃), 35.85 (C(CH₃)₃), 108.56 (NCHCCN), 118.10 (CN), 120.85 (NCHCH), 153.03 (NCHCH), 155.06 (NCHCCN), 162.37 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₁₀H₁₂N₂: 160.0995; found: 160.0997.

The analytical data agreed with those previously reported.¹³

Ethyl 4-(*tert*-butyl)pyridine-3-carboxylate (8)

According to GP_A a solution of **9a** (305 mg, 2.00 mmol, 276 μL) in CH₂Cl₂ (12 mL) was treated with TIPSOTf (663 mg, 2.10 mmol, 582 μL), 1,4-dioxane (388 mg, 4.4 mmol, 376 μL) and *t*-Bu₂Mg (0.43 M solution in Et₂O, 4.00 mmol, 9.30 mL). Quantitative analysis revealed 628 mg (86%) of dihydropyridine **7**. Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/EtOAc = 9:1).

Oxidation of dihydropyridine **7** was performed according to GP_B with sulfur (70.5 mg, 2.20 mmol) and naphthalene (3.85 g, 30.0 mmol). Purification by FC (SiO₂, hexanes/EtOAc = 4:1) afforded **8**.

Yield: 343 mg (83%); slightly yellowish oil; R_f = 0.42 (SiO₂, hexanes/EtOAc = 4:1).

IR (Film): 2969, 2910, 2873, 1728, 1586, 1544, 1487, 1468, 1448, 1403, 1367, 1302, 1275, 1258, 1231, 1202, 1173, 1135, 1094, 1065, 1016, 959, 932, 873, 858, 837, 787, 754, 724, 687 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.39–1.42 (m, 12 H, (CH₃)₃, CH₂CH₃), 4.40 (q, J = 7.2 Hz, 2 H, CH₂), 7.35 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, NCHCH), 8.51 (s, 1 H, NCHCCO), 8.55 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, NCHCH) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 14.07 (CH₃CH₂), 30.49 ((CH₃)₃), 36.01 (C(CH₃)₃), 61.85 (CH₂CH₃), 121.45 (NCHCH), 129.22 (NCHCCO), 149.36 (NCHCCO), 150.94 (NCHCH), 156.71 (NCHCHC), 169.87 (C(=O)OCH₂) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₁₂H₁₇NO₂: 207.1254; found: 207.1257.

4-(*tert*-Butyl)-3-fluoropyridin-1-ium chloride (11g)

According to GP_A a solution of **9g** (0.29 g, 3.0 mmol, 0.26 mL) in CH₂Cl₂ (18 mL) was treated with TIPSOTf (1.0 g, 3.2 mmol, 0.87 mL), 1,4-dioxane (0.58 g, 6.6 mmol, 0.57 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.44 M solution in Et₂O, 6.0 mmol, 14 mL). Quantitative analysis revealed 805 mg (86%) of dihydropyridine **10g**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10g** was performed according to GP_B with sulfur (0.11 g, 3.3 mmol) and naphthalene (5.8 g, 45 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-Pentan/Et₂O = 2:1) afforded 4-(*tert*-butyl)-3-fluoropyridine as a colorless liquid, which was treated with 2 M HCl in Et₂O (4.5 mL, 9.0 mmol) to yield the corresponding hydrochloride **11g**.

Yield: 267 mg (47%); colorless solid; MP 125 °C; R_f (4-(*tert*-butyl)-3-fluoropyridine) = 0.39 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 2:1).

IR (Film): 3040, 3070, 2994, 2963, 2875, 2699, 2517, 2076, 2052, 2025, 1900, 1643, 1595, 1526, 1513, 1485, 1460, 1400, 1368, 1349, 1256, 1236, 1226, 1205, 1150, 1106, 1078, 1028, 858, 827, 813 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.51 (d, J = 1.1 Hz, 9 H, (CH₃)₃), 7.88–7.93 (m, 1 H, NCHCH), 8.61 (d, J = 4.6 Hz, 1 H, NCHCF), 8.68 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, NCHCH) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.73 (d, J = 3.1 Hz, C(CH₃)₃), 36.39 (d, J = 3.1 Hz, C(CH₃)₃), 125.60 (d, J = 5.4 Hz, NCHCH), 130.11 (d, J = 38.3 Hz, NCHCF), 137.51 (d, J = 4.4 Hz, NCHCH), 158.07 (d, J = 9.2 Hz, CC(CH₃)₃), 159.58 (d, J = 259.8 Hz, CF) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₉H₁₃FN: 154.1027; found: 154.1026.

4-(*tert*-Butyl)-3-phenylpyridine (11h)

According to GP_A a solution of **9h** (0.47 g, 3.0 mmol, 0.44 mL) in CH₂Cl₂ (18 mL) was treated with TIPSOTf (1.0 g, 3.2 mmol, 0.87 mL), 1,4-dioxane (0.58 g, 6.6 mmol, 0.57 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.44 M solution in Et₂O, 6.0 mmol, 14 mL). Quantitative analysis revealed 976 mg (88%) of dihydropyridine **10h**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). Oxidation of dihydropyridine **10h** was performed according to GP_B with sulfur (0.11 g, 3.3 mmol) and naphthalene (5.8 g, 45 mmol). Purification by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:2) afforded **11h**.

Yield: 477 mg (75%); colorless solid; MP 106–107 °C; R_f = 0.36 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:2).

IR (Film): 3025, 3000, 2964, 2953, 1959, 1894, 1850, 1820, 1770, 1598, 1584, 1538, 1478, 1457, 1439, 1400, 1364, 1302, 1256, 1232, 1201, 1092, 1070, 1036, 1006, 992, 842, 774, 710, 696 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.18 (s, 9 H, (CH₃)₃), 7.25–7.29 (m, 2 H, CCHCHCH), 7.36–7.40 (m, 4 H, NCHCH, CCHCHCH, CCHCHCH), 8.16 (s, 1 H, NCHCCCHCHCH), 8.45 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, NCHCH) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 31.83 (C(CH₃)₃), 36.85 (C(CH₃)₃), 121.54 (NCHCH), 127.63 (CCHCHCH), 127.87 (CCHCHCH), 130.75 (CCHCHCH), 137.83 (CCHCHCH), 141.76 (NCHCCCHCHCH), 149.07 (NCHCH), 152.63 (NCHCCCHCHCH), 156.57 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₁₅H₁₇N: 211.1361; found: 211.1355.

4-(*tert*-Butyl)-*N,N*-dimethylpyridine-3-carboxamid (**11i**)

According to GP_A a solution of **9i** (0.45 g, 3.0 mmol) in CH₂Cl₂ (18 mL) was treated with TIPSOTf (1.9 g, 6.0 mmol, 1.7 mL), 1,4-dioxane (0.58 g, 6.6 mmol, 0.57 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.39 M solution in Et₂O, 6.0 mmol, 15 mL). Quantitative analysis revealed 810 mg (74%) of dihydropyridine **10i**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane/EtOAc/CH₂Cl₂ = 3:1:1). Oxidation of dihydropyridine **10i** was performed according to GP_B with sulfur (0.11 g, 3.3 mmol) and naphthalene (5.8 g, 45 mmol). Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, EtOAc/CH₂Cl₂ = 2:3) afforded **11i**.

Yield: 312 mg (50%); clear yellowish oil; R_f = 0.26 (Al₂O₃, EtOAc/CH₂Cl₂ = 2:3).

IR (Film): 2961, 2871, 1638, 1585, 1543, 1484, 1394, 1365, 1262, 1216, 1199, 1117, 1092, 1055, 933, 916, 843, 759, 696, 660 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.38 (s, 9 H, (CH₃)₃), 2.85 (s, 3 H, NCH₃), 3.13 (s, 3 H, NCH₃), 7.36 (dd, J = 5.5/0.6 Hz, 1 H, NCHCH), 8.26–8.29 (m, 1 H, NCHCO), 8.50 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, NCHCH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 30.41 (C(CH₃)₃), 34.85 (NCH₃), 36.23 (C(CH₃)₃), 39.36 (NCH₃), 122.14 (NCHCH), 131.24 (NCHCO), 148.05 (NCHCO), 149.84 (NCHCH), 155.95 (CC(CH₃)₃), 170.79 (CO) ppm.

HRMS (EI): m/z [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₉N₂O: 207.1492; found: 207.1532.

4-(*tert*-Butyl)-3-ethynylpyridine (**11j**)

According to GP_A a solution of **9j** (0.32 g, 3.0 mmol) in CH₂Cl₂ (18 mL) was treated with TIPSOTf (1.0 g, 3.2 mmol, 0.87 mL), 1,4-dioxane (0.58 g, 6.6 mmol, 0.57 mL) and *t*-Bu₂Mg (0.42 M solution in Et₂O, 6.0 mmol, 14 mL). Quantitative analysis revealed 848 mg (89%) of dihydropyridine **10j**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, *n*-pentane). The colorless oil was dissolved in 1,4-dioxane (0.6 mL), treated with Pd/C (10% Pd, 0.16 g, 0.15 mmol) and the resulting suspension was stirred for 9 days at room temperature. The mixture was filtrated over celite, washed with Et₂O (80 mL) and the organic layer was extracted with 2 M HCl (3 x 30 mL). The combined aqueous layers were washed with Et₂O (40 mL), neutralized with K₂CO₃ and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1) to yield **11j**.

Yield: 146 mg (31%); colorless liquid; R_f = 0.47 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1).

IR (Film): 3298, 3205, 3035, 2992, 2963, 2909, 2871, 2098, 1583, 1537, 1483, 1463, 1448, 1398, 1365, 1291, 1263, 1203, 1193, 1102, 1075, 933, 850, 835, 789, 697 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.49–1.50 (m, 9 H, (CH₃)₃), 3.52 (s, 1 H, CCH), 7.24–7.25 (m, 1 H, NCHCH), 8.44 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, NCHCH), 8.65 (s, 1 H, NCHCCCH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 29.07 (C(CH₃)₃), 35.87 (C(CH₃)₃), 81.96 (CCH), 85.75 (CCH), 117.74 (NCHCCCH), 120.13 (NCHCH), 149.30 (NCHCH), 155.79 (NCHCCCH), 160.55 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₁₁H₁₃N: 159.1048; found: 159.1049.

rac-4-(*tert*-Butyl)-3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridine (*rac*-**11k**)

According to GP_A a solution of *rac*-**9k** (810 mg, 5.00 mmol, 798 μ L) in CH₂Cl₂ (30 mL) was treated with TIPSOTf (1.66 g, 5.25 mmol, 1.45 mL), 1,4-dioxane (969 mg, 11.0 mmol, 941 μ L) and *t*-Bu₂Mg (0.41 M solution in Et₂O, 5.50 mmol, 13.4 mL). Quantitative analysis revealed 1.53 g (81%) of dihydropyridine *rac*-**10k**. Purification by FC (Al₂O₃-basic, activity III, hexanes/EtOAc = 4:1). Oxidation of dihydropyridine *rac*-**10k** was performed according to GP_B with sulfur (176 mg, 5.5 mmol) and

naphthalene (9.61 g, 75 mmol) at 120 °C. Purification by FC (SiO₂, Et₂O/TEA = 97:3) afforded *rac*-**11k**.

Yield: 671 mg (62%); colorless solid; Mp 63 °C; R_f = 0.48 (SiO₂, Et₂O/TEA = 97:3).

IR (Film): 3101, 3070, 3042, 2995, 2963, 2935, 2906, 2873, 2831, 2772, 2662, 1589, 1535, 1482, 1459, 1414, 1403, 1366, 1350, 1319, 1296, 1255, 1234, 1219, 1192, 1173, 1154, 1113, 1083, 1043, 974, 963, 922, 900, 841, 827, 709, 592, 573, 520 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (s, 9 H, (CH₃)₃), 1.63–1.74 (m, 1 H, NCHCHH), 1.76–1.87 (m, 1 H, NCH₂CHH), 1.96–2.09 (m, 1 H, NCH₂CHH), 2.19 (s, 3 H, NCH₃), 2.22–2.37 (m, 2 H, NCHCHH, NCHHCH₂), 3.24–3.31 (m, 1 H, NCHHCH₂), 3.82 (t, J = 8.2 Hz, 1 H, NCHCH₂), 7.16 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, NCHCH), 8.35 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, NCHCH), 8.96 (s, 1 H, NCHCCHNCH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 22.90 (NCH₂CH₂), 31.39 (C(CH₃)₃), 35.53 (C(CH₃)₃), 36.41 (NCHCH₂), 40.29 (NCH₃), 56.82 (NCH₂CH₂), 65.61 (NCHCH₂), 119.71 (NCHCH), 138.32 (CH₃NCHC), 147.71 (NCHCH), 151.76 (NCHCCHNCH₃), 156.24 (CC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calcd for C₁₄H₂₂N₂: 218.1783; found: 218.1774.

Funding Information

This study was funded by the German Ministry of Defense (E/U2AD/CF514/DF561).

Supporting Information

YES (this text will be updated with links prior to publication)

Primary Data

NO (this text will be deleted prior to publication)

References

- Henry, G. D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6043.
- Baumann, M.; Baxendale I. R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2265.
- Isambert, N.; Lavilla, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8444.
- Doherty, E. M.; Fotsch, C.; Bo, Y.; Chakrabarti, P.; Narender Gava, N. C.; Han, N.; Kelly, M. G.; Kincaid, J.; Kliensky, L.; Liu, Q.; Ognyanov, V. I.; Tamir, R.; Wang, X.; Zhu, J.; Norman, M. H.; Treanor, J. J. *S. J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 71.
- Hopkins, B. T.; Ma, B.; Chan, T. R.; Kumaravel, G.; Miao, H.; Bertolotti-Ciarlet, A.; Otipoby, K. PCT Int. Appl. WO 2015/089327, **2015**.
- (a) Eatherthon, A. J.; Giblin, G. M. P.; Jandu, K. S.; Mitchell, W. L.; Naylor, A.; Palombi, G.; Rawlings, D. A.; Slingsby, B. P.; Whittington, A. R. PCT Int. Appl. WO 2004/029026, **2004**. (b) Price, E. M.; Docx, C. J.; Rice, H.; Fairhall, S. J.; Poole, S. J. C.; Bird, M.; Whiley, L.; Flint, D. P.; Green, A. C.; Timperley, C.M.; Tattersall, J. E. H. *Toxicol. Lett.* **2016**, *244*, 154.
- Bierer, D.; McClure, A.; Fu, W.; Achebe, F.; Ladouceur, G. H.; Burke, M. J.; Bi, C.; Hart, B.; Dumas, J.; Sibley, R.; Scott, W. J.; Johnson, J.; Asgari, D. PCT Int. Appl. WO 03/027085, **2003**. New address: P. J. Kocienski, School of Chemistry, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK.
- (a) Doebelin, C.; Wagner, P.; Bertin, I.; Simonin, F.; Schmitt, M.; Bihel, F.; Bourguignon, J.-J. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 10296. (b) Dias Pires, M. J.; Poeira, D. L.; Marques, M. B. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7197. (c) Tamao, K.; Komada, S.; Nakajima, I.; Kumada, M. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347. (d) Hintermann, L.; Xiao, L.; Labonne, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8246. (e) Piller, F. M.; Appukkuttan, P.; Gavryushin, A.; Helm, M.; Knochel, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6802.
- Chen, X.; Goodhue, C. E.; Yu, J.-Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12634.

- (10) (a) Vila, C.; Giannerini, M.; Hornillos, V.; Fanas-Mastral, M.; Feringa, B. L.; *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1361. (b) Joshi-Pangu, A.; Wang, C.-Y.; Biscoe, M. J. *Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8478.
- (11) For more information about addition of organometallic nucleophiles on *N*-acylpyridinium ions, see: (a) Lavilla, R. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **2002**, 1141. (b) Bull, J. A.; Mousseau, J. J.; Pelletier, G.; Charette, A. B. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2642. (c) Lyle, R. E.; Marshall, J. L.; Comins, D. L. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1015. (d) Lyle, R. E.; Comins, D. L. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3250. (e) Yamaguchi, R.; Nakazono, Y.; Kawanisi, M. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1801. (f) Yamaguchi, R.; Nakazono, Y.; Matsuki, T.; Hata, E.; Kawanisi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 215. (g) Yamaguchi, R.; Moriyasu, M.; Yoshioka, M.; Kawanisi, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3507. (h) Piers, E.; Soucy, M. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 3563. (i) Chia, W.-L.; Shiao, M.-J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2033. (j) Beveridge, R. E.; Black, D. A.; Arndtsen, B. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3650. (k) Comins, D. L.; O'Connor, S.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1843. (l) Shiao, M.-J.; Chia, W.-L.; Peng, C.-J.; Shen, C.-C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3162. (m) Wang, X.; Kauppi, Anna. M.; Olsson, R.; Almqvist, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4586. (n) Comins, D. L.; King, L. S.; Smith, E. D.; Févriér, F. C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5059. (o) Fraenkel, G.; Cooper, J. W.; Fink, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 523. (p) Comins, D. L.; Abdullah, A. H. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4135.
- (12) Wallace, D. J.; Gibb, D. A.; Cottrell, F. I.; Kennedy, D. J.; Brands, K. M. J.; Dolling, U. H. *Synthesis*, **2001**, *12*, 1784.
- (13) Chen, Q.; du Jourdin, X. M.; Knochel, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4958.
- (14) Panda, S.; Coffin, A.; Nguyen, Q. N.; Tantillo, D. J.; Ready, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2205.
- (15) Braeckow, J.; Wanner, K. T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2395.
- (16) Sperger, C. A.; Wanner, K. T. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5824.
- (17) Claridge, T. D. W.; Davies, S. G.; Polywka, M. E. C.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Savory, E. D.; Smith, A. D. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5433.
- (18) Wallace, D. L.; Gibb, A. D.; Cottrell, I. F.; Kennedy, D. J.; Brands, K. M. J.; Dolling, U. H. *Synthesis* **2001**, *12*, 1784.
- (19) Bagley, M. C.; Lubinu, M. C. *Synthesis* **2006**, *8*, 1283.
- (20) Comins, D. L.; Mantlo, N. B. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4410.
- (21) Pabel, J. *Asymmetrische Synthese von Liganden der Iifenprodil-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors*; Dissertation: LMU München, **2001**, 99.
- (22) Shiao, M.-J.; Chia, W.-L.; Peng, C.-J.; Shen, C.-C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3162.
- (23) Comins, D. L.; King, L. S.; Smith, E. D.; Févriér, F. C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5059.
- (24) Bowman, E. R.; McKennis, H. Jr.; Martin, B. R. *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 871.
- (25) Sperger, C. *Regioselektive Synthesen 4,4-disubstituierter Piperidinderivate mit Hilfe von N-Silylpyridiniumsalzen*; Dissertation: LMU München, **2007**, 73.
- (26) Bleicher, L. S.; Cosford, N. D. P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5299.
- (27) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*; Pergamon: New York, **1988**.
- (28) Hünig, S.; Kreitmeier, P.; Märkl, G.; Sauer, J. *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*; Lehmanns: Berlin, **2006**.
- (29) Wakefield, B. J.; *Organomagnesium Methods in Organic Synthesis*; Academic: New York, **1995**.
- (30) Yong, K. H.; Taylor, N. J.; Chong, J. M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3553.

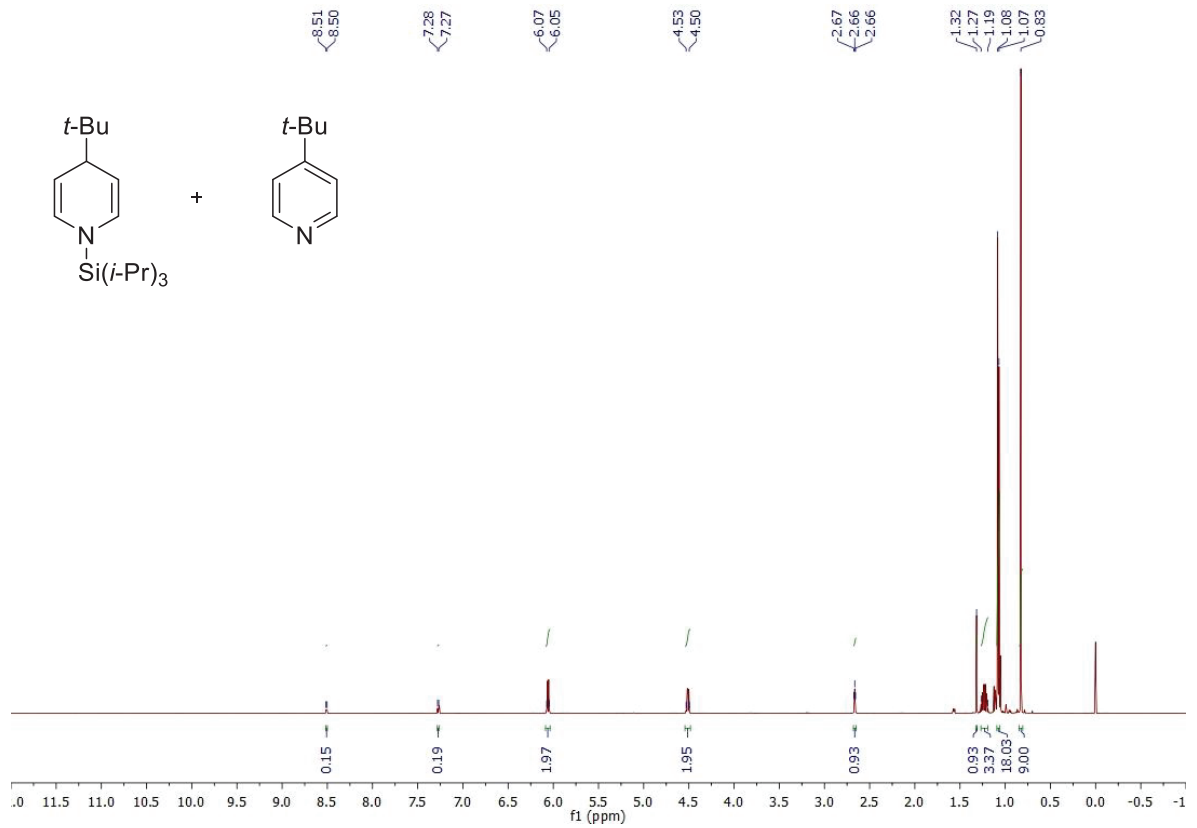
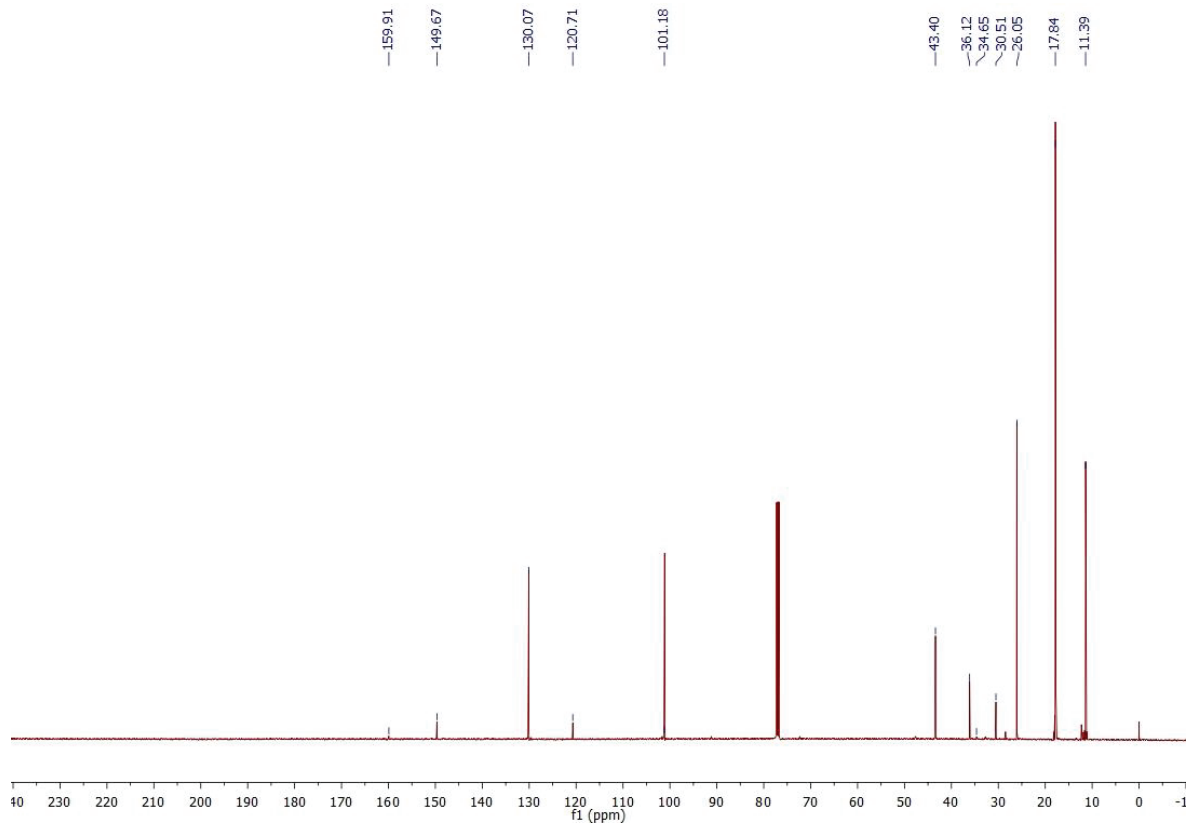
Supporting Information

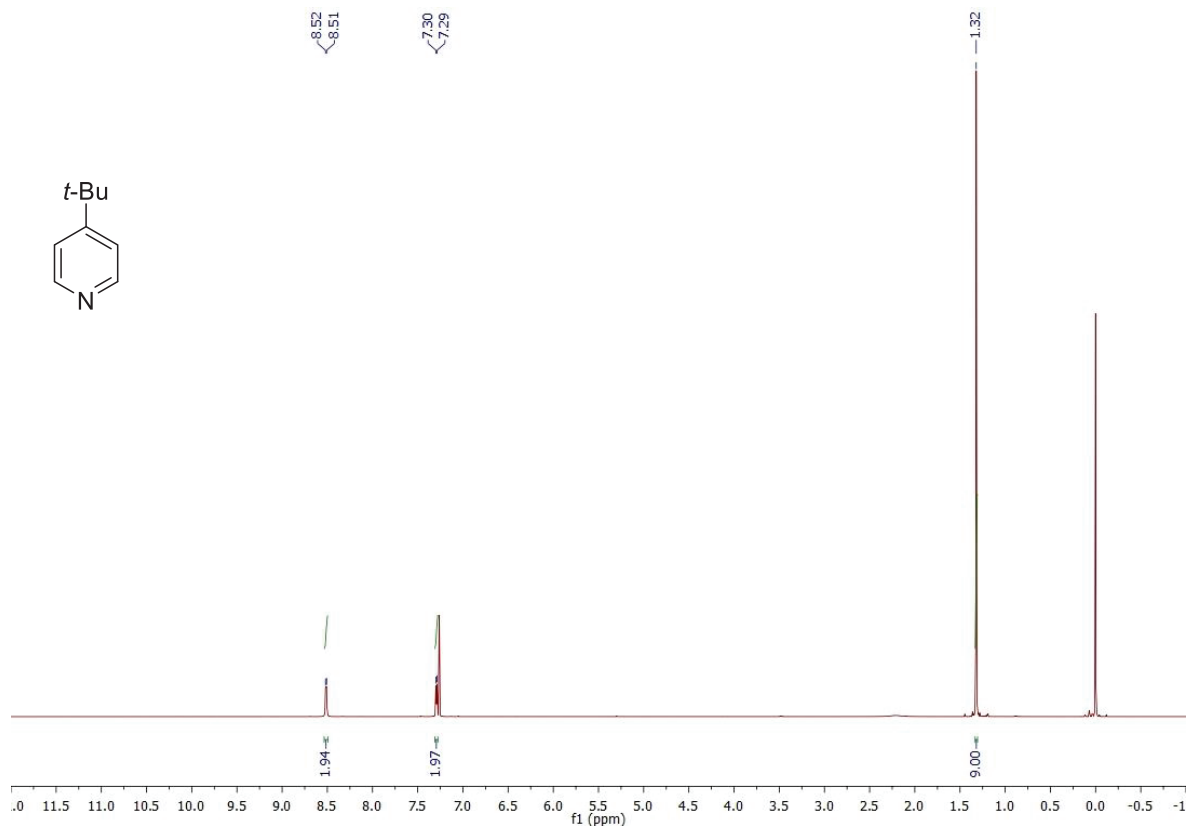
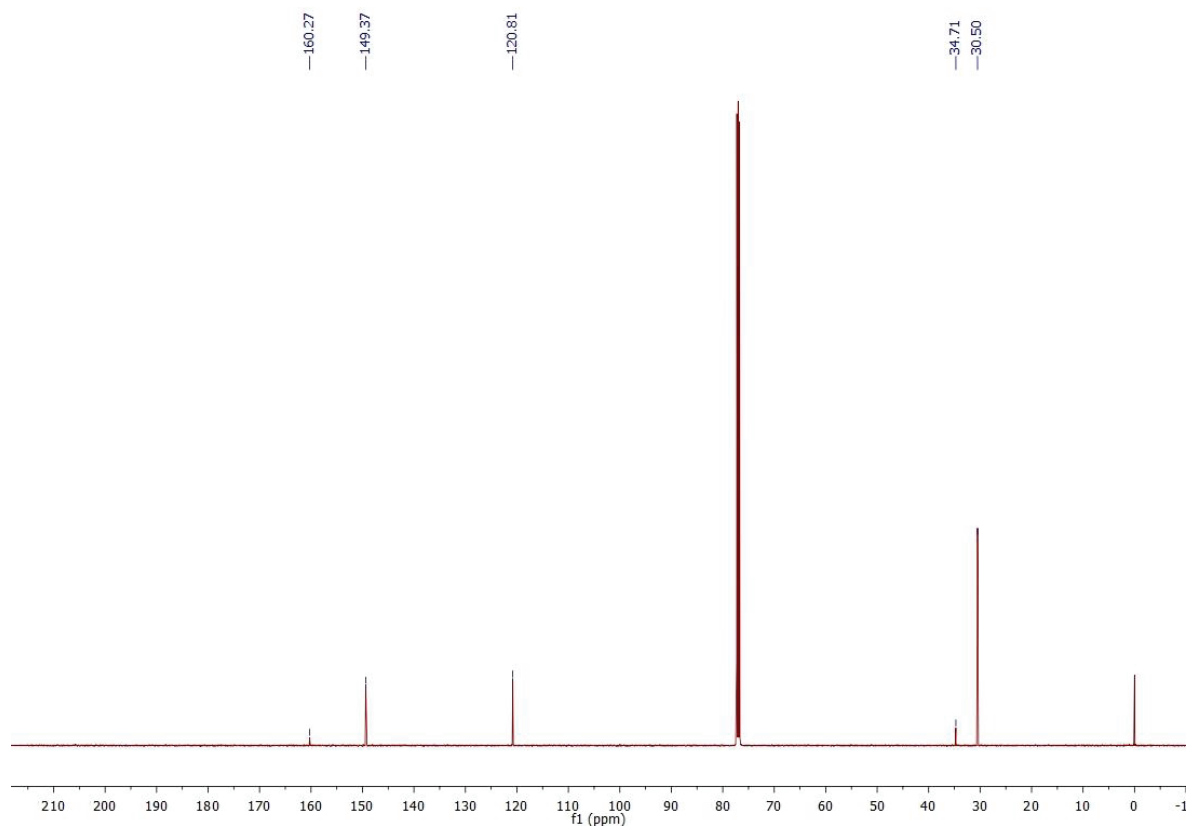
Regioselective and Transition Metal Free Addition of *tert*-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives – A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-*tert*-Butylpyridine Derivatives

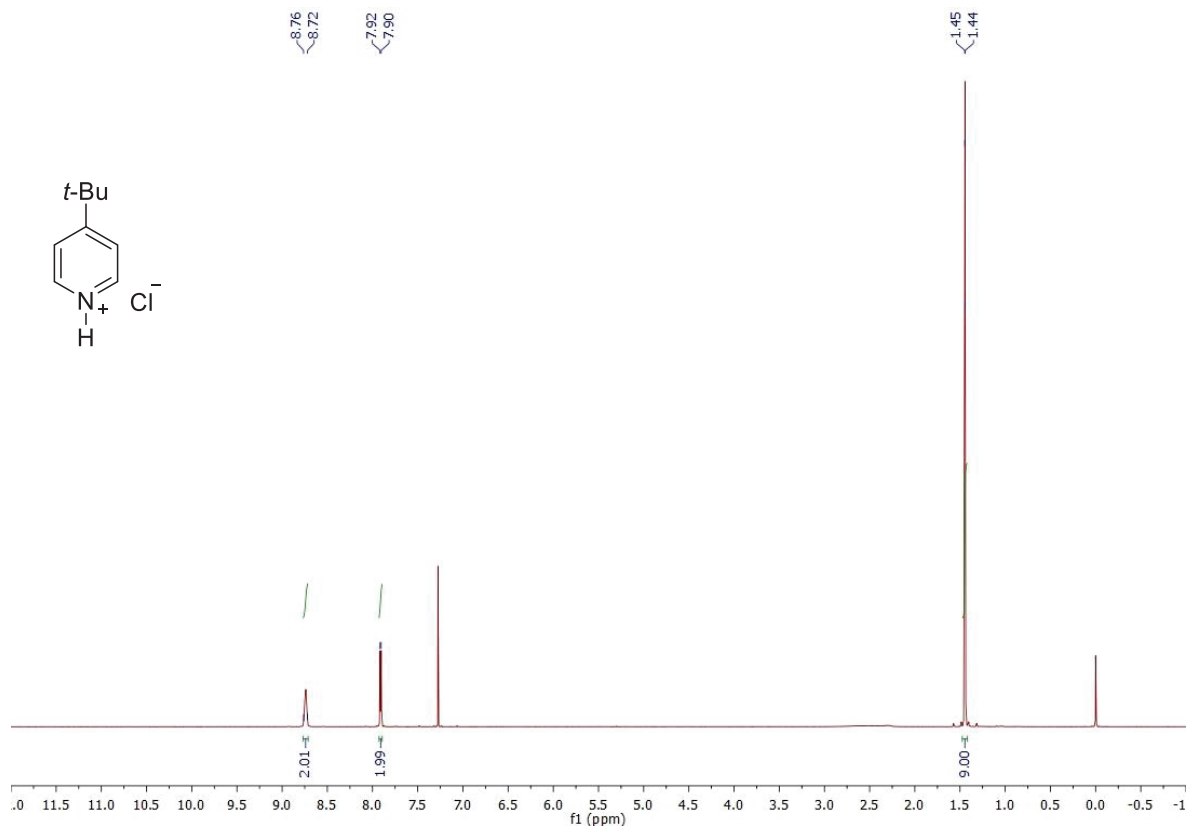
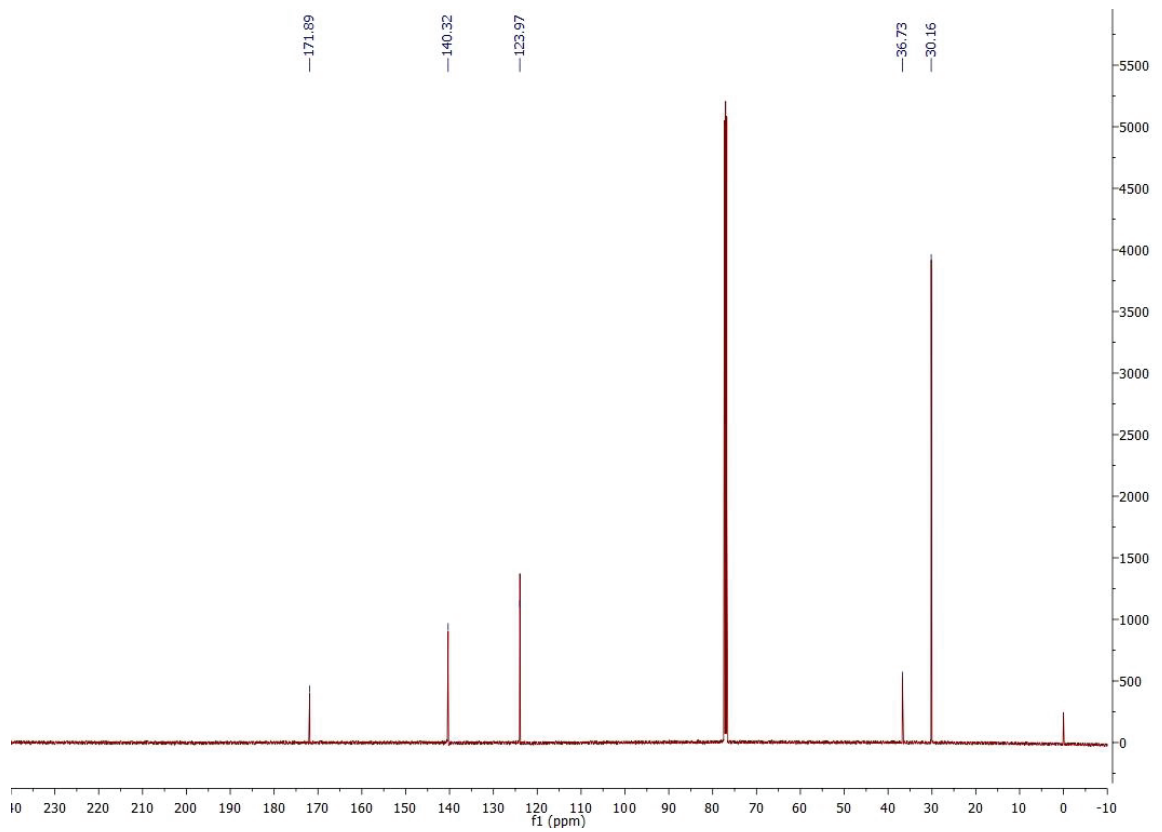
Sebastian Rappenglück¹, Karin V. Niessen², Thomas Seeger², Franz Worek², Horst Thiermann², Klaus T. Wanner^{1*}

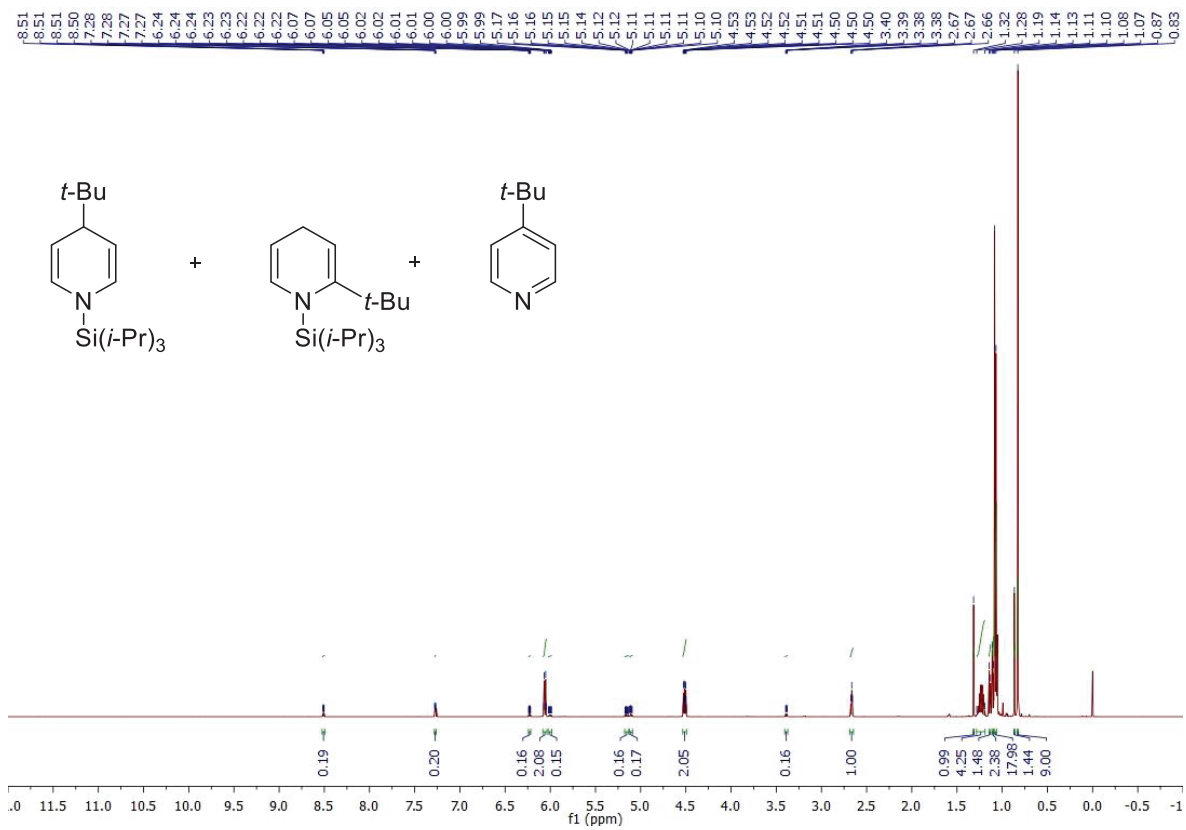
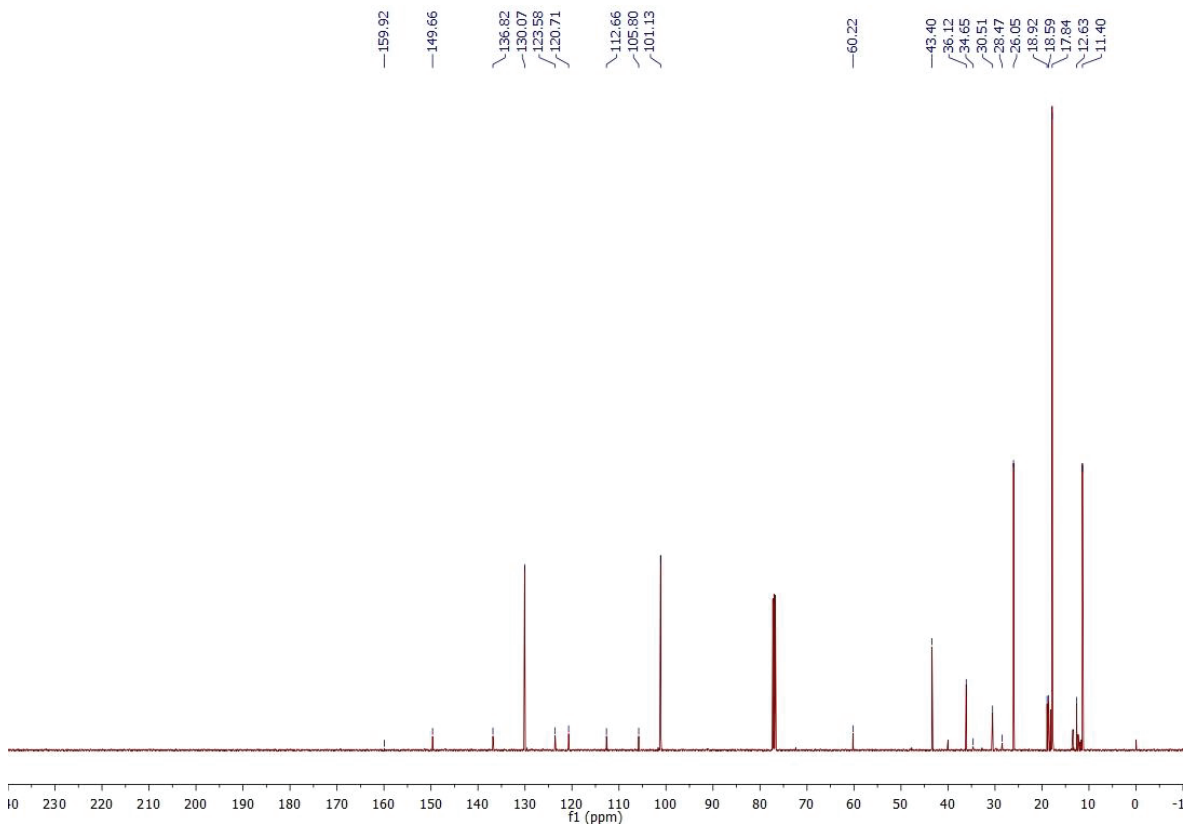
¹ Ludwig-Maximilians-Universität München, Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, Butenandtstr. 5-13, Haus C, 81377 Munich, Germany
Fax +49(89)218077247; E-mail: klaus.wanner@cup.uni-muenchen.de

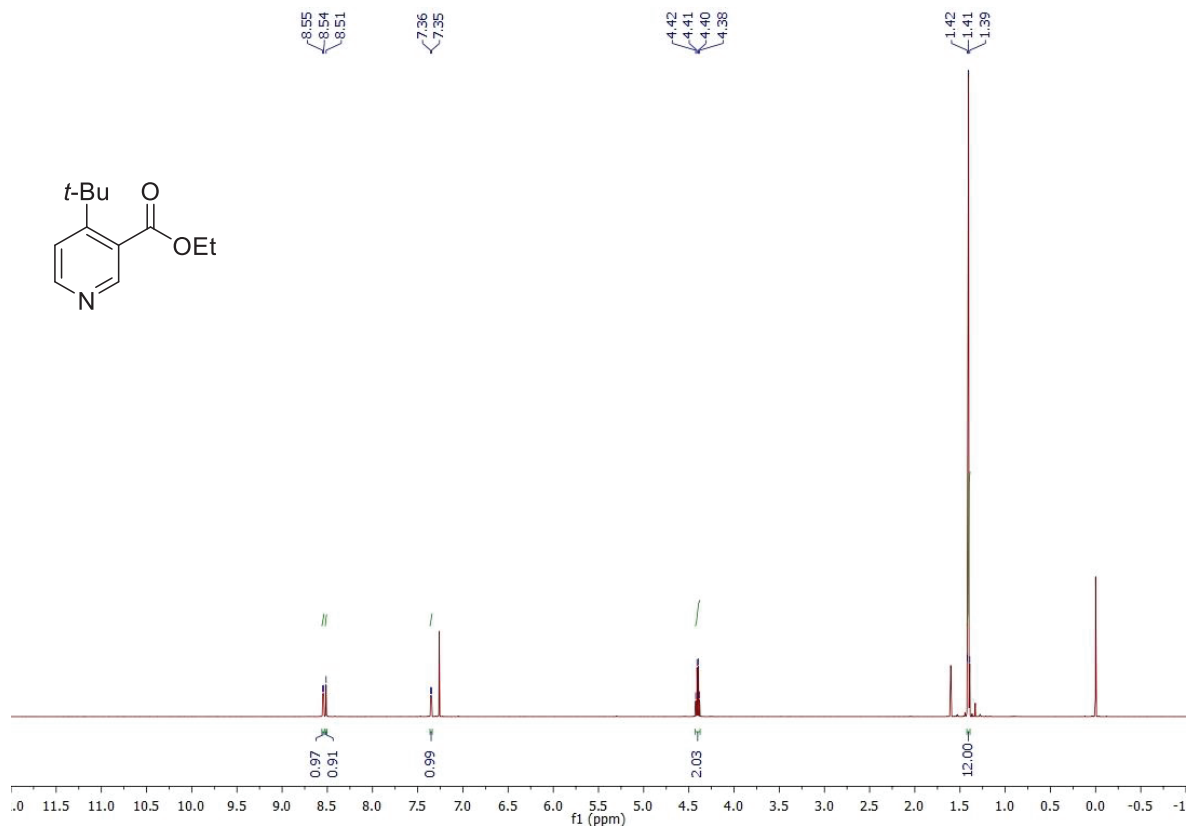
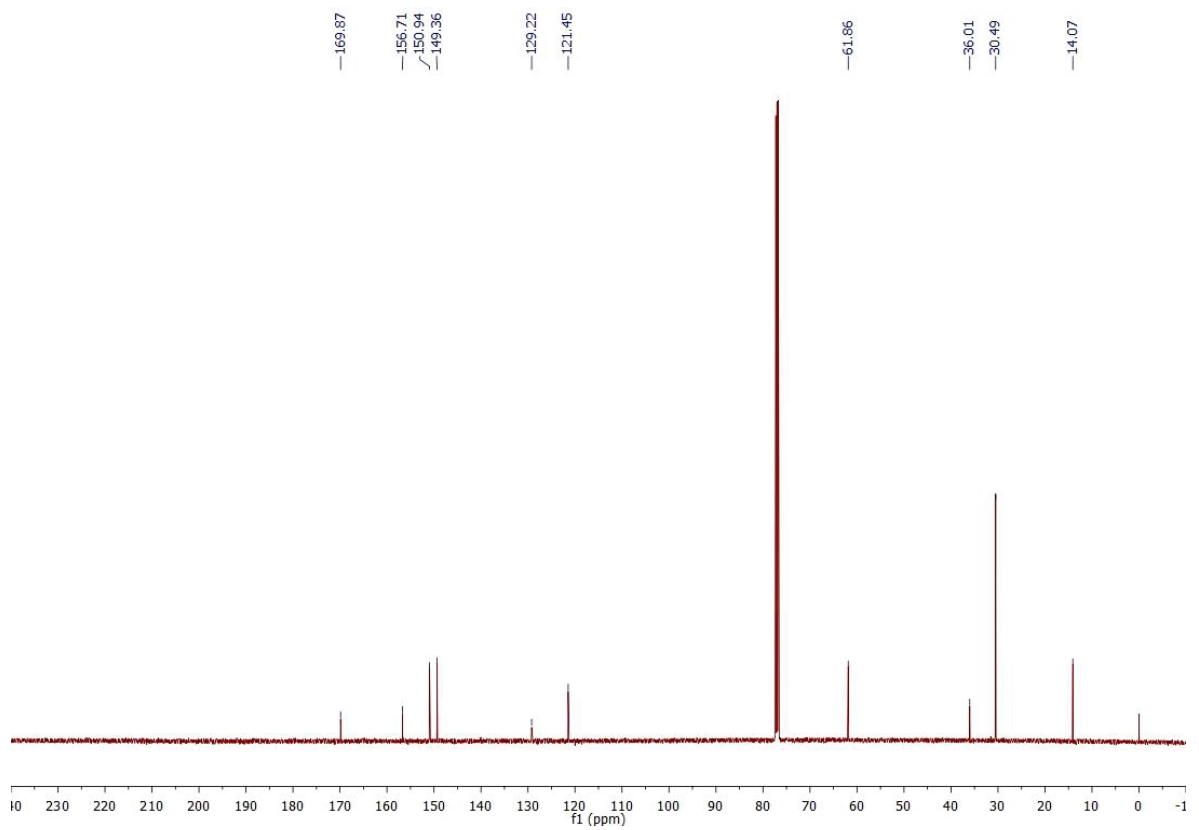
² Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany

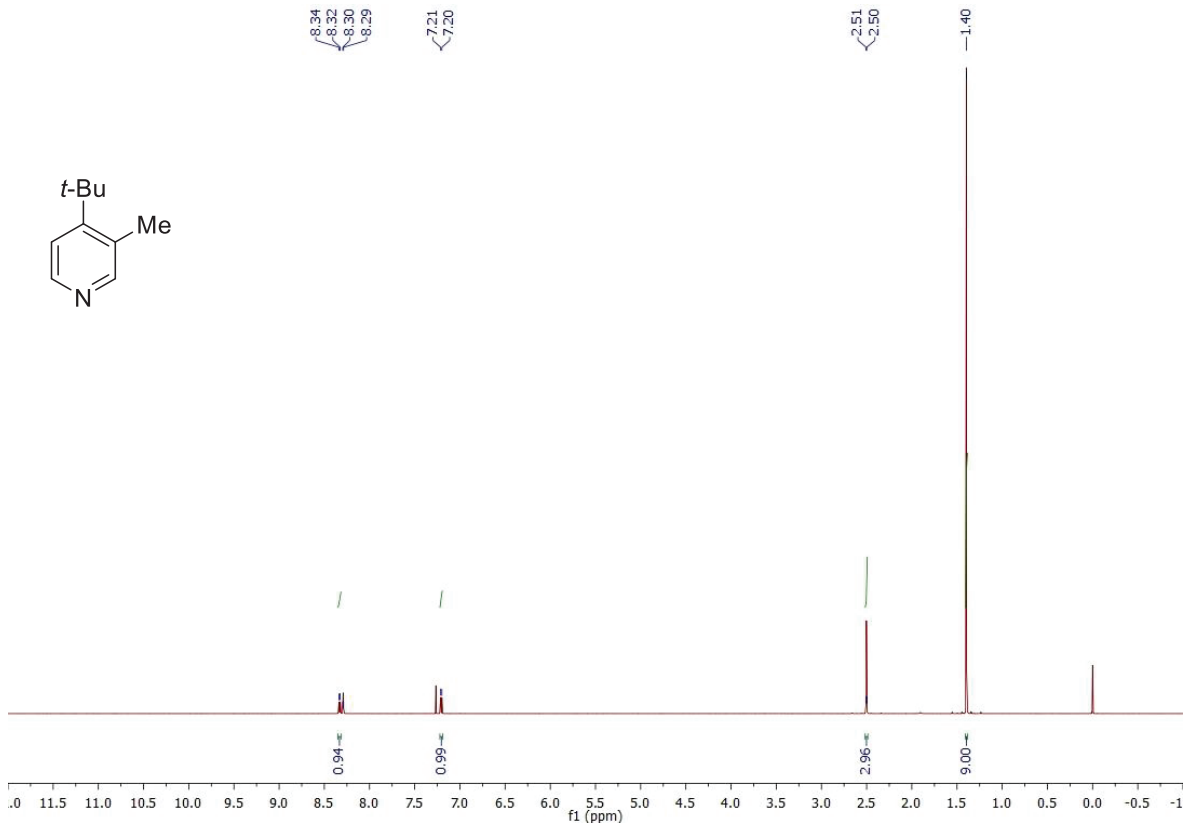
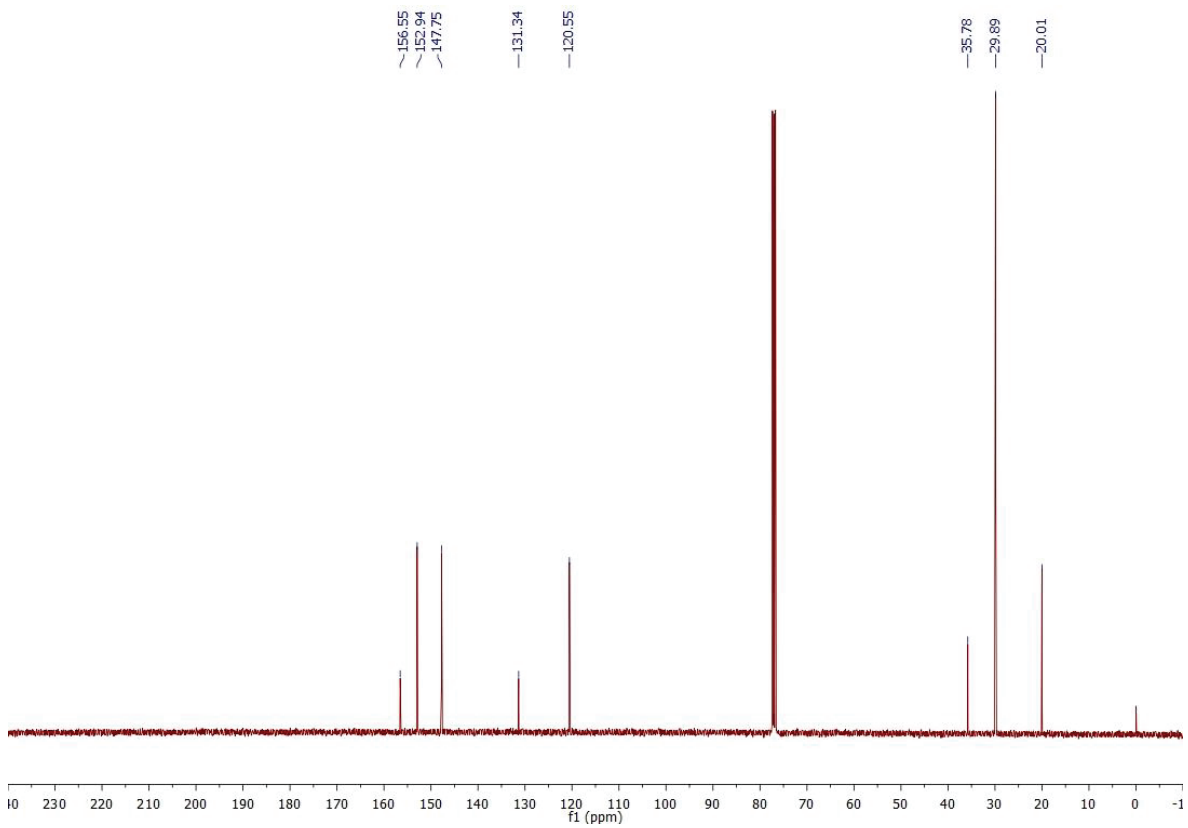
^1H and ^{13}C NMR spectra**3 + 4 (^1H):****3 + 4 (^{13}C):**

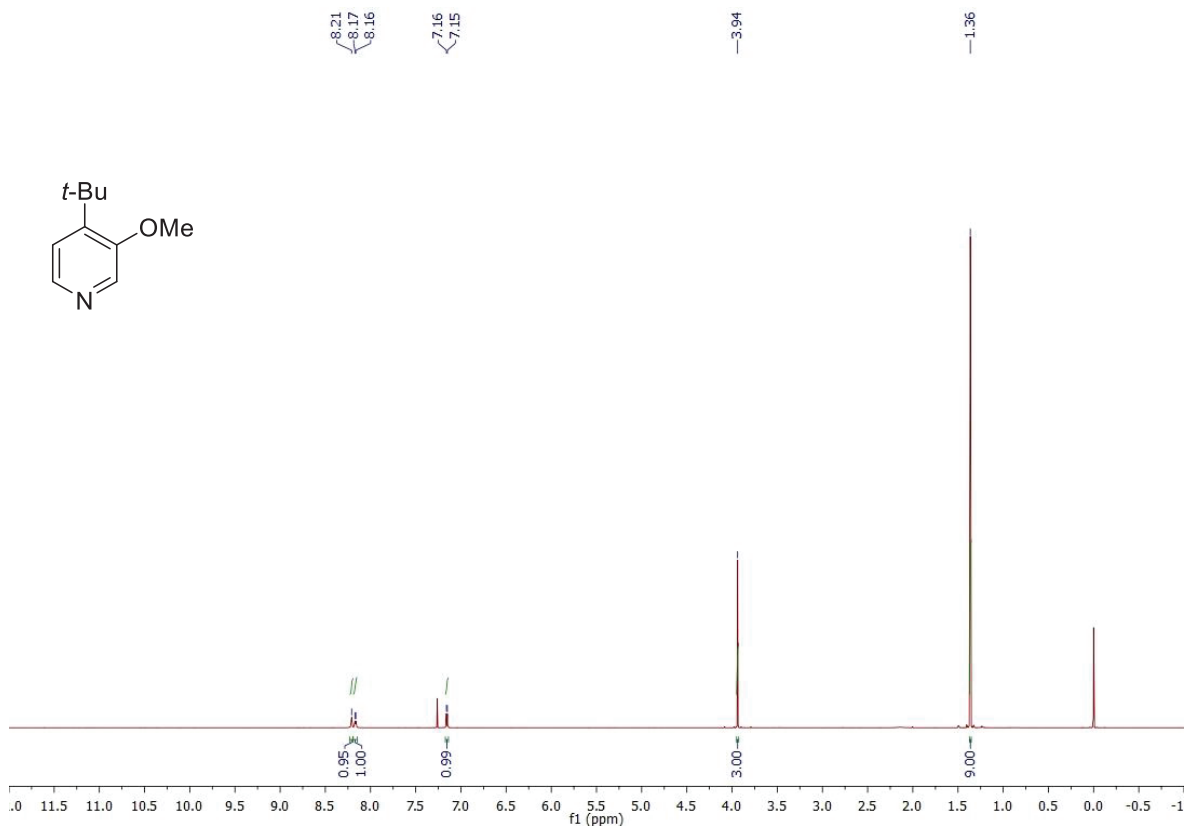
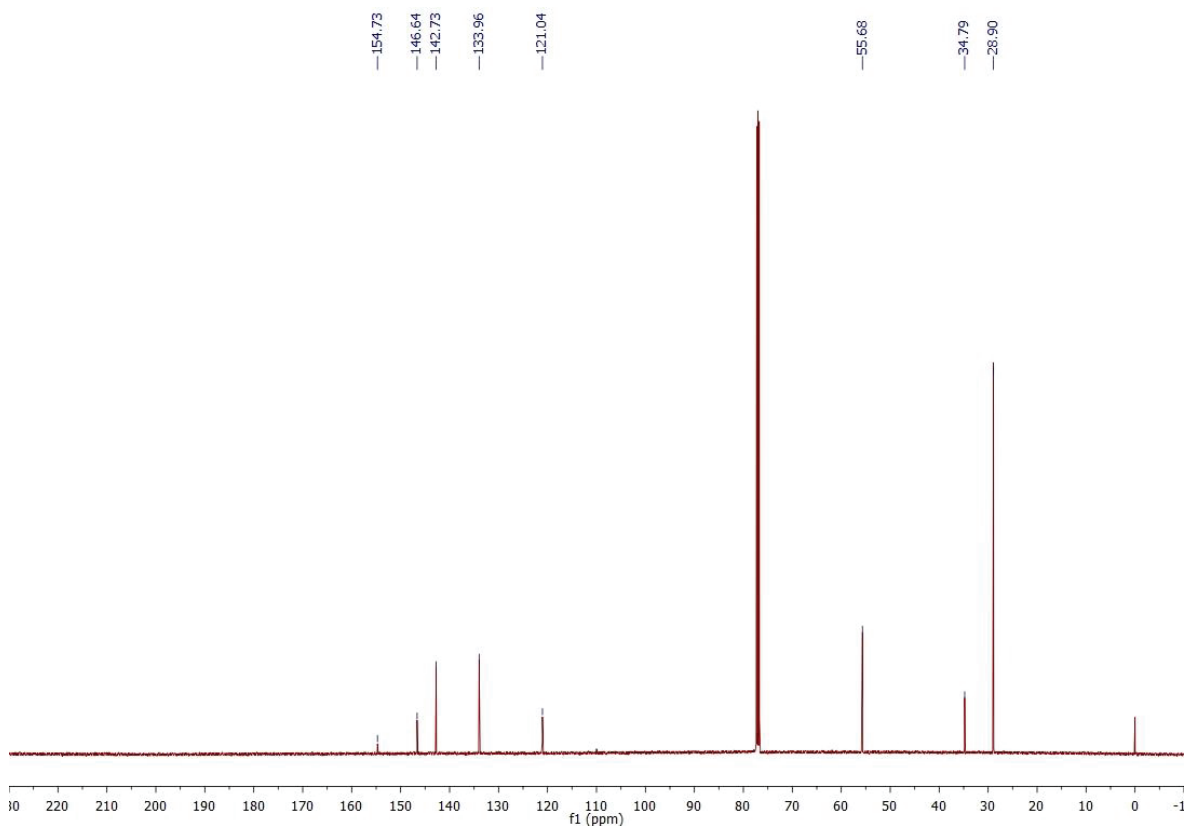
4 (^1H):**4** (^{13}C):

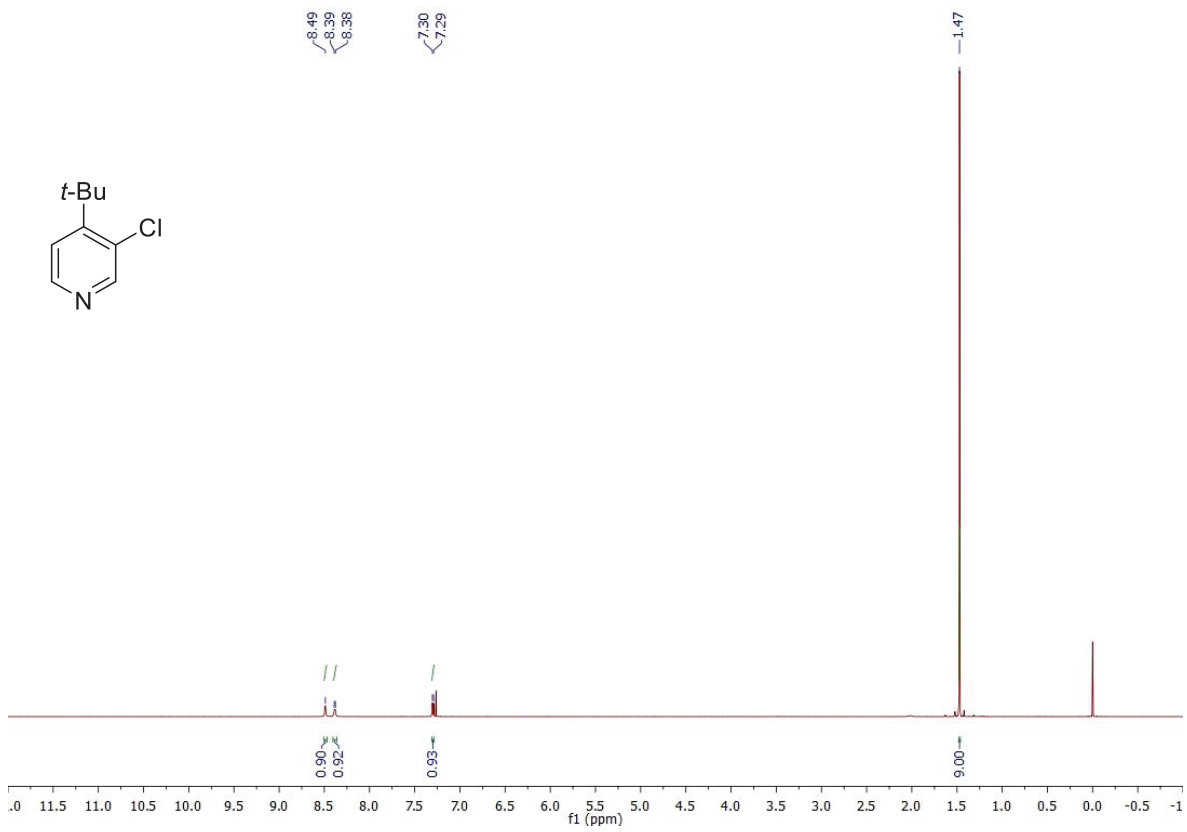
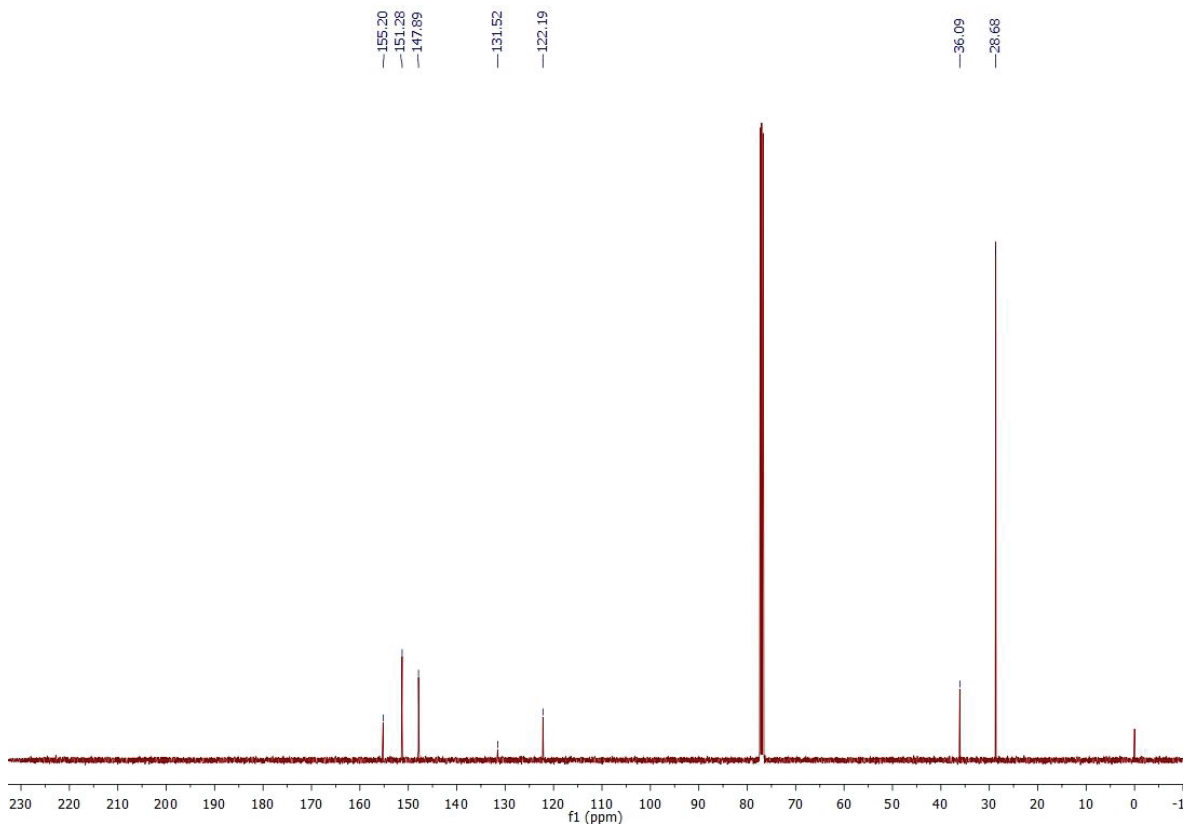
6 (^1H):**6** (^{13}C):

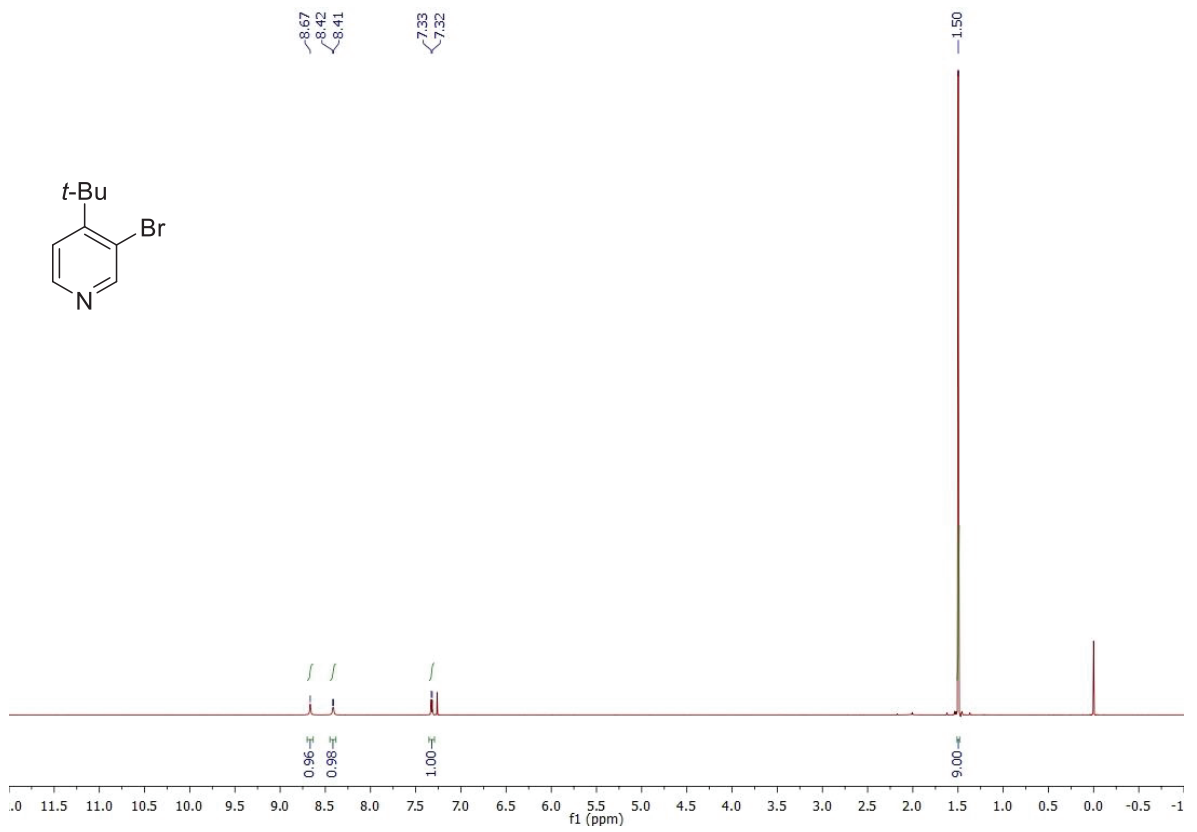
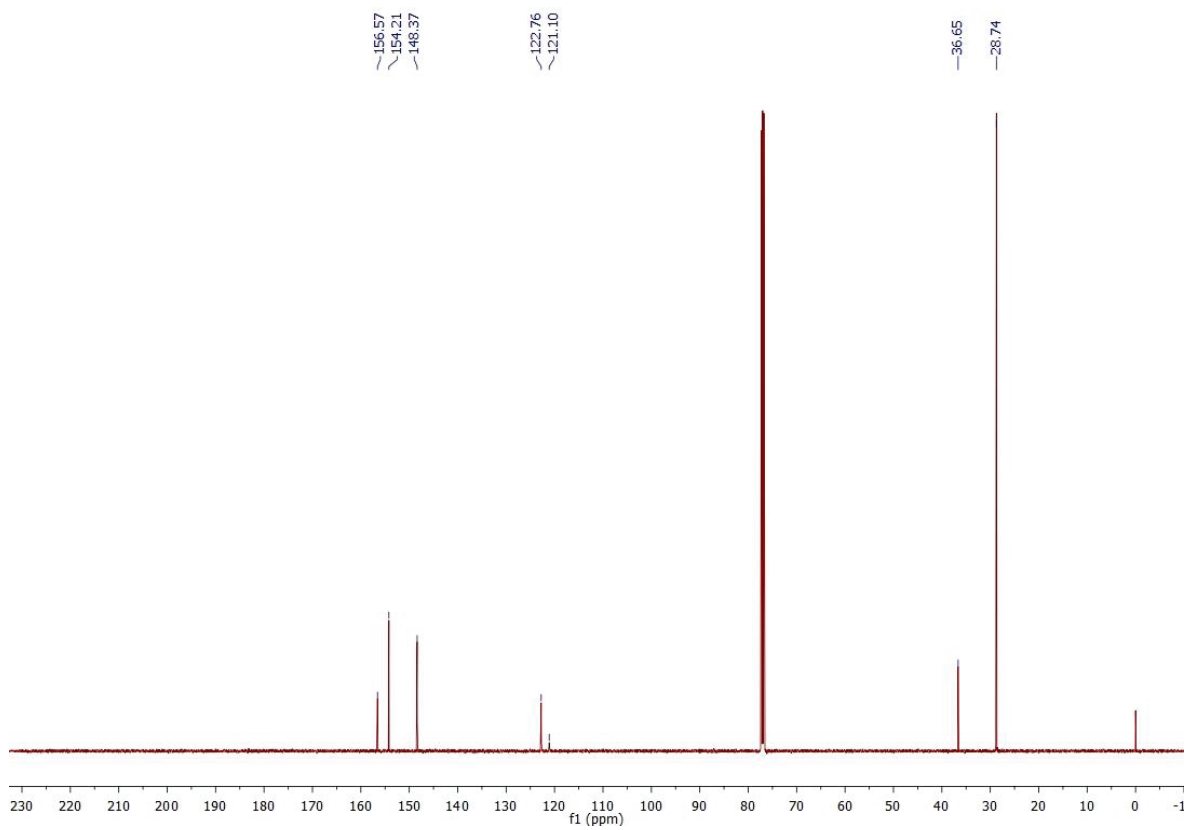
3 + 4 + 5 (¹H):**3 + 4 + 5 (¹³C):**

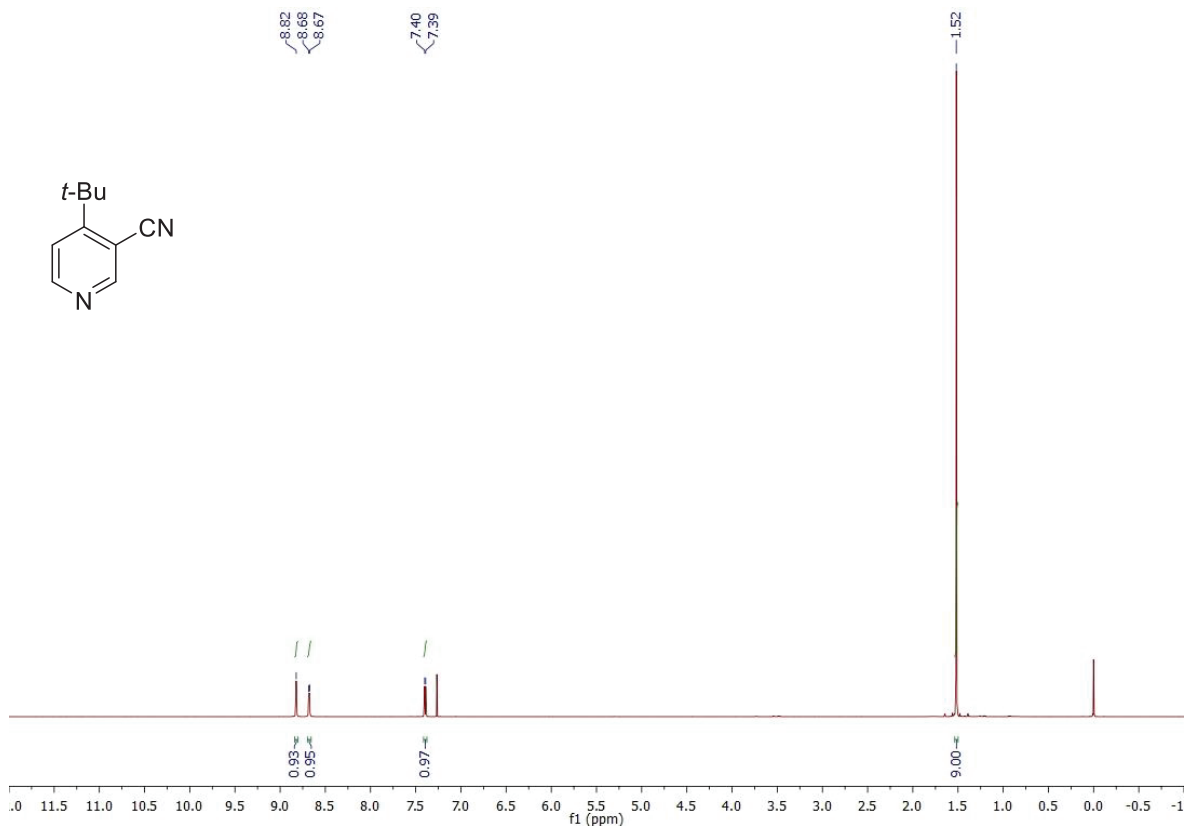
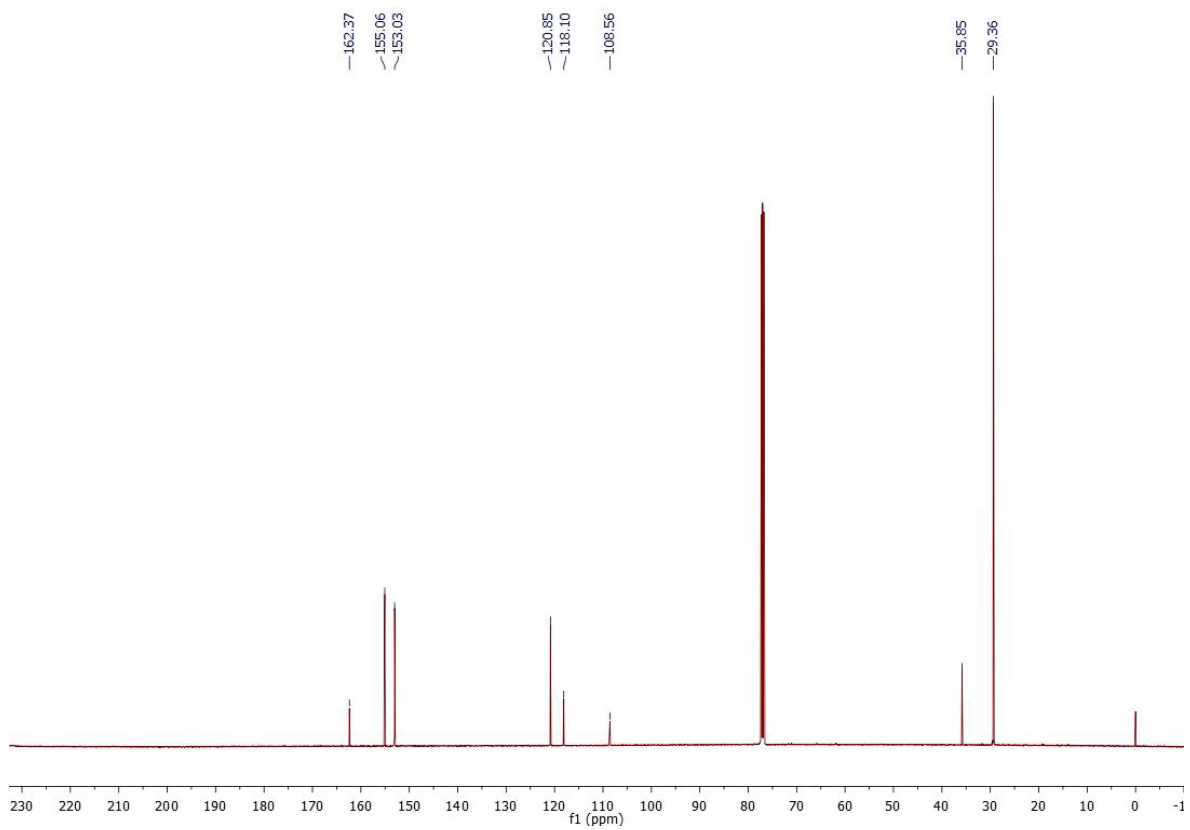
8 (^1H):**8** (^{13}C):

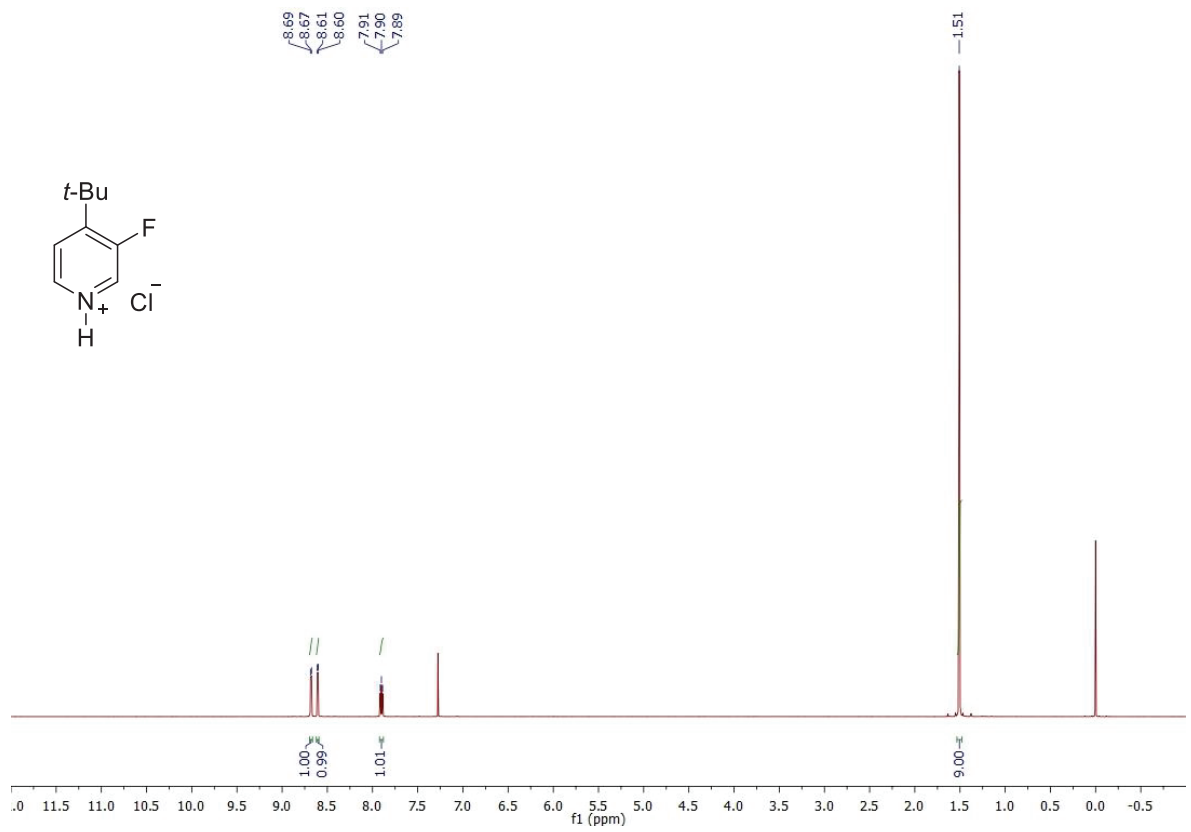
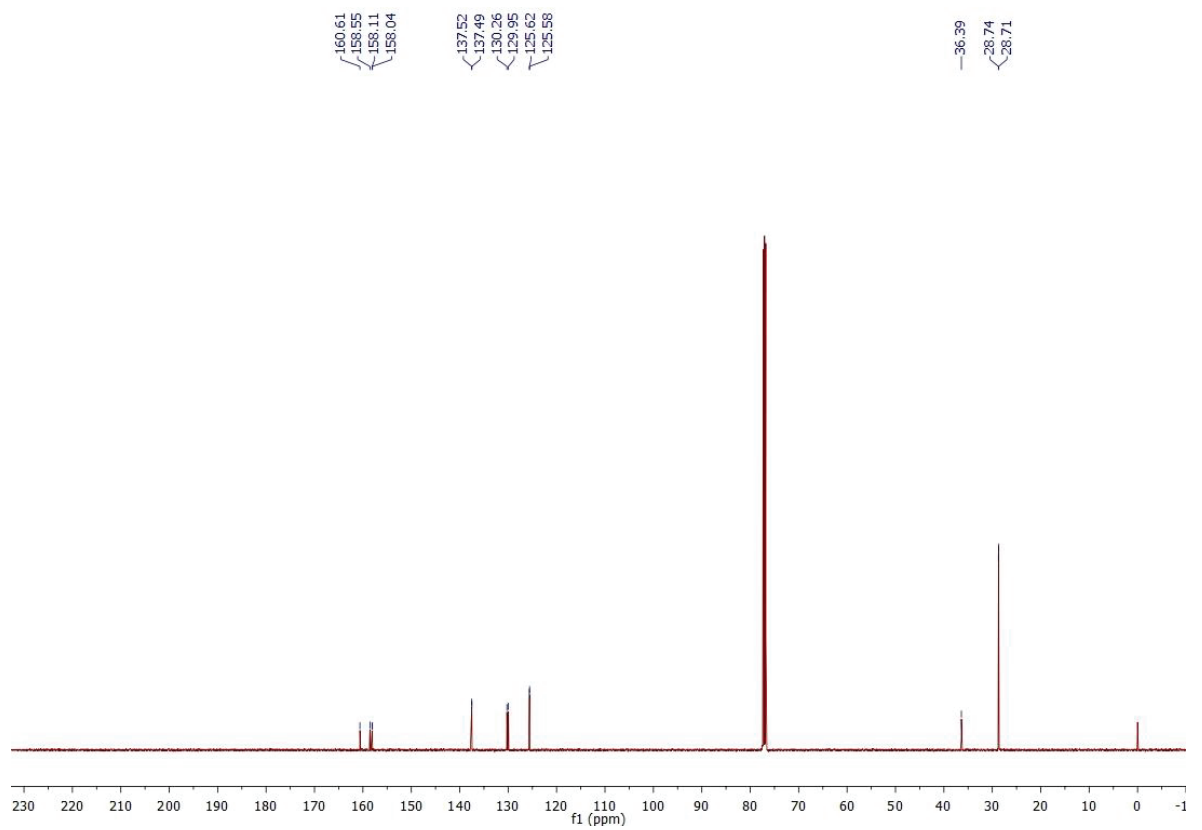
11b (^1H):**11b (^{13}C):**

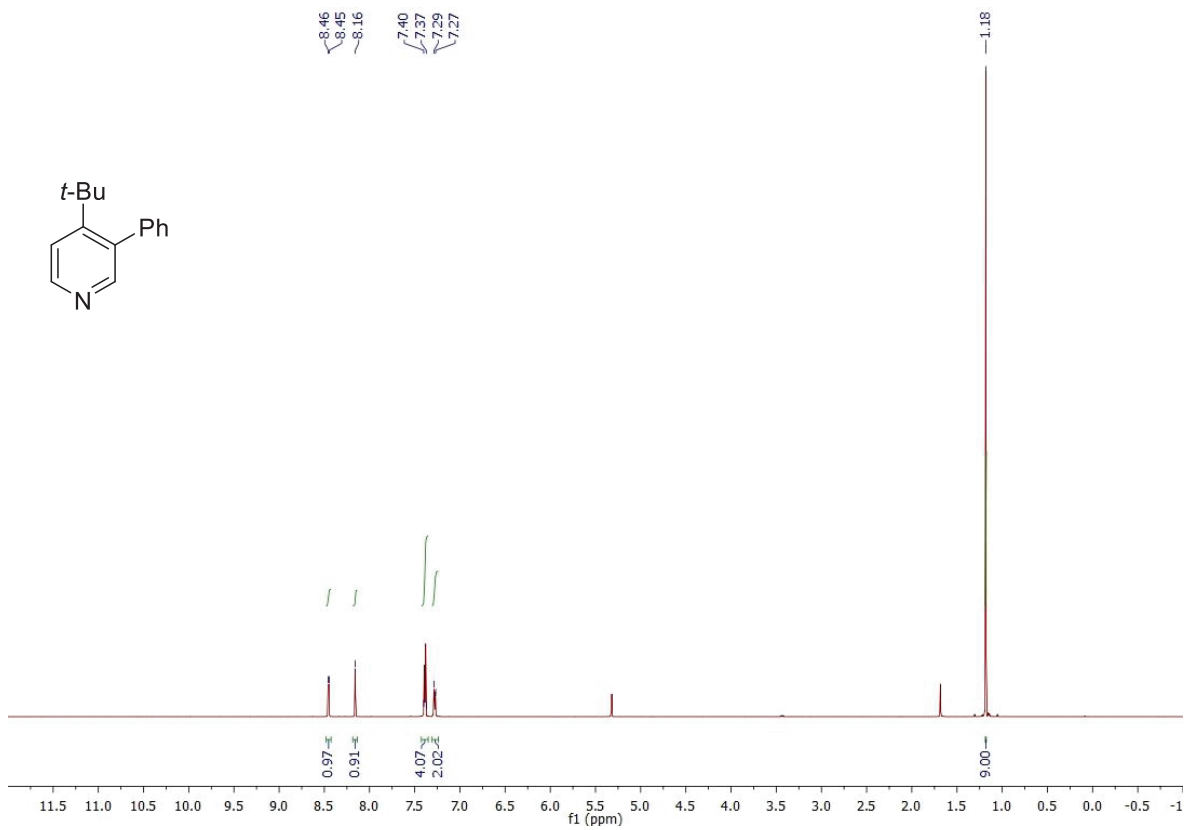
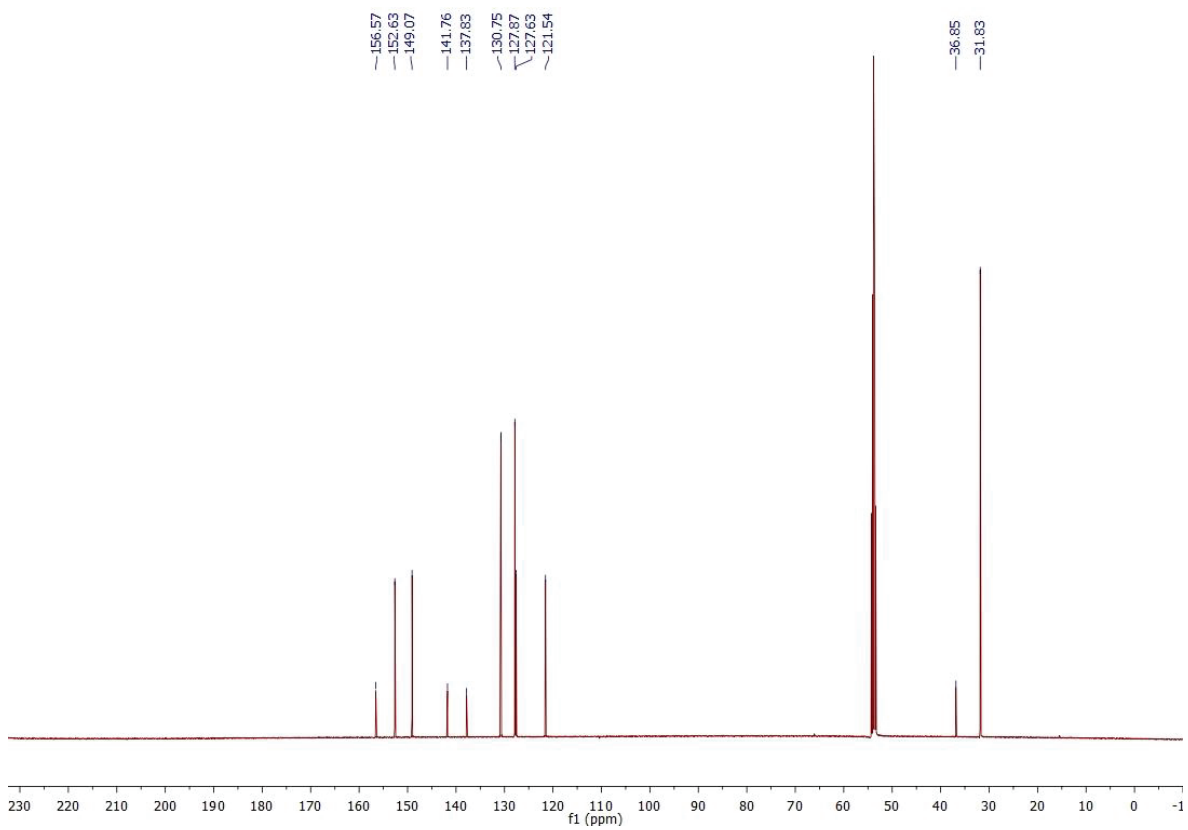
11c (^1H):**11c** (^{13}C):

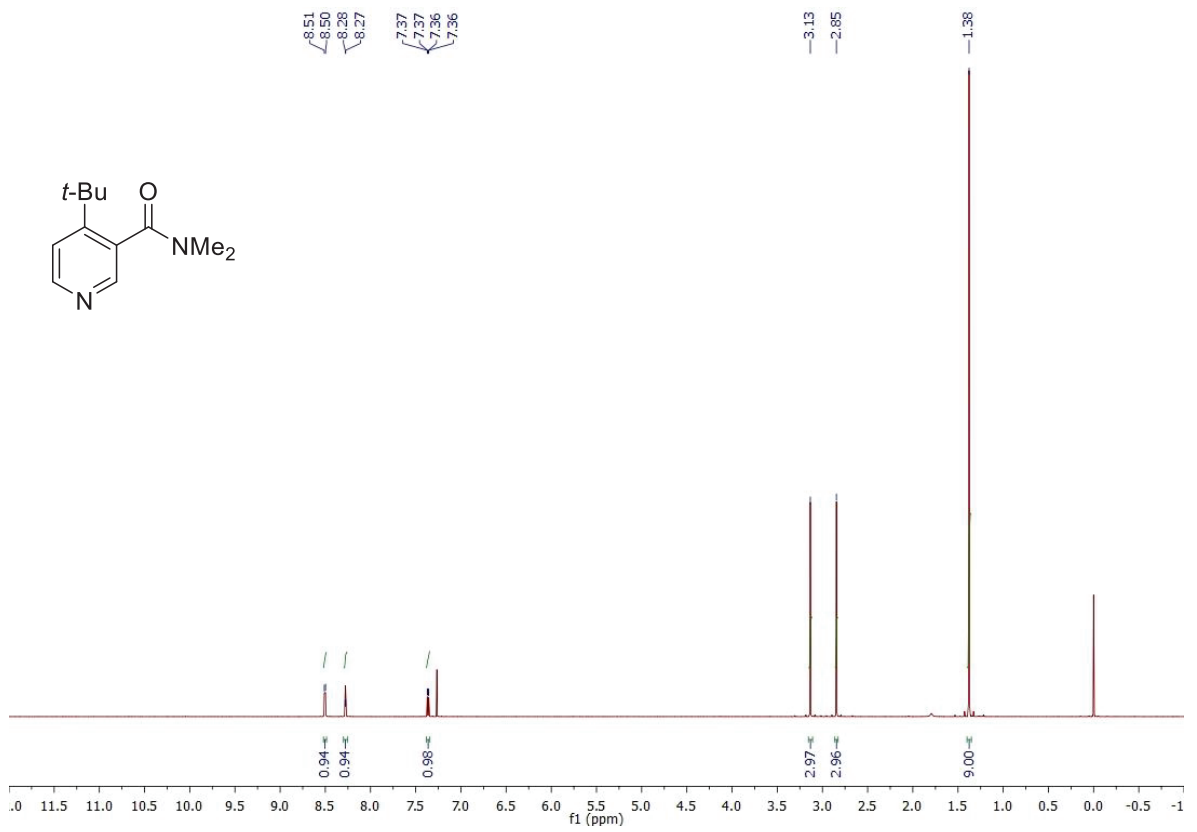
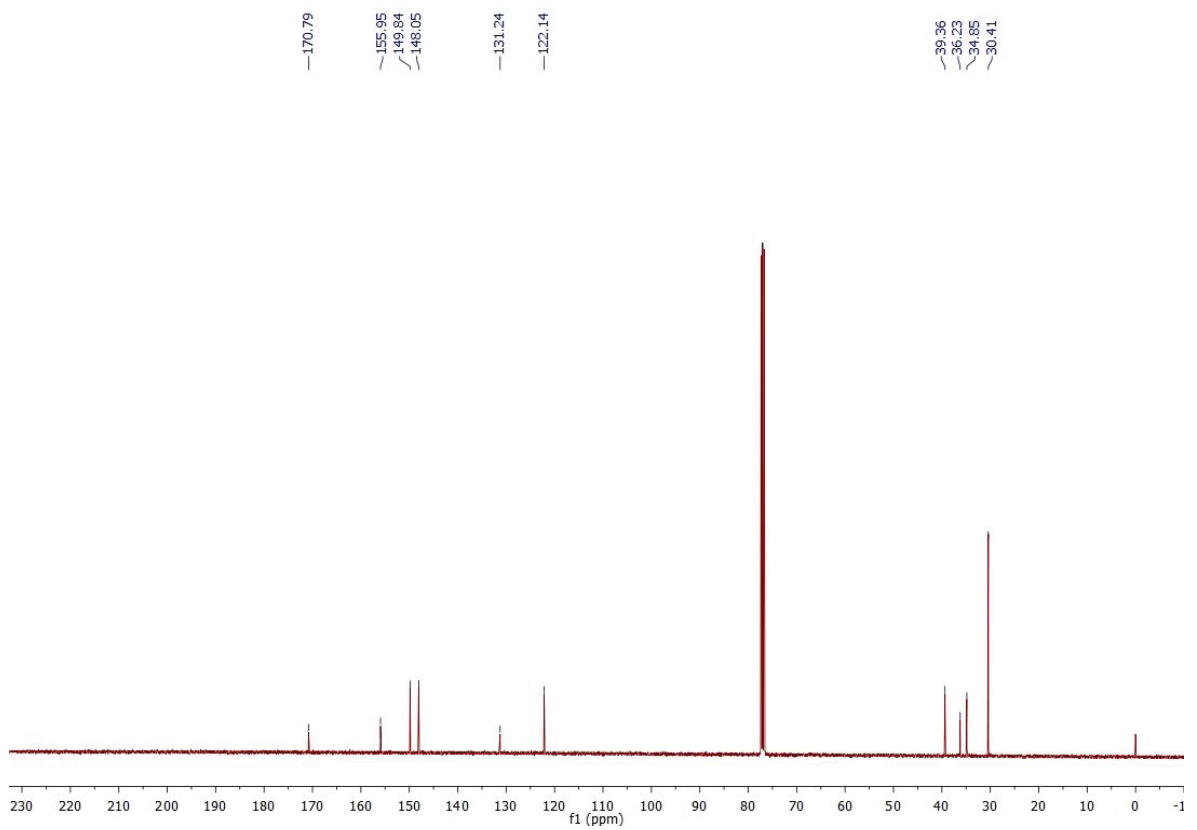
11d (^1H):**11d (^{13}C):**

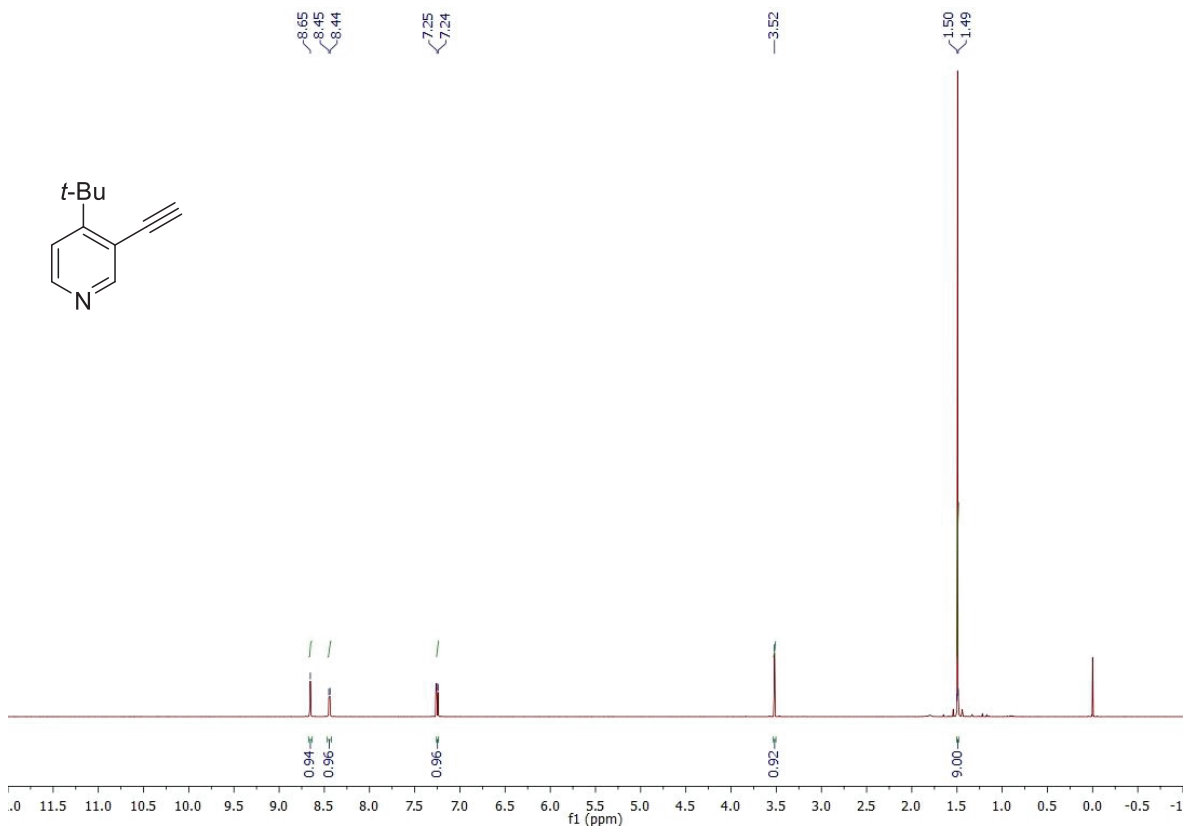
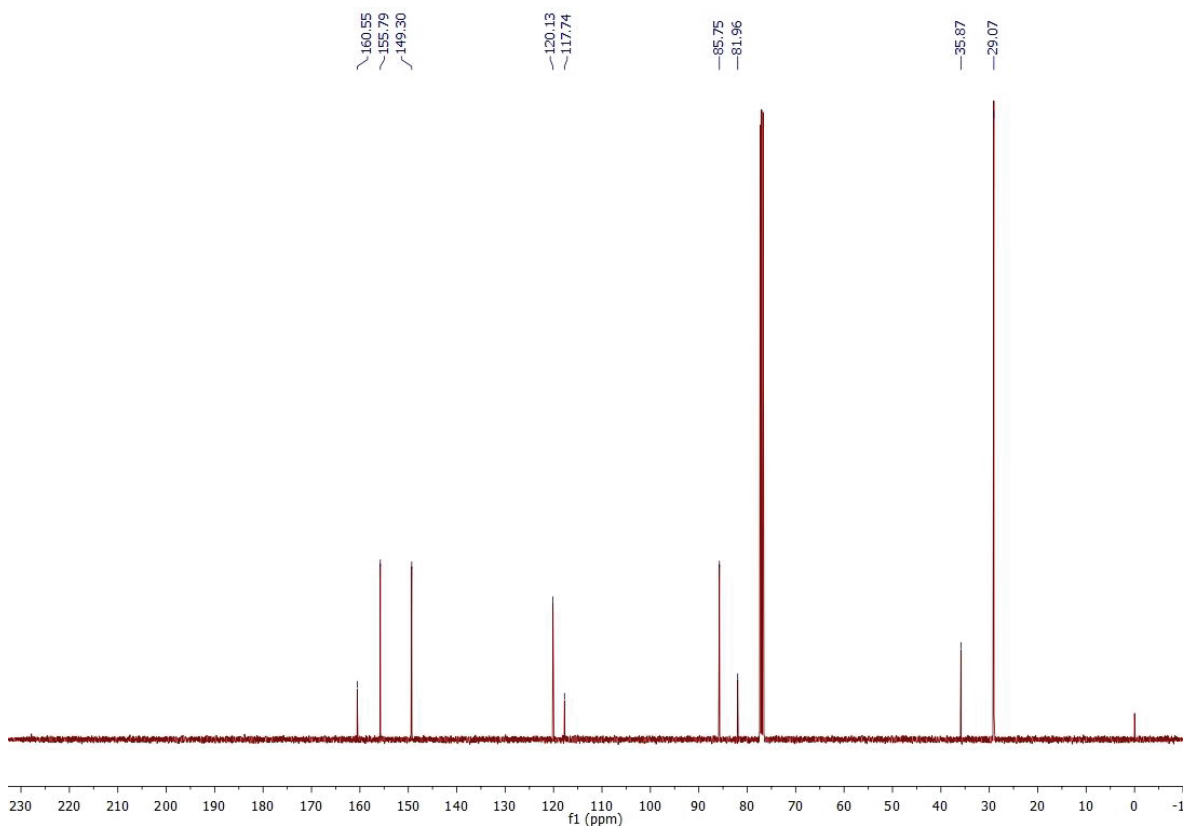
11e (^1H):**11e** (^{13}C):

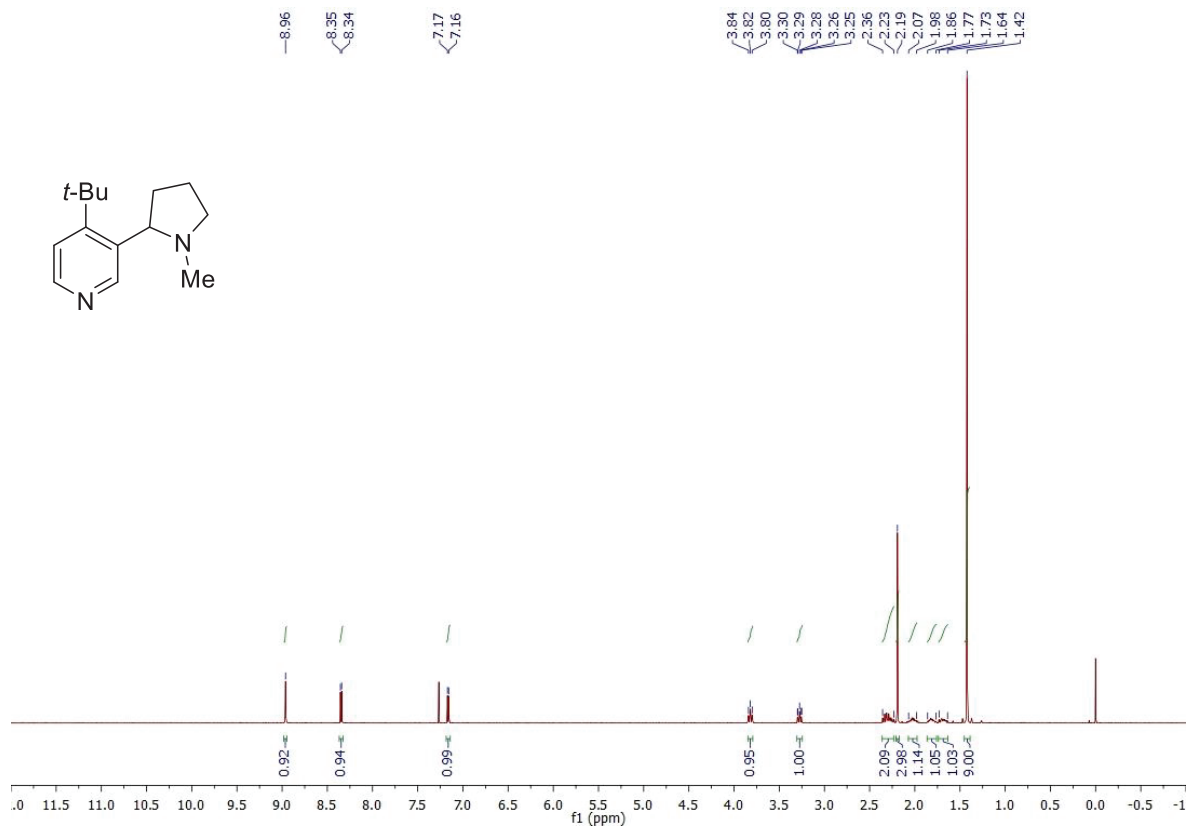
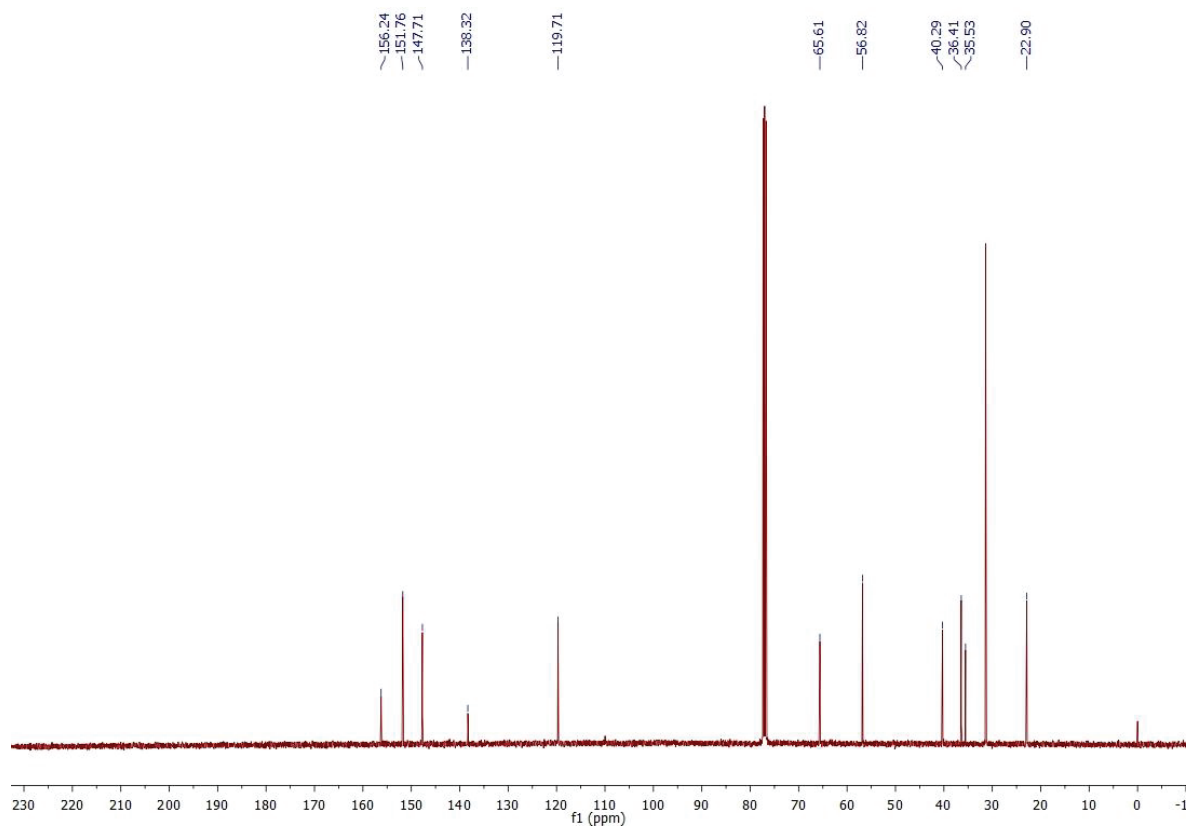
11f (^1H):**11f (^{13}C):**

11g (¹H):**11g (¹³C):**

11h (^1H):**11h (^{13}C):**

11i (^1H):**11i** (^{13}C):

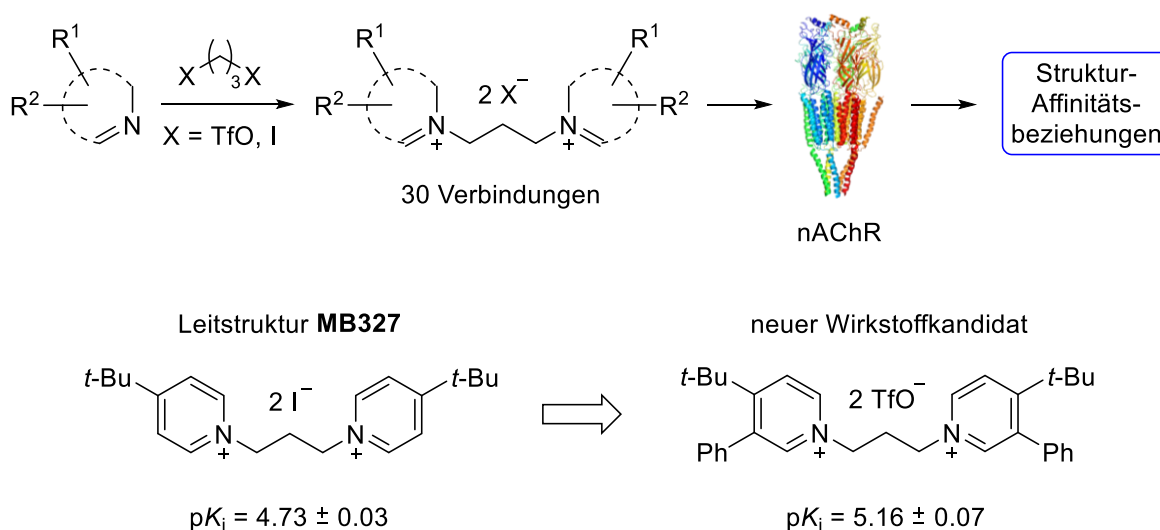
11j (^1H):11j (^{13}C):

rac-11k (¹H):**rac-11k (¹³C):**

3.2 Zweite Publikation: *Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor*

3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hemmung der nikotinerger Neurotransmission als Folge der Desensibilisierung der nAChR ist eines der drängendsten Probleme bei der Behandlung von phosphororganischen Vergiftungen. Um die Funktion der Rezeptoren in Gegenwart einer hohen Konzentration an Neurotransmitter wiederherzustellen werden allosterische Modulatoren der nAChR, sogenannten Resensitizer, benötigt. Die wirkungsvollste, für den Einsatz am Menschen aber nicht ausreichend potente Verbindung dieser Klasse ist das Bispyridiniumsalz **MB327**. Größtes Hemmnis für die Entwicklung neuer Wirkstoffe war bisher das Fehlen valider Struktur-Wirkungsbeziehungen. In der vorliegenden Studie wurden deshalb mit **MB327** als Leitstruktur systematisch unterschiedlich substituierte Wirkstoffkandidaten synthetisieren, diese hinsichtlich ihrer Affinität zur MB327-Bindungsstelle am nAChR charakterisiert und somit erste quantitative Bindungsdaten generiert. Im zweiten Schritt wurden anhand der Bindungsdaten Struktur-Affinitätsbeziehungen aufgestellt und somit eine Basis für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gelegt (Schema 7).



Schema 7: Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten mit **MB327** als Leitstruktur.

Bei den neu synthetisierten Verbindungen handelte es sich wie bei **MB327** um sogenannte symmetrische bisquaternäre Salze (vgl. Kapitel 2.2) mit einem Propan-1,3-

diyl-Linker, welche durch N-Alkylierung der jeweiligen Heterocyclen mit einem Biselektrophil synthetisiert wurden. Hierfür wurden effiziente Alkylierungsverfahren mit Propan-1,3-bistriflat oder 1,3-Diodpropan entwickelt, welche in der Lage sind selbst nicht nukleophile N-Heterocyclen wie 2-*tert*-Butylpyridin zuverlässig mit guten Ausbeuten zu alkylieren und dennoch eine Vielzahl wichtiger funktioneller Gruppen wie z.B. Ester, Amide, tertiäre und sekundäre Amine, Alkine oder Ether tolerieren. Im Vergleich mit der Affinität der Leitstruktur **MB327** ($pK_i = 4.72 \pm 0.03$) wurden für polar substituierte (OMe, COOEt, CONMe₂, COOH, N-Methylpyrrolidin) Bispyridiniumverbindungen geringere Bindungsaffinitäten als für lipophil substituierte (C≡CH, *t*-Bu, *i*-Pr, Ph) gefunden. Einzige Ausnahme war die NMe₂-Gruppe. Mit ihr wurde ein polarer isosterer Ersatz für den *tert*-Butylrest identifiziert. Mit einem pK_i Wert von 5.16 ± 0.07 besaß die lipophilste aller 30 Verbindungen, das 3-phenyl-4-*tert*-butylsubstituierte Bispyridiniumsalz **31h**, die höchste Bindungsaffinität aller Testsubstanzen und übertraf den pK_i Wert von **MB327** um 0.44 log Einheiten. Dies unterstreicht die Relevanz lipophiler Wechselwirkungen wie z. B. Van-der-Waals-, π - π - oder Kation- π -Wechselwirkungen für die Bindung zum Target. Mit der Ausarbeitung erster Struktur-Affinitätsbeziehungen und der Identifizierung einer signifikant affineren Bispyridiniumverbindung konnte ein wertvoller Beitrag für die Entwicklung neuer Resensitizer geleistet werden.

3.2.2 Darstellung des Eigenanteils

Alle Synthesen sowie die analytische Charakterisierung der Verbindungen wurden von mir durchgeführt. Die technische Durchführung der MS- und NMR-Messungen zur analytischen Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde von der Abteilung des Departments Pharmazie übernommen. Sonja Sichler übernahm die biologische Prüfung der Zielverbindungen mittels der von ihr, G. Höfner und K. T. Wanner entwickelten MS-Bindungsassays sowie die Berechnung der pK_i Werte. Die Erstellung des Manuskripts wurde zu gleichen Teilen von Sonja Sichler und mir unterstützt von G. Höfner, T. Wein und K. T. Wanner durchgeführt. Die Korrektur des Manuskripts übernahmen G. Höfner, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, F. F. Paintner und K. T. Wanner.

Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor

Sebastian Rappenglück^{+, [a]} Sonja Sichler^{+, [a]} Georg Höfner,^[a] Thomas Wein,^[a] Karin V. Niessen,^[b] Thomas Seeger,^[b] Franz F. Paintner,^[a] Franz Worek,^[b] Horst Thiermann,^[b] and Klaus T. Wanner^{*[a]}

A novel series of 30 symmetric bispyridinium and related N-heteroaromatic bisquaternary salts with a propane-1,3-diyol linker was synthesized and characterized for their binding affinity at the **MB327** binding site of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from *Torpedo californica*. Compounds targeting this binding site are of particular interest for research into new antidotes against organophosphate poisoning, as therapeutically active 4-*tert*-butyl-substituted bispyridinium salt **MB327** was previously identified as a nAChR re-sensitizer. Efficient access to the target compounds was provided by newly developed methods enabling N-alkylation of sterically hindered or

electronically deactivated heterocycles exhibiting a wide variety of functional groups. Determination of binding affinities toward the **MB327** binding site at the nAChR, using a recently developed mass spectrometry (MS)-based Binding Assay, revealed that several compounds reached affinities similar to that of **MB327** ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$). Notably, the newly prepared lipophilic 4-*tert*-butyl-3-phenyl-substituted bispyridinium salt PTM0022 (**3h**) was found to have significantly higher binding affinity, with a pK_i value of 5.16 ± 0.07 , thus representing considerable progress toward the development of more potent nAChR re-sensitizers.

Introduction

The recent use of sarin as a chemical weapon in Syria as well as the high number of fatal poisonings with organophosphorus pesticides underline the threat emanating from organophosphorus compounds (OPCs) to humanity.^[1–3] Therefore, there is an urgent need for effective medical treatment of OPC intoxications. OPCs inactivate the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which results in accumulation of acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft of both muscarinic and nicotinic synapses. Whereas overstimulation of muscarinic receptors (mAChRs) can be antagonized by using atropine, administration of anticholinergics to counteract nAChR overstimulation is precluded by their therapeutic limitations.^[4] Thus, ongoing overstimulation by accumulated ACh forces the nAChRs into a desensitized state,^[5,6] which is currently therapeutically inaccessible.^[7] Resulting disturbance of neuromuscular transmission may cause

paralysis of respiratory and other skeletal muscles as the most severe and often lethal consequences of OPC poisoning.

Current medical countermeasures make use of oximes such as obidoxime or pralidoxime to reactivate the inhibited AChE, thus treating cholinergic crisis. However, in many cases oximes have been shown to be ineffective. Rapid dealkylation of the AChE–organophosphonate complex in the case of soman intoxication or very slow reactivation rates of tabun-inhibited AChE for most commonly used oximes are only two of several examples for which the reactivation kinetics of this phenomenon has been well studied.^[8,9] Hundreds of different oximes have been developed and tested over the last decades, without the successful identification of a universal reactivator of AChE.^[10] As a consequence, restoration of nAChR-mediated cholinergic signaling in the event of OPC poisoning remains a highly challenging task, demanding an alternative approach not based exclusively on AChE reactivation.

One very promising strategy might be the direct intervention at the nAChR to recover its activity from desensitization, as recently demonstrated in measurements using a novel electrophysiological (surface electronic event reader, SURFE²R) platform by Niessen et al.^[11] These studies revealed that the 4-*tert*-butyl-substituted bispyridinium compound **MB327** can re-sensitize the desensitized nAChR and restore channel function.^[11,12] As previous investigations have already shown that **MB327** targets the orthosteric binding site with only weak affinity, functional recovery of the nAChR is suggested to be mediated rather by allosteric modulation.^[13,14] In contrast to an

[a] S. Rappenglück,⁺ S. Sichler,⁺ Dr. G. Höfner, Dr. T. Wein, Prof. Dr. F. F. Paintner, Prof. Dr. K. T. Wanner
Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: klaus.wanner@cup.uni-muenchen.de

[b] K. V. Niessen, Dr. T. Seeger, Prof. Dr. F. Worek, Prof. Dr. H. Thiermann
Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstr. 11, 80937 Munich (Germany)

[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800325>.

oxime-based therapy aiming at reactivation of inhibited AChE, an allosterically mediated re-sensitization of the nAChR has the advantage of restoring nAChR activity, thereby preserving neuromuscular function in any case of organophosphorus nerve agent poisoning.

The therapeutic effect of **MB327** against OPC poisoning has also been demonstrated in several ex vivo, in vitro, as well as in vivo studies. In the case of tabun-poisoned guinea pigs, for example, treatment with **MB327** significantly increased the survival rate relative to the oxime HI-6, both administered together with physostigmine and hyoscine.^[15] Furthermore, Seeger et al. found that **MB327** restores soman-impaired neuromuscular transmission in human and rat respiratory muscle preparations at concentrations of 100–200 μM .^[16] Unfortunately, **MB327** also acts as an AChE inhibitor at slightly higher concentrations (IC_{50} –600 μM) and antagonizes nicotinic currents at concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$,^[17,18] possibly leading to adverse effects, if administered in vivo.^[19] Therefore, the therapeutic window of **MB327** is too narrow for administration in cases of OPC poisoning, and hence more potent and more selective nAChR re-sensitizers must be developed.

Although **MB327** has been studied extensively in the past few years regarding its potential use in treatment regimens,^[20–22] the targeted binding site at the nAChR was characterized only very recently.^[23] Binding assays using mass spectrometry for marker quantification (MS Binding Assays) that enable the affinity determination for ligands targeting the **MB327** binding site have been established.^[24] Based on these MS Binding Assays, we could characterize the affinity of **MB327** for nAChR with a K_i value of $18.3 \pm 2.6 \mu\text{M}$, which is in line with its potency determined in electrophysiological and pharmacological studies. For our MS Binding Assays, we use the nAChR from *Torpedo californica*, which shows a high degree of homology to the human muscle-type nAChR and represents the most common model system.^[25,26]

In parallel to the development of [$^2\text{H}_6$]**MB327** MS Binding Assays, our research group identified two putative **MB327** binding sites using in silico docking studies at the nAChR of *Torpedo marmorata* at 4 Å resolution.^[23] Respective sites are located inside the channel: one in the extracellular and one in the transmembrane domain. The developed MS Binding Assays have allowed the collection of quantitative binding data for the nAChR for the first time. These data are an essential prerequisite for a detailed understanding of the binding interactions at the molecular level and for the development of valid structure–affinity relationships representing a key element in the search for new antidotes against OPC intoxication. Hence, we envisaged the synthesis and affinity characterization of a novel series of structurally different **MB327** analogues, which were expected to be of interest to gain initial insight into structure–affinity relationships. Herein we report the results of this endeavor.

Results and Discussion

Structure of target compounds

With **MB327** as lead structure, we focused on the investigation of symmetrical bispyridinium compounds with distinct structural modifications. The results of how these structural changes affect affinity for the **MB327** binding site should provide information on the molecular interactions important for the binding event. **MB327** is a symmetric bispyridinium diiodide with a *tert*-butyl group at the 4-position of each pyridinium ring and a propyl linker connecting both aromatic rings (Figure 1).

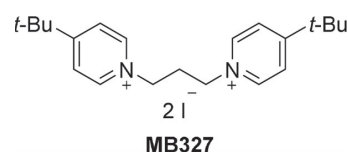


Figure 1. Structure of **MB327**.

Depending on the structural characteristics, the influence of which on the binding affinity should be studied, target compounds were divided into four different types (I–IV), comprising in total 30 structurally related compounds (Figure 2). Compounds of types I and II are bispyridinium salts substituted with either one lipophilic (Me, *i*Pr, *t*Bu) or one hydrophilic (OMe, NMe₂, *N*-methylpyrrolidine) substituent on each pyridinium ring. These moieties were introduced to investigate the influence of the substituent position at the ring system, the steric demand of the functional groups as well as hydrogen bridge interactions between polar moieties and the binding pocket on the binding affinity. Bispyridinium salts of type III were directly delineated from the lead structure **MB327** by introduction of an additional substituent and designed to investigate the resulting affinity. These compounds exhibit a 4-*tert*-butyl group as well as a second functional group (e.g., Ph, CN, OMe, COOEt, Cl) at the 2- or 3-position of the pyridinium ring.

As a consequence, from these compounds, substituent effects can be directly derived by comparing the binding affinity with that of **MB327**, which is devoid of any substituent at the 2- or 3-position. To investigate the importance of π – π interactions with aromatic amino acid side chains of the nAChR during the binding event and to expand the structural diversity amongst the test compounds, pyridine was finally replaced by other heteroaromatic compounds such as isoquinoline, thiazole, or 2-*tert*-butylpyrazine, thus resulting in new target structures of type IV.

Common to all newly synthesized compounds, however, is the propane-1,3-diyl (C3) linker, known from **MB327**. This linker was used for all test compounds, as **MB327** showed a significantly higher re-sensitization potency in SURF²R-based electrophysiological experiments than structurally analogous compounds with shorter (ethane-1,2-diyl (C2)) or longer (butane-1,4-diyl (C4)) linkers.^[11]

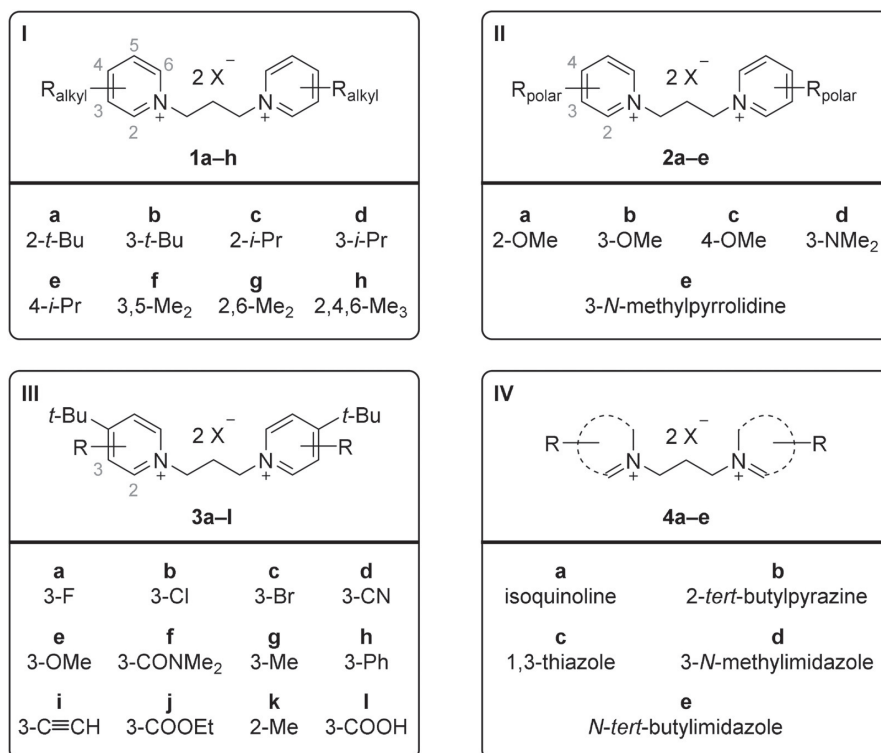


Figure 2. Structures of envisaged target compounds (type I-IV). X = Cl⁻, I⁻, OTf⁻.

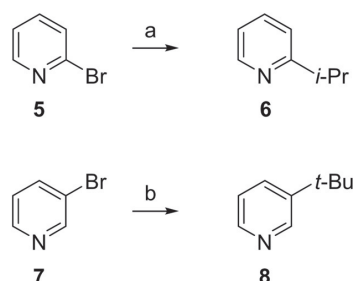
Chemistry

As shown in Figure 2, all target compounds are symmetric bispyridinium salts or related from *N*-aromatic-subunit-derived salts with a propane-1,3-diyl linker. As such, these compounds are easily accessible in a two-step reaction sequence. In the first step, the required nitrogen heterocycles are synthesized, which, in the second step, afford the target compounds upon *N*-alkylation. Of the 30 nitrogen heterocycles used in the synthesis of the target compounds, 25 were either commercially available or synthesized according to published procedures,^[27–29] including the 3-substituted 4-*tert*-butylpyridine derivatives, the preparation of which was recently reported by us.^[30] The remaining five pyridine derivatives, namely 4-(*tert*-butyl)-2-methylpyridine (**15**), 3-*tert*-butylpyridine (**8**), 2- (**6**), 3- (**11**), and 4-isopropylpyridine (**13**) were prepared as described below.

Preparation of alkyl-substituted pyridine derivatives

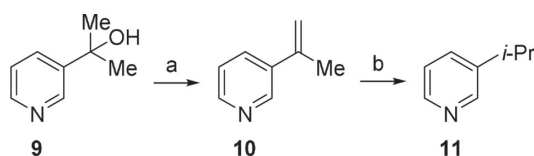
2-Isopropylpyridine (**6**) as well as 3-*tert*-butylpyridine (**8**) were prepared from the corresponding bromopyridines **5** and **7** by cuprate-mediated substitution reactions resulting in low to moderate yields of 19 and 43%, respectively, for the target compounds (Scheme 1).^[27] The low yields can be assigned to side reactions that led to pyridine as a byproduct, which, in each of the two cases, was isolated in large amounts. These

side reactions might result from a halogen metal exchange caused by the intermediate isopropyl cuprate and by a β-H elimination of the putative (tBu)₂Cu(III)pyridyl complex.^[31] Interestingly, THF turned out to be far less favorable for substitution with the *tert*-butyl cuprate, affording **8** in only 12% yield (43% in Et₂O). This is likely due to the more reactive cuprate oligomers, present in Et₂O, as compared with the less reactive monomers, predominant in THF, which is a specific feature of cyano cuprates observed by Krause, Gschwind, and co-workers.^[32] Besides, yields were also negatively affected by the remarkably high volatility of compounds **6** and **8**.



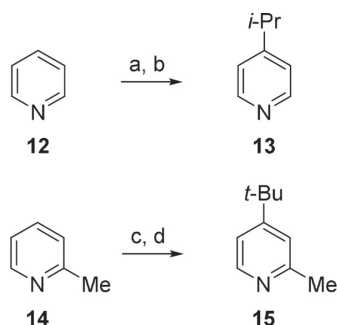
Scheme 1. Synthesis of alkyl pyridines **6** and **8**: a) CuCN (4.0 equiv), *i*PrMgCl (8.0 equiv), –78 °C for 2 h → RT for 15 h, THF, 19%; b) CuCN (4.0 equiv), *t*BuMgCl (8.0 equiv), –78 °C for 2 h → RT for 15 h, Et₂O, 43% (12% yield in THF).

As 3-isopropylpyridine (**11**) was found to be inaccessible by cuprate-mediated substitution of **7**, it was synthesized in two steps from tertiary alcohol **9**.^[33] Acid-catalyzed dehydration of **9** and subsequent hydrogenation of the resulting alkene **10** with Pd/C and H₂ afforded **11** in 51% yield (Scheme 2).^[34]



Scheme 2. Synthesis of **11**: a) conc. AcOH/conc. H₂SO₄ (1:2.7), 150 °C, 30 min; b) Pd/C (5 mol%), H₂, MeOH, 16 h, 51% over both steps.

The synthesis of 4-isopropylpyridine (**13**) and 4-(*tert*-butyl)-2-methylpyridine (**15**) was accomplished in a two-step reaction starting from **12** and **14**, respectively (Scheme 3). Treatment of **12** with AcCl and of **14** with PhOCOCI followed by addition of the respective organocuprates to the thus formed *N*-acyliminium intermediates provided, after oxidation, compounds **13** and **15** in 33 and 47% yield, respectively.

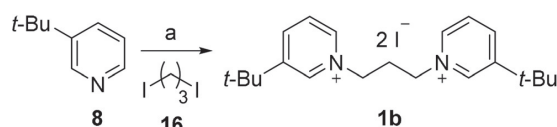


Scheme 3. Synthesis of **13** and **15**: a) AcCl (1.0 equiv), THF, -78 °C, 75 min, then (iPr)₂CuCN(MgCl)₂ (1.1 equiv), 80 min; b) DDQ (1.0 equiv), CH₂Cl₂, RT, 70 min, 33% over both steps; c) PhOCOCI (1.0 equiv), tBuZnBr (1.1 equiv), CuCN (1.1 equiv), LiCl (2.2 equiv), -78 °C for 5 h → RT for 16 h, THF; d) S₈ (1.1 equiv), naphthalene (15 equiv), 200 °C, 20 min, microwave: 300 W, 47% over both steps.

Preparation of the target compounds

As mentioned above, the synthesis of symmetric bis(pyridinium) salts with a propane-1,3-diyl linker (Figure 2) is commonly accomplished by reaction of 1,3-diiodo- or 1,3-dibromopropane with an excess of the respective pyridine derivatives in DMF or MeCN at 70 °C.^[35–37] However, when these reaction conditions were used for the synthesis of compounds of type I and II, in most cases, only a negligible conversion but substantive decomposition of reactants occurred. This is mainly attributed to the low reactivity of the alkyl halides, especially when sterically hindered 2-substituted pyridine derivatives were used (**6**, **17**, **19**, **20**). Besides, in case of *N*-alkylated **22** and **24**, demethylation reactions by iodide ions also occurred. Notably, even

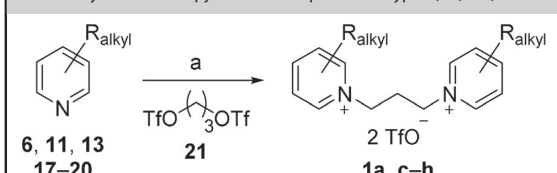
for the reaction of 1,3-diiodopropane (**16**) with 2.5 equivalents of the pyridine derivative **8**, devoid of any substituents at the 2- and 6-positions and of any electron-withdrawing groups, required 72 h at 70 °C in DMF for full conversion, affording **1b** in 79% yield (Scheme 4).



Scheme 4. Synthesis of **1b**: 1,3-diiodopropane (**16**, 1.0 equiv), **8** (2.5 equiv), DMF, 70 °C, 72 h, 79%.

Hence, 1,3-diiodopropane (Scheme 4) did not seem suitable for an efficient preparation of the desired target compounds. This problem could, however, be overcome using the far more reactive propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (**21**). With bistriflate **21**, compounds of type I–III (**1a**, **c–h**, Table 1;

Table 1. Synthesis of bispyridinium compounds of type I (**1a**, **c–h**).

						
Entry	Starting material R _{alkyl}	No.	T [°C]	t [min]	Product	Yield [%]
1	2- <i>t</i> Bu	17	85	300	1a	73
2	2- <i>i</i> Pr	6	50	5	1c	77
3	3- <i>i</i> Pr	11	50	2	1d	88
4	4- <i>i</i> Pr	13	50	60	1e	81
5	3,5-Me ₂	18	50	1	1f	69
6	2,6-Me ₂	19	70	1	1g	75
7	2,4,6-Me ₃	20	50	15	1h	81

Reagents and conditions: a) pyridine derivatives (2.5 equiv), **21** (1.0 equiv), no solvent, T, t.

2a–e, Table 2; **3a–l**, Table 3) were easily accessible in fair to excellent yields (47–99%) by alkylation of the corresponding heterocycles. Reactions were performed either at 50 °C in CH₂Cl₂ or, if necessary, at higher temperatures without a solvent. Resulting bis(trifluoromethanesulfonate) salts were finally purified by crystallization without any problems.

In contrast to the above-mentioned alkylation reaction with 1,3-diiodopropane (**16**), the high reactivity of bistriflate **21** allowed short reaction times (1–30 min in most cases) and also gave access to bispyridinium compounds with sterically demanding substituents at the 2-position such as **1a**, **1c**, **1g**, **1h** (Table 1), and **3k** (Table 3).

Despite the high reactivity of bistriflate **21**, a variety of functional groups, that is, alkylarylethers (**2a–c**, **3e**), nitrile (**3d**), halide (**3a–c**), terminal alkyne (**3i**), ester (**3j**), amide (**3f**), and even secondary (**2d**) and tertiary amino substituents (**2e**) were

Table 2. Synthesis of bispyridinium compounds of type II (2a–e).

Entry	Starting material R _{polar}	No.	t [min]	Product	Yield [%]
1	2-OMe	22	1	2a	67
2	3-OMe	23	1	2b	83
3	4-OMe	24	1	2c	84
4	3-NMe ₂	25	10	2d	47
5	3-N-methylpyrrolidine	rac-26	30	2e	72

Reagents and conditions: a) pyridine derivatives (2.5 equiv), **21** (1.0 equiv), 50 °C, t; entry 1–4: no solvent; entry 5: reaction in CH₂Cl₂.

Table 3. Synthesis of bispyridinium compounds of type III (3a–l).

Entry	Starting material R	No.	t [min]	Product	Yield [%]
1	3-F	27 ^[b]	4	3a	85
2	3-Cl	28	30	3b	81
3	3-Br	29	30	3c	99
4	3-CN	30	40	3d	85
5	3-OMe	31	5	3e	83
6	3-CONMe ₂	32	30	3f	77
7	3-Me	33	20	3g	89
8	3-Ph	34	30	3h	99
9	3-C≡CH	35	40	3i	91
10	3-COOEt	36	30	3j	98
11	2-Me	15	30	3k	82
12 ^[a]	3-COOEt	3j	16 h	3l	66

Reagents and conditions: a) pyridine derivatives (2.5 equiv), **21** (1.0 equiv), CH₂Cl₂, 50 °C, t. [a] Compound **3l** was synthesized from **3j** (1.0 equiv) in 66% yield by basic hydrolysis using aqueous NaOH (0.1 M, 2.5 equiv) in H₂O/MeCN (5:1) at RT for 16 h. [b] 4-(tert-butyl)-3-fluoropyridine was released in situ from the corresponding hydrochloride **27**.

well tolerated. Also, the carboxylic acid **3l** (Table 3, entry 12) could be synthesized by basic hydrolysis of the ester function of **3j** with aqueous NaOH. To this end, however, milder conditions had to be used (hydroxide ion concentration of only 0.055 M), to minimize a Zincke–König type cleavage, thus affording **3l** in 66% yield after crystallization.

Although biological evaluation of synthesized bispyridinium salts **1a–h** (Table 1), **2a–e** (Table 2), and **3a–l** (Table 3) using our MS Binding Assays yielded reliable results, the triflate counterion was assumed to cause interference in electrophysiological measurements on the SURFE²R platform.^[38] Thus, we

decided to synthesize compounds of type IV with iodide instead of triflate counterions.

Therefore, compounds **4a–e** were synthesized by reaction of the respective *N*-heteroaromatics **37–41** with 1,3-diiodopropane (**16**) in MeCN under microwave heating at 90–120 °C. The yields were good to excellent (78–92%, Table 4). Under microwave conditions, higher reaction temperatures could be reached, resulting in distinctly reduced reaction times. Moreover, side reactions appeared to be absent this time.

Table 4. Synthesis of non-bispyridinium compounds of type IV (4a–e).

Entry	Starting material N _{het.}	No.	T [°C]	t [h]	Product	Yield [%]
1		37	90	3	4a	86
2		38	120	16	4b	78
3		39	120	16	4c	87
4		40	90	1	4d	92
5		41	90	1	4e	82

Reagents and conditions: a) N_{het.} (2.5 equiv), **16** (1.0 equiv), MeCN, T, t, microwave: 150 W.

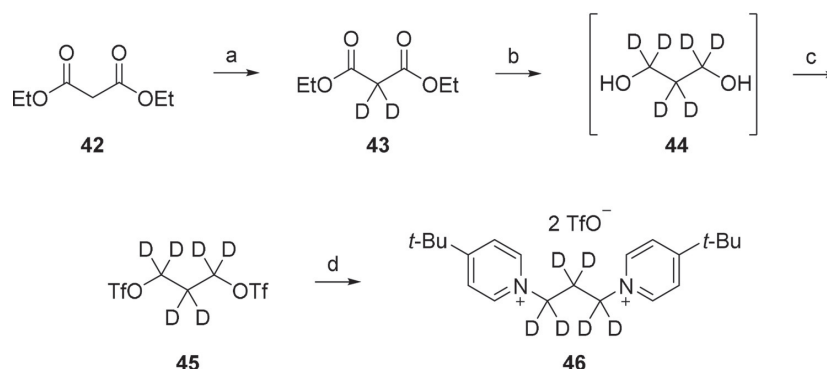
The solubility of compounds of type I–IV in water proved to be sufficient for biological testing and allowed the preparation of solutions with concentrations of at least 2.5 mM. Interestingly, a faster dissolution in water was observed for triflate salts of type I–III relative to iodide salts of type IV.

To evaluate the stability of synthesized target compounds in water, NMR measurements of a random selection of compounds (**1b**, **2a**, **2c**, **3d**, and **3l**) after 12 h incubation in D₂O at room temperature were performed and provided no indications for hydrolysis.

Preparation of deuterated MB327 analogues for MS Binding Assays

For the recently established MS Binding Assays targeting the MB327 binding site at *T. californica* nAChR, deuterated MB327 analogues [²H₆]MB327 (**46**) and [²H₁₀]MB327 (**49**) were required as MS marker and internal standard, respectively. Their synthesis was accomplished as follows.

The deuterium-labeled compound **46** was synthesized in four steps starting from malonic ester **42** in an overall yield of



Scheme 5. Synthesis of $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (**46**): a) pyridine (6.0 equiv), D_2O (12 equiv), RT, 20 h, 40%, < 99.6% D; b) LiAlD_4 (3.0 equiv), Et_2O , 50°C , 5.5 h; c) Tf_2O (2.0 equiv), pyridine (2.0 equiv), CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C}\rightarrow\text{RT}$, 3 h, 58% over both steps; d) 4-*tert*-butylpyridine (2.5 equiv), CH_2Cl_2 , 50°C , 30 min, 77%, 99% D.

18% and a deuteration degree of $\geq 99\%$ (Scheme 5). At first, **42** was treated with D_2O and pyridine according to Cocker et al., affording the D_2 derivative **43** in 40% yield.^[39] Reduction with LiAlD_4 in Et_2O and subsequent treatment of crude $[\text{D}_6]$ propanediol **44** with Tf_2O provided the corresponding bis-triflate **45** in 58% yield over both steps. Reaction of **45** with 2.5 equivalents 4-*tert*-butylpyridine finally afforded **46** in a yield of 77%.

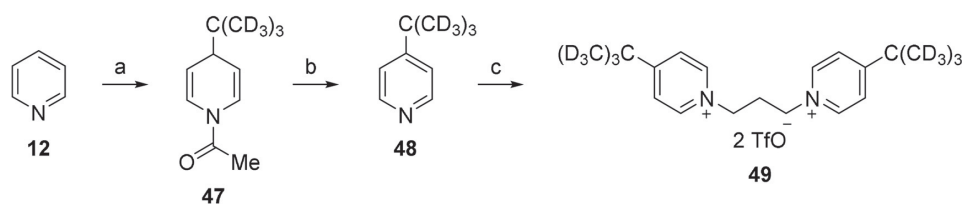
The synthesis of $[^2\text{H}_{18}]\text{MB327}$ (**49**) started from pyridine (**12**) and was performed in three steps, the total yield amounting to 25% and the deuteration degree to $\geq 99\%$ (Scheme 6). In the first step, pyridine (**12**) was treated with AcCl to generate the corresponding *N*-acetylpyridinium ion in situ, which upon trapping with $(t\text{Bu})_2\text{CuCN}(\text{MgCl})_2$, afforded **47** with good regioselectivity (79:21 for C4 isomer). Oxidation of 1,4-dihydropyridine **47** with DDQ led to D_3 -labeled pyridine **48** in 31% yield, which upon reaction of triflate **21** with 2.5 equivalents, provided **49** in 81% yield.

Biological evaluation

All target compounds synthesized in the context of this study were catalogued with a certain PTM number (Pharmacy and Toxicology Munich). Binding affinities toward the **MB327** binding site at *T. californica* nAChR were determined in MS Binding Assays using $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (**46**) as marker (Table 5).^[24]

With these MS Binding Assays, developed recently in our research group, it was possible to characterize the binding of **MB327** at the nAChR ($\text{p}K_i = 4.75 \pm 0.07$ for **MB327** in auto-com-

petition experiments with $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (**46**) as marker). According to the corresponding experimental protocol, aliquots of nAChR-enriched membranes, prepared from *T. californica* electroplaque tissue and frozen in storage buffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 8.05 mM Na_2HPO_4 , and 1.95 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) were thawed, directly diluted with incubation buffer, and incubated in the presence of the marker (and test compounds if required). Both buffers—storage and incubation buffer—are almost identical in this assay, except that the latter also contains 1 mM CaCl_2 . With the aim to simplify the developed MS Binding Assays, we examined the possibility of using only one buffer for the whole procedure, that is, for the storage of *Torpedo* membrane preparations as well as for incubation in the binding experiments described herein. Because the storage buffer, differing from the incubation buffer by the lack of CaCl_2 , was also identical to the incubation buffer that had been used in $[^3\text{H}]\text{epibatidine}$ binding studies,^[18,38] which were conducted recently for characterization of bispyridinium compounds at the orthosteric binding site of the *T. californica* nAChR, it appeared obvious to choose this buffer for incubation in $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ MS Binding Assays as well. Hence, saturation and auto-competition experiments were conducted exactly as described previously,^[24] but also using the storage buffer for incubation of binding samples. Under these marginally modified conditions, we found a K_d value of $14.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$ and a B_{max} value of $263 \pm 30 \text{ pmol} [\text{mg protein}]^{-1}$ ($n=3$) in saturation experiments using $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (**46**) as marker and a $\text{p}K_i$ of 4.73 ± 0.03 ($K_i = 18.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$, $n=3$) for auto-competition experiments using $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (**46**) as marker and native **MB327**



Scheme 6. Synthesis of $[^2\text{H}_{18}]\text{MB327}$ (**49**): a) AcCl (1.0 equiv), THF, -78°C , 60 min, then $[\text{D}_3]\text{tBuMgCl}$ (2.2 equiv), CuCN (1.1 equiv), THF, -78°C , 1.5 h; b) DDQ (1.0 equiv), CH_2Cl_2 , RT, 1 h, 31% over both steps; c) **21** (0.4 equiv), 50°C , 2.5 h, 81%, 99% D.

Table 5. Structures of synthesized target substances and binding affinities to the MB327 binding site.

Entry	Compound	R _{alkyl} /R _{polar} /R/N _{het.}	pK _i ^[a]	PTM code
1	MB327	4- <i>t</i> Bu	4.73 ± 0.03	
2	1a	2- <i>t</i> Bu	4.43 ± 0.12	0002
3	1b	3- <i>t</i> Bu	4.44 ± 0.10	0001
4	1c	2- <i>i</i> Pr	3.83 ± 0.11*	0003
5	1d	3- <i>i</i> Pr	4.18 ± 0.11	0014
6	1e	4- <i>i</i> Pr	4.27 ± 0.11	0013
7	1f	3,5-Me ₂	3.76 ± 0.14*	0005
8	1g	2,6-Me ₂	3.80 ± 0.04*	0004
9	1h	2,4,6-Me ₃	4.30 ± 0.09	0006
10	2a	2-OMe	3.87 ± 0.13*	0010
11	2b	3-OMe	3.79 ± 0.09*	0009
12	2c	4-OMe	3.97 ± 0.04*	0008
13	2d	3-NMe ₂	4.78 ± 0.05	0007
14	2e	3- <i>N</i> -methylpyrrolidine	3.63 ± 0.13*	0027
15	3a	3-F	4.23 ± 0.05*	0021
16	3b	3-Cl	4.54 ± 0.09	0020
17	3c	3-Br	4.62 ± 0.08	0018
18	3d	3-CN	4.00 ± 0.12*	0019
19	3e	3-OMe	4.46 ± 0.07	0016
20	3f	3-CONMe ₂	4.43 ± 0.10	0024
21	3g	3-Me	4.57 ± 0.08	0017
22	3h	3-Ph	5.16 ± 0.07*	0022
23	3i	3-C≡CH	4.80 ± 0.08	0025
24	3j	3-COOEt	4.50 ± 0.04	0015
25	3k	2-Me	4.31 ± 0.09	0023
26	3l	3-COOH	2.74 ± 0.13*	0028
27	4a	isoquinoline	4.77 ± 0.06	0032
28	4b	2- <i>tert</i> -butylpyrazine	3.56 ± 0.09*	0057
29	4c	1,3-thiazole	4.07 ± 0.13	0033
30	4d	<i>N</i> -methylimidazole	3.55 ± 0.11*	0034
31	4e	<i>N</i> - <i>tert</i> -butylimidazole	4.34 ± 0.13	0059

[a] Data are the mean ± SEM of three independent experiments. Statistically significant pK_i values relative to the binding affinity of MB327 are indicated by an asterisk (verified by two-sided *t*-test, using a 5% significance level).

as competitor (see the Supporting Information for further details). As there was no significant difference (verified by two-sided *t*-test) between the affinity constants, obtained in experiments with CaCl₂ as opposed to experiments without CaCl₂ in the incubation buffer,^[24] we decided to use the CaCl₂-free storage buffer also as incubation buffer in all binding experiments.

Although this marginal modification of the sample matrix was not expected to affect the quantification of the MS marker, we still decided to again examine the parameters of selectivity, linearity, lower limit of quantification (LLOQ), accuracy, as well as precision of the LC-ESI-MS/MS quantification

method according to the FDA's guidance on bioanalytical method validation.^[40] In short, all requirements of the Center for Drug Evaluation and Research (CDER) guideline of the FDA regarding the above-mentioned parameters were fulfilled (see the Supporting Information for further details), clearly demonstrating the LC-ESI-MS/MS quantification to be robust and reliable also under these binding conditions. This modified protocol for [²H₆]MB327 MS Binding Assays (see the Experimental Section below) was finally used for all further determinations of binding affinities of target compounds.

Initially, the influence of the position of the *tert*-butyl substituent on the binding affinity was investigated by comparing the pK_i value of 2-*tert*-butyl- and 3-*tert*-butyl-substituted compounds **1a** (PTM0002) and **1b** (PTM0001) (type I) with that of 4-*tert*-butyl-substituted **MB327** (Table 5, entries 1–3). Interestingly, the difference between both 2- and 3-regioisomers was negligible, but binding affinity decreased if the *tert*-butyl group was moved from the 4- to the 3- or 2-position. Moreover, reduction of the steric demand of the lipophilic substituent by replacing the *tert*-butyl group in **MB327**, **1a** (PTM0002) and **1b** (PTM0001) with an isopropyl group (**1c–e**, PTM0003, PTM0013, PTM0014, entries 4–6) led to a distinct decrease in binding affinity, except for the 3-substituted compounds, where the difference was less pronounced. A decrease in binding affinity was also observed for the lutidine- (**1f**, **1g**, PTM0005 and PTM0004, entries 7 and 8) and collidine-derived bispyridinium salts (**1h**, PTM0006, entry 9), especially if the 4-position remained unsubstituted (**1f**, PTM0005: 3,5-Me₂, $pK_i = 3.76 \pm 0.14$; **1g**, PTM0004: 2,6-Me₂, $pK_i = 3.80 \pm 0.04$; **1h**, PTM0006: 2,4,6-Me₃, $pK_i = 4.30 \pm 0.09$ relative to **MB327**: $pK_i = 4.73 \pm 0.03$; see Table 5 entries 1 and 7–9).

Comparing the affinities of the bispyridinium salts substituted with lipophilic (type I, Table 5, entries 1–9) with those substituted with polar residues of type II (Table 5, entries 10–14), it becomes clear that replacement of the alkyl substituents with an *N*-methylpyrrolidine moiety at the 3-position (**2e**, PTM0027) or a polar methoxy group (**2a–c**, PTM0008–PTM0010) in the 2-, 3-, or 4-positions has a negative influence on binding affinity. The determined pK_i values range from 3.87 ± 0.13 to 3.97 ± 0.04 and are thus at least about half a log unit lower than those found for the *tert*-butyl-substituted compounds **1a** (PTM0002), **1b** (PTM0001) and **MB327** ($pK_i = 4.43 \pm 0.12$ to 4.73 ± 0.03 , Table 5, entries 1–3). In contrast, the 3-dimethylamino-substituted bispyridinium salt **2d** (PTM0007) showed a higher pK_i value (4.78 ± 0.05 , Table 5, entry 13) than the 3-*tert*-butyl-substituted compound **1b** (PTM0001, $pK_i = 4.44 \pm 0.10$, Table 5, entry 3). In conclusion, the NMe₂ group is suggested as potential substitute for the *tert*-butyl substituent.

The binding affinities of type III compounds exhibiting a F, Cl, Br, CN, OMe, CONMe₂, Me, C≡CH, or COOEt substituent at the 3-position (Table 5, entries 15–21 and 23–25) in addition to the 4-*tert* butyl group in **MB327** varied from 4.00 ± 0.12 in case of 3-CN derivative **3d** (PTM0019, Table 5, entry 18) to 4.80 ± 0.08 for 3-alkyne-substituted **3i** (PTM0025, Table 5, entry 23) without a clear tendency when regarding the nature of the substituent.

However, the results indicate that the 4-*tert*-butyl group in the bispyridinium salts has a beneficial effect on binding affinity. This becomes evident by comparing the pK_i value of 4-*tert*-butyl-substituted **MB327** ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$, Table 5, entry 1) with those of 3-methoxy substituted **2b** (PTM0009, $pK_i = 3.79 \pm 0.09$, Table 5, entry 11) and 4-*tert*-butyl-3-methoxy derivative **3e** (PTM0016, $pK_i = 4.46 \pm 0.07$). Apparently, the addition of a *tert*-butyl group at the 4-position increased the binding affinity of the 3-methoxy derivative **2b** (PTM0009) by 0.67 log units from 3.79 ± 0.09 to 4.46 ± 0.07 for **3e** (PTM0016, compare Table 5, entries 11 and 19).

In accordance with the negative effect of polar substituents on binding affinity as discussed above, zwitterionic carboxylic acid **3l** (PTM0028) exhibited the lowest binding affinity of all tested compounds, with a pK_i value of 2.74 ± 0.13 (Table 5, entry 26). The highest binding affinity, on the other hand, was displayed by the lipophilic 3-phenyl-substituted **MB327** analogue **3h** (PTM0022), with a pK_i value of 5.16 ± 0.07 (Table 5, entry 22), which is about half a log unit higher than the pK_i value of **MB327** (Table 5, entry 1) and two and a half orders of magnitude above that found for carboxylic acid **3l** (PTM0028, Table 5, entry 26). The statistical significance of the higher affinity found for the phenyl-substituted derivative **3h** (PTM0022) relative to **MB327** was also verified by two-sided *t*-test (5% significance level). The two additional aromatic phenylpyridinium rings present in **3h** (PTM0022) are likely to be involved in lipophilic interactions with the target, giving rise to increased affinity.

According to the pK_i values found for the non-bispyridinium compounds of type IV (**4a–e**, PTM0032–PTM0034, PTM0057, PTM0059, entries 27–31) none of the heterocyclic systems studied revealed a significantly higher binding affinity than **MB327**. Interestingly, electron-poor 2-*tert*-butylpyrazinium salt **4b** (PTM0057, $pK_i = 3.56 \pm 0.09$, Table 5, entry 28) showed a clearly lower pK_i value than the structurally related but far less electron-deficient 3-*tert*-butylpyridinium salt **1b** (PTM0001, $pK_i = 4.44 \pm 0.10$, Table 5, entry 3). Binding affinity of bisimidazolium salts decreased significantly upon transition from *N*-*tert*-butyl-substituted **4e** (PTM0059, $pK_i = 4.34 \pm 0.13$, Table 5, entry 31) to *N*-methyl-substituted **4d** (PTM0034, $pK_i = 3.55 \pm 0.11$, Table 5, entry 30). This indicates a general beneficial effect of the *tert*-butyl group over smaller groups that had similarly been observed for the bispyridinium salts (compare, for example, **MB327** with **1e** (PTM0013), Table 5, entries 1 and 6). Although being unsubstituted and hence smaller than the *N*-methylimidazole derivative **4d** (PTM0034, Table 5, entry 30), the 1,3-thiazole-derived compound **4c** (PTM0033) still had a reasonable affinity ($pK_i 4.07 \pm 0.13$, Table 5, entry 29).

Interestingly, bis(isoquinolinium) salt **4a** (PTM0032, $pK_i = 4.77 \pm 0.06$), which is able to undergo more extensive lipophilic interactions, was found to have the highest binding affinity of all non-bispyridinium compounds, being in the same range as the binding affinity of **MB327**. Altogether, the substitution of bispyridinium compounds by the addition of polar but uncharged functional groups generally led to a slight decrease in binding affinity, whereas the addition of a carboxylic acid function decreased binding affinity dramatically (**3l**, PTM0028, Table 5, entry 26). The sole exception is the 3-dimethylamino-substituted bispyridinium compound **2d** (PTM0007, Table 5, entry 13), which shows a slightly increased binding affinity relative to **MB327** (Table 5, entry 1).

Notably, more lipophilic 3-phenyl-4-*tert*-butyl-substituted bispyridinium salt **3h** (PTM0022, $pK_i = 5.16 \pm 0.07$, Table 5, entry 22) revealed the highest binding affinity of all bispyridinium salts tested so far, representing important progress in the development of new nAChR re-sensitizers with improved potency, although its pharmacological effects remain to be determined. Very recently, Wein et al. described the putative binding

site as being composed of two subdomains, one of which is lined with more hydrophilic and the other with more lipophilic residues.^[23] Accordingly, the design of non-symmetric compounds displaying two different polar termini, one with higher and the other with lower polarity, could be a promising strategy for increasing binding affinity.

Conclusions

In summary, a set of 30 symmetric bispyridinium and related salts with a propane-1,3-diyl linker were synthesized and characterized for their binding affinity for the **MB327** binding site at the *T. californica* nAChR. Binding affinities were determined using our recently developed MS Binding Assays and discussed regarding **MB327**'s binding affinity, the most potent nAChR re-sensitizer so far, as reference. To the best of our knowledge, this is the first study to provide quantitative binding data for the **MB327** binding site, which, in turn, should be useful for further developments in the structure- and ligand-based design of nAChR re-sensitizers.

All target compounds were synthesized via N-alkylation of the respective aromatic *N*-heterocycles using either propane-1,3-ditriflate or propane-1,3-diiodide as alkylating agents. Optimized reaction conditions allowed very rapid and clean reactions in the presence of a wide variety of functional groups. Being also well suited for the alkylation of less reactive nitrogen heterocycles, such as sterically hindered 2-*tert*-butylpyridine or electron-deficient 2-*tert*-butylpyrazine, makes both methods highly valuable for organic synthesis.

Regarding structure-affinity relationships, the influence of various lipophilic and hydrophilic functional groups as well as of different heterocycles on the binding affinity of the bisquaternary salts was investigated. Notably, molecular structures allowing additional lipophilic interactions were found to play a vital role in the binding event. In line with this observation, lipophilic 3-phenyl-4-*tert*-butyl-substituted bispyridinium compound **3h** (PTM0022) was found to possess a significantly improved binding affinity relative to **MB327**.

Furthermore, differences in binding affinities were found between polar (OMe, NMe₂, COOEt, etc.) and apolar (C≡CH, Me, *i*Pr, etc.) substituted compounds, generally revealing higher binding affinities for the less polar derivatives. Interestingly, NMe₂ was identified to be the only notable exception, revealing better results than most apolar substituted compounds. As a consequence, the role of hydrogen bridge acceptors on the binding affinity is worthy of more detailed investigation.

Finally, there is compelling evidence that anionic functional groups have a distinct negative influence on the binding process, as the addition of two carboxylic acid functions to the structure of **MB327** resulted in a severe decrease in binding affinity (**3i**, PTM0028). To gain deeper insight into the interaction of bisquaternary salts with the **MB327** binding site at the nAChR, further studies based on structurally more diverse non-symmetric bispyridinium compounds are underway.

Experimental Section

Chemistry

Anhydrous reactions were carried out in vacuum-dried glassware under argon atmosphere. Microwave reactions were performed in sealed glass vials using a CEM Discover SP microwave synthesizer. THF, 1,4-dioxane and CH₂Cl₂ were distilled prior to use under nitrogen atmosphere and dried according to standard procedures.^[41] Et₂O (technical grade) was purified by distillation and dried by holding at reflux for 6 h over sodium without benzophenone under nitrogen atmosphere before being distilled once again prior to use. All other chemicals were used as purchased from commercial sources and solvents were distilled before use. TLC was carried out using plates purchased from Merck (silica gel 60F₂₅₄ on aluminum sheet). Flash chromatography (FC) was performed using Merck silica gel 60 (40–63 μm mesh size) as stationary phase. Melting points were determined with a BÜCHI 510 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectroscopy was performed using an FT-IR Spectrometer 1600 and Paragon 1000 (PerkinElmer); oils were measured as film and solid samples as KBr pellets. High-resolution (HR) mass spectrometry was performed on a Finnigan MAT 95 (EI), Finnigan LTQ FT (ESI) and Jeol JMS 700 MStation (FAB). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker BioSpin Avance III HD 400 and 500 MHz (equipped with a Prodigy™ cryoprobe) using TMS as internal standard and integrated with MestReNova (Version 10.0.2), Mestrelab Research S.L. 2015. The purity of the test compounds was determined by means of quantitative NMR using Sigma Aldrich TraceCERT® maleic acid or dimethylsulfone as internal calibrants.^[42,43] The purity of all tested compounds was >95%. See the Supporting Information for the characterization data of the described compounds.

The following compounds were prepared according to published methods: propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (**21**),^[44,45] 2-*tert*-butylpyridine (**17**),^[27] 2-(pyridin-3-yl)propan-2-ol (**9**),^[33] *rac*-nicotine (*rac*-**26**),^[28] 1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazole (**41**)^[29] and the 4-*tert*-butyl-substituted pyridine derivatives 4-(*tert*-butyl)-3-methylpyridine (**33**), 4-(*tert*-butyl)-3-methoxypyridine (**31**), 4-(*tert*-butyl)-3-chloropyridine (**28**), 3-bromo-4-(*tert*-butyl)pyridine (**29**), 4-(*tert*-butyl)pyridine-3-carbonitrile (**30**), ethyl 4-(*tert*-butyl)pyridine-3-carboxylate (**36**), 4-(*tert*-butyl)-3-fluoropyridin-1-ium chloride (**27**), 4-(*tert*-butyl)-3-phenylpyridine (**34**), 4-(*tert*-butyl)-*N,N*-dimethylpyridine-3-carboxamide (**32**), and 4-(*tert*-butyl)-3-ethynylpyridine (**35**).^[30]

General procedures

Synthesis of symmetric bispyridinium compounds by N-alkylation with 21 (GP1): **21** (1.0 equiv) was carefully added to a solution of the corresponding pyridine derivative (2.5 equiv) in CH₂Cl₂ (0.8 mL mmol⁻¹) or to the neat pyridine derivative (2.5 equiv) at room temperature. The resulting mixture was stirred at 50 °C for the indicated period and residual CH₂Cl₂ was removed in vacuo if necessary. The residue was finally recrystallized from the given solvent.

Synthesis of symmetric bispyridinium compounds by N-alkylation with 16 (GP2): **16** (1.0 equiv) was added to a solution of the corresponding aromatic nitrogen heterocycle (2.5 equiv) in MeCN (0.8 mL mmol⁻¹) and the resulting mixture was heated at 90 °C (150 W) in a sealed microwave reactor for the indicated period. The solvent was removed in vacuo and the residue was recrystallized from the given solvent.

Synthesis of 2- and 3-alkylpyridines by cuprate-mediated substitution reactions of 2- and 3-bromopyridines (GP3): The corresponding bromopyridine derivative (1.0 equiv) was added dropwise to a suspension of the respective dialkylcuprate (4.0 equiv, prepared according to GP4) in THF or Et₂O at –78 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h at –78 °C before being allowed to stir for additional 15 h at room temperature. The mixture was cooled to 0 °C and the reaction was quenched by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 8 mL mmol⁻¹). The mixture was filtrated over Celite® and the residue was alternately washed with Et₂O (3 × 5 mL mmol⁻¹) and saturated aqueous NaCl (2 × 5 mL mmol⁻¹). The layers were separated, and the organic phase was washed with saturated aqueous NaCl solution (10 mL mmol⁻¹). The combined aqueous layers were extracted with Et₂O (3 × 10 mL mmol⁻¹) and the combined organic layers were dried over MgSO₄. The solvent was carefully removed under reduced pressure (40 °C bath temperature, 450 mbar) and the resulting crude product was purified in a first step by FC and subsequently by a vacuum distillation (5 × 10⁻² mbar at 200 °C). The pure alkylpyridine was obtained as a colorless liquid.

Preparation of (iPr)₂CuCN(MgCl)₂, (tBu)₂CuCN(MgCl)₂, and (D₃tBu)₂CuCN(MgCl)₂ (GP4): The corresponding Grignard reagent (solution in Et₂O or THF, 2.0 equiv) was added to a suspension of CuCN (1.0 equiv) in Et₂O or THF (2.0–4.5 mL mmol⁻¹) at –78 °C and the resulting mixture was stirred for 45 min at –78 °C, for 5 min at room temperature and again for 10 min at –78 °C.

Preparation of tBuCu(CN)ZnBr·2LiCl: tBuZnBr (0.5 M solution in THF, 11.0 mmol, 22.0 mL, 1.0 equiv) was added to a solution of CuCN (995 mg, 11.0 mmol, 1.0 equiv) and LiCl (933 mg, 22.0 mmol, 2.0 equiv) in THF (50 mL) at –10 °C and the resulting 0.15 M cuprate suspension was stirred for 10 min at 0 and –78 °C each.

Synthesized compounds

Pyridine derivatives: 3-*tert*-Butylpyridine (**8**, colorless liquid, 43%), 3-isopropylpyridine (**11**, colorless and highly volatile liquid, 51%), 2-isopropylpyridine (**6**, colorless liquid, 20%), 4-isopropylpyridine (**13**, clear and highly volatile liquid, 33%), 4-(*tert*-butyl)-2-methylpyridine (**15**, colorless liquid, 47%).

Compounds of type I (1a–h): 1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[2-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**1a**, colorless solid, 73%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[3-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (**1b**, yellow crystals, 79%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1c**, colorless solid, 77%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(3-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1d**, colorless solid, 88%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(4-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1e**, colorless solid, 81%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(3,5-dimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1f**, colorless solid, 69%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,6-dimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1g**, colorless solid, 75%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4,6-trimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**1h**, colorless solid, 81%).

Compounds of type II (2a–e): 1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(2-methoxy-pyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**2a**, colorless solid, 67%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(3-methoxypyridin-1-ium) bis(trifluoro-methanesulfonate) (**2b**, colorless solid, 83%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (**2c**, colorless solid, 84%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[3-(dimethylamino)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**2d**, yellowish solid, 47%), *rac*-(1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[3-(1-methylpyrrolidin-2-

yl)pyridin-1-ium]) bis(trifluoromethane-sulfonate) (**2e**, yellowish solid, 72%).

Compounds of type III (3a–l): 1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-fluoropyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3a**, colorless solid, 85%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-chloropyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3b**, colorless solid, 81%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[3-bromo-4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3c**, colorless solid, 99%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-cyanopyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3d**, slightly beige solid, 85%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-methoxypyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3e**, colorless solid, 83%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-(dimethylcarbamoyl)-pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3f**, colorless solid, 77%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-methylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3g**, colorless solid, 89%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-phenylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3h**, colorless solid, 99%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-ethynylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3i**, colorless solid, 91%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoro-methanesulfonate) (**3j**, colorless solid, 98%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-2-methylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (**3k**, colorless solid, 82%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-[4-(*tert*-butyl)-3-carboxypyridin-1-ium-1-yl]propyl]pyridin-1-ium-3-carboxylate trifluoromethanesulfonate (**3l**, colorless solid, 66%).

Compounds of type IV (4a–e): 2,2'-(Propane-1,3-diyl)bis(isoquinolin-2-ium) diiodide (**4a**, yellow solid, 86%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[3-(*tert*-butyl)pyrazin-1-ium] diiodide (**4b**, yellow powder, 78%), 3,3'-(propane-1,3-diyl)bis(thiazol-3-ium) diiodide (**4c**, beige solid, 87%), 3,3'-(propane-1,3-diyl)bis(1-methyl-1*H*-imidazol-3-ium) diiodide (**4d**, colorless solid, 92%), 3,3'-(propane-1,3-diyl)bis[1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-3-ium] diiodide (**4e**, colorless solid, 82%).

Deuterated compounds: 4-(2-[²H₃]Methyl[1,1,1,3,3,3-²H₆]propan-2-yl)pyridine (**48**, colorless liquid, 31%), 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(2-[²H₃]methyl[1,1,1,3,3,3-²H₆]propan-2-yl)pyridin-1-ium] bis(trifluoro-methanesulfonate) (**49**, colorless solid, 81%), diethyl [²H₆]malonate (**43**, colorless liquid, 40%), [²H₆]propane-1,3-diol (**44**) and [²H₆]propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (**45**, grayish and turbid oil, 58%), 1,1'-(²H₆)propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethane-sulfonate) (**46**, colorless solid, 77%).

Biological evaluation

General procedure for [²H₆]MB327 MS Binding Assays: Membranes from frozen *Torpedo californica* electroplaque tissue were prepared as previously reported and stored in storage buffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 8.05 mM Na₂HPO₄, 1.95 mM NaH₂PO₄, pH 7.4).^[24] Total protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin as standard.^[46] All binding experiments were performed as described previously,^[24] but in absence of CaCl₂ during incubation. For saturation and competition experiments, aliquots of the membrane preparation (60–120 µg protein per sample) were incubated with [²H₆]MB327 (**46**) as marker (saturation: 2–160 µM, competition: 10 µM) in triplicates in storage buffer in a total volume of 125 µL for 2 h at 25 °C. In competition experiments the concentrations of the competitors ranged from 100 nM to 1 mM. After incubation, binding samples were processed exactly as previously described.^[22] In saturation experiments, the maximum density of binding sites (B_{max}) and the equilibrium dissociation constant (K_d) were deter-

mined from saturation isotherms calculated for specific binding using the “one-site—specific binding” regression tool (Prism ver. 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Competition curves were analyzed with the “one-site-fit K_i ” regression tool fixing top and bottom level of the sigmoidal competition curves to total binding (in absence of competitor, $n=3$) and nonspecific binding (determined by heat denaturation, $n=3$). For statistical comparisons, data were examined by means of a t -test (two-sided, $\alpha=0.05$). If not stated otherwise, results are given as means \pm SEM.

Validation of the LC-ESI-MS/MS quantification method: In accordance with the FDA’s guidance for bioanalytical method validation selectivity, lower limit of quantification (LLOQ), linearity, precision, and accuracy were investigated exactly in the same way as described for marker quantification in binding samples resulting from incubation in presence of 1 mM CaCl_2 .^[24]

Supporting Information

Synthetic procedures and analytical characterization of all compounds as well as details of the improved MS Binding Assay protocol and validation data can be found in the Supporting Information.

Acknowledgements

This study was funded by the German Ministry of Defense (E/U2AD/CF514/DF561).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: bispyridinium · drug design · MS Binding Assays · nitrogen heterocycles · re-sensitizers

- [1] D. Gunnell, M. Eddleston, M. R. Phillips, F. Konradsen, *BMC Public Health* **2007**, *7*, 357–372.
- [2] E. Dolgin, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1194–1195.
- [3] J. Newmark, *Neurologist* **2007**, *13*, 20–32.
- [4] R. D. Sheridan, A. P. Smith, S. R. Turner, J. E. H. Tattersall, *J. R. Soc. Med.* **2005**, *98*, 114–115.
- [5] R. Giniatullin, A. Nistri, J. L. Yakel, *Trends Neurosci.* **2005**, *28*, 371–378.
- [6] R. L. Papke, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 1–11.
- [7] H. Thiermann, T. Seeger, S. Gonder, N. Herkert, B. Antkowiak, T. Zilker, F. Eyer, F. Worek, *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *187*, 265–269.
- [8] F. Worek, N. Aurbek, M. Koller, C. Becker, P. Eyer, H. Thiermann, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1807–1817.
- [9] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237–2248.
- [10] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille, *Chem.-Biol. Interact.* **2016**, *259*, 93–98.
- [11] K. V. Niessen, S. Muschik, F. Langguth, S. Rappenglück, T. Seeger, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. Lett.* **2016**, *247*, 1–10.
- [12] D. K. Williams, J. Wang, R. L. Papke, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 915–930.
- [13] K. V. Niessen, T. Seeger, J. E. H. Tattersall, C. M. Timperley, M. Bird, C. Green, H. Thiermann, F. Worek, *Chem.-Biol. Interact.* **2013**, *206*, 545–554.
- [14] J. E. H. Tattersall, *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 1006–1015.
- [15] S. R. Turner, J. E. Chad, M. Price, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, J. E. H. Tattersall, *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 105–111.
- [16] T. Seeger, M. Eichhorn, M. Lindner, K. V. Niessen, J. E. H. Tattersall, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicology* **2012**, *294*, 80–84.
- [17] C. Scheffel, K. V. Niessen, S. Rappenglück, K. T. Wanner, H. Thiermann, F. Worek, T. Seeger, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 157–166.
- [18] K. V. Niessen, J. E. H. Tattersall, C. M. Timperley, M. Bird, C. Green, T. Seeger, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 100–104.
- [19] M. E. Price, C. J. Docx, H. Rice, S. J. Fairhall, S. J. C. Poole, M. Bird, L. Whiley, D. P. Flint, A. C. Green, C. M. Timperley, J. E. H. Tattersall, *Toxicol. Lett.* **2016**, *244*, 154–160.
- [20] K. Schoene, J. Steinhanses, H. Oldiges, *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1955–1958.
- [21] A. Ring, B. Oddvar Strom, S. R. Turner, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, J. E. Chad, F. Worek, J. E. H. Tattersall, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135811.
- [22] C. M. Timperley, M. Bird, C. Green, M. E. Price, J. E. Chad, S. R. Turner, J. E. H. Tattersall, *MedChemComm* **2012**, *3*, 352–356.
- [23] T. Wein, G. Höfner, S. Rappenglück, S. Sichler, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 184–189.
- [24] S. Sichler, G. Höfner, S. Rappenglück, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, F. F. Paintner, K. T. Wanner, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 172–183.
- [25] N. S. Millar, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 869–874.
- [26] M. Navedo, M. Nieves, L. Rojas, J. A. Lasalde-Dominicci, *Biochemistry* **2004**, *43*, 78–84.
- [27] T. W. Bell, L. Y. Hu, S. V. Patel, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3847–3850.
- [28] E. R. Bowman, H. McKennis, Jr., B. R. Martin, *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 871–879.
- [29] C. H. Leung, A. R. Chianese, B. R. Garrett, C. S. Letko, R. H. Crabtree, *Inorg. Synth.* **2010**, *35*, 84–87.
- [30] S. Rappenglück, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, *Synthesis* **2017**, *49*, 4055–4064.
- [31] N. Yoshikai, E. Nakamura, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2339–2372.
- [32] W. Henze, A. Vyater, N. Krause, R. M. Gschwind, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17335–17342.
- [33] J. Epszajn, A. Bieniek, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 213–219.
- [34] H. C. Brown, W. A. Murphey, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3308–3312.
- [35] K. Musilek, M. Komloova, V. Zavadova, O. Holas, M. Hrabanova, M. Pohanka, V. Dohnal, F. Nachon, M. Dolezal, K. Kuca, Y.-S. Jung, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *20*, 1763–1766.
- [36] K. Musilek, J. Roder, M. Komloova, O. Holas, M. Hrabanova, M. Pohanka, V. Dohnal, V. Opletalova, K. Kuca, Y.-S. Jung, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *21*, 150–154.
- [37] C. M. Timperley, M. Bird, S. C. Heard, S. Notman, R. W. Read, J. E. H. Tattersall, S. R. Turner, *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 1160–1165.
- [38] K. V. Niessen, T. Seeger, S. Rappenglück, T. Wein, G. Höfner, K. T. Wanner, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 190–197.
- [39] W. Cocker, N. W. A. Geraghty, T. B. H. McMurry, P. V. R. Shannon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 2245–2254.
- [40] *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry*, United States Food and Drug Administration (FDA), **2001**: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> (accessed August 10, 2017).
- [41] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, New York, **1988**.
- [42] M. Cushman, G. I. Georg, U. Holzgrabe, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9219.
- [43] G. F. Pauli, S.-N. Chen, C. Simmler, D. C. Lankin, T. Gödecke, B. U. Jaki, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, J. G. Napolitano, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9220–9231.
- [44] M. J. Corr, K. F. Gibson, A. R. Kennedy, J. A. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9174–9175.
- [45] E. Lindner, G. Von Au, H. J. Eberle, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 810–813.
- [46] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.

Manuscript received: May 14, 2018

Revised manuscript received: June 28, 2018

Accepted manuscript online: July 5, 2018

Version of record online: August 1, 2018



Supporting Information

Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor

Sebastian Rappenglück^{+, [a]} Sonja Sichler^{+, [a]} Georg Höfner,^[a] Thomas Wein,^[a]
Karin V. Niessen,^[b] Thomas Seeger,^[b] Franz F. Paintner,^[a] Franz Worek,^[b] Horst Thiermann,^[b]
and Klaus T. Wanner^{*[a]}

cmdc_201800325_sm_miscellaneous_information.pdf

Content

- 1 Syntheses and Analytical Data
- 2 Characterization of [²H₆]MB327's affinity towards the *Torpedo*-nAChR employing an improved MS Binding Assay protocol
- 3 Validation of the developed LC-ESI-MS/MS quantification method

1 Syntheses and Analytical Data

3-*tert*-Butylpyridine (8)

According to GP3, with **7** (319 mg, 2.00 mmol, 197 μ L, 1.0 eq.) and (*t*-Bu)₂CuCN(MgCl)₂ (4 eq.), which was prepared according to GP4 with *t*-BuMgCl (2.0 M solution in Et₂O, 16.0 mmol, 8.00 mL, 8.0 eq.) and CuCN (724 mg, 8.00 mmol, 4.0 eq.) in Et₂O (35 mL). FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 7:1) and subsequent vacuum distillation yielded pure 3-*tert*-butylpyridine (**8**, 115 mg, 43%) as a colorless liquid.

R_f =0.26 (Et₂O/*n*-pentane 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ =1.35 (s, 9 H, CH₃), 7.22 (ddd, J =8.0/4.7/0.9 Hz, 1 H, NCHCHCH), 7.68 (ddd, J =8.0/2.5/1.6 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.43 (dd, J =4.7/1.6 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.67 ppm (dd, J =2.5/0.8 Hz, 1 H, NCHC(C(CH₃)₃)); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ =30.99 (CH₃), 33.61 (C(CH₃)₃), 122.95 (NCHCHCH), 132.85 (NCHCHCH), 145.86 (CC(CH₃)₃), 146.90 (NCHCHCH), 147.45 ppm NCHC(C(CH₃)₃); IR (film): $\tilde{\nu}$ =3088, 3033, 2964, 2904, 2870, 2716, 1904, 1870, 1715, 1589, 1572, 1481, 1462, 1414, 1396, 1369, 1335, 1273, 1242, 1204, 1184, 1125, 1104, 1041, 1021, 948, 926, 841, 808, 714, 624 cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [$M+H$]⁺ calcd for C₉H₁₄N: 136.1121, found: 136.1120.

The analytical data were consistent with those previously reported.¹

3-Isopropylpyridine (11)

A solution of **9** (0.71 g, 5.2 mmol, 1.0 eq.) in conc. H₂SO₄ (2.2 mL) and conc. AcOH (3.7 mL) was heated to reflux at 150 °C for 30 min. The solution was allowed to cool to room temperature, poured into H₂O (100 mL) and adjusted to pH 9 by addition of K₂CO₃. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was carefully removed under reduced pressure (40 °C bath temperature, 400 mbar). The resulting liquid was dissolved in MeOH (10 mL), treated with Pd/C (10% Pd, 0.27 g, 0.25 mmol, 0.05 eq.) and the suspension was stirred for 16 h under H₂ atmosphere (normal pressure) at room temperature. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (40 mL), H₂O (30 mL) and saturated aqueous NaCl (30 mL) and the layers were separated. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄

[1] T. Fujii, T. Hiraga, S. Yoshifuji, M. Ohba, K. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26* (10), 3233–3237.

and the solvent was carefully removed under reduced pressure. The resulting brownish oil was purified by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 3:1) to yield **11** (323 mg, 51%) as a clear, colorless and highly volatile liquid.

*R*_f=0.18 (*n*-pentane/Et₂O 3:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=1.28 (dd, *J*=6.9/0.7 Hz, 6 H, CH₃), 2.94 (hept, *J*=6.9 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 7.19–7.24 (m, 1 H, NCHCH), 7.51–7.56 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.41–8.45 (m, 1 H, NCHCH), 8.48–8.51 ppm (m, 1 H, NCHC(CH(CH₃)₂)); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ=23.68 (CH₃), 31.78 (CH(CH₃)₂), 123.31 (NCHCH), 133.65 (NCHCHCH), 143.66 (NCHC(CH(CH₃)₂)), 147.35 (NCHCH), 148.68 ppm (NCHC(CH(CH₃)₂)); IR (film): $\tilde{\nu}$ =3027, 2962, 2927, 2872, 1575, 1478, 1423, 1385, 1365, 1310, 1192, 1145, 1126, 1102, 1064, 1036, 1023, 925, 807, 759, 715 cm⁻¹. HRMS-EI *m/z* [*M*]⁺ calcd for C₈H₁₁N: 121.0886, found: 121.0886.

2-Isopropylpyridine (6)

According to GP3, with **5** (1.39 g, 861 μL, 8.82 mmol, 1.00 eq.) and (*i*-Pr)₂CuCN(MgCl)₂ (4 eq.), which was prepared according to GP4 with *i*-PrMgCl (2.0 M solution in THF, 70.6 mmol, 35.3 mL, 8.00 eq.) and CuCN (3.19 g, 35.3 mmol, 4.00 eq.) in THF (70 mL). For reaction quenching and aqueous workup half of the volumes indicated in GP3 were used. FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 7:1) and subsequent vacuum distillation yielded pure 2-isopropylpyridine (**6**, 216 mg, 20%) as a colorless liquid.

*R*_f=0.44 (*n*-pentane/Et₂O 1:1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=1.31 (d, *J*=6.9 Hz, 6 H, C(CH₃)₂), 3.06 (sept., *J*=6.9 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 7.09 (ddd, *J*=7.5/4.9/1.1 Hz, 1 H, NCHCH), 7.17 (dt, *J*=7.9/0.8 Hz, 1 H, CHCCH(CH₃)₂), 7.60 (td, *J*=7.7/1.9 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.54 ppm (ddd, *J*=4.9/1.8/0.9 Hz, 1 H, NCHCH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=22.58 (CH₃), 36.36 (CH(CH₃)₂), 120.62 (CHCCH(CH₃)₂), 120.98 (NCHCH), 136.35 (NCHCHCH), 149.06 (NCHCH), 167.33 ppm (NCCH(CH₃)₂); IR (film): $\tilde{\nu}$ =3066, 3007, 2964, 2930, 2870, 2341, 1591, 1570, 1476, 1433, 1379, 1361, 1335, 1287, 1216, 1149, 1103, 1059, 1044, 991, 958, 923, 893, 784, 747, 668 cm⁻¹; HRMS-EI *m/z* [*M*]⁺ calcd for C₈H₁₁N: 121.0886, found: 121.0897.

The analytical data were consistent with those previously reported.^{2,3}

-
- [2] E. Pasquinet, P. Rocca, F. Marsais, A. Godard, G. Queguiner, *Tetrahedron* **1998**, *54* (30), 8771–8782.
- [3] M. R. Friedfeld, G. W. Margulieux, B. A. Schaefer, P. J. Chirik, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (38), 13178–13181.

4-Isopropylpyridine (13)

Acetylchloride (0.79 g, 10 mmol, 0.72 mL, 1.0 eq.) was added to a solution of **12** (0.79 g, 10 mmol, 0.81 mL, 1.0 eq.) in THF (18 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the resulting suspension was stirred for 1 h before $(i\text{-Pr})_2\text{CuCN}(\text{MgCl})_2$ (1.1 eq.), prepared according to GP4 with $i\text{-PrMgCl}$ (1.95 M solution in Et_2O , 22 mmol, 11 mL, 2.2 eq.) and CuCN (1.0 g, 11 mmol, 1.1 eq.) in THF (50 mL), was added via transfer cannula. The reaction was stirred for an additional 2.5 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1, 20 mL). The mixture was diluted with H_2O (20 mL) and the aqueous phase was extracted with Et_2O (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (30 mL) and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude dihydropyridine was purified by FC (Al_2O_3 -neutral, activity III, $n\text{-pentane}/\text{Et}_2\text{O} = 9:1$). The resulting colorless oil was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) and treated with DDQ (2.3 g, 10 mmol, 1.0 eq.). The reaction was stirred for 70 min at room temperature prior to being diluted with CH_2Cl_2 (30 mL). The mixture was extracted with 2 M HCl (3 x 30 mL) and the combined aqueous layers were washed with Et_2O (30 mL). The aqueous phase was neutralized by addition of K_2CO_3 and adjusted to pH 12 by adding 1 M NaOH . The aqueous mixture was extracted with Et_2O (3 x 30 mL) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was carefully removed under reduced pressure (780 mbar, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$). The residue was purified by FC (SiO_2 , $n\text{-pentane}/\text{Et}_2\text{O} = 5:1 \rightarrow 1:1$) followed by vacuum distillation ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 mbar) to obtain **13** (0.41 g, 33%) as a clear and highly volatile liquid.

$R_f=0.25$ ($n\text{-pentane}/\text{Et}_2\text{O}$ 1:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=1.26$ (d, $J=6.9$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.88 (sept., $J=6.9$ Hz, 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.11–7.16 (m, 2 H, NCHCH), 8.47–8.52 ppm (m, 2 H, NCH); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta=23.10$ ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 33.55 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 121.96 (NCHCH), 149.79 (NCH), 157.45 ppm (NCHCHC); IR (film): $\tilde{\nu}=3070, 3025, 2965, 2929, 2891, 2873, 2342, 1935, 1686, 1599, 1556, 1493, 1464, 1413, 1385, 1365, 1309, 1239, 1220, 1145, 1090, 1070, 1054, 993, 923, 893, 819, 783, 750\text{ cm}^{-1}$; HRMS-EI m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$: 121.0886, found: 121.0899.

The analytical data were consistent with those previously reported.⁴

[4] A. R. Katritzky, H. Beltrami, M. P. Sannes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, (11), 2480–2484.

4-(tert-Butyl)-2-methylpyridine (15)

Phenyl chloroformate (1.59 g, 10.0 mmol, 1.28 mL, 1.0 eq) was added to a solution of **14** (950 mg, 10.0 mmol, 1.00 mL, 1.0 eq.) in THF (18 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the resulting suspension was stirred for 1 h before *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (0.15 M suspension in THF, 11.0 mmol, 72.0 mL, 1.1 eq.) was added via transfer cannula. The mixture was stirred for additional 5 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and for 16 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1, 20 mL) and extracted with Et_2O (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (100 mL) and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude dihydropyridine was purified by FC (SiO_2 , *n*-pentane/ Et_2O = 12:1). Sulfur (353 mg, 11.0 mmol, 1.1 eq.) and naphthalene (19.3 g, 150 mmol, 15 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min under microwave conditions (300 W). The reaction was allowed to cool to room temperature and the solid residue was dissolved in Et_2O (70 mL). The organic phase was washed with 1 M NaOH (2 x 40 mL) and the combined aqueous layers were extracted with Et_2O (40 mL). The combined organic layers were extracted with 2 M HCl (3 x 40 mL) and the combined acidic aqueous layers were washed with Et_2O (50 mL). The acidic aqueous phase was neutralized by addition of K_2CO_3 and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by FC (SiO_2 , *n*-pentane/ Et_2O = 2:1) to yield **15** (701 mg, 47%) as a colorless liquid.

$R_f=0.11$ (*n*-pentane/ Et_2O 2:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=1.30$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.54 (s, 3 H, CCH_3), 7.06–7.10 (m, 1 H, NCHCH), 7.12–7.15 (m, 1 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 8.39 ppm (d, $J=5.3$ Hz, 1 H, NCHCH); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta=24.61$ (CCH_3), 30.54 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.54 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 117.86 (NCHCH), 120.14 ($\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 148.94 (NCHCH), 158.08 (NCCH_3), 160.22 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (film): $\tilde{\nu}=3069, 3012, 2964, 2870, 1600, 1549, 1480, 1459, 1395, 1363, 1299, 1284, 1221, 1201, 1118, 1039, 997, 896, 879, 832, 742, 711, 613\text{ cm}^{-1}$; HRMS-EI m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}$: 149.1204, found: 149.1197.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[2-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (1a)

According to GP1, with **17** (402 mg, 2.97 mmol, 2.5 eq.) and **21** (410 mg, 1.21 mmol, 1.0 eq.) at 85 °C without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 5 h. Recrystallization from EtOH (1 mL) yielded **1a** (537 mg, 73%) as a colorless solid.

mp: 165 °C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.60 (s, 18 H, CH₃), 2.55–2.57 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.94–5.07 (m, 4 H, NCH₂), 8.07–8.15 (m, 2 H, NCHCH), 8.15–8.21 (m, 2 H, CHCC(CH₃)₃), 8.50–8.59 (m, 2 H, NCHCHCH), 9.08–9.17 ppm (m, 2 H, NCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=29.51 (C(CH₃)₃), 34.71 (NCH₂CH₂), 37.27 (C(CH₃)₃), 54.70 (NCH₂), 120.50 (q, *J*=322.3 Hz, CF₃), 125.90 (NCHCH), 126.95 (CHCC(CH₃)₃), 146.06 (NCHCHCH), 148.18 (NCH), 163.45 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3162, 3086, 3066, 3049, 2988, 2285, 1628, 1576, 1510, 1487, 1453, 1438, 1409, 1375, 1261, 1226, 1158, 1031, 1081, 1031, 935, 901, 872, 848, 838, 819, 784, 757, 706, 639, 573, 545, 517, 466 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₂H₃₂F₃N₂O₃S: 461.2080, found: 461.2076.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (1b)

16 (395 mg, 1.32 mmol, 153 μL, 1.0 eq.) was added to a solution of **8** (393 mg, 2.91 mmol, 2.2 eq.) in DMF (2.4 mL) and the resulting mixture was stirred for 72 h at 70 °C under the exclusion of light. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was recrystallized from DMF/Acetone (1:10, 11 mL) to afford **1b** (592 mg, 79%) as yellow crystals.

mp: 243 °C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.39 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.71 (quin., *J*=7.3 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.77 (t, *J*=7.1 Hz, 4 H, NCH₂), 8.13–8.20 (m, 2 H, NCHCH), 8.70–8.76 (m, 2 H, NCHCHCH), 8.94–8.98 (m, 2 H, NCHCH), 9.06 ppm (s, 2 H, NCHC(C(CH₃)₃)); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=29.91 (C(CH₃)₃), 31.85 (NCH₂CH₂), 34.51 (C(CH₃)₃), 57.54 (NCH₂), 127.54 (NCHCH), 142.03 (NCHC(C(CH₃)₃)), 142.24 (NCHCH), 143.13 (NCHCHCH), 150.93 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3429, 3142, 3063, 3036, 3019, 2985, 2961, 2866, 2009, 1968, 1933, 1794, 1628, 1508, 1479, 1462, 1449, 1400, 1374, 1365, 1353, 1325, 1282, 1248, 1222, 1195, 1180, 1148, 1064, 1043, 903, 893, 821, 750, 688 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M*-I]⁺ calcd for C₂₁H₃₂I₂N₂: 439.1605, found: 439.1601.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(2-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1c)

According to GP1, with **6** (410 mg, 3.38 mmol, 2.5 eq.) and **21** (460 mg, 1.35 mmol, 1.0 eq.) without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 5 min. Recrystallization from EtOH (1.5 mL) afforded **1c** (604 mg, 77%) as a colorless solid.

mp: 164–165°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.39 (d, 6.9 Hz, 12 H, CH₃), 2.35–2.46 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.64 (sept., *J*=6.6 Hz, 2 H, CH(CH₃)₂), 4.74–4.84 (m, 4 H, NCH₂CH₂), 7.99–8.05 (m, 2 H, NCHCH), 8.18–8.24 (m, 2 H, CHCCH(CH₃)₂), 8.53–8.60 (m, 2 H, NCHCHCH), 8.92–8.98 ppm (m, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=21.99 (CH₃), 29.29 (CH(CH₃)₂), 32.10 (NCH₂CH₂), 53.80 (NCH₂), 120.52 (q, *J*=322.3 Hz, CF₃), 125.50 (NCHCH), 126.32 (CHCCH(CH₃)₂), 145.43 (NCHCH), 145.79 (NCHCHCH), 163.59 ppm (CCH(CH₃)₂); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3154, 3087, 2987, 2951, 2884, 2343, 2361, 1631, 1581, 1511, 1481, 1465, 1450, 1397, 1376, 1363, 1272, 1259, 1224, 1162, 1149, 1103, 1090, 1057, 1029, 943, 892, 788, 766, 755, 747, 637, 572, 517, 484, 465 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₀H₂₈F₃N₂O₃S: 433.1767, found: 433.1762.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(3-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1d)

According to GP1, with **11** (225 mg, 1.86 mmol, 2.5 eq.) and **21** (253 mg, 0.743 mmol, 1.0 eq.) without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 2 min. Precipitation from *i*-PrOH (2 mL) by addition of Et₂O (7 mL) afforded **1d** (382 mg, 88%) as a colorless solid.

mp: 123°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=1.38 (d, *J*=6.9 Hz, 12 H, CH₃), 2.92–3.01 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.21 (hept, *J*=6.5 Hz, 2 H, CH(CH₃)₂), 4.95–5.03 (m, 4 H, NCH₂), 7.90 (dd, *J*=7.9/6.2 Hz, 2 H, NCHCH), 8.24 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H, NCHCHCH), 9.23–9.30 (m, 2 H, NCHCH), 9.35 ppm (s, 2 H, NCHC(CH(CH₃)₂)); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ=22.89 (CH₃), 32.21 (CH(CH₃)₂), 34.99 (NCH₂CH₂), 57.74 (NCH₂CH₂), 120.55 (q, *J*=319.3 Hz, CF₃), 128.02 (NCHCH), 142.89 (NCHCH), 143.31 (NCHCHCH), 144.15 (NCHC(CH(CH₃)₂)), 150.98 ppm (C(CH(CH₃)₂)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3064, 2969, 2932, 2881, 1637, 1515, 1480, 1470, 1394, 1370, 1336, 1273, 1225, 1161, 1105, 1064, 1028, 824, 742, 756, 699, 692 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₀H₂₈F₃N₂O₃S: 433.1767, found: 433.1782.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(4-isopropylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1e)

According to GP1, with **13** (350 mg, 2.89 mmol, 2.5 eq.) and **21** (393 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 1 h. Precipitation from *i*-PrOH (2 mL) by addition of Et₂O (7 mL) afforded **1e** (549 mg, 81%) as a colorless solid.

mp: 86–87°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=1.35 (d, *J*=6.9 Hz, 12 H, CH₃), 2.84–2.94 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.17 (sept., *J*=6.8 Hz, 2 H, CH(CH₃)₂), 4.88–4.97 (m, 4 H, NCH₂), 7.80 (d, *J*=6.7 Hz, 4 H, NCHCH), 9.24 ppm (d, *J*=6.8 Hz, 4 H, NCH); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ=22.40 (CH₃), 34.39 (NCH₂CH₂), 34.64 (CH(CH₃)₂), 56.99 (NCH₂), 120.55 (q, *J*=319.9 Hz, CF₃), 126.52 (NCHCH), 144.88 (NCH), 169.28 ppm (NCHCHC); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3132, 3078, 2981, 2940, 2880, 2296, 1960, 1644, 1572, 1516, 1473, 1390, 1371, 1341, 1264, 1223, 1184, 1165, 1081, 1056, 1031, 974, 892, 853, 824, 756, 637, 594, 573, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*]⁻ calcd for C₂₁H₂₈F₆N₂O₆S₂: 582.1293, found: 582.1290.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(3,5-dimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1f)

According to GP1, with **18** (1.30 g, 12.0 mmol, 1.38 mL, 2.5 eq.) and **21** (1.63 g, 4.80 mmol, 1.0 eq.) without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 1 min. Recrystallization from EtOH (2 mL) afforded **1f** (1.83 g, 69%) as a colorless solid.

mp: 110°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=2.46 (s, 12 H, CH₃), 2.64 (quin., *J*=6.9 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.59 (t, *J*=6.9 Hz, 4 H, NCH₂), 8.34 (s, 2 H, (CH₃)CCHC(CH₃)), 8.77 ppm (s, 4 H, NCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=17.61 (CH₃), 31.03 (NCH₂CH₂), 57.30 (NCH₂), 120.51 (q, *J*=322.3 Hz, CF₃), 137.91 ((CH₃)C), 141.56 (NCH), 146.41 ppm (CH₃)CCHC(CH₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3061, 2957, 2360, 2341, 1637, 1611, 1509, 1484, 1468, 1445, 1387, 1309, 1277, 1251, 1224, 1196, 1163, 1144, 1068, 1028, 953, 936, 878, 756, 697, 637, 573, 518 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₁₈H₂₄F₃N₂O₃S: 405.1454, found: 405.1449.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(2,6-dimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1g)

According to GP1, with **19** (137 mg, 1.26 mmol, 149 μ L, 2.5 eq.) and **21** (171 mg, 503 μ mol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent at 70 °C. Reaction time: 1 min. Recrystallization from EtOH (4 mL) afforded **1g** (210 mg, 75%) as a colorless solid.

mp: 221 °C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ =2.34–2.42 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 2.92 (s, 12 H, CH_3), 4.73–4.80 (m, 4 H, NCH_2CH_2), 7.91 (d, J =7.9 Hz, 4 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 8.35 ppm (t, J =7.9 Hz, 2 H, $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCH}$); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ =20.74 (CH_3), 24.86 (NCH_2CH_2), 48.97 (NCH_2), 120.5 (q, J =322.3 Hz, CF_3), 127.55 ($\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 144.44 ($\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCH}$), 155.70 ppm ($\text{NC}(\text{CH}_3)$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3095, 3072, 3040, 1627, 1589, 1495, 1477, 1453, 1414, 1388, 1329, 1258, 1225, 1158, 1058, 1030, 902, 802, 754, 638, 572, 517, 487 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z $[\text{M-OTf}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 405.1454, found: 405.1451.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(2,4,6-trimethylpyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (1h)

According to GP1, with **20** (1.23 g, 10.0 mmol, 1.34 mL, 3.2 eq.) and **21** (1.07 g, 3.15 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 15 min. Recrystallization from EtOH (5.5 mL) afforded **1h** (1.48 g, 81%) as a colorless solid.

mp: 146 °C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ =2.32 (quin., J =11.5 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 2.49 (s, 6 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CHC}(\text{CH}_3)$), 2.84 (s, 12 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)$), 4.61–4.72 (m, 4 H, NCH_2CH_2), 7.76 ppm (s, 4 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ =20.62 ($\text{NC}(\text{CH}_3)$), 20.81 ($\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CHC}(\text{CH}_3)$), 25.23 (NCH_2CH_2), 48.41 (NCH_2), 120.65 (q, J =322.3 Hz, CF_3), 128.04 ($\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 154.57 ($\text{NC}(\text{CH}_3)$), 157.38 ppm ($\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CHC}$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3574, 4379, 3070, 2981, 1642, 1575, 1508, 1482, 1444, 1419, 1388, 1321, 1256, 1225, 1195, 1146, 1059, 1031, 872, 804, 756, 717, 638, 573, 553, 517 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[\text{M-OTf}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 433.1767, found: 433.1770.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(2-methoxypyridin-1-ium) bis(trifluoromethane-sulfonate) (2a)

According to GP1, with **22** (918 mg, 8.25 mmol, 863 μ L, 3.8 eq) and **21** (731 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 1 min. Recrystallization from EtOH (5 mL) afforded **2a** (746 mg, 67%) as a colorless solid.

mp: 153–154°C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =2.37 (quin., J =7.3 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.25 (s, 6 H, CH_3), 4.49 (t, J =7.3 Hz, 4 H, NCH_2), 7.60–7.65 (m, 2 H, NCHCH), 7.80 (d, J =8.9 Hz, 2 H, OCCH), 8.53–8.59 (m, 2 H, OCCHCH), 8.67 ppm (dd, J =6.4/1.6 Hz, 2 H, NCH); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =28.13 (NCH_2CH_2), 51.46 (NCH_2), 60.01 (CH_3), 112.37 (OCCH), 117.29 (NCHCH), 121.13 (q, J =322.3 Hz, CF_3), 143.33 (NCH), 148.62 (OCCHCH), 160.56 ppm (NCO); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3166, 3098, 3066, 2365, 2345, 2296, 1639, 1586, 1521, 1477, 1441, 1397, 1356, 1330, 1266, 1224, 1158, 1077, 1048, 1030, 1006, 866, 824, 781, 753, 637, 604, 573, 517, 479 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 409.1040, found: 409.1036.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(3-methoxypyridin-1-ium) bis(trifluoromethane-sulfonate) (2b)

According to GP1, with **23** (791 mg, 7.03 mmol, 730 μ L, 2.6 eq.) and **21** (929 mg, 2.73 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 1 min. Recrystallization from EtOH (2 mL) afforded **2b** (1.27 g, 83%) as a colorless solid.

mp: 101°C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =2.66 (quin., J =6.7 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.02 (s, 6 H, CH_3), 4.65 (t, J =6.9 Hz, 4 H, NCH_2), 8.13 (dd, J =8.8/5.9 Hz, 2 H, NCHCH), 8.29 (dd, J =8.8/2.4 Hz, 2 H, OCCHCH), 8.68 (d, J =5.9 Hz, 2 H, NCHCH), 8.88–8.92 ppm (m, 1 H, NCHCOCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =31.29 (NCH_2CH_2), 57.23 (CH_3), 57.67 (NCH_2), 120.50 (q, J =322.5 Hz, CF_3), 128.42 (NCHCH), 130.33 (OCCHCH), 132.82 (NCHCO), 137.08 (NCHCH), 157.94 ppm (OCCH); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3087, 2993, 2965, 2857, 1638, 1627, 1589, 1508, 1480, 1465, 1451, 1341, 1296, 1267, 1226, 1188, 1165, 1096, 1043, 1031, 1013, 919, 907, 800, 766, 754, 687, 682, 642, 636, 573, 517 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 409.1040, found: 409.1036.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium) bis(trifluoromethanesulfonate) (2c)

According to GP1, with **24** (791 mg, 6.25 mmol, 654 μ L, 2.5 eq) and **21** (851 mg, 2.50 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 1 min. Recrystallization from EtOH (5 mL) afforded **2c** (1.17 g, 84%) as a colorless solid.

mp: 153°C; ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ =2.52–2.71 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.01–4.14 (m, 6 H, CH_3), 4.46–4.59 (m, 2 H, NCH_2), 7.40–7.49 (m, 4 H, NCHCH), 8.52–8.60 ppm (m, 4 H, NCH); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ =30.83 (NCH_2CH_2), 55.75 (NCH_2), 57.35 (CH_3), 113.37 (NCHCH), 119.19 (q, J =317.2 Hz, CF_3), 144.97 (NCH), 171.28 ppm (OCCH); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3150, 3070, 3017, 2968, 2373, 2313, 1647, 1575, 1529, 1493, 1464, 1445, 1376, 1328, 1317, 1280, 1254, 1226, 1215, 1193, 1158, 1067, 1030, 1005, 851, 788, 757, 741, 661, 637, 573, 518 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 409.1040, found: 409.1036.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(dimethylamino)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (2d)

According to GP1, with **25** (1.16 g, 9.53 mmol, 2.5 eq.) and **21** (1.29 g, 3.80 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 10 min. Recrystallization from EtOH (2 mL) afforded **2d** (1.04 g, 47%) as a yellowish solid.

mp: 155°C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.66 (quin., J =7.2 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 3.08 (s, 12 H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.60 (t, J =7.1 Hz, 4 H, NCH_2), 7.79 (dd, J =8.9/2.4 Hz, 2 H, NCHCHCH), 7.84 (dd, J =9.0/5.6 Hz, 2 H, NCHCH), 8.20 (d, J =5.6 Hz, 1 H, NCHCH), 8.27–8.29 ppm (m, 2 H, $\text{NCHCN}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =31.48 (NCH_2CH_2), 57.99 (NCH_2), 120.62 (q, J =322.9 Hz, CF_3), 125.53 (NCHCHCH), 127.41 (2 C, NCHCH , $\text{NCHCN}(\text{CH}_3)_2$), 130.31 (NCHCH), 148.17 ppm ($\text{NCHCN}(\text{CH}_3)_2$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3094, 2929, 2839, 1624, 1587, 1529, 1448, 1389, 1349, 1265, 1225, 1204, 1159, 1068, 1028, 864, 802, 756, 741, 683, 636, 573, 517 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 435.1672, found: 435.1668.

***rac*-{1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin-1-ium]} bis-(trifluoromethanesulfonate) (2e)**

According to GP1, with ***rac*-26** (324 mg, 2.00 mmol, 0.318 mL, 2.5 eq.) and **21** (272 mg, 800 μ mol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1.6 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc/hexanes (1 mL, 1:1) afforded **2e** (380 mg, 72%) as a slightly yellowish solid.

mp: 120°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ =1.60–1.70 (m, 2 H, NCHCHH), 1.83–2.01 (m, 4 H, CH₃NCH₂CH₂), 2.22 (s, 6 H, NCH₃), 2.34–2.51 (m, 4 H, NCHCHH, CH₃NCHH), 2.92–3.02 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂N), 3.27 (ddd, J =9.5/7.6/2.4 Hz, 2 H, CH₃NCHH), 3.52 (t, J =8.1 Hz, 2 H, NCHCH₂), 4.92–5.03 (m, 4 H, NCH₂CH₂CH₂N), 7.93 (dd, J =8.0/6.1 Hz, 2 H, NCHCH), 8.47–8.53 (m, 2 H, NCHCHCH), 9.24–9.30 (m, 2 H, NCHCH), 9.31 ppm (s, 2 H, NCHCCHNCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ =23.25 (CH₃NCH₂CH₂), 34.78 (NCH₂CH₂CH₂N), 35.77 (NCHCH₂), 40.32 (NCH₃), 56.73 (CH₃NCH₂), 57.74 (NCH₂CH₂CH₂N), 66.79 (NCHCH₂), 120.57 (q, J =319.5 Hz, CF₃), 128.24 (NCHCH), 143.69 (NCHCCHNCH₃), 144.06 (NCHCHCH), 144.53 (NCHCH), 147.88 ppm (NCHCCHNCH₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3061, 2959, 2881, 2848, 2792, 1636, 1505, 1483, 1468, 1318, 1276, 1258, 1225, 1156, 1090, 1048, 1029, 820, 755, 693, 638, 572, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [$M+H$]⁺ calcd for C₂₅H₃₅F₆N₄O₆S₂: 665.1897, found: 665.1920.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-fluoropyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3a)

27 (440 mg, 2.32 mmol, 2.5 eq.) was dissolved in H₂O (10 mL) and the solution was neutralized by the addition of K₂CO₃. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), dried over MgSO₄ and the solvent was carefully removed under reduced pressure (40 °C, 600 mbar). The resulting clear liquid was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL) and treated according to GP1 with **21** (316 mg, 0.928 mmol, 1.0 eq.). Reaction time: 4 min. Recrystallization from EtOAc/MeOH (7.7 mL, 11:1) afforded **3a** (512 mg, 85%) as a colorless solid.

mp: 206–207°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ =1.40–1.47 (m, 18 H, C(CH₃)₃), 2.65 (quin. J =7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.65 (t, J =7.1 Hz, 4 H, NCH₂CH₂), 8.19 (dd, J =8.0/6.6 Hz, 2 H, NCHCH), 8.91 (dd, J =6.5/1.4 Hz, 2 H, NCHCH), 9.35 ppm (dd, J =6.6/1.2 Hz, 2 H, NCHCF); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ =28.15 (d, J =2.8 Hz, C(CH₃)₃), 30.70 (NCH₂CH₂), 35.60 (d, J =3.0 Hz, C(CH₃)₃), 56.90 (NCH₂CH₂), 120.50

(q, $J=322.3$ Hz, CF_3), 126.59 (d, $J=5.8$ Hz, NCHCH), 134.80 (d, $J=42.5$ Hz, NCHCF), 141.60 (d, $J=3.5$ Hz, NCHCH), 155.50 (d, $J=9.4$ Hz, $\text{CC}(\text{CH}_3)_3$), 158.56 ppm (d, $J=254.0$ Hz, CF); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3060, 2973, 2881, 1651, 1513, 1486, 1462, 1371, 1285, 1260, 1225, 1167, 1100, 1031, 988, 953, 920, 847, 832, 802, 756, 728, 617, 638, 617$ cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 497.1892, found: 497.1917.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-chloropyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3b)

According to GP1, with **28** (272 mg, 1.60 mmol, 2.5 eq.) and **21** (218 mg, 0.641 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (1.3 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc (4.5 mL) afforded **3b** (353 mg, 81%) as a colorless solid.

mp: 178°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta=1.54$ (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.88–2.98 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.94–5.02 (m, 4 H, NCH_2), 7.97 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.22 (dd, $J=6.6/1.5$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.35 ppm (d, $J=1.5$ Hz, 2 H, NCHCCI); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta=28.00$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.06 (NCH_2CH_2), 38.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.02 (NCH_2CH_2), 120.45 (q, $J=319.4$ Hz, CF_3), 126.71 (NCHCH), 135.79 (NCHCCI), 143.04 (NCHCH), 145.47 (NCHCCI), 167.42 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3121, 3045, 2974, 2881, 1638, 1496, 1453, 1368, 1282, 1224, 1197, 1163, 1084, 1030, 924, 895, 847, 790, 755, 705, 637$ cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 529.1301, found: 529.1331.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-bromo-4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3c)

According to GP1, with **29** (281 mg, 1.31 mmol, 2.5 eq.) and **21** (179 mg, 0.525 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (1 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOH/Et₂O/*n*-pentane (1:1:2.5, 9 mL) afforded **3c** (402 mg, 99%) as a colorless solid.

mp: 169–170°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta=1.57$ (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.88–2.97 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.93–4.99 (m, 4 H, NCH_2), 7.97 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.28 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.50 ppm (s, 2 H, NCHCBr); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta=28.06$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.26 (NCH_2CH_2), 38.81 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 56.77 (NCH_2CH_2), 120.47 (q, $J=319.4$ Hz, CF_3), 123.41 (NCHCBr), 126.69 (NCHCH), 143.28 (NCHCH), 148.16 (NCHCBr), 168.90 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3120, 3040, 2978, 1635, 1559, 1541, 1489, 1455, 1368, 1279, 1257, 1224, 1196, 1160, 1133, 1079, 1030, 935, 907,$

846, 785, 755 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 617.0290, found: 617.0294.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(tert-butyl)-3-cyanopyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3d)

According to GP1, with **30** (705 mg, 4.40 mmol, 2.5 eq.) and **21** (599 mg, 1.76 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (3.5 mL). Reaction time: 40 min. Recrystallization from EtOAc (4 mL) afforded **3d** (991 mg, 85%) as a slightly beige solid.

mp: 172°C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =1.55 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.67 (quin., $J=7.1$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.68 (t, $J=7.1$ Hz, 4 H, NCH_2), 8.36 (d, $J=6.7$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.22 (dd $J=6.8/1.5$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.74 ppm (d, $J=1.3$ Hz, 2 H, NCHCCN); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =28.33 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.41 (NCH_2CH_2), 37.08 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.02 (NCH_2CH_2), 110.77 (NCHCCN), 114.84 (CN), 120.49 (q, $J=322.3$ Hz, CF_3), 126.12 (NCHCH), 147.73 (NCHCH), 150.61 (NCHCCN), 170.63 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3150, 3115, 3058, 2987, 2970, 2942, 1642, 1557, 1499, 1483, 1463, 1373, 1285, 1251, 1226, 1166, 1098, 1030, 1006, 939, 856, 830, 806, 759, 638 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z [$M\text{-OTf}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 511.1985, found: 511.1968.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(tert-butyl)-3-methoxypyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3e)

According to GP1, with **31** (254 mg, 1.54 mmol, 2.5 eq.) and **21** (210 mg, 0.617 mmol, 1.0 eq.) without CH_2Cl_2 as solvent. Reaction time: 5 min. The residue was dissolved in *i*-PrOH (1 mL) and precipitated by the addition of $\text{Et}_2\text{O}/n$ -pentane (2:3, 15 mL) to afford **3e** (342 mg, 83%) as a colorless solid.

mp: 104°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ =1.41 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.92–3.00 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.14 (s, 6H, OCH_3), 4.88–4.93 (m, 4 H, NCH_2), 7.73 (d, $J=6.3$ Hz, 2 H, NCHCH), 8.94–8.97 (m, 2 H, NCHCH), 9.01–9.04 ppm (m, 2 H, NCHCOCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ =28.08 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.92 (NCH_2CH_2), 36.74 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.11 (NCH_2CH_2), 57.88 (OCH_3), 119.27 (q, $J=319.2$ Hz, CF_3), 125.17 (NCHCH), 128.10 (NCHCOCH_3), 137.88 (NCHCH), 157.99 (NCHCOCH_3)*, 158.07 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$)*; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3566, 3493, 3063, 2970, 1635, 1570, 1559, 1513, 1477, 1454, 1366, 1345, 1325, 1316, 1285, 1257, 1225, 1199, 1165, 1097, 1043, 1034, 1028,

891, 845, 798, 757 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M\text{-OTf}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 521.2292, found: 521.2281.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-(dimethylcarbamoyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3f)

According to GP1, with **32** (299 mg, 1.45 mmol, 2.5 eq.) and **21** (197 mg, 0.580 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (1.2 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc (12 mL) afforded **3f** (335 mg, 77%) as a colorless solid.

mp: 199–201°C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =1.40 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.62 (quin., $J=7.1$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 2.87 (m, 6 H, NCH_3), 3.05 (d, $J=1.6$ Hz, 6 H, NCH_3), 4.56–4.68 (m, 4 H, NCH_2CH_2), 8.33 (dd, $J=6.6/2.0$ Hz, 2 H, NCHCH), 8.95–9.01 ppm (m, 4 H, NCHCH , NCHCCO); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =29.96 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.60 (NCH_2CH_2), 34.97 (NCH_3), 38.22 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.32 (NCH_3), 57.32 (NCH_2NCH_2), 121.13 (q, $J=322.4$ Hz, CF_3), 128.02 (NCHCH), 135.17 (NCHCCO), 143.05 (NCHCCO), 144.61 (NCHCH), 165.74 (CO), 166.30 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3047, 2972, 1646, 1559, 1495, 1457, 1403, 1369, 1261, 1225, 1158, 1117, 1087, 1060, 1031, 962, 852, 756, 660, 639, 574, 557, 518 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M\text{-OTf}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$: 603.2823, found: 603.2843.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-methylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3g)

According to GP1, with **33** (279 mg, 1.87 mmol, 2.5 eq.) and **21** (254 mg, 0.748 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (1 mL). Reaction time: 20 min. Recrystallization from EtOAc/hexanes (1.1:1, 3.8 mL) afforded **3g** (425 mg, 89%) as a colorless solid.

mp: 90°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ =1.47 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.73 (s, 6 H, CHCCH_3), 2.85–2.92 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.82–4.87 (m, 4 H, NCH_2), 7.85 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H, NCHCH), 9.05–9.09 ppm (m, 4 H, NCH); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ =20.26 (CHCCH_3), 29.25 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.60 (NCH_2CH_2), 37.69 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 56.44 (NCH_2CH_2), 120.57 (q, $J=319.4$ Hz, CF_3), 125.44 (NCHCH), 138.78 ($\text{CHC}(\text{CH}_3)$), 141.91 (NCH)*, 145.94 (NCH)*, 168.72 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3066, 2972, 1644, 1508, 1479, 1387, 1368, 1282, 1256, 1224, 1155, 1099, 1028, 969, 935, 850, 805, 755 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M\text{-OTf}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 489.2393, found: 489.2399.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-phenylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3h)

According to GP1, with **34** (444 mg, 2.10 mmol, 2.5 eq.) and **21** (286 mg, 0.84 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1.7 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc/Et₂O (1:5, 12 mL) afforded **3h** (620 mg, 99 %) as a colorless solid.

mp: 178–179°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.25 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.86–2.95 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.82–4.90 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 7.29–7.34 (m, 4 H, NCHCCCH), 7.45–7.55 (m, 6 H, NCHCCCHCH, NCHCCCHCHCH), 8.06 (d, *J*=6.8 Hz, 2 H, NCHCH), 8.74 (d, *J*=1.7 Hz, 2 H, NCHCCCH), 9.15 ppm (dd, *J*=6.8/1.8 Hz, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=31.38 (C(CH₃)₃), 34.22 (NCH₂CH₂), 38.98 (C(CH₃)₃), 57.07 (NCH₂CH₂), 120.98 (q, *J*=320.1 Hz, CF₃), 127.14 (NCHCH), 128.67 (NCHCCCHCH), 129.77 (NCHCCCHCHCH), 130.18 (NCHCCCH), 136.09 (NCHCCCH), 142.95 (NCHCH), 143.24 (NCHCCCH), 146.27 (NCHCCCH), 169.28 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3057, 2972, 2876, 1636, 1507, 1488, 1473, 1445, 1368, 1257, 1224, 1156, 1102, 1030, 851, 765, 755, 707, 638, 572, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₄₄H₄₀F₃N₂O₃S: 613.2706, found: 613.2718.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-ethynylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3i)

According to GP1, with **35** (259 mg, 1.63 mmol, 2.5 eq.) and **21** (225 mg, 0.661 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1.3 mL). Reaction time: 40 min. Recrystallization from EtOAc/hexanes (2.3:1, 4 mL) afforded **3i** (392 mg, 91%) as a colorless solid.

mp: 161°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.56 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.86–2.96 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.95 (s, 2 H, CCH), 4.88–5.00 (m, 4 H, NCH₂CH₂), 7.92 (d, *J*=6.6 Hz, 2 H, NCHCH), 9.23 (dd, *J*=6.6/1.4 Hz, 2 H, NCHCH), 9.34 ppm (d, *J*=1.3 Hz, 2 H, NCHCCCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=28.39 (C(CH₃)₃), 34.25 (NCH₂CH₂), 37.87 (C(CH₃)₃), 56.92 (NCH₂NCH₂), 92.75 (NCHCCCH), 120.52 (q, *J*=319.5 Hz, CF₃), 123.35 (NCHCCCH), 125.56 (NCHCH), 143.77 (NCHCH), 149.42 (NCHCCCH), 171.65 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3308, 3234, 3062, 2969, 2108, 1637, 1497, 1460, 1368, 1294, 1262, 1225, 1160, 1098, 1034, 1028, 936, 842, 757, 638, 573, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₆H₃₂F₃N₂O₃S: 509.2080, found: 509.2105.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3j)

According to GP1, with **36** (477 mg, 2.30 mmol, 2.5 eq.) and **21** (313 mg, 0.920 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1.8 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc (1.5 mL) afforded **3j** (677 mg, 98%) as a colorless solid.

mp: 157°C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=1.45 (t, *J*=7.2 Hz, 6 H, CH₂CH₃), 1.48 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.88–2.97 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.49 (q, *J*=7.2 Hz, 4 H, CH₂CH₃), 4.92–5.00 (m, 4 H, NCH₂CH₂), 8.02 (d, *J*=6.7 Hz, 2 H, NCHCH), 9.36 (dd, *J*=6.7/1.6 Hz, 2 H, NCHCH), 9.43 ppm (d, *J*=1.5 Hz, 2 H, NCHCCO); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ=13.64 (CH₂CH₃), 29.98 (C(CH₃)₃), 34.75 (NCH₂CH₂), 38.18 (C(CH₃)₃), 56.88 (NCH₂CH₂), 64.22 (CH₂CH₃), 120.51 (q, *J*=319.4 Hz, CF₃), 127.01 (NCHCH), 134.40 (NCHCCO), 144.84 (NCHCCO), 145.08 (NCHCH), 164.34 (CH₃CH₂OCO), 169.01 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3100, 3052, 2983, 1735, 1641, 1559, 1499, 1466, 1372, 1317, 1258, 1226, 1194, 1156, 1136, 1091, 1031, 1009, 936, 855, 782, 755, 712, 695, 638, 607, 573, 553, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₈H₄₀F₃N₂O₇S: 605.2503, found: 605.2480.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)-2-methylpyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (3k)

According to GP1, with **15** (547 mg, 3.67 mmol, 2.5 eq.) and **21** (499 mg, 1.47 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (3 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc/hexanes (2:1, 3 mL) afforded **3k** (773 mg, 82%) as a colorless solid.

mp: 115–116°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=1.38 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.59–2.69 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.02 (s, 6 H, CH₃), 4.86–4.96 (m, 4 H, NCH₂CH₂), 7.71 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H, CH₃CCH), 7.73 (dd, *J*=6.7/2.3 Hz, 1 H, NCHCH), 9.14 ppm (d, *J*=6.7 Hz, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=20.76 (CH₃), 29.86 (C(CH₃)₃), 30.65 (NCH₂CH₂), 36.38 (C(CH₃)₃), 53.41 (NCH₂CH₂), 120.54 (q, *J*=320.1 Hz, CF₃), 123.46 (NCHCH), 127.00 (CH₃CCH), 145.26 (NCHCH), 154.93 (NCCH₃), 171.24 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3062, 2974, 2879, 1641, 1567, 1517, 1469, 1373, 1259, 1224, 1156, 1108, 1030, 919, 851, 755, 637, 573, 517 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-OTf]⁺ calcd for C₂₄H₃₆F₃N₂O₃S: 489.239, found: 489.2381.

4-(tert-Butyl)-1-{3-[4-(tert-butyl)-3-carboxypyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium-3-carboxylate trifluoromethanesulfonate (3i)

Aqueous NaOH (0.1 M solution, 16.6 mL, 1.66 mmol, 2.5 eq.) was added to a solution of **3j** (500 mg, 0.662 mmol, 1.0 eq.) in H₂O/MeCN (5:1, 30 mL) and the resulting solution was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was washed with Et₂O (3 x 50 mL) and the water was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (20 mL) and the pH was adjusted to 2 by the addition of 5 % aqueous TfOH. The aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (3 x 50 mL) and the water was removed under reduced pressure. The solid residue was dissolved in EtOH/MeOH (1:1, 40 mL) and insoluble components were removed by filtration. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by crystallization from EtOH/MeOH (2.4:1, 29 mL) to yield **3i** (242 mg, 66%) as a colorless solid.

mp (decomposition): 209°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₄]MeOH): δ=1.55 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.70 (quin. *J*=7.6 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.67–4.73 (m, 4 H, NCH₂CH₂), 8.17 (d, *J*=6.7 Hz, 2 H, NCHCH), 8.80 (dd, *J*=6.7/1.7 Hz, 2 H, NCHCH), 8.89 ppm (d, *J*=1.6 Hz, 2 H, NCHCOO); ¹³C NMR (125 MHz, [D₄]MeOH): δ=30.41 (C(CH₃)₃), 33.03 (NCH₂CH₂), 39.02 (C(CH₃)₃), 58.41 (NCH₂NCH₂), 121.82 (q, *J*=318.5 Hz, CF₃), 128.33 (NCHCH), 139.98 (NCHCOO), 144.34 (NCHCH, NCHCOO), 168.13 (CC(CH₃)₃), 170.12 ppm (COO); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3111, 3055, 2977, 2478, 1709, 1638, 1556, 1499, 1476, 1374, 1252, 1224, 1201, 1164, 1093, 1070, 1030, 933, 856, 809, 785, 774, 756, 712, 680, 639, 560, 517, 500 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₂F₃N₂O₇S: 549.1877, found: 549.1907.

2,2'-(Propane-1,3-diyl)bis(isoquinolin-2-ium) diiodide (4a)

According to GP2, with **37** (680 mg, 5.00 mmol, 624 μL, 2.5 eq.) and **16** (592 mg, 2.00 mmol, 230 μL, 1.0 eq.) in MeCN (4 mL). Reaction time: 3 h. Recrystallization from MeOH (30 mL) afforded **4a** (950 mg, 86%) as a yellow solid.

mp (decomposition): 260°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ=2.88 (quin., *J*=7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.91 (t, *J*=7.2 Hz, 4 H, NCH₂CH₂), 8.08–8.13 (m, 2 H, NCHCCHCH), 8.27–8.32 (m, 2 H, NCHCHCCHCH), 8.36–8.39 (m, 2 H, NCHCHCCH), 8.47–8.52 (m, 2 H, NCHCCH), 8.63–8.67 (m, 2 H, NCHCH), 8.81–8.85 (m, 2 H, NCHCH), 10.13 ppm (s, 2 H, NCHCCH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ=31.72 (NCH₂CH₂), 58.05

(NCH₂CH₂), 126.46 (NCHCH), 127.72 (NCHCCH), 127.75 (NCHCHCCH), 130.91 (NCHCCH), 131.76 (NCHCCHCH), 135.38 (NCHCH), 137.56 (NCHCHCCHCH, NCHCHCCH), 150.89 ppm (NCHCCH); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3011, 2937, 2022, 1943, 1855, 1804, 1643, 1607, 1580, 1516, 1477, 1426, 1402, 1394, 1370, 1356, 1282, 1234, 1217, 1202, 1185, 1168, 1131, 1103, 1071, 1017, 982, 931, 880, 840, 832, 777, 759, 745, 646, 628, 532, 519, 474 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M-I*]⁺ calcd for C₂₁H₂₀N₂: 427.0666, found: 427.0670.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(*tert*-butyl)pyrazin-1-ium] diiodide (4b)

According to GP2, with **38** (460 mg, 3.28 mmol, 2.5 eq.) and **16** (388 mg, 1.31 mmol, 150 μ L, 1.0 eq.) in MeCN (2.6 mL). Reaction time: 16 h at 120 °C. Recrystallization from MeOH (60 mL), dissolution of the yellow crystals in H₂O (70 mL) and subsequent lyophilization afforded **4b** (578 mg, 78%) as a yellow powder.

mp: 273 °C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ =1.44 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.73–2.85 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.81 (t, *J*=6.8 Hz, 4 H, NCH₂), 9.08 (s, 2 H, CH₂NCHCHN), 9.26 (s, 2 H, NCHC(C(CH₃)₃)), 9.55 ppm (s, 2 H, CH₂NCHCHN); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): δ =28.86 (C(CH₃)₃), 30.56 (NCH₂CH₂), 37.68 (C(CH₃)₃), 57.99 (NCH₂), 132.69–135.01 (CH₂NCHCHN, NCHC(C(CH₃)₃)), 149.42 (CH₂NCHCHN), 170.30 ppm (NCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3109, 3009, 2965, 2869, 1619, 1552, 1484, 1457, 1367, 1296, 1253, 1190, 1160, 1134, 1020, 863, 811, 760, 744, 643, 623, 461 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M-I*]⁺ calcd for C₁₉H₃₀N₄: 441.1510, found: 441.1514.

3,3'-(Propane-1,3-diyl)bis(thiazol-3-ium) diiodide (4c)

According to GP2, with **39** (426 mg, 5.00 mmol, 355 μ L, 2.5 eq.) and **16** (592 mg, 2.00 mmol, 230 μ L, 1.0 eq.) in MeCN (4 mL). Reaction time: 16 h at 120 °C. Recrystallization from MeOH (22 mL) afforded **4c** (806 mg, 87%) as a beige solid.

mp: 218 °C; ¹H NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): δ =2.60 (quin., *J*=7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.65 (t, *J*=7.2 Hz, 4 H, NCH₂CH₂), 8.40 (dd, *J*=3.7/2.4 Hz, 2 H, CH₂NCHCH), 8.59 (dd, *J*=3.7/1.3 Hz, 2 H, CH₂NCHCH), 10.21 ppm (dd, *J*=2.3/1.4 Hz, 2 H, NCHS); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]DMSO): δ =30.33 (NCH₂CH₂), 51.87 (NCH₂CH₂), 127.59 (CH₂NCHCH), 137.47 (CH₂NCHCH), 160.32 ppm (NCHS); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3028, 2951, 1622, 1546, 1448, 1418, 1348, 1321, 1259, 1195, 1160, 1087, 1060, 970, 955, 908, 825, 742, 699,

677, 638, 620, 601, 589, 569, 556 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M-I]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{I}_2\text{N}_2\text{S}_2$: 338.9481, found: 338.9493.

3,3'-(Propane-1,3-diyl)bis(1-methyl-1*H*-imidazol-3-ium) diiodide (4d)

According to GP2, with **40** (411 mg, 5.00 mmol, 399 μL , 2.5 eq.) and **16** (592 mg, 2.00 mmol, 230 μL , 1.0 eq.) in MeCN (4 mL). Reaction time: 1 h. Recrystallization from EtOH (2 mL) afforded **4d** (845 mg, 92%) as a colorless solid.

mp: 226°C; ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ =1.65 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.62 (quin., $J=6.8$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.38 (t, $J=7.1$ Hz, 4 H, NCH_2), 7.57 (s, 2 H, CH_2NCHCHN), 7.64 (s, 2 H, CH_2NCHCHN), 9.26 ppm (s, 2 H, NCHN); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN): δ =29.91 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.08 (NCH_2CH_2), 47.53 (NCH_2), 61.35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 121.03 (CH_2NCHCHN), 123.78 (CH_2NCHCHN), 135.75 ppm (NCHN); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3133, 3075, 2969, 2874, 1617, 1552, 1457, 1408, 1376, 1312, 1295, 1239, 1208, 1136, 1118, 1098, 1049, 1001, 944, 892, 826, 787, 751, 654, 629, 616 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z $[M-I]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{I}_2\text{N}_4$: 417.1510, found: 417.1515.

3,3'-(Propane-1,3-diyl)bis[1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-3-ium] diiodide (4e)

According to GP2, with **41** (404 mg, 3.25 mmol, 2.5 eq.) and **16** (385 mg, 1.30 mmol, 150 μL , 1.0 eq.) in MeCN (2.6 mL). Reaction time: 1 h. Recrystallization from EtOH (30 mL) afforded **4e** (581 mg, 82%) as a colorless solid.

mp: 226°C; ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ =1.65 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.62 (quin., $J=6.8$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.38 (t, $J=7.1$ Hz, 4 H, NCH_2), 7.57 (s, 2 H, CH_2NCHCHN), 7.64 (s, 2 H, CH_2NCHCHN), 9.26 ppm (s, 2 H, NCHN); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN): δ =29.91 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.08 (NCH_2CH_2), 47.53 (NCH_2), 61.35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 121.03 (CH_2NCHCHN), 123.78 (CH_2NCHCHN), 135.75 ppm (NCHN); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3133, 3075, 2969, 2874, 1617, 1552, 1457, 1408, 1376, 1312, 1295, 1239, 1208, 1136, 1118, 1098, 1049, 1001, 944, 892, 826, 787, 751, 654, 629, 616 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z $[M-I]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{I}_2\text{N}_4$: 417.1510, found: 417.1515.

4-(2-[$^2\text{H}_3$]Methyl[1,1,1,3,3,3- $^2\text{H}_6$]propan-2-yl)pyridine (48)

Acetyl chloride (0.22 g, 2.8 mmol, 0.20 mL, 1.0 eq.) was added to a solution of **12** (0.22g, 2.8 mmol, 0.23 mL, 1.0 eq.) in THF (5 mL) at -78 °C and the resulting suspension was stirred for 1 h before (d_9 -*t*-Bu) $_2\text{CuCN}(\text{MgCl})_2$ (1.1 eq.), prepared

according to GP4 with d_9 -*t*-BuMgCl* (0.67 M solution in THF, 6.2 mmol, 9.2 mL, 2.2 eq.) and CuCN (0.28 g, 3.1 mmol, 1.1 eq.) in THF (8 mL), was added via transfer cannula. The reaction was stirred for an additional 1 h at -78 °C and quenched by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 10 mL). The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (30 mL) and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude dihydropyridine was purified by FC (Al₂O₃-neutral, activity III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1). The resulting colorless oil was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and treated with DDQ (0.64 g, 2.8 mmol, 1.0 eq.). The reaction was stirred for 60 min at room temperature prior to being diluted with CH₂Cl₂ (20 mL). The mixture was extracted with 2 M HCl (3 x 20 mL) and the combined aqueous layers were washed with Et₂O (30 mL). The aqueous phase was neutralized by addition of K₂CO₃ and adjusted to pH 10 by adding 1 M NaOH. The aqueous mixture was extracted with Et₂O (3 x 30 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄. The solvent was carefully removed under reduced pressure (200 mbar, 40 °C). The residue was purified by FC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 5:1 → 1:1) and subsequently by vacuum distillation ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar, 200 °C) to yield pure **48** (126 mg, 31%, 99% D) as a colorless liquid.

$R_f=0.37$ (*n*-pentane/Et₂O 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): $\delta=7.09$ – 7.45 (m, 2 H, NCHCH), 8.26–8.66 ppm (m, 2 H, NCH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): $\delta=29.55$ (sept., $J=19.6$ Hz, C(CD₃)₃), 34.24 (C(CD₃)₃), 121.08 (NCHCH), 150.02 (NCH) 160.24 ppm (NCHCHC); IR (film): $\tilde{\nu}=3078, 3025, 2982, 2934, 2361, 2336, 2219, 2152, 2119, 2077, 2050, 1934, 1597, 1552, 1492, 1407, 1331, 1294, 1257, 1225, 1172, 1062, 1037, 995, 840, 801, 780, 757, 738$ cm⁻¹; HRMS-EI m/z [M]⁺ calcd for C₉H₄D₉N: 144.1607, found: 144.1607.

*Prepared from d_9 -*t*-BuCl with magnesium turnings in THF.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(2-[²H₃]methyl[1,1,1,3,3,3-²H₆]propan-2-yl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (49)

According to GP1, with **48** (75 mg, 0.52 mmol, 2.5 eq.) and **21** (71 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq.) without CH₂Cl₂ as solvent. Reaction time: 2.5 h. Recrystallization from *i*-PrOH/Et₂O (1:3.5, 9 mL) afforded **49** (106 mg, 81%, 99% D) as a colorless solid.

mp: 146 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta=2.81$ – 2.97 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.86–5.01 (m, 4 H, NCH₂), 7.91 (d, $J=6.9$ Hz, 4 H, NCHCH), 9.27 ppm (d, $J=7.0$ Hz, 4 H, NCH);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ =28.88 (m, $\text{C}(\text{CD}_3)_3$), 34.56 (NCH_2CH_2), 36.10 ($\text{C}(\text{CD}_3)_3$), 56.79 (NCH_2), 120.54 (q, J =319.7 Hz, CF_3), 125.50 (NCHCH), 144.68 (NCH), 171.93 ppm (NCHCHC); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3135, 3066, 2365, 2221, 1646, 1570, 1517, 1465, 1286, 1261, 1225, 1167, 1149, 1059, 1029, 860, 811, 757, 638, 573, 559, 518 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{D}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 479.3210, found: 479.3212.

Diethyl [$^2\text{H}_2$]malonate (**43**)

12 (5.0 g, 5.0 mL, 63 mmol, 3.2 eq.) was added to a solution of **42** (3.2 g, 3.0 mL, 20 mmol, 1.0 eq.) in D_2O (2.3 g, 2.1 mL, 0.12 mol, 5.9 eq.) and the resulting mixture was stirred for 20 h at room temperature. **12** and D_2O were removed by vacuum distillation and the procedure was repeated for further three times using identical amounts of **12** and D_2O . To remove residual pyridine, D_2O (10 mL) was added to the oily residue and removed by distillation. The resulting oil was purified by vacuum distillation (bath temp.: 100 °C, boiling point: 80 °C) to afford **43** (1.3 g, 40%, > 99. % D) as a colorless liquid.

R_f =0.74 (*n*-pentane/EtOAc 5:1); ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ =1.26 (t, J =7.1 Hz, 6 H, CH_2CH_3), 4.17 ppm (q, J =7.1 Hz, 4 H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2): δ =14.26 (CH_2CH_3), 41.60 (quin., J =20.0 Hz, CD_2), 61.79 (CH_2CH_3), 166.98 ppm (CO); IR (film): $\tilde{\nu}$ =2985, 2940, 2908, 1733, 1467, 1447, 1391, 1368, 1272, 1155, 1087, 1045, 1026, 912, 865, 812, 756 cm^{-1} ; HRMS-EI m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{D}_2\text{O}_4$: 162.0856, found: 162.0848.

The analytical data were consistent with those previously reported.⁵

[$^2\text{H}_6$]Propane-1,3-diol (**44**) and [$^2\text{H}_6$]propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (**45**)

A solution of **43** (1.50 g, 1.40 mL, 9.22 mmol, 1.0 eq.) in Et_2O (3 mL) was dropwise added to a suspension of LiAlD_4 (98% D, 1.19 g, 27.7 mmol, 3.0 eq.) in Et_2O (38 mL) at 0 °C and the resulting suspension was stirred for 5.5 h at 50 °C and for another 72 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of 1 M NaOH (18.4 mL, 18.4 mmol, 2.0 eq.) at 0 °C and the mixture was filtrated. The solid residue was washed

[5] J. S. Dickschat, C. A. Citron, N. L. Brock, R. Riclea, H. Kuhz, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3339–3346.

with Et₂O (20 mL) and repeatedly extracted with THF (4 x 30 mL). The filtrates were combined, and the solvent was removed under reduced pressure to yield the crude corresponding diol **44** (732 mg) as a yellowish and turbid oil. A mixture of **44** (732 mg, 8.92 mmol, 1.0 eq.) and **12** (1.41 g, 1.44 mL, 17.8 mmol, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (4.4 mL) was added to a solution of Tf₂O (5.14 g, 3.06 mL, 17.8 mmol, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (22 mL) at -78 °C and the reaction was stirred for 3 h at room temperature. The mixture was washed with D₂O (3 x 10 mL) and the organic phase was dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂) to afford **45** (1.86 g, 58%) as a grayish and turbid oil.

$R_f=0.88$ (SiO₂, CH₂Cl₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta=28.35$ (quin., $J=20.0$ Hz, OCD₂CD₂), 70.62 (quin., $J=23.7$ Hz, OCD₂CD₂), 118.56 ppm (q, $J=319.6$ Hz, CF₃); IR (film): $\tilde{\nu}=1415, 1252, 1207, 1147, 1083, 1062, 960, 833, 741\text{cm}^{-1}$.

1,1'-([²H₆]Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis(trifluoromethanesulfonate) (46**)**

According to GP1, with 4-*tert*-butylpyridine (1.82 g, 13.4 mmol, 1.97 mL, 2.5 eq.) and **45** (1.86 g, 5.38 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (11 mL). Reaction time: 30 min. Recrystallization from EtOAc afforded **46** (2.54 g, 77%, > 99% D) as a colorless solid.

mp: 144 °C; ¹H NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=1.39$ (s, 18 H, C(CH₃)₃), 8.23 (d, $J=7.1$ Hz, 4 H, NCHCH), 8.95 ppm (d, $J=7.1$ Hz, 4 H, NCHCH); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=22.58$ (NCD₂CD₂), 30.00 (C(CH₃)₃), 36.78 (C(CH₃)₃), 56.12–56.84 (m, NCD₂CD₂), 121.14 (q, $J=322.3$ Hz, CF₃), 125.54 (NCHCH), 144.74 (NCHCH), 170.66 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3134, 3077, 3057, 2970, 2913, 2877, 2361, 2341, 1646, 1564, 1515, 1466, 1373, 1287, 1256, 1226, 1147, 1114, 1094, 1069, 1029, 846, 829, 756, 667, 639, 601, 573, 561, 518\text{cm}^{-1}$; HRMS-ESI m/z : [$M\text{-TfO}$]⁺ calcd for C₂₂H₂₆D₂O₃N₂F₃S: 467.2457, found: 467.2454.

2 Characterization of [²H₆]MB327's affinity towards the *Torpedo*-nAChR employing a improved [²H₆]MB327 MS Binding Assay protocol

To test the possibility of a uniform buffer system from storage of *Torpedo* membranes to incubation, [²H₆]MB327 MS Binding Assays were conducted in incubation buffer devoid of CaCl₂ (= storage buffer). Corresponding binding experiments yielded a K_d of $14.2 \pm 1.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ and a B_{max} of $263 \pm 30 \text{ pmol} [\text{mg protein}]^{-1}$ for saturation experiments ($n = 3$, for a representative saturation isotherm see Fig. 1a) and a K_i of $18.7 \pm 1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ for autocompetition experiments using native MB327 as competitor ($n = 3$, for a representative saturation isotherm see Fig. 1b). Specific binding was defined as the difference between total binding and nonspecific binding. In all [²H₆]MB327 binding experiments, total ligand binding never exceeded 10% of the nominal concentration of the marker, so marker depletion was negligible.

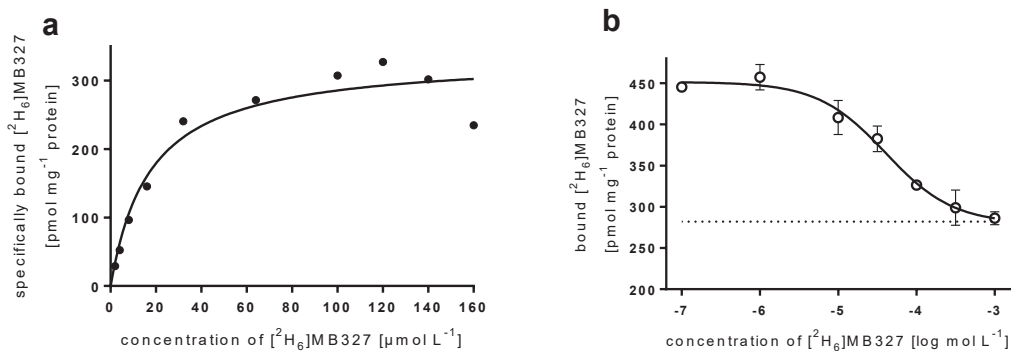


Fig. 1: Representative saturation and autocompetition binding experiments for [²H₆]MB327 binding towards *Torpedo*-nAChR in absence of $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$. a) Specific binding is shown at marker concentrations from 2 – $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ yielding a K_d of $17.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and B_{max} of $335 \text{ pmol} [\text{mg protein}]^{-1}$ in this example. b) Total binding, shown as mean \pm SD with [²H₆]MB327 employed in a nominal concentration of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and MB327 as competitor yielded a pK_i of 4.61 in this case. Nonspecific binding, determined in control experiments by heat-denaturation ($n = 3$) is shown as dashed line.

3 Validation of the developed LC-ESI-MS/MS quantification method

With final changes to the [$^2\text{H}_6$]MB327 MS Binding Assay protocol the LC-ESI-MS/MS quantification method was validated again exactly as previously published.⁶ For each validation series “IS containing blank matrix” from either nonspecific or total binding samples was spiked with marker to generate a set of matrix standards (Cal, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 nmol L⁻¹) as well as quality control samples (QCs, 0.25, 1, 8 nmol L⁻¹). Selectivity was demonstrated by analysis of blank matrix which did not show any interfering signals for both matrix types at the mass transitions m/z 159.2/144.3 ([$^2\text{H}_6$]MB327) or m/z 165.2/147.2 ([$^2\text{H}_{18}$]MB327). For 100 pmol L⁻¹ [$^2\text{H}_6$]MB327 matrix standards (LLOQ), in presence of both matrix types, the signal-to-noise ratio was always ≥ 13 (calculated by Analyst v. 1.6.1 software). For generation of a global calibration curve obtained area ratios (y) of [$^2\text{H}_6$]MB327 vs [$^2\text{H}_{18}$]MB327 were plotted against the concentration of [$^2\text{H}_6$]MB327 (x) in calibration standards. Linear regression analysis for these data employing a $1/x^2$ weighting yielded the following calibration function: $y = 0.562x - 0.00346$ ($R^2 = 0.9989$). Calibration standards and QCs were examined with respect to accuracy and precision within one validation series following the CDER guideline of the FDA for bioanalytical method validation in total binding matrix (for respective values see Table 1) and nonspecific binding matrix (for respective values see Table 2). Accuracy and precision were also determined inter-batch as recovery and relative standard deviation, respectively, for QC samples as well as matrix standards at all concentration levels over all validation series (for respective values see Table 3).

[6] S. Sichler, G. Höfner, S. Rappenglück, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, F. F. Paintner, K. T. Wanner, *Toxicol. Lett.* **2017**, ahead of print.

Table 1: Validation of [²H₆]MB327 quantification in total binding matrix by LC-ESI-MS/MS with an API 3200 using a YMC-Triart Diol-HILIC (50 mm x 2 mm, 3 µm) and [²H₁₈]MB327 as internal standard. $y = 0.562x - 0.00346$ ($R^2 = 0.9989$) with a $1/x^2$ weighting was used as global calibration curve.

Samples (n)	Intra-series																	
	Series 1			Series 2			Series 3			Series 4			Series 5			Series 6		
	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD
100 pmol L ⁻¹ Cal (6)	100.0	100.0	4.94	96.52	96.52	4.32	105.3	105.3	3.32	96.97	96.97	5.00	107.5	107.5	4.08	107.4	107.4	4.49
200 pmol L ⁻¹ Cal (6)	199.17	99.58	1.60	191.2	95.62	2.38	205.0	102.5	2.49	193.8	96.72	2.85	199.7	99.87	4.55	206.2	103.2	3.88
500 pmol L ⁻¹ Cal (3)	506.00	101.2	3.84	481.7	96.33	2.21	506.7	101.0	0.81	487.7	97.67	3.25	504.3	100.9	3.84	534.3	107.0	3.50
1 nmol L ⁻¹ Cal (3)	1020	102.0	2.77	992.7	99.27	1.80	963.7	96.37	4.75	972.0	97.20	1.52	1047	104.7	2.25	1093	109.3	1.14
2 nmol L ⁻¹ Cal (3)	2037	101.8	2.35	1913	95.60	2.70	1907	95.43	0.92	1937	96.77	1.79	1957	97.83	0.90	2103	105.0	1.35
4 nmol L ⁻¹ Cal (3)	4107	102.8	5.42	4123	103.0	2.10	3943	98.53	1.89	3963	98.90	2.56	4030	100.9	3.10	4243	106.0	2.31
7 nmol L ⁻¹ Cal (3)	6910	98.77	0.51	6743	96.30	1.50	7063	101.0	1.62	6963	99.37	1.28	6820	97.47	1.98	7453	106.7	2.21
10 nmol L ⁻¹ Cal (3)	10053	100.5	1.75	10533	105.3	0.90	10467	104.7	1.19	10133	101.3	1.23	9833	98.33	2.48	10833	108.3	1.74
250 pmol L ⁻¹ QC (6)	249.0	99.52	2.42	231.5	92.72	4.99	245.7	98.47	4.77	240.0	96.02	1.24	253.7	101.4	2.08	259.7	103.8	3.85
1 nmol L ⁻¹ QC (6)	988.8	98.88	2.69	947.0	94.70	1.70	960.8	96.08	1.74	962.5	96.25	0.99	980.2	98.02	4.28	1062	106.2	3.46
8 nmol L ⁻¹ QC (6)	7828	97.87	1.56	8045	100.5	3.36	7845	97.97	2.73	7892	98.62	1.86	7775	97.13	2.50	8247	103.0	2.51

M Mean of calculated concentrations (pmol L⁻¹), *Acc* accuracy (%), *RSD* relative standard deviation (%), *Cal* calibration standard, *QC* quality control sample, *n* number of replicates examined

Table 2: Validation of [²H₆]MB327 quantification in nonspecific binding matrix by LC-ESI-MS/MS with an API 3200 using a YMC-Triart Diol-HILIC (50 mm x 2 mm, 3 µm) and [²H₁₈]MB327 as internal standard. $y = 0.562x - 0.00346$ ($R^2 = 0.9989$) with a $1/x^2$ weighting was used as global calibration curve.

Samples (n)	Intra-series																	
	Series 1			Series 2			Series 3			Series 4			Series 5			Series 6		
	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD	M	Acc	RSD
100 pmol L ⁻¹ Cal (6)	103.4	103.4	6.50	94.53	94.53	3.75	102.8	102.8	5.57	91.28	91.28	5.15	110.0	110.0	3.82	107.2	107.2	3.30
200 pmol L ⁻¹ Cal (6)	206.3	102.9	3.18	189.8	94.93	3.48	200.0	99.88	3.28	188.0	94.08	2.02	204.3	102.2	5.33	213.2	106.7	2.46
500 pmol L ⁻¹ Cal (3)	481.3	96.27	1.40	456.7	91.30	2.15	483.0	96.67	0.77	475.0	95.00	1.13	486.0	97.07	2.27	519.7	103.9	3.51
1 nmol L ⁻¹ Cal (3)	1010	101.0	2.19	948.7	94.87	2.46	941.7	94.17	2.56	952.3	95.23	2.32	983.7	98.37	2.73	1067	106.7	1.77
2 nmol L ⁻¹ Cal (3)	1963	98.17	1.82	1813	90.63	2.20	1900	95.03	2.82	1953	97.73	4.19	1883	94.23	2.34	2050	102.8	2.58
4 nmol L ⁻¹ Cal (3)	3963	99.17	0.42	3870	96.57	2.88	3817	95.27	3.51	3877	96.87	0.52	3803	95.13	2.80	4223	106.0	2.04
7 nmol L ⁻¹ Cal (3)	6890	98.43	0.75	6647	94.90	0.98	6707	95.67	4.84	6737	96.20	1.15	6713	95.93	2.58	7173	102.3	1.22
10 nmol L ⁻¹ Cal (3)	9990	99.90	2.39	9937	99.37	0.58	10067	100.7	0.94	9903	99.03	4.55	9650	96.50	5.40	10400	104.0	2.08
250 pmol L ⁻¹ QC (6)	255.3	102.3	3.12	230.2	92.12	2.64	241.5	96.63	4.70	241.8	96.78	4.97	255.3	102.2	1.19	243.0	106.6	2.82
1 nmol L ⁻¹ QC (6)	1020	101.9	2.24	932.5	93.25	2.47	978.7	97.87	2.45	968.3	96.83	4.11	978.7	97.87	3.53	1047	104.7	2.11
8 nmol L ⁻¹ QC (6)	7948	99.28	4.17	7848	98.13	2.99	7935	99.05	2.39	7917	99.02	3.51	7722	96.63	2.58	8397	105.0	2.80

M Mean of calculated concentrations (pmol L⁻¹), *Acc* accuracy (%), *RSD* relative standard deviation (%), *Cal* calibration standard, *QC* quality control sample, *n* number of replicates examined

Table 3: Inter-series determination of mean, accuracy and precision of the validation of $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ quantification in (total and nonspecific) binding matrix by LC-ESI-MS/MS employing $[^2\text{H}_{18}]\text{MB327}$ as internal standard. $y = 0.562x - 0.00346$ ($R^2 = 0.9989$) with a $1/x^2$ weighting was used as global calibration curve.

Samples (n)	Inter-series		
	M	Acc	RSD
100 pmol L ⁻¹ Cal (6)	101.9	101.9	5.62
200 pmol L ⁻¹ Cal (6)	199.7	99.84	3.71
500 pmol L ⁻¹ Cal (3)	493.5	98.69	4.14
1 nmol L ⁻¹ Cal (3)	999.3	99.93	4.71
2 nmol L ⁻¹ Cal (3)	1951	97.59	3.93
4 nmol L ⁻¹ Cal (3)	3997	99.93	3.67
7 nmol L ⁻¹ Cal (3)	6902	98.59	3.30
10 nmol L ⁻¹ Cal (3)	10150	101.5	3.21
250 pmol L ⁻¹ QC (6)	245.6	99.04	4.26
1 nmol L ⁻¹ QC (6)	985.4	98.54	3.77
8 nmol L ⁻¹ QC (6)	7950	99.35	2.35

M Mean of calculated concentrations (pmol L⁻¹), *Acc* accuracy (%), *RSD* relative standard deviation (%), *Cal* calibration standard, *QC* quality control sample, *n* number of replicates examined

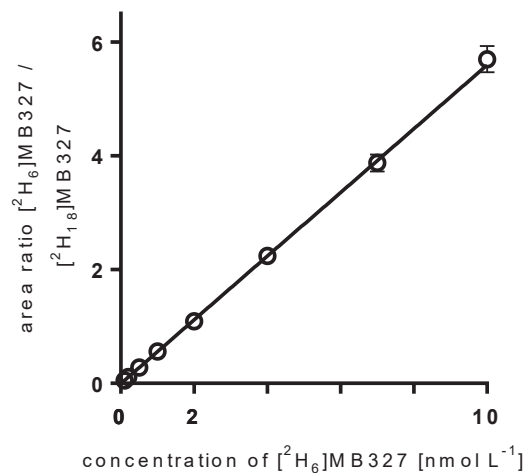


Fig. 2: Global calibration curve ($y = 0.562x - 0.00346$, $R^2 = 0.9989$) for $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ based on 12 validation series (6 validation series for total binding matrix and nonspecific binding matrix, respectively), each consisting of blank and zero samples as well as matrix calibration standards at eight concentration levels (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 7 and 10 nmol L⁻¹). Area ratios of $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ vs $[^2\text{H}_{18}]\text{MB327}$ (y) for calibration standards as determined with the developed LC-ESI-MS/MS method were plotted against the corresponding concentration of $[^2\text{H}_6]\text{MB327}$ (x). Data points are shown as means \pm SD.

3.3 Dritte Publikation: *Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor*

3.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Bispyridiniumsalz **MB327** ist ein im mikromolaren Bereich therapeutisch wirksamer Resensitizer nikotinscher Acetylcholinrezeptoren und Leitstruktur für die Entwicklung von Antidoten zur Behandlung von Nervenkeimstoffvergiftungen. Erste Erfolge auf diesem Gebiet gelangen uns im Vorfeld der vorliegenden Studie mit der Etablierung eines MS-Bindung-Assays zur Bestimmung der Bindungsaffinität an der MB327-Bindungsstelle des nAChR aus dem *Torpedo californica*, dem Screening einer gezielt synthetisierten Substanzbibliothek an symmetrischen MB327-Analoga sowie der Analyse erster Struktur-Affinitätsbeziehungen. **MB327** besteht aus zwei, über einen Propan-1,3-diyl-Linker miteinander verbundenen 4-*tert*-Butylpyridinringen. Kürzlich postulierten Wein et al. die Teilung der MB327-Bindungsstelle am nAChR in eine lipophile und eine hydrophile Seite. Dies gab Anlass, die bisher durch das Screening der symmetrischen MB327-Analoga aufgebauten Struktur-Affinitätsbeziehung (vgl. Kapitel 3.2.1) um nicht-symmetrische Verbindungen zu erweitern.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb 25 bisquaternäre Salze mit jeweils zwei unterschiedlichen Heterocyclen auf beiden Seiten des Propan-1,3-diyl-Linkers sowie ein Desaza Analogon von **MB327** synthetisiert und diese hinsichtlich ihrer Affinität zur MB327-Bindungsstelle charakterisiert. Im Fall des Desaza-Analogons wurde formal einer der beiden 4-*tert*-Butylpyridiniumringe durch einen 4-*tert*-Butylphenylring ersetzt. Allen Zielverbindungen gemeinsam waren ein 4-*tert*-Butylpyridinium- oder 3-Methoxypyridiniummotiv, welche über den C3-Linker mit unterschiedlichen N-Heterocyclen kombiniert wurden.

Die Synthese der bisquaternären Salze erfolgte unter Verwendung einer Labormikrowelle in zwei Stufen. Der erste Schritt bestand in der Synthese eines *N*-(3-Halogenpropyl)pyridinium-Intermediats durch Reaktion der N-Heterocyclen mit einem Propan-Biselektrophil. Hierfür wurden in Abhängigkeit der Reaktivität der N-Heterocyclen entweder 1,3-Diodpropan (4.0 Äq.) oder 3-Brompropyltriflat (1.0 Äq.) eingesetzt. Die bisquaternären Zielverbindungen wurden anschließend durch eine

Substitution der Halogenidfunktion der Pyridiniumintermediate mit den jeweiligen N-Heterocyclen und Aufreinigung der Biskationen mittels RP-MPLC erhalten.

Mit dieser Strategie konnten selbst sehr schwach nukleophile Heterocyclen wie 2-*tert*-Butylpyrazin, 2-*tert*-Butylpyridin oder 1,3-Thiazol mit guten Ausbeuten alkyliert werden, wobei gleichzeitig wichtige funktionelle Gruppen wie OMe, NMe₂, CF₃, COOEt oder CONMe₂ toleriert wurden.

Von den fünf verschiedenen auf der variablen Seite eingeführten N-Heterocyclen (Isoquinolin, Pyrazin, Imidazol, Pyridin und Thiazol) lieferten Verbindungen mit zwei Pyridiniumringen die höchsten Bindungsaffinitäten, sofern sie auf einer Seite einen 4-*tert*-Butylpyridiniumring besaßen. Bispyridiniumsalze mit einem 3-Methoxypyridiniummotiv zeigten im Allgemeinen niedrigere Bindungsaffinitäten ($pK_i = 4.35 \pm 0.08 - 4.64 \pm 0.09$) und eignen sich somit weniger als primäres Strukturmotiv für die Entwicklung potenter Resensitizer. Die formale Addition einer Methoxygruppe in 3-Position eines 4-*tert*-Butylpyridiniumrings von **MB327** erhöhte die Bindungsaffinität leicht von $pK_i = 4.73 \pm 0.03$ auf 4.97 ± 0.02 . Dies lässt vermuten, dass die Kombination mehrerer funktioneller Gruppen an einem Pyridiniumring Potential zur Erhöhung der Bindungsaffinität bietet. Darüber hinaus konnte kationischen Wechselwirkungen eine entscheidende Bedeutung bei der Stabilisierung der Resensitizer in der MB327-Bindungsstelle zugeschrieben werden. Die Bindungsaffinität des biskationischen **MB327** lag um 0.39 log-Einheiten über der seines nur einfach positiv geladenen Desaza-Analogons mit einem 4-*tert*-Butylphenylring ($pK_i = 4.34 \pm 0.04$).

In Übereinstimmung mit bereits bestehenden Struktur-Affinitätsbeziehungen wurde zudem die NMe₂-Gruppe in ihrer kürzlich gefundenen Eigenschaft als polares Bioisoster der lipophilen *tert*-Butylgruppe bestätigt (4-NMe₂: $pK_i = 4.90 \pm 0.06$; 4-*t*-Bu (**MB327**): $pK_i = 4.73 \pm 0.03$).

Obwohl Molecular-Modeling Studien eine deutliche Zweiteilung der Bindungstasche für Bispyridiniumsalze in eine eher lipophile und eine eher hydrophile Seite zeigten, wies keine der synthetisierten nicht-symmetrischen Verbindungen eine vergleichbar hohe Bindungsaffinität wie das symmetrische 3-phenyl-4-*tert*-butylsubstituierte Bispyridiniumsalze PTM0022 auf ($pK_i = 5.16 \pm 0.07$, vgl. Kapitel 3.2). Offensichtlich befand sich das für die Bindungstasche erforderliche Substitutionsmuster nicht unter den synthetisierten Zielverbindungen. Dennoch konnten in der vorliegenden Studie erste wertvolle Einblicke in die Struktur-Affinitätsbeziehungen nicht-symmetrischer

potentieller Resensitizer gewonnen werden. Hierauf aufbauend, kann das Screening größerer und strukturell diverser Substanzbibliotheken helfen, detaillierte Informationen über mögliche Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten der Bindungsstelle zu erhalten. Somit könnte die Leitstruktur zukünftig zielgerichtet optimiert und die Entwicklung potenterer Resensitizer weiter vorangetrieben werden.

3.3.2 Darstellung des Eigenanteils

Alle Synthesen sowie die analytische Charakterisierung der Verbindungen wurden von mir durchgeführt. Die technische Durchführung der MS- und NMR-Messungen zur analytischen Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde von der Abteilung des Departments Pharmazie übernommen. Sonja Sichler übernahm die biologische Prüfung der Zielverbindungen mittels der von ihr, G. Höfner und K. T. Wanner entwickelten MS-Bindungsassays sowie die Berechnung der pK_i Werte. Die Erstellung des Manuskripts wurde zu gleichen Teilen von Sonja Sichler und mir unterstützt von G. Höfner, T. Wein und K. T. Wanner durchgeführt. Die Korrektur des Manuskripts übernahmen G. Höfner, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, F. F. Paintner und K. T. Wanner.



DOI: 10.1002/cmdc.201800539

CHEMMEDCHEM
Full Papers

Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor

Sebastian Rappenglück⁺,^[a] Sonja Sichler⁺,^[a] Georg Höfner,^[a] Thomas Wein,^[a] Karin V. Niessen,^[b] Thomas Seeger,^[b] Franz F. Paintner,^[a] Franz Worek,^[b] Horst Thiermann,^[b] and Klaus T. Wanner^{*[a]}

The current standard therapy to counteract organophosphate intoxication is not effective in equal measure against all types of organophosphorus compounds (OPCs), as the outcome of oxime-induced reactivation of inactivated acetylcholinesterase (AChE) strongly depends on the particular OPC. In case the re-activation is insufficient, acetylcholine concentrations that rise to pathophysiological levels force the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) into a desensitized state and hence a functionally inactive state. As a consequence, neurotransmission is irreversibly disrupted at the neuromuscular junction. Previous electrophysiological studies identified the symmetric bispyridinium compound 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (MB327) as a re-sensitizer of the desensitized nAChR. MB327 is thereby capable of restoring the functional activity. Very recently, *in silico* modeling studies suggested

non-symmetric derivatives of MB327 as potential re-sensitizers with enhanced binding affinity and thus possible enhanced efficacy. In this study, 26 novel non-symmetric bispyridinium compounds and related derivatives were synthesized. For the synthesis of the highly polar target compounds in sufficient quantities, newly developed and highly efficient two-step procedures were used. Compounds were characterized in terms of their binding affinity toward the MB327 binding site at the nAChR using recently developed mass spectrometry (MS) Binding Assays. Regarding structure–affinity relationships at the MB327 binding site, the presence of two quaternary aromatic nitrogen centers as well as pyridinium systems with a *tert*-butyl group at the 4-position or a NMe₂ group at the 3- or 4-positions appeared to be beneficial for high binding affinities.

Introduction

Organophosphorus compounds (OPCs) have been investigated for plant protection since the early 20th century. In the 1930s and 1940s nerve agents such as tabun, sarin, and soman were found to possess increased toxicity against humans. Since then, such chemicals have been repeatedly used in warfare as well as in terrorist attacks.^[1–3] OPCs still cause high numbers of annual fatalities, mostly due to pesticide self-poisoning.^[4,5] Hence, there is an urgent need for an effective medical treatment to counteract OPC intoxication. Unfortunately, the currently available antidotal treatment is not effective against all types of OPCs.

OPCs inactivate the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which leads to accumulation of acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft and effects subsequently an overstimulation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors (mAChRs and nAChRs, respectively). The current standard drug therapy for OPC poisoning includes administration of atropine and an oxime reactivator of AChE such as obidoxime or pralidoxime. As a competitive antagonist of mAChRs, atropine selectively counteracts overstimulation of this receptor. In contrast, an analogous application of nAChR antagonists to treat nAChR overstimulation is not feasible as their therapeutic window is too small and patients would need artificial ventilation.^[6] Here oxime reactivators of AChE as part of the treatment regimen come into play. These compounds help to regain mAChR as well as nAChR function as they restore AChE activity and thus decrease the ACh overload in the synaptic cleft. However, as indicated before, oxime reactivators of AChE do not show equipotent activity against all types of OPCs. For example, in case of soman poisoning, the enzyme-organophosphate complex undergoes a rapid dealkylation reaction (so-called “aging”) which prevents any subsequent restoration of AChE activity.^[7] If ACh cannot be removed, progressive overstimulation forces the nAChR into a desensitized state thereby disrupting nAChR-mediated cholinergic signaling.^[8] In conclusion, there is an

[a] S. Rappenglück,⁺ S. Sichler,⁺ Dr. G. Höfner, Dr. T. Wein, Prof. Dr. F. F. Paintner, Prof. Dr. K. T. Wanner

Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: klaus.wanner@cup.uni-muenchen.de

[b] K. V. Niessen, Dr. T. Seeger, Prof. Dr. F. Worek, Prof. Dr. H. Thiermann
Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstrasse 11, 80937 Munich (Germany)

[⁺] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800539>.

urgent need for a novel therapeutic approach enabling direct restoration of nAChR function rather than the indirect way via AChE promoted removal of the neurotransmitter ACh from the synaptic cleft.

The bispyridinium salt MB327 (Figure 1), which is the most potent representative of a class of analogous compounds, was shown to be capable of recovering muscle function even after soman poisoning.^[9] Because MB327 does not reactivate AChE,

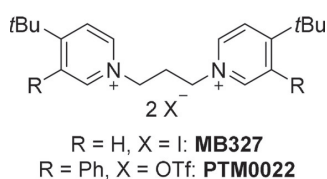


Figure 1. Structures of MB327 and PTM0022.

restoration of cholinergic transmission was assumed to be mediated by a direct intervention at the nAChR. Further examination of the effect of MB327 and of structural analogues on the nAChR by Niessen et al., using electrophysiological measurements on a SURFE²R (surface electronic event reader) platform, corroborated this hypothesis and demonstrated the capability of MB327 to reconstitute nAChR function after agonist-induced desensitization as well as to prevent desensitization when co-applied with the agonist carbamoylcholine.^[10]

MB327, however, needs to be applied at high concentration (100–200 μM) to achieve muscle force recovery in vitro.^[9] This low potency of MB327 is in line with a low binding affinity toward the nAChR (MB327: $pK_i = 4.73 \pm 0.03$), which was determined by MS Binding Assays previously developed by us.^[11] We were planning to develop compounds with increased affinity to the MB327 binding site. Assuming that an increase in affinity is paralleled by intrinsic activity, these compounds should display also a higher potency as nAChR re-sensitizers, hence, being more effective antidotes for the treatment of OPC poisoning. Because MB327 is the most potent nAChR re-sensitizer known so far, it appeared to be a well suited starting point for this endeavor.

First attempts to create nAChR re-sensitizers with increased potency were previously published by us.^[12] We reported on the synthesis of 30 novel symmetric bispyridinium and related salts structurally analogous to MB327 and their binding affinities toward the MB327 binding site. The most affine com-

pound, lipophilic 3-phenyl-4-*tert*-butyl-substituted bispyridinium salt PTM0022 (Figure 1), showed a pK_i value significantly higher than that of MB327.^[12] Furthermore, the study provided vital information on the influence of various functional groups and structural motives on binding affinity. Later on, using the 3D structure of the nAChR of *Torpedo marmorata* published by Unwin^[13] in silico docking studies revealed two putative binding sites for MB327.^[14] Both sites are located inside the channel, one in the extracellular domain between the γ and α subunits and the other between the β and δ subunits in the transmembrane region. These putative sites were found to be non-symmetrical with regard to their polarity, that is, one of the two pyridinium rings is embedded in a more hydrophilic and the other in a more lipophilic environment. This finding suggests that a non-symmetric substitution of the two pyridinium rings with hydrophilic and lipophilic residues might lead to compounds with improved affinities toward the MB327 binding site. However, to gain more information on the effect of selective substitutions on binding affinity, we aimed at novel non-symmetric bisquaternary compounds with a wide variety of different residues. More precisely, we focused on structures with either two lipophilic, two hydrophilic, or one lipophilic and one hydrophilic substituted *N*-aromatic subunit. As lead structure, MB327 instead of the recently developed PTM0022 was chosen as so far only for MB327, but not for PTM0022, the therapeutic efficacy has been verified. In particular, evaluation of non-symmetric compounds in terms of their binding affinity toward the MB327 binding site was anticipated to provide a more comprehensive and detailed insight in individual, regio, and functional group dependent ligand-target interactions. Herein we report on the results of this study.

Results and Discussion

Structure of target compounds

For the synthesis of the envisaged non-symmetric bisquaternary target compounds (Figures 2 and 3), symmetric bispyridinium salt MB327 (Figure 1) served as a starting point.

Taking into account the results from the aforementioned in silico modeling studies at the *Torpedo*-nAChR,^[14] one of the two 4-*tert*-butylpyridinium rings of MB327 should be replaced by different *N*-heterocycles or pyridine rings substituted either with lipophilic or hydrophilic functional groups at varying ring positions (**1a–l**, **2a–e** and **3a–e**, Figures 2 and 3). To allow a straightforward analysis of the effect of newly introduced pyri-

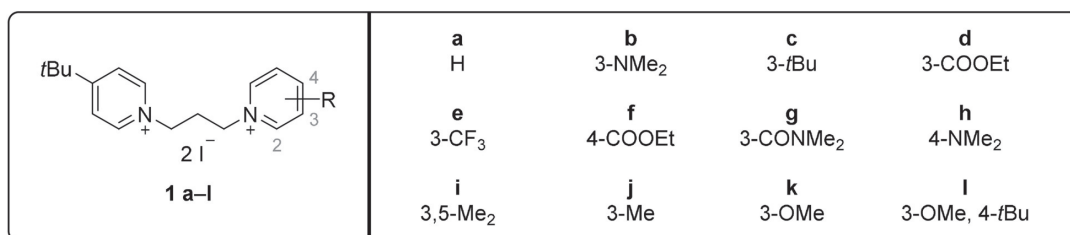


Figure 2. Structures of envisaged target compounds **1a–l**.

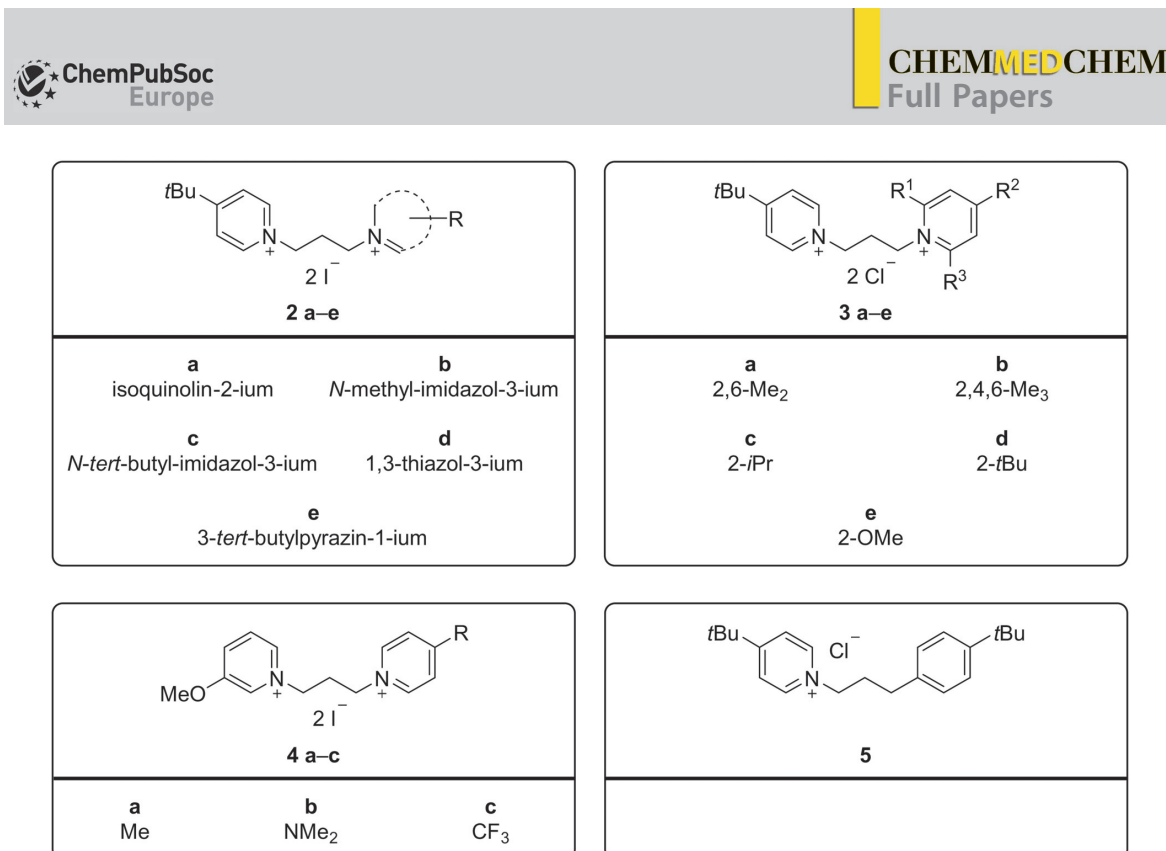


Figure 3. Structures of envisaged target compounds **2 a–e**, **3 a–e**, **4 a–c** and **5**.

dine ring substituents and *N*-heterocycles on the binding affinity for the putative MB327 binding site, pyridinium salt **1 a** being devoid of one of the two *tert*-butyl residues of MB327 should be synthesized as reference compound.

Moreover, analysis of the MB327 binding site suggested^[14] that non-symmetric bispyridinium compounds combining a 3-methoxypyridinium motive (**4 a–c**) with a second pyridinium ring exhibiting either an electron donating (**4 b**: 4-NMe₂), withdrawing (**4 c**: 4-CF₃), or neutral (**4 a**: 4-Me) substituent, might also have reasonable binding affinities (Figure 3). Finally, to expand the pool of target compounds beyond highly polar bisquaternary species, one of both 4-*tert*-butylpyridinium rings of MB327 should be replaced by a 4-*tert*-butylphenyl unit to afford monocationic species **5**. Being structurally closely related to MB327, the biological characterization of compound **5** should allow to estimate the effect of the second positively charged pyridine ring in MB327 on binding affinity.

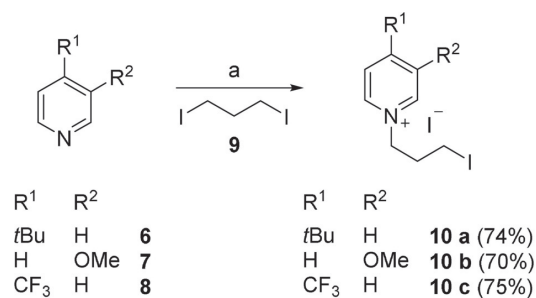
Chemistry

Depending on the substitution pattern of the aromatic nitrogen heterocycles present in the envisaged bispyridinium and related salts, target compounds were synthesized via two straightforward routes allowing the synthesis of reasonable quantities sufficient for use in biological testing.

Compounds **1 a–I** (Figure 2), **2 a–e** (Figure 3) and **4 a–c** (Figure 3) being devoid of any ring substituents adjacent to the quaternary nitrogen atom of the aromatic heterocycles

were synthesized in two steps. First, 4-*tert*-butylpyridine (**6**), 3-methoxypyridine (**7**) or 4-trifluoromethylpyridine (**8**) were subjected to a *N*-alkylation with 4.0 equivalents 1,3-diiodopropane (**9**) at 90 °C for 1–16 h under microwave irradiation to yield *N*-(3-iodopropyl)pyridinium salts **10 a–c** (Scheme 1). Using diiodide **9** in excess decreased the formation of undesired bispyridinium species and allowed the formation of the monoalkylation products **10 a–c** in 70–75% yield after purification by flash column chromatography.

In the next step, the second nitrogen heterocycle was introduced to afford target compounds **1 a–I**, **2 a–e** and **4 a–c** (Table 1). For that purpose, *N*-(3-iodopropyl)pyridinium iodides **10 a–c** were subjected to microwave assisted reactions with the corresponding nitrogen heteroaromatics **7** and **11–27**.



Scheme 1. Synthesis of *N*-(3-iodopropyl)pyridinium iodides **10 a–c**: a) **9** (4.0 equiv), MeCN, microwave: 150 W, 90 °C, 1 h (**10 a** and **b**) or 16 h (**10 c**).

Table 1. Synthesis of non-symmetric bispyridinium and related diiodides **1 a–l**, **2 a–e** and **4 a–c**.

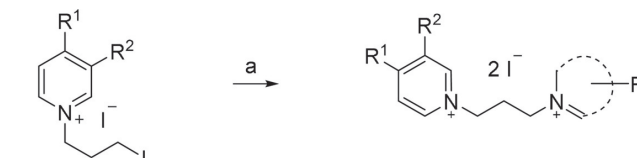

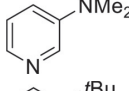

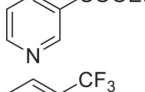
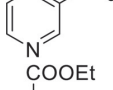

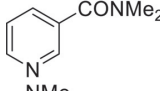

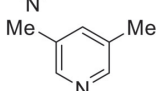
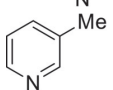
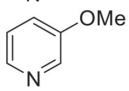
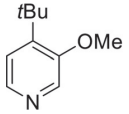
Entry	10	Starting materials <i>N</i> -heterocycle	No.	Reaction conditions		Product	Yield [%]
				<i>T</i> [°C]	<i>t</i> [h]		
							
		R ¹ R ² <i>t</i> Bu H 10 a H OMe 10 b CF ₃ H 10 c		R ¹ R ² <i>t</i> Bu H 1 a–l , 2 a–e H OMe 4 a–b CF ₃ H 4 c			
1	a		11	90	1	1 a	52
2	a		12	90	1	1 b	51
3	a		13	90	1	1 c	94
4	a		14	90	3	1 d	82
5	a		15	90	16	1 e	61
6	a		16	90	3	1 f	73
7	a		17	90	3	1 g	87
8	a		18	90	1	1 h	95
9	a		19	90	1	1 i	87
10	a		20	90	1	1 j	86
11	a		7	90	1	1 k	78
12	a		21	90	1	1 l	85

Table 2. Synthesis of *N*-(3-bromopropyl)pyridinium triflates **34 a–e**.

Entry	Starting material R ¹ /R ² /R ³ No.	T [°C]	t [h]	Product	Yield [%]
1	Me/H/Me 28	RT	16	34 a	83
2	Me/Me/Me 29	RT	16	34 b	81
3	<i>i</i> Pr/H/H 30	50	3	34 c	78
4	<i>t</i> Bu/H/H 31	85	1.5	34 d	67
5	OMe/H/H 32	RT	16	34 e	96

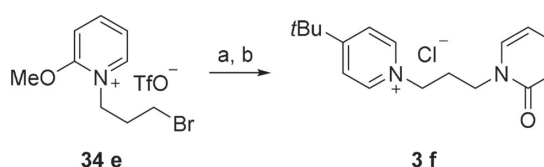
Reagents and conditions: a) pyridine derivatives (1.0 equiv), **33** (1.2 equiv), CH₂Cl₂, T, t.

tylpyridine (**31**, Table 2, entry 4). For that reason, we developed an alternative approach that allows the straightforward *N*-alkylation of sterically hindered heterocycles and gives efficient access to the desired target compounds within two steps.

First, sterically hindered pyridine derivatives **28–32** were subjected to a reaction with the highly reactive bromopropyltriflate **33** providing the corresponding *N*-(3-bromopropyl)pyridinium salts **34 a–e** in 67–96% yield after purification by flash column chromatography (Table 2).

In the second step, **34 a–e** were treated with 1.2 equivalents of 4-*tert*-butylpyridine (**6**) for 3 h at 90 °C under microwave heating (Table 3). The markedly different reactivities of the two electrophilic centers present in bis-electrophile **33** allowed both the smooth alkylation of sterically demanding *N*-heterocycles in the first step (Table 2) by the triflate function as well as a facile subsequent substitution of the bromide function by

4-*tert*-butylpyridine (**6**) in the second step (Table 3). Subsequent treatment without prior isolation of the formed mixed triflate/bromide salts with a chloride loaded anion-exchange resin finally afforded bispyridinium dichlorides **3 a–d** in 78–94% yield after purification by RP-MPLC (Table 3). However, treatment of **34 e** with 1.2 equivalents 4-*tert*-butylpyridine (**6**) and subsequent ion-exchange reaction did not lead to the desired bispyridinium salt **3 e** (Table 3, entry 5). Instead, pyridiniumpropylpyridone **3 f** (Scheme 2) was obtained amongst various side products in 21% yield. As compound **3 f** is an interesting monocationic species with a polar pyridone subunit, it was worth including it for biological testing.

**Scheme 2.** Synthesis of pyridiniumpropylpyridone **3 f**: a) **6** (3.0 equiv), MeCN, 90 °C, 3 h, microwave: 150 W; b) Amberlite® IRA-410 Cl[−] form, H₂O, RT, 16 h, 90% over both steps.

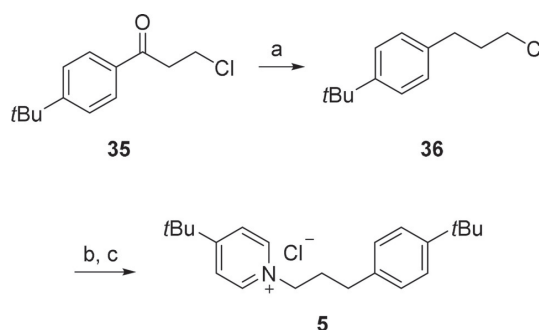
Hence, an attempt to improve the formation of **3 f** was undertaken. Because pyridiniumpropylpyridone **3 f** was assumed to be mainly formed by *O*-demethylation of **34 e** effected by 4-*tert*-butylpyridine (**6**), the reaction was repeated, but this time using 3.0 equivalents of 4-*tert*-butylpyridine (**6**) instead of 1.2 (Scheme 2). That way, indeed, complete *O*-demethylation occurred and compound **3 f** could be obtained in 90% yield after ion exchange and purification by RP-MPLC.

Finally, the synthesis of the mono cationic MB327 analogue **5** could be accomplished in two steps starting from chloropropanone **35** (Scheme 3).^[18–29] Reduction of the keto function with Et₃SiH in TFA at 75 °C under microwave irradiation following a procedure adapted from Perlmutter et al. led to chloropropyl benzene **36** in 90% yield.^[21] Subsequent treatment of **36** with 4-*tert*-butylpyridine in the presence of stoichiometric

Table 3. Synthesis of bispyridinium dichlorides **3 a–d** exhibiting alkyl substituents in 2-position.

Entry	34	Product R ¹ /R ² /R ³	3 a–e No.	Yield [%]
1	a	Me/H/Me	3 a	78
2	b	Me/Me/Me	3 b	85
3	c	H/H/ <i>i</i> Pr	3 c	94
4	d	H/H/ <i>t</i> Bu	3 d	90
5	e	H/H/OMe	3 e	–

Reagents and conditions: a) Pyridinium bromides **34 a–e** (1.0 equiv), 4-*tert*-butylpyridine (**6**, 1.2 equiv), MeCN, 90 °C, 3 h, microwave: 150 W; b) Amberlite® IRA-410 Cl[−] form, H₂O, RT, 16 h.

**Scheme 3.** Synthesis of monocationic MB327 analogue **5**: a) Et₃SiH (4.0 equiv), TFA, 75 °C, 15 h, microwave: 100 W, 90%; b) NaI (1.1 equiv), **6** (1.2 equiv), MeCN, 90 °C, 16 h, microwave: 150 W; c) Amberlite® IRA-410 Cl[−] form, H₂O, RT, 16 h, 90% over both steps.

amounts of NaI (16 h, 90 °C) and ion-exchange reaction with Amberlite® IRA-410 in its chloride form provided target compound **5** in 81 % yield.

Altogether, with **1 a–l**, **2 a–e**, **3 a–d**, **3 f**, **4 a–c** and **5**, a set of 26 non-symmetric salts featuring a broad variety of lipophilic and hydrophilic substituents could be made available for biological characterization in MS Binding Assays.

Biological evaluation

All target compounds synthesized in the context of this study were catalogued with a certain PTM number (Pharmacy and Toxicology Munich). Binding affinities toward the nAChR were

determined in MS Binding Assays using [²H₆]MB327 as marker and nAChR-enriched membranes prepared from *Torpedo californica* electroplaque tissue as target (Table 4).^[12] In the following, binding data for compounds are given and discussed with respect to the substitution pattern using bispyridinium salt **1 a** as reference compound. This compound is characterized by the presence of a 4-*tert*-butylpyridinium and an unsubstituted pyridinium unit. The latter will be referred to as blank pyridine when it comes to the substitution at this part of **1 a**. For reference compound **1 a** (PTM0029), the pK_i value for the binding toward the MB327 binding site amounts to 4.52 ± 0.06 (Table 4, entry 2). Hence omitting one *tert*-butyl residue from MB327 (pK_i = 4.73 ± 0.03), the most prototypic re-sensitizer of

Table 4. Structures of synthesized non-symmetric target compounds and binding affinities to the MB327 binding site, determined in MS Binding Assays as previously described.^[12]

Entry	Compound	R/N _{het}	pK _i ^[a]	PTM code
1	MB327	4- <i>t</i> Bu	4.73 ± 0.03	
2	1 a	H	4.52 ± 0.06	0029
3	1 b	3-NMe ₂	4.92 ± 0.09	0030
4	1 c	3- <i>t</i> Bu	4.50 ± 0.02	0049
5	1 d	3-COOEt	4.84 ± 0.03	0050
6	1 e	3-CF ₃	4.14 ± 0.10	0051
7	1 f	4-COOEt	4.26 ± 0.03	0052
8	1 g	3-CONMe ₂	4.62 ± 0.08	0053
9	1 h	4-NMe ₂	4.90 ± 0.06	0056
10	1 i	3,5-Me ₂	4.48 ± 0.04	0035
11	1 j	3-Me	4.50 ± 0.09	0037
12	1 k	3-OMe	4.35 ± 0.08	0040
13	1 l	3-OMe, 4- <i>t</i> Bu	4.97 ± 0.02	0038
14	2 a	isoquinolin-2-ium	4.90 ± 0.06	0054
15	2 b	<i>N</i> -methylimidazol-3-ium	4.70 ± 0.04	0031
16	2 c	<i>N-tert</i> -butylimidazol-3-ium	4.40 ± 0.06	0058
17	2 d	1,3-thiazol-3-ium	4.30 ± 0.11	0039
18	2 e	3- <i>tert</i> -butylpyrazin-1-ium	4.33 ± 0.12	0055
19	3 a	2,6-Me ₂	4.82 ± 0.04	0046
20	3 b	2,4,6-Me ₃	4.89 ± 0.04	0041
21	3 c	2- <i>i</i> Pr	4.39 ± 0.08	0048
22	3 d	2- <i>t</i> Bu	4.54 ± 0.05	0047
23	3 f	pyridin-2(1 <i>H</i>)-one	3.65 ± 0.12	0036
24	4 a	4-Me	4.40 ± 0.06	0042
25	4 b	4-NMe ₂	4.64 ± 0.09	0043
26	4 c	4-CF ₃	4.52 ± 0.10	0044
27	5	–	4.34 ± 0.04	0060

[a] Data are the mean ± SEM of three independent experiments.

desensitized nAChR, caused a slight decrease in binding affinity.

In case of the new target compounds, binding affinities ranged from $pK_i = 3.65 \pm 0.12$, found for pyridin-2(1*H*)-one derivative **3 f** (PTM0036, Table 4, entry 23), up to $pK_i = 4.97 \pm 0.02$ for **1 l** with a 3-methoxy and a 4-*tert*-butyl substituent at the second pyridinium ring (PTM0038, Table 4, entry 13).

As compared with symmetric 4-*tert*-butyl-substituted MB327 (Table 4, $pK_i = 4.73 \pm 0.03$, entry 1), non-symmetric compounds **3 d** (PTM0047, $pK_i = 4.54 \pm 0.05$, Table 4, entry 22) and **1 c** (PTM0049, $pK_i = 4.50 \pm 0.02$, Table 4, entry 4) with a *tert*-butyl substituent at one of the two pyridinium groups in 2- or 3-position have a somewhat lower binding affinity. Interestingly, the pK_i values of **3 d** and **1 c** are similar to that of reference compound **1 a** (PTM0029). This indicates that a *tert*-butyl substituent in 2- or 3-position of blank pyridine is rather ineffective at increasing binding affinity toward the MB327 binding site. Similar binding affinities as determined for **3 d** and **1 c** or parent compound **1 a**, respectively, were also found at the blank pyridine 3-CONMe₂, 3,5-Me₂, 3-Me or 2-*i*-Pr-substituted compounds **1 g** (PTM0053, Table 4, entry 8), **1 i** (PTM0035, Table 4, entry 10), **1 j** (PTM0037, Table 4, entry 11), and **3 c** (PTM0048, Table 4, entry 21), showing pK_i values from 4.39 ± 0.08 to 4.62 ± 0.08 . Distinctly lower binding affinities than parent compound **1 a**, however, were found for pyridinium salts exhibiting a 3-CF₃ (**1 e**, PTM0051, Table 4, entry 6), 4-COOEt (**1 f**, PTM0052, Table 4, entry 7), or 3-OMe (**1 k**, PTM0040, Table 4, entry 12) group at the blank pyridine with pK_i values ranging from 4.14 ± 0.10 for **1 e** (PTM0051) up to 4.35 ± 0.08 for **1 k** (PTM0040). For compounds displaying a 3-(ethoxycarbonyl)unit (**1 d**, PTM0050: $pK_i = 4.84 \pm 0.03$, Table 4, entry 5) or two methyl groups in 2,6-position (**3 a**, PTM0046: $pK_i = 4.82 \pm 0.04$, Table 4, entry 19) at blank pyridine, binding affinities were increased. In fact, pK_i values were about 0.3 log units higher than for reference compound **1 a** (PTM0029, Table 4, entry 2).

The binding affinities of these compounds are at least as high as the one of the currently most potent nAChR re-sensitizer MB327 ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$, Table 4, entry 1). Promising results were further obtained for compounds in which the blank pyridinium subunit of **1 a** is replaced by a 2,4,6-collidinium (**3 b**, PTM0041, $pK_i = 4.89 \pm 0.04$, Table 4, entry 20) or 3- and 4-dimethylamino pyridinium moiety (**1 b**, PTM0030, $pK_i = 4.92 \pm 0.09$, Table 4, entry 3; **1 h**, PTM0056, $pK_i = 4.90 \pm 0.06$, Table 4, entry 9), showing pK_i values about 0.4 log units higher as the respective pK_i value of the unsubstituted reference **1 a** (PTM0029, Table 4, entry 2). Notably, the increased binding affinity of dimethylamino-substituted compounds is in accordance with recently published structure–affinity relationships found for symmetric bispyridinium compounds. The dimethylamino group was identified as potential substitute for the lipophilic 4-*tert*-butyl substituent, as it enhances binding affinity as well.^[12] Although 3-methoxy-substituted **1 k** (PTM0040, $pK_i = 4.35 \pm 0.08$, Table 4, entry 12) showed a lower binding affinity than unsubstituted **1 a** (PTM0029, $pK_i = 4.52 \pm 0.06$, Table 4, entry 2), the pK_i value for the bifunctional compound **1 l** (PTM0038, Table 4, entry 13), with an additional 4-*tert*-butyl group next to the 3-methoxy moiety, increased significantly

(determined by a two-sided t-test, $\alpha = 0.05$) about 0.6 log units (**1 l**, PTM0038: $pK_i = 4.97 \pm 0.02$) relative to the pK_i value of compound **1 a** (PTM0029). With a pK_i value even 0.24 log units above the respective value of MB327, **1 l** (PTM0038) showed the highest affinity toward the MB327 binding site of all compounds synthesized in this study. This result underlines not only the positive effect of the *tert*-butyl group at the 4-position of the pyridinium ring, but also demonstrates the possibility to improve binding affinity toward the MB327 binding site by a synergistic effect of two functional groups, in this case with an additional 3-methoxy moiety, even if the latter alone has a rather negative effect.

Binding affinities of compounds with a 3-methoxypyridinium motive (**4 a–c**, PTM0042, PTM0043, PTM0044, Table 4, entries 24–26) were distributed within a small range from $pK_i = 4.40 \pm 0.06$ for 4-Me derivative **4 a** (PTM0042) to $pK_i = 4.64 \pm 0.09$ for 4-NMe₂-substituted **4 b** (PTM0043). In line with the results obtained for 4-*tert*-butylpyridinium compounds **1 a–l** (PTM0029, PTM0030, PTM0035, PTM0037, PTM0038, PTM0040, PTM0049-0053, PTM0056), the highest binding affinity was found for NMe₂-substituted **4 b** (PTM0043).

Nevertheless, the 4-*tert*-butylpyridinium analogue **1 h** displays a clearly higher binding affinity (PTM0056, $pK_i = 4.90 \pm 0.06$, Table 4, entry 9) than the 3-methoxypyridinium salt **4 b** (PTM0043, $pK_i = 4.64 \pm 0.09$, Table 4, entry 25). Hence, the 4-*tert*-butylpyridinium motive still appears to be better suited as a subunit for the development of new bisquaternary *N*-aromatic re-sensitizers with high potency.

Next, analogues of the bispyridinium salts in which one of the two pyridinium rings was replaced by a nitrogen containing heteroaromatic were studied (**2 a–e**, PTM0031, PTM0039, PTM0054, PTM0055, PTM0058, Table 4, entries 14–18). Interestingly, *N*-methylimidazolium derivative **2 b** (PTM0031, $pK_i = 4.70 \pm 0.04$, Table 4, entry 15) showed a higher binding affinity than its *tert*-butyl imidazolium analogue **2 c** (PTM0058, $pK_i = 4.40 \pm 0.06$, Table 4, entry 16). Also 3-*tert*-butylpyrazinium salt **2 e** (PTM0055, $pK_i = 4.33 \pm 0.12$, Table 4, entry 18) exhibited decreased binding affinity relative to its 3-*tert*-butylpyridinium analogue **1 c** (PTM0049, $pK_i = 4.50 \pm 0.02$, Table 4, entry 4).

According to these results, *tert*-butyl groups do not have a beneficial effect on binding affinity of *N*-aromatic bisquaternary species toward the MB327 binding site in general, but only in 4-position of bispyridinium systems as observed for MB327 or **1 l** (PTM0038). A relatively low binding affinity was also determined for 1,3-thiazolium derivative **2 d** (PTM0039, $pK_i = 4.30 \pm 0.11$, Table 4, entry 17). Notably, isoquinolinium species **2 a** (PTM0054, $pK_i = 4.90 \pm 0.06$, Table 4, entry 14) revealed one of the highest binding affinities of all tested target compounds, suggesting extended π -systems to be important for binding.

To further expand the scope of structure–affinity relationships, we studied the monocationic MB327 analogue **5** (PTM0060, $pK_i = 4.34 \pm 0.04$, Table 4, entry 27), in which one 4-*tert*-butyl pyridinium ring of MB327 has been replaced by an uncharged 4-*tert*-butylphenyl ring. Apparently, due to the missing quaternary nitrogen atom, **5** (PTM0060) showed a lower binding affinity than bicationic MB327 ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$,



Table 4, entry 1). As a consequence, pyridinium systems or quaternary aromatic nitrogen centers which are able to undergo additional ionic, ion-dipole or cation- π interactions appear to be important parts of compounds targeting the MB327 binding site that cannot be replaced by a sole lipophilic moiety like a phenyl residue.

Finally, the lowest binding affinity of all tested compounds was found for pyridiniumpropylpyridone **3 f** (PTM0036, $pK_i = 3.65 \pm 0.12$, Table 4, entry 23). This result seems to be, again, in accordance with the structure-affinity relationships discussed so far, as the pyridone subunit of **3 f** (PTM0036) misses a cationic center as well as a functional group that contributes to positive target interactions, such as a *tert*-butyl group in 4-position or a NMe₂ group in 3- or 4-position.

Conclusions

In conclusion, 26 novel non-symmetric bispyridinium and related salts with a 4-*tert*-butylpyridinium or 3-methoxypyridinium motive were synthesized and characterized with respect to their binding affinity toward the MB327 binding site at the *Torpedo*-nAChR.

All target compounds were prepared from aromatic *N*-heterocyclic precursors in two consecutive alkylation reactions. By the combination of microwave synthesis with RP-MPLC purification a very efficient and reliable access to a broad variety of highly polar bisquaternary compounds in practical quantities was achieved. The synthetic value of our method is particularly demonstrated by the fact that even less nucleophilic *N*-heterocycles, such as 2-*tert*-butylpyridine or 1,3-thiazole, underwent a smooth alkylation reaction and that a broad variety of functional groups (e.g., COOEt, CONMe₂, OMe, NMe₂ or CF₃) was tolerated.

Binding affinities were determined in MS Binding Assays with [²H₆]MB327 as marker. Altogether, it was found that biscationic compounds exhibiting a 4-*tert*-butylpyridinium motive on one side and an isoquinolinium (**2 a**, PTM0054), 3-dimethylamino (**1 b**, PTM0030), 4-dimethylamino (**1 h**, PTM0056) or 3-methoxy-4-*tert*-butylpyridinium (**1 l**, PTM0038) motive on the opposite side display improved binding affinities relative to that of the unsubstituted analogue **1 a** (PTM0029) possessing pK_i values in the same range as MB327. In contrast, a distinctly lower binding affinity was found for monocationic compounds, that is, without a second quaternary nitrogen atom such as **5** (PTM0060) or **3 f** (PTM0036).

Although none of the synthesized compounds showed a binding affinity much higher than lipophilic substituents carrying MB327, the results shed light on the importance of extended π -systems as well as of ionic, ion-dipole and cation- π interactions for binding toward the MB327 binding site. Interestingly, polar NMe₂-group was identified as fully adequate isostere of the *tert*-butyl group in terms of binding affinity. Regarding the fit into the MB327 binding pocket, non-symmetric compounds presented in this study obviously do not yet exhibit the specific substitution pattern required for favorable interactions with amino acid side chains of the nAChR. Especially the polar site of the putative binding pocket is assumed to be rich

in aspartate, threonine, or tyrosine side chains^[14] which are usually strongly hydrogen bonded by surrounding water molecules. Clearly this removal of the hydration shell requires ligands that exactly match the substitution in the binding pocket, otherwise, binding energy will not be gained, but lost. The information on the influence of polar and lipophilic substituents, ionic interactions as well as extended π -systems on binding affinity gathered in this as well as in the previous study will certainly be of great value for a more rational optimization of the lead structure MB327.^[12] Further in-depth studies on binding interactions at the MB327 binding site and studies associated with the development of new re-sensitizers targeting the nAChR are underway.

Experimental Section

Chemistry

Anhydrous reactions were carried out in vacuum-dried glassware under argon atmosphere. Microwave reactions were performed in sealed glass vials using a CEM Discover SP microwave synthesizer. THF, Et₂O, 1,4-dioxane and CH₂Cl₂ were distilled prior to use under nitrogen atmosphere and dried according to standard procedures.^[22] All other chemicals were used as purchased from commercial sources and solvents were distilled before use. TLC was carried out using plates purchased from Merck (silica gel 60F₂₅₄ on aluminum sheet). Medium pressure liquid chromatography (MPLC) was carried out using a Büchi preparative chromatography system with YMC-Triart Prep C18-S (reversed phase, 20 μ m mesh size) or YMC SIL-HG (normal phase, 20 μ m mesh size) silica gel as stationary phase. Flash column chromatography (FC) was performed using Merck silica gel 60 (40–63 μ m mesh size) as stationary phase. Melting points were determined with a Büchi 510 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectroscopy was performed using an FT-IR Spectrometer 1600 and Paragon 1000 (PerkinElmer); oils were measured as film and solid samples as KBr pellets. High-resolution (HR) mass spectrometry was performed on a Finnigan MAT 95 (EI), Finnigan LTQ FT (ESI) and Jeol JMS 700 MStation (FAB). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker BioSpin Avance III HD 400 and 500 MHz (equipped with a Prodigy™ cryoprobe) using TMS as internal standard and integrated with MestReNova (Version 10.0.2), Mestrelab Research S.L. 2015. The purity of the test compounds was determined by means of quantitative NMR using Sigma Aldrich TraceCERT® maleic acid or dimethylsulfone as internal calibrants.^[23,24] The purity of all tested compounds was >95%. See the Supporting Information for the characterization data of the described compounds.

The following compounds were prepared according to literature: 3-Bromopropyl trifluoromethanesulfonate (**33**),^[25,26] 2-*tert*-butylpyridine (**31**),^[27] 4-(*tert*-butyl)-3-methoxypyridine (**21**),^[28] 2-isopropylpyridine (**30**),^[12] 3-*tert*-butylpyridine (**13**),^[12] 1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazole (**24**),^[29] 1-[4-(*tert*-Butyl)phenyl]-3-chloropropan-1-ol (**35**).^[18,19]

General procedures

Synthesis of *N*-(3-bromopropyl)pyridinium salts (GP1): A) The corresponding pyridine derivative (1.0 equiv) was added to a solution of 3-bromopropyl trifluoromethanesulfonate (**33**, 1.25 equiv) in CH₂Cl₂ and the resulting mixture was stirred for the indicated period at room temperature and/or 50 °C. The solvent was re-



moved in vacuo and the crude product was purified by FC. B) 3-Bromopropyl trifluoromethanesulfonate (**33**, 1.25 equiv) was added dropwise to the corresponding pyridine derivative (1.0 equiv) and the resulting mixture was stirred at given reaction conditions. The mixture was allowed to cool to room temperature and the crude product was purified by crystallization from EtOAc.

Synthesis of non-symmetric diiodide target compounds by a substitution reaction of *N*-(3-iodopropyl)pyridinium salts with *N*-heterocycles (GP2): The corresponding pyridine derivative (1.2 equiv) was added to a solution of the respective *N*-(3-iodopropyl)pyridinium salt (1.0 equiv) in MeCN (2 mLmmol⁻¹) and the resulting reaction mixture was stirred at 90 or 120 °C for 1, 3 or 16 h under microwave conditions (150 W). The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by RP-MPLC. The resulting highly viscous liquid was dissolved in double-distilled H₂O (8 mLmmol⁻¹) and lyophilized to obtain the corresponding salt as a solid. In case of hygroscopic products, the purified material was treated repeatedly with EtOAc (3 × 10 mLmmol⁻¹) and the solvent was removed under reduced pressure. If mentioned, the crude product was purified by crystallization instead of RP-MPLC.

Synthesis of non-symmetric dichloride target compounds by a substitution reaction of *N*-(3-bromopropyl)pyridinium salts with 4-*tert*-butylpyridine (GP3): 4-*tert*-Butylpyridine (**6**) was added to a suspension/solution of the corresponding *N*-(3-bromopropyl)pyridinium salt (1.0 equiv, prepared according to GP1) in MeCN (2 mLmmol⁻¹) and the resulting mixture was stirred for 3 h at 90 °C under microwave conditions (150 W). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in double-distilled H₂O (40 mLmmol⁻¹). Amberlite® IRA-410 Cl⁻ form ion-exchange resin (20 gmmol⁻¹, 50 meqmmol⁻¹) was added to the aqueous solution and the resulting suspension was vigorously stirred for 16 h at room temperature. The resin was removed by filtration, washed with double-distilled H₂O (65 mLmmol⁻¹) and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by RP-MPLC and the resulting highly viscous liquid was dissolved in double-distilled H₂O (8 mLmmol⁻¹) and lyophilized to obtain the corresponding salt as a solid. In case of hygroscopic products, the purified material was treated repeatedly with EtOAc (3 × 10 mLmmol⁻¹) and the solvent was removed under reduced pressure. If mentioned, the crude product was purified by crystallization instead of RP-MPLC.

Synthesized compounds

***N*-Alkylpyridinium salts:** 4-(*tert*-Butyl)-1-(3-iodopropyl)pyridin-1-ium iodide (**10a**, yellow solid, 74%), 1-(3-iodopropyl)-3-methoxy-pyridin-1-ium iodide (**10b**, yellow solid, 70%), 1-(3-iodopropyl)-4-(trifluoromethyl)pyridin-1-ium iodide (**10c**, yellow solid, 75%), 1-(3-bromopropyl)-2,6-dimethylpyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**34a**, colorless solid, 83%), 1-(3-bromopropyl)-2,4,6-trimethylpyridin-1-ium trifluoromethane-sulfonate (**34b**, colorless solid, 81%), 1-(3-bromopropyl)-2-isopropylpyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**34c**, colorless solid, 78%), 1-(3-bromopropyl)-2-(*tert*-butyl)-pyridin-1-ium trifluoromethane-sulfonate (**34d**, colorless solid, 67%), 1-(3-bromopropyl)-2-methoxy-pyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**34e**, colorless solid, 96%).

Compounds 1a–l: 4-(*tert*-Butyl)-1-[3-(pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**1a**, colorless hygroscopic solid, 52%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-(dimethylamino)-pyridin-1-ium diiodide (**1b**, yellow hygroscopic solid, 51%), 3-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide

(**1c**, yellow solid, 94%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-(ethoxycarbonyl)-pyridin-1-ium diiodide (**1d**, yellow solid, 82%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-(trifluoromethyl)-pyridin-1-ium diiodide (**1e**, yellow solid, 61%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-pyridin-1-ium diiodide (**1f**, orange solid, 73%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-(dimethylcarbamoyl)-pyridin-1-ium diiodide (**1g**, yellow solid, 87%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(dimethylamino)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-pyridin-1-ium diiodide (**1h**, yellow solid, 95%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3,5-dimethylpyridin-1-ium diiodide (**1i**, yellow solid, 87%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-methylpyridin-1-ium diiodide (**1j**, yellow solid, 86%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-methoxy-pyridin-1-ium diiodide (**1k**, yellow solid, 78%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-methoxy-pyridin-1-ium diiodide (**1l**, as a yellow solid, 85%).

Compounds 2a–e: 2-[3-(4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]isoquinolin-2-ium diiodide (**2a**, yellow solid, 96%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**2b**, slightly yellowish solid, 80%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**2c**, yellow solid, 99%), 3-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]thiazol-3-ium diiodide (**2d**, yellow solid, 89%), 3-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyrazin-1-ium diiodide (**2e**, yellow solid, 87%).

Compounds 3a–f: 1-[3-(4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-2,6-dimethylpyridin-1-ium dichloride (**3a**, colorless solid, 78%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-2,4,6-trimethylpyridin-1-ium dichloride (**3b**, colorless solid, 85%), 1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-2-isopropylpyridin-1-ium dichloride (**3c**, colorless solid, 94%), 2-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium dichloride (**3d**, slightly hygroscopic and colorless solid, 90%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(2-oxopyridin-1(2*H*)-yl)propyl]pyridin-1-ium chloride (**3f**, colorless and moderately hygroscopic solid, 90%).

Compounds 4a–c: 3-Methoxy-1-[3-(4-methylpyridin-1-ium-1-yl)propyl]-pyridin-1-ium diiodide (**4a**, yellow solid, 83%), 1-[3-(4-(dimethylamino)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]-3-methoxy-pyridin-1-ium diiodide (**4b**, yellow solid, 70%), 3-methoxy-1-[3-(4-(trifluoromethyl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**4c**, yellow solid, 62%).

Compound 5: 1-(*tert*-Butyl)-4-(3-chloropropyl)benzene (**36**, colorless liquid, 90%), 4-(*tert*-butyl)-1-[3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)propyl]pyridin-1-ium chloride (**5**, colorless and less hygroscopic solid, 90%).

Biological evaluation—MS Binding Assays

MS Binding Assays were performed with [³H]₆MB327 as marker and nAChR-enriched membranes, prepared from *Torpedo californica* electroplaque tissue, as previously described.^[11,12]

Supporting Information

Synthetic procedures and analytical characterization of all compounds can be found in the Supporting Information.

Acknowledgements

This study was funded by the German Ministry of Defense (E/U2AD/CF514/DF561).



Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: bispyridinium · drug design · microwave chemistry · MS binding assays · re-sensitizers

- [1] E. Dolgin, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1194–1195.
[2] J. Newmark, *Neurologist*. **2007**, *13*, 20–32.
[3] F. R. Sidell, J. Borak, *Ann. Emerg. Med.* **1992**, *21*, 865–871.
[4] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille, *Chem.-Biol. Interact.* **2016**, *259*, 93–98.
[5] D. Gunnell, M. Eddleston, M. R. Phillips, F. Konradsen, *BMC Public Health* **2007**, *7*, 357.
[6] R. D. Sheridan, A. P. Smith, S. R. Turner, J. E. H. Tattersall, *J. R. Soc. Med.* **2005**, *98*, 114–115.
[7] F. Worek, L. Szinicz, P. Eyer, H. Thiermann, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *209*, 193–202.
[8] R. A. Maselli, C. Leung, *Muscle Nerve* **1993**, *16*, 548–553.
[9] T. Seeger, M. Eichhorn, M. Lindner, K. V. Niessen, J. E. H. Tattersall, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicology* **2012**, *294*, 80–84.
[10] K. V. Niessen, S. Muschik, F. Langguth, S. Rappenglück, T. Seeger, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. Lett.* **2016**, *247*, 1–10.
[11] S. Sichler, G. Höfner, S. Rappenglück, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, F. F. Paintner, K. T. Wanner, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 172–183.
[12] S. Rappenglück, S. Sichler, G. Höfner, T. Wein, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1806–1816.
[13] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989.
[14] T. Wein, G. Höfner, S. Rappenglück, S. Sichler, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 184–189.
[15] L. Cecchi, F. D. Sarlo, F. Machetti, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4852–4860.
[16] F. Tao, S. L. Bernasek, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4815–4823.
[17] C. Ögretir, S. Demirayak, N. F. Tay, M. Duran, *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 422–426.
[18] C. Gronnier, S. Kramer, Y. Odabachian, F. Gagosz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 828–831.
[19] A. Gomtsyan, E. K. Bayburt, R. G. Schmidt, C. S. Surowy, P. Honore, K. C. Marsh, S. M. Hannick, H. A. McDonald, J. M. Wetter, J. P. Sullivan, M. F. Jarvis, C. R. Faltynek, C.-H. Lee, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 392–395.
[20] M. S. Gowda, S. S. Pande, R. A. Ramakrishna, K. R. Prabhu, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5365–5368.
[21] J. I. Perlmutter, L. T. Forbes, D. J. Krysan, K. Ebsworth-Mojica, J. M. Colquhoun, J. L. Wang, P. M. Dunman, D. P. Flaherty, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8540–8562.
[22] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, New York, **1988**.
[23] M. Cushman, G. I. Georg, U. Holzgrabe, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9219.
[24] G. F. Pauli, S.-N. Chen, C. Simmler, D. C. Lankin, T. Gödecke, B. U. Jaki, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, J. G. Napolitano, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9220–9231.
[25] C. L. Hugelshofer, K. T. Mellem, A. G. Myers, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3134–3137.
[26] M. Sajadi, F. Berndt, C. Richter, M. Gerecke, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1845–1849.
[27] T. W. Bell, L. Y. Hu, S. V. Patel, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3847–3850.
[28] S. Rappenglück, K. V. Niessen, T. Seeger, F. Worek, H. Thiermann, K. T. Wanner, *Synthesis* **2017**, *49*, 4055–4064.
[29] C. H. Leung, A. R. Chianese, B. R. Garrett, C. S. Letko, R. H. Crabtree, *Inorg. Synth.* **2010**, *35*, 84–87.

Manuscript received: August 9, 2018

Revised manuscript received: September 28, 2018

Accepted manuscript online: October 26, 2018

Version of record online: November 27, 2018



Supporting Information

Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor

Sebastian Rappenglück^{+, [a]} Sonja Sichler^{+, [a]} Georg Höfner^{, [a]} Thomas Wein^{, [a]}
Karin V. Niessen^{, [b]} Thomas Seeger^{, [b]} Franz F. Paintner^{, [a]} Franz Worek^{, [b]} Horst Thiermann^{, [b]}
and Klaus T. Wanner^{*[a]}

cmdc_201800539_sm_miscellaneous_information.pdf

Experimental Procedures and Analytical Data of Synthesized Compounds

4-(*tert*-Butyl)-1-(3-iodopropyl)pyridin-1-ium iodide (**10 a**)

9 (11.8 g, 40.0 mmol, 4.59 mL, 4.0 eq.) was added to a solution of **6** (1.35 g, 10.0 mmol, 1.46 mL, 1.0 eq.) in MeCN (20 mL) and the resulting mixture was stirred for 1 h at 90 °C under microwave conditions (150 W). The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and the crude product was precipitated by addition of Et₂O (120 mL). Subsequent purification by FC (first purification: SiO₂, CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH = 9:1; second purification: SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9:1) afforded **10 a** (3.19 g, 74%) as a yellow solid.

$R_f=0.25-0.50$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); mp: 154–155 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta=1.45$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.53 (quin., $J=6.9$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 3.27 (t, $J=6.8$ Hz, 2 H, CH₂I), 4.69 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H, NCH₂), 8.13–8.17 (m, 2 H, NCHCH), 8.86–8.90 ppm (m, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): $\delta=-0.56$ (CH₂I), 30.24 (C(CH₃)₃), 35.46 (NCH₂CH₂), 37.67 (CC(CH₃)₃), 62.27 (NCH₂), 126.80 (NCHCH), 145.44 (NCHCH), 173.14 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3073, 3016, 2965, 2866, 1991, 1636, 1557, 1511, 1460, 1438, 1373, 1330, 1306, 1271, 1239, 1228, 1190, 1111, 991, 926, 881, 866, 847, 789, 735, 577$ cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₁₂H₁₉IN: 304.0557, found: 304.0563.

1-(3-Iodopropyl)-3-methoxypyridin-1-ium iodide (**10 b**)

9 (12.5 g, 42.4 mmol, 4.87 mL, 4.0 eq.) was added to a solution of **7** (1.19 g, 10.6 mmol, 1.10 mL, 1.0 eq.) in MeCN (21 mL) and the resulting mixture was stirred for 1 h at 90 °C under microwave conditions (150 W). The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and the crude product was precipitated by adding successively Et₂O (80 mL), EtOAc (20 mL), MeOH (20 mL) and again Et₂O (100 mL). Subsequent purification by FC (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9:1) and lyophilization of the resulting highly viscous liquid in H₂O bidest. (5 mL) afforded **10 b** (3.02 g, 70%) as a yellow solid.

$R_f=0.20$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); mp: 97 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta=2.56$ (quin., $J=7.0$ Hz, 2 H, CH₂I), 3.27 (t, $J=6.9$ Hz, 2 H, CH₂CH₂I), 4.08 (s, 3 H, OCH₃), 4.72 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H, NCH₂), 8.02 (dd, $J=8.8/6.0$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.20 (ddd,

$J=8.8/2.6/0.7$ Hz, 1 H, NCHCH), 8.62 (d, $J=5.9$ Hz, 1 H, NCHCH), 8.80–8.83 ppm (m, 1 H, NCHCOCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): $\delta=-0.76$ (CH₂l), 35.59 (CH₂CH₂l), 58.24 (OCH₃), 63.52 (NCH₂), 129.92 (NCHCHCH), 132.08 (NCHCH), 133.86 (NCHCOCH₃), 138.34 (NCHCH), 160.64 ppm (COCH₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3130, 3082, 3044, 3023, 2983, 2958, 2933, 2842, 1997, 1622, 1594, 1505, 1478, 1446, 1431, 1423, 1356, 1328, 1289, 1269, 1217, 1197, 1171, 1150, 1127, 1098, 1039, 997, 950, 893, 863, 854, 807, 765, 715, 670, 561, 503$ cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [M-I]⁺ calcd for C₉H₁₃INO: 278.0036, found: 278.0033.

1-(3-Iodopropyl)-4-(trifluoromethyl)pyridin-1-ium iodide (10 c)

9 (4.14 g, 14.0 mmol, 1.61 mL, 4.0 eq.) was added to a solution of **8** (515 mg, 3.50 mmol, 400 μ L, 1.0 eq) in MeCN (7 mL) and the resulting mixture was stirred for 16 h at 90 °C under microwave conditions (150 W). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by FC (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9:1) yielding **10 c** (1.16 g, 75%) as a yellow solid.

$R_f=0.1-0.4$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); mp: 88–90 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta=2.55$ (quin., $J=7.1$ Hz, 2 H, CH₂CH₂l), 3.27 (t, $J=7.0$ Hz, 2 H, CH₂l), 4.81 (t, $J=7.3$ Hz, 2 H, NCH₂), 8.36–8.40 (m, 2 H, NCHCH), 9.18 ppm (d, $J=6.5$ Hz, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): $\delta=-0.22$ (CH₂l), 35.03 (CH₂CH₂l), 63.51 (t, $J=3.4$ Hz, NCH₂), 122.08 (q, $J=275.2$ Hz, CF₃), 126.27 (q, $J=3.2$ Hz, NCHCH), 145.50 (q, $J=36.5$ Hz, CCF₃), 147.90 ppm (t, $J=8.9$ Hz, NCH); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3113, 3040, 3010, 2951, 2856, 1649, 1582, 1463, 1425, 1324, 1288, 1188, 1155, 1124, 1108, 1080, 1048, 968, 852, 766, 745, 733, 658, 643$ cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [M-I]⁺ calcd for C₉H₁₀F₃IN: 315.9805, found: 315.9802.

1-(3-Bromopropyl)-2,6-dimethylpyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (34 a)

According to GP1A, with **33** (678 mg, 2.50 mmol, 1.25 eq.) and **28** (214 mg, 2.00 mmol, 232 μ L, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL). Reaction time: 16 h at room temperature and 1 h at 50 °C. Purification by FC (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9:1) afforded **34 a** (628 mg, 83%) as a colorless solid.

$R_f=0.1-0.3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); mp: 76 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta=2.31-2.41$ (m, 2 H, NCH₂CH₂), 2.83 (s, 6 H, CH₃), 3.66 (t, $J=6.2$ Hz, 2 H, CH₂Br), 4.51–4.59 (m, 2 H, NCH₂), 7.71 (d, $J=7.9$ Hz, 2 H, NC(CH₃)CH), 8.19 ppm (t, $J=7.9$ Hz, 1 H,

CHCHCH); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN): δ =21.72 (CH_3), 30.65 (CH_2Br), 31.16 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 52.87 (NCH_2), 122.15 (q, J =320.7 Hz, CF_3), 129.24 ($\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CH}$), 145.70 (CHCHCH), 156.93 ppm (CCH_3); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3073, 3026, 2983, 2952, 1626, 1591, 1495, 1461, 1413, 1388, 1371, 1264, 1226, 1174, 1157, 1031, 990, 900, 854, 820, 806, 766, 755, 691, 638, 572, 560, 517 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-TfO}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{BrN}$: 228.0382, found: 228.0383.

1-(3-Bromopropyl)-2,4,6-trimethylpyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (34 b)

According to GP1A, with **33** (576 mg, 2.13 mmol, 1.25 eq.) and **29** (206 mg, 1.70 mmol, 225 μL , 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (5 mL). Reaction time: 16 h at room temperature and 1 h at 50 °C. Purification by FC (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 9:1) afforded **34 b** (538 mg, 81%) as a colorless solid.

R_f =0.1–0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); mp: 53°C; ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ =2.29–2.37 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 2.49 (s, 3 H, $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CHCCH}_3$), 2.76 (s, 6 H, NCCH_3), 3.64 (t, J =6.2 Hz, 2 H, CH_2Br), 4.44–4.51 (m, 2 H, NCH_2), 7.54 ppm (s, 2 H, CH); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3CN): δ =21.43 (NCCH_3), 21.59 $\text{NC}(\text{CH}_3)\text{CHCCH}_3$, 30.68 (CH_2Br), 31.31 (NCH_2CH_2), 52.12 (NCH_2), 122.21 (q, J =320.8 Hz, CF_3), 129.67 (CH), 155.56 (NCCH_3), 159.43 ppm (NCCH_3); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3071, 3006, 2981, 2923, 1644, 1583, 1508, 1483, 1471, 1456, 1421, 1380, 1327, 1259, 1159, 1030, 1071, 1030, 990, 922, 871, 843, 764, 755, 718, 638, 571, 517 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-TfO}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{BrN}$: 242.0539, found: 242.0538.

1-(3-Bromopropyl)-2-isopropylpyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (34 c)

According to GP1B, with **33** (643 mg, 2.37 mmol, 1.25 eq.) and **30** (230 mg, 1.90 mmol, 1.0 eq.) at 50 °C. Reaction time: 3 h. Crystallization from EtOAc (1 mL) by dropwise addition of Et_2O (3.5 mL) afforded **34 c** (584 mg, 78%) as a colorless solid.

mp: 93°C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ =1.41 (s, 6 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.42–2.50 (m, 2 H, CH_2Br), 3.47–3.60 (m, 3 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.62–4.67 (m, 2 H, NCH_2), 7.82 (ddd, J =7.6/6.5/1.4 Hz, 1 H, NCHCH), 7.98–8.03 (m, 1 H, NCHCHCHCH), 8.39–8.46 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.58 ppm (dd, J =6.3/1.1 Hz, 1 H, NCH); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN): δ =22.51 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.03 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 31.12 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 34.37 (CH_2Br), 57.40 (NCH_2), 119.38–124.86 (m, CF_3), 126.81 (NCHCH), 127.82 (NCHCHCHCH), 146.42 (NCH), 147.05 (NCHCHCH), 165.41 ppm ($\text{NC}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3155,

3097, 3058, 2988, 1632, 1579, 1516, 1479, 1454, 1431, 1396, 1366, 1279, 1255, 1237, 1225, 1164, 984, 895, 854, 812, 795, 769, 756, 640, 572, 555, 538, 517, 469 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-TfO}^-$] $^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{BrN}$: 242.0539, found: 242.0539.

1-(3-Bromopropyl)-2-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**34 d**)

According to GP1B, with **33** (551 mg, 2.03 mmol, 1.25 eq.) and **31** (220 mg, 1.63 mmol, 1.0 eq.) at 85 °C. Reaction time: 1.5 h. Recrystallization from EtOAc (4 mL) afforded **34 d** (441 mg, 67%) as a colorless solid.

mp: 102 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ =1.61 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.49–2.58 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 3.66 (t, J =6.3 Hz, 2 H, CH_2Br), 4.80–4.88 (m, 2 H, NCH_2), 7.89 (ddd, J =7.7/6.4/1.5 Hz, 1 H, NCHCH), 8.10 (dd, J =8.4/1.3 Hz, 1 H, NCHCHCHCH), 8.40 (ddd, J =8.5/7.6/1.6 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.62–8.66 ppm (m, 1 H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN): δ =30.16 (CH_2Br), 30.55 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35.48 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 38.66 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.37 (NCH_2), 117.10–127.03 (m, CF_3), 127.27 (NCHCH), 128.66 (NCHCHCHCH), 147.08 (NCHCHCH), 148.71 (NCH), 165.59 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3150, 3084, 3063, 2995, 1625, 1577, 1509, 1481, 1444, 1432, 1379, 1260, 1224, 1189, 1160, 1030, 980, 835, 805, 788, 770, 756, 640, 573, 556, 547, 517, 473 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-TfO}^-$] $^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{BrN}$: 256.0695, found: 256.0673.

1-(3-Bromopropyl)-2-methoxypyridin-1-ium trifluoromethanesulfonate (**34 e**)

According to GP1A, with **33** (650 mg, 2.40 mmol, 1.25 eq.) and **32** (214 mg, 1.92 mmol, 200 μL , 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (4.8 mL). Reaction time: 16 h at room temperature. Purification by FC (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 9:1) afforded **34 e** (702 mg, 96%) as a colorless solid.

R_f =0.15–0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); mp: 74 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ =2.42–2.50 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 3.53 (t, J =6.3 Hz, 2 H, CH_2Br), 4.34 (s, 3 H, CH_3), 4.62 (t, J =7.1 Hz, 2 H, NCH_2), 7.55 (ddd, J =7.5/6.4/1.2 Hz, 1 H, NCHCH), 7.72 (d, J =8.9 Hz, 1 H, CH_3OCCH), 8.50 (ddd, J =9.1/7.4/1.8 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.57 ppm (dd, J =6.4/1.7 Hz, 1 H, NCH); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ =29.77 (CH_2Br), 32.64 (NCH_2CH_2), 54.67 (NCH_2), 60.12 (CH_3), 112.80 (CH_3OCCH), 120.21 (NCHCH), 121.82 (q, J =318.5 Hz, CF_3), 144.25 (NCH), 149.61 (NCHCHCH), 162.20 (CH_3OC) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3093, 3063, 1638, 1587, 1521, 1477, 1462, 1441, 1373, 1350, 1316,

1263, 1226, 1158, 1032, 1011, 841, 756, 797, 787, 756, 747, 640, 573, 552, 518, 474 cm^{-1} ; HRMS-ESI m/z [$M\text{-TfO}^-$] $^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{BrNO}$: 230.0175, found: 230.0180.

4-(*tert*-Butyl)-1-[3-(pyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**1 a**)

According to GP2, with **10 a** (647 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq.) and **11** (237 mg, 3.00 mmol, 242 μL , 2.0 eq.) in MeCN (3 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Recrystallization from *i*PrOH/MeCN (6:1, 4 mL) under argon atmosphere afforded **1 a** (398 mg, 52%) as a colorless hygroscopic solid.

mp: 171 °C; ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =1.38 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.66 (quin., $J=7.5$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.68 (t, $J=7.3$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 4.74 (t, $J=7.3$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{NCHCHCH}$), 8.19–8.25 (m, 4 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$, NCHCHCH), 8.63–8.69 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.96–9.00 (m, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 9.08–9.12 ppm (m, 2 H, NCHCHCH); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =30.02 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.97 (NCH_2CH_2), 36.80 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.08 ($\text{CH}_2\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 58.12 ($\text{CH}_2\text{NCHCHCH}$), 125.62 ($\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 128.68 (NCHCHCH), 144.75 ($\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 145.42 (NCHCHCH), 146.35 (NCHCHCH), 170.63 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3483, 3417, 3126, 3041, 3013, 2963, 2865, 1644, 1637, 1605, 1580, 1569, 1518, 1503, 1489, 1471, 1447, 1374, 1366, 1350, 1280, 1201, 1187, 1177, 1156, 1119, 884, 860, 853, 817, 807, 766, 758, 737, 679, 604, 573, cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z [$M\text{-I}^-$] $^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{IN}_2$: 383.0979, found: 383.0985.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-(dimethylamino)pyridin-1-ium diiodide (**1 b**)

According to GP2, with **10 a** (604 mg, 1.40 mmol, 1.0 eq.) and **12** (349 mg, 2.80 mmol, 2.0 eq.) in MeCN (3 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Recrystallization from MeCN (1.5 mL) under argon atmosphere afforded **1 b** (395 mg, 51%) as a yellow hygroscopic solid.

^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =1.37 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.66 (quin., $J=7.1$ Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 3.09 (s, 6 H, NCH_3), 4.62–4.70 (m, 4 H, NCH_2), 7.79 (dd, $J=8.8/2.5$ Hz, 1 H, $\text{CHCN}(\text{CH}_3)_2$), 7.85 (dd, $J=9.0/5.6$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.22–8.19 (m, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 8.22–8.24 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.33–8.38 (m, 1 H, $\text{NCHCN}(\text{CH}_3)_2$), 8.96–9.01 ppm (m, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =30.00 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.00 (NCH_2CH_2), 36.79 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.10 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$),

57.28 (CH₂NCHCHCC(CH₃)₃), 58.31 (CH₂NCHCHCH), 125.56 (NCHCHCC(CH₃)₃), 126.08 (CHCN(CH₃)₂), 127.95 (NCHCN(CH₃)₂, NCHCHCH), 130.85 (NCHCHCH), 144.73 (NCHCHCC(CH₃)₃), 148.69 (NHCN(CH₃)₂), 170.61 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3037, 3008, 2963, 1638, 1617, 1581, 1524, 1466, 1385, 1351, 1274, 1239, 1194, 1157, 1115, 1029, 855, 817, 805, 776, 677, 573 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-I]⁺ calcd for C₁₉H₂₉IN₃: 426.1401, found: 426.1391.

3-(*tert*-Butyl)-1-{3-[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium diiodide (1 c)

According to GP2, with **10 a** (604 mg, 1.40 mmol, 1.0 eq.) and **13** (227 mg, 1.68 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 30:70) afforded **1 c** (743 mg, 94%) as a yellow solid.

RP-MPLC: *t*_R=975 s (C18, MeOH/H₂O 30:70); mp: 221°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ =1.39 (s, 9 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 1.44 (s, 9 H, NHC(C(CH₃)₃)), 2.78 (quin, *J*=8.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.82–4.88 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.88–4.94 (m, 2 H, CH₂NCHC(C(CH₃)₃)), 7.95–8.01 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.06 (d, *J*=6.1 Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.54 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.89 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.02 (d, *J*=6.2 Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.24 ppm (s, 1 H, NHC(C(CH₃)₃)); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ =30.10 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 30.78 (NHC(C(CH₃)₃)), 34.08 (NCH₂CH₂), 35.94 (NHC(C(CH₃)₃)), 37.45 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 57.50 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 58.47 (CH₂NCHC(C(CH₃)₃)), 126.64 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 128.84 (NCHCHCH), 142.97 (NCHCHCH), 143.75 (NHC(C(CH₃)₃)), 144.43 (NCHCHCH), 145.03 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 153.39 (NHC(C(CH₃)₃)), 172.69 ppm (NCHCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3417, 2994, 2962, 2867, 1643, 1565, 1510, 1469, 1445, 1398, 1372, 1345, 1278, 1231, 1205, 1184, 1150, 1116, 1077, 1053, 1029, 993, 935, 915, 868, 853, 840, 810, 766, 738, 714, 687, 578, 567 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-I]⁺ calcd for C₂₁H₃₂IN₂: 439.1605, found: 439.1625.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium diiodide (1 d)

According to GP2, with **10 a** (476 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **14** (202 mg, 1.32 mmol, 183 μ L, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 3 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **1 d** (528 mg, 82%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_R=1500$ s (C18, MeOH/H₂O 15:85); mp: 174°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta=1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.43 (t, $J=7.0$ Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 2.74–2.83 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.48 (q, $J=6.9$ Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 4.84 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.99 (t, $J=7.7$ Hz, 2 H, CH₂NCHCHCH), 8.06 (d, $J=5.7$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.21 (t, $J=6.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.93–9.01 (m, 3 H, NCHCHC(C(CH₃)₃), NCHCHCH), 9.33 (d, $J=5.7$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.60 ppm (s, 1 H, NCHCCO); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): $\delta=14.55$ (OCH₂CH₃), 30.10 (C(CH₃)₃), 33.57 (NCH₂CH₂), 37.46 (C(CH₃)₃), 57.42 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 59.00 (CH₂NCHCHCH), 64.23 (OCH₂CH₃), 126.68 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 129.96 (NCHCHCH), 132.52 (NCHCCO), 145.04 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 146.98 (NCHCHCH, NCHCCO), 147.05 (NCHCHCH), 148.78 (CCO), 172.77 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3044, 2967, 1736, 1639, 1587, 1563, 1514, 1487, 1473, 1424, 1389, 1367, 1321, 1293, 1229, 1193, 1182, 1162, 1115, 1010, 858, 834, 745, 677, 577$ cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₂₀H₂₈N₂O₂: 455.1190, found: 455.1199.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-(trifluoromethyl)pyridin-1-ium diiodide (1 e)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **15** (194 mg, 1.32 mmol, 152 μ L, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 16 h. Recrystallization from EtOH (5 mL) afforded **1 e** (390 mg, 61%) as a yellow solid.

mp: 194°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta=1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.79–2.88 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.84–4.89 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 5.02–5.07 (m, 2 H, CH₂NCHCCF₃), 8.04–8.09 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.29–8.35 (m, 1 H, NCHCHCH), 8.84 (d, $J=8.3$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.98–9.03 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.46 (d, $J=6.2$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.75 ppm (s, 1 H, NCHCCF₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): $\delta=30.10$ (C(CH₃)₃), 33.59 (NCH₂CH₂), 37.46 (C(CH₃)₃), 57.34 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 59.19 (CH₂NCHCCF₃), 122.55 (q, $J=273.0$ Hz, CF₃), 126.71 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 130.71 (NCHCHCH), 131.53 (q, $J=36.4$ Hz, CCF₃), 144.16–144.54 (m, NCHCCF₃, NCHCHCH), 145.04 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 149.61 (NCHCHCH), 172.74 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3010, 2967, 1640, 1593, 1562, 1513, 1468, 1373, 1333, 1275, 1228, 1142, 1114, 1096, 896, 851, 776, 735, 682, 575$ cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₁₈H₂₃F₃N₂: 451.0853, found: 451.0850.

4-(tert-Butyl)-1-{3-[4-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium diiodide (1 f)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **16** (204 mg, 1.32 mmol, 202 μ L, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 3 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 10:90) afforded **1 f** (465 mg, 73%) as an orange solid.

RP-MPLC: t_R =2100 s (C18, MeOH/H₂O 10:90); mp: 162°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ =1.38–1.43 (m, 12 H, C(CH₃)₃, OCH₂CH₃), 2.76–2.86 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.47 (q, J =7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 4.84–4.90 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.98–5.04 (m, 2 H, CH₂NCHCHCCO), 8.04–8.08 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.48 (d, J =6.7 Hz, 2 H, NCHCHCCO), 9.01–9.05 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.36 ppm (d, J =6.9 Hz, 2 H, NCHCHCCO); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): δ =14.32 (OCH₂CH₃), 30.10 (C(CH₃)₃), 33.64 (NCH₂CH₂), 37.46 (C(CH₃)₃), 57.37 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 58.94 (CH₂NCHCHCCO), 64.52 (OCH₂CH₃), 126.67 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 128.85 (NCHCHCCO), 145.05 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 146.57 (NCHCHCCO), 147.34 (NCHCHCCO), 162.93 (NCHCHCCO), 172.72 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3121, 3007, 2967, 2949, 2870, 1731, 1645, 1572, 1518, 1464, 1394, 1371, 1328, 1296, 1214, 1198, 1182, 1129, 1114, 1048, 1018, 875, 857, 847, 807, 765, 686, 660, 574, 538, 506 cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₂₀H₂₈N₂O₂: 455.1190, found: 455.1186.

1-{3-[4-(tert-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-(dimethylcarbamoyl)pyridin-1-ium diiodide (1 g)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **17** (198 mg, 1.32 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 3 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **1 g** (554 mg, 87%) as a yellow solid.

RP-MPLC: t_R =950 s (C18, MeOH/H₂O 15:85); mp: 70°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ =1.38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.66 (quin. J =7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 2.99 (s, 3 H, NCH₃), 3.05 (s, 3 H, NCH₃), 4.69 (t, J =7.3 Hz, 2 H, CH₂NCHCCO), 4.74 (t, J =7.3 Hz, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.23 (d, J =6.9 Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.27 (dd, J =7.8/6.3 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.72 (d, J =8.0 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.99 (d, J =6.9 Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.16 (d, J =6.1 Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.30 ppm (s, 1 H, NCHCCO); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ =30.01 (C(CH₃)₃), 31.92 (NCH₂CH₂), 35.60 (NCH₃), 36.80 (C(CH₃)₃), 39.50 (NCH₃), 57.06 (CH₂NCHCCO), 58.36 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 125.61 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 128.63 (NCHCHCH), 136.50

(CCO), 144.22 (NCHCHCH)*, 144.23 (NCHCCO)*, 144.76 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 145.95 (NCHCHCH), 164.40 (CO), 170.63 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3010, 2963, 1642, 1561, 1512, 1492, 1465, 1399, 1372, 1267, 1229, 1192, 1158, 1113, 1058, 846, 738, 681, 652, 570 cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₃O: 454.1350, found: 454.1341.

4-(*tert*-Butyl)-1-{3-[4-(dimethylamino)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium diiodide (1 h)

According to GP2, with **10 a** (431 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **18** (134 mg, 1.10 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **1 h** (525 mg, 95%) as a yellow solid.

RP-MPLC: t_R =1200 s (C18, MeOH/H₂O 15:85); mp: 261 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ =1.39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.54–2.64 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.18 (s, 6 H, N(CH₃)₂), 4.36–4.42 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(N(CH₃)₂)), 4.71–4.78 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 6.85–6.92 (m, 2 H, NCHCHC(N(CH₃)₂)), 8.01–8.07 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.23–8.29 (m, 2 H, NCHCHC(N(CH₃)₂)), 8.92–8.98 ppm (m, 1 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): δ =30.11 (C(CH₃)₃), 33.26 (NCH₂CH₂), 37.43 (C(CH₃)₃), 40.82 (N(CH₃)₂), 54.66 (CH₂NCHCHC(N(CH₃)₂)), 57.83 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 108.94 (NCHCHC(N(CH₃)₂)), 126.60 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 142.89 (NCHCHC(N(CH₃)₂)), 145.00 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 157.54 (NCHCHC(N(CH₃)₂)), 172.55 ppm (NCHCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3013, 2962, 1652, 1575, 1536, 1518, 1469, 1454, 1427, 1404, 1373, 1352, 1279, 1232, 1211, 1200, 1187, 1119, 1067, 1036, 946, 858, 834, 808, 743, 578, 529, 507 cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [$M-I$]⁺ calcd for C₁₉H₂₉N₃: 426.1401, found: 426.1405.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3,5-dimethylpyridin-1-ium diiodide (1 i)

According to GP2, with **10 a** (431 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **19** (130 mg, 1.20 mmol, 140 μ L, 1.2 eq.) in MeCN (2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 10:90 → 15:85) afforded **1 i** (467 mg, 87%) as a yellow solid.

RP-MPLC: t_R =470 s (MeOH/H₂O 15:85); mp: 177 °C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): δ =1.38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.47 (s, 6 H, CHCCH₃), 2.66 (quin., J =7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.63 (t, J =7.2 Hz, 2 H, CH₂NCHCCH₃), 4.68 (t, J =7.3 Hz, 2 H,

$\text{CH}_2\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$, 8.20–8.25 (m, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 8.35 (br. s, 1 H, $\text{CH}_3\text{CCHCCH}_3$), 8.84 (br. s, 2 H, NCHCCH_3), 8.97–9.01 ppm (m, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =17.63 (CHCCH_3), 29.38 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.08 (NCH_2CH_2), 36.17 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 56.50 ($\text{CH}_2\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 57.19 ($\text{CH}_2\text{NCHCCH}_3$), 124.95 ($\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 137.80 (CHCCH_3), 141.56 (NCHCCH_3), 144.11 ($\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 146.36 ($\text{CH}_3\text{CCHCCH}_3$), 170.01 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3128, 3032, 3010, 2966, 2932, 2868, 1639, 1606, 1565, 1510, 1498, 1469, 1444, 1402, 1375, 1361, 1348, 1302, 1276, 1263, 1229, 1211, 1190, 1114, 1052, 1027, 910, 900, 849, 840, 821, 767, 675, 564, 552 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[\text{M}-\text{I}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2$: 411.1292, found: 411.1322.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-methylpyridin-1-ium diiodide (1 j)

According to GP2, with **10 a** (431 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **20** (112 mg, 1.20 mmol, 117 μL , 1.2 eq.) in MeCN (2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/ H_2O = 10:90) afforded **1 j** (450 mg, 86%) as a yellow solid.

RP-MPLC: t_{R} =900 s (MeOH/ H_2O 10:90); mp: 159 °C; ^1H NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =1.38 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.52 (s, 3 H, CH_3), 2.66 (quin., J =7.1 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.68 (t, J =7.1 Hz, 4 H, NCH_2), 8.10 (dd, J =7.9/6.2 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.23 (d, J =7.0 Hz, 2 H, $\text{CHCC}(\text{CH}_3)_3$), 8.49 (d, J =7.8 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.92 (d, J =6.0 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.99 (d, J =7.0 Hz, 2 H, $\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 9.02 ppm (s, 1 H, NCHCCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ =17.79 (CHCCH_3), 29.38 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.21 (NCH_2CH_2), 36.17 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 56.46 (NCH_2), 57.31 (NCH_2), 124.97 ($\text{CHCC}(\text{CH}_3)_3$), 127.33 (NCHCHCH), 138.61 (CHCCH_3), 142.01 (NCHCHCH), 144.11 ($\text{NCHCHCC}(\text{CH}_3)_3$), 144.24 (NCHCCH_3), 145.96 (NCHCHCH), 170.00 ppm ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3511, 3430, 3080, 3042, 3005, 2966, 2867, 1638, 1590, 1562, 1508, 1471, 1456, 1420, 1373, 1353, 1275, 1250, 1231, 1205, 1193, 1163, 1114, 1083, 1047, 1032, 994, 929, 913, 864, 853, 808, 776, 679, 580, 5442 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[\text{M}-\text{I}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2$: 397.1135, found: 397.1164.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-methoxypyridin-1-ium diiodide (1 k)

According to GP2, with **10 a** (438 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq.) and **7** (137 mg, 1.22 mmol, 127 μL , 1.2 eq.) in MeCN (2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/ H_2O = 10:90) afforded **1 k** (430 mg, 78%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_R=1300$ s (MeOH/H₂O 10:90); mp: 117°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=1.38$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.66 (quin., $J=7.0$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.03 (s, 3 H, OCH₃), 4.66 (t, $J=7.4$ Hz, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.71 (t, $J=7.1$ Hz, 2 H, CH₂NCHCOCH₃), 8.13 (dd, $J=8.8/5.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.22 (d, $J=6.9$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.28 (dd, $J=8.7/2.3$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.93–8.96 (m, 1 H, NCHCOCH₃), 8.98 ppm (d, $J=6.9$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=30.01$ (C(CH₃)₃), 31.91 (NCH₂CH₂), 36.80 (C(CH₃)₃), 57.07 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 57.98 (OCH₃), 58.36 (CH₂NCHCOCH₃), 125.59 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 129.04 (NCHCHCH), 131.07 (NCHCHCH), 133.33 (NCHCOCH₃), 137.76 (NCHCHCH), 144.75 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 158.51 (NCHCOCH₃), 170.64 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3013, 2966, 1639, 1585, 1567, 1512, 1468, 1373, 1339, 1296, 1233, 1192, 1164, 1116, 1045, 1008, 933, 906, 848, 817, 778, 743, 570$ cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [M-Cl]⁺ calcd for C₁₈H₂₆IN₂O: 413.1084, found: 413.1082.

4-(tert-Butyl)-1-{3-[4-(tert-butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-methoxypyridin-1-ium diiodide (1 I)

According to GP2, with **10 a** (431 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **21** (198 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 30:70) afforded **1 I** (508 mg, 85%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_R=1300$ s (MeOH/H₂O 30:70); mp: 209°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=1.38$ (s, 9 H, CHC(C(CH₃)₃)CH), 1.40 (s, 9 H, CH₃OCC(C(CH₃)₃)), 2.68 (quin., $J=7.3$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.09 (s, 3 H, OCH₃), 4.70 (dt, $J=10.5/7.4$ Hz, 4 H, NCH₂), 7.96 (d, $J=6.3$ Hz, 1 H, CH₃OCC(C(CH₃)₃)CH), 8.24 (d, $J=7.0$ Hz, 2 H, CHC(C(CH₃)₃)CH), 8.66–8.70 (m, 1 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)COCH₃), 8.80–8.83 (m, 1 H, NCHCOCH₃), 9.01 ppm (d, $J=7.0$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)CH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=28.38$ (CHC(C(CH₃)₃)CH), 30.02 (CH₃OCC(C(CH₃)₃)), 31.96 (NCH₂CH₂), 36.58 (CH₃OCC(C(CH₃)₃)), 36.81 (CHC(C(CH₃)₃)CH), 57.13 (CH₂NCHCOCH₃), 57.59 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)CH), 58.27 (OCH₃), 125.52 (NCHCHC(C(CH₃)₃)COCH₃), 125.61 (NCHCHC(C(CH₃)₃)CH), 129.43 (NCHCOCH₃), 138.15 (CH₃OCC(C(CH₃)₃)CHCH), 144.74 (NCHCHC(C(CH₃)₃)CH), 156.10 (CH₃OCC(C(CH₃)₃)), 157.09 (CH₃OC), 170.64 ppm (NCHCHC(C(CH₃)₃)CH); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3119, 3015, 2965, 2869, 1642, 1563, 1507, 1477, 1459, 1441, 1396, 1367, 1360, 1343, 1312, 1278, 1230, 1194, 1116, 1098, 1065, 1049, 1027, 973, 957, 889,$

871, 854, 819, 740, 700, 677, 630, 573, 559, 530 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M-I]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: 469.1710, found: 469.1692.

2-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}isoquinolin-2-ium diiodide (**2 a**)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **22** (170 mg, 1.32 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 50:50) afforded **2 a** (591 mg, 96%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_R=460$ s (C18, MeOH/H₂O 50:50); mp: 173°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta=1.37$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.84–2.95 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.86–4.93 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.99–5.07 (m, 2 H, CH₂NCHCC), 8.02–8.09 (m, 3 H, NCHCHC(C(CH₃)₃), NCHCCHCH), 8.18–8.27 (m, 2 H, NCHCCHCHCH), 8.28 (d, $J=8.0$ Hz, 1 H, NCHCCCH), 8.45 (d, $J=6.8$ Hz, 1 H, NCHCHCC), 8.52 (d, $J=8.9$ Hz, 1 H, NCHCCH), 8.78 (dd, $J=6.8/1.4$ Hz, 1 H, NCHCHCC), 9.03 (d, $J=7.1$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 10.30 ppm (s, 1 H, NCHCC); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): $\delta=30.10$ (C(CH₃)₃), 33.40 (NCH₂CH₂), 37.44 (C(CH₃)₃), 57.69 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 58.38 (CH₂NCHCC), 126.66 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 127.58 (NCHCHCC), 128.40 (NCHCCCH), 128.88 (NCHCCH), 131.40 (NCHCCH), 132.60 (NCHCCHCH), 135.68 (NCHCHCC), 138.43 (NCHCCHCHCH), 138.90 (NCHCHCC), 145.06 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 150.95 (NCHCCH), 172.65 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3007, 2965, 2866, 1720, 1642, 1608, 1581, 1568, 1514, 1460, 1399, 1364, 1286, 1277, 1223, 1200, 1182, 1160, 1117, 1066, 1021, 996, 980, 926, 906, 877, 847, 838, 767, 755, 641, 628, 572, 527, 475$ cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[M-I]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2$: 433.1135, found: 433.1129.

4-(*tert*-Butyl)-1-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**2 b**)

According to GP2, with **10 a** (647 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq.) and **23** (246 mg, 3.00 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (3 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Recrystallization from EtOAc/Aceton/MeCN (2/7/1.3 mL) afforded **2 b** (614 mg, 80%) as a slightly yellowish solid.

mp: 148°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta=1.39$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.57–2.65 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.88 (s, 3 H, NCH₃), 4.42 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H, NCHNCH₂), 4.71–4.77 (m, 2 H, CH₂NCHCHCC(CH₃)₃), 7.38 (t, $J=1.8$ Hz, 1 H, CH₃NCHCH), 7.61 (t, $J=1.8$ Hz, 1 H,

CH₃NCHCH), 8.03–8.07 (m, 2 H, NCHCHCC(CH₃)₃), 8.94–8.98 (m, 2 H, NCHCHCC(CH₃)₃), 9.00 ppm (br. s, 1 H, NCHN); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ=30.11 (C(CH₃)₃), 32.36 (NCH₂CH₂), 37.28 (NCH₃), 37.43 (C(CH₃)₃), 47.09 (NCHNCH₂), 57.88 (CH₂NCHCHCC(CH₃)₃), 123.53 (CH₃NCHCH), 124.84 (CH₃NCHCH), 126.61 (NCHCHCC(CH₃)₃), 137.63 (NCHN), 145.08 (NCHCHCC(CH₃)₃), 172.57 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3138, 3056, 2966, 2870, 1639, 1575, 1562, 1512, 1466, 1369, 1352, 1327, 1275, 1197, 1169, 1113, 843, 830, 777, 766, 637, 620, 572 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [*M*-I]⁺ calcd for C₁₆H₂₅IN₃: 386.1088, found: 386.1107.

4-(*tert*-Butyl)-1-{3-[1-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]propyl}pyridin-1-ium diiodide (2 c)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **24** (164 mg, 1.32 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **2 c** (603 mg, 99%) as a yellow solid.

RP-MPLC: *t*_R=1300 s (C18, MeOH/H₂O 15:85); mp: 151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ=1.39 (s, 9 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 1.65 (s, 9 H, NC(CH₃)₃), 2.63–2.72 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.41–4.47 (m, 2 H, CH₂NCHN), 4.72–4.78 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 7.57 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H, CH₂NCHCHN), 7.65 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H, CH₂NCHCHN), 8.03–8.07 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.94–8.98 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.28 ppm (t, *J*=1.7 Hz, 1 H, NCHN); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): δ=29.89 (NC(CH₃)₃), 30.12 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 32.32 (NCH₂CH₂), 37.43 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 47.13 (CH₂NCHN), 58.08 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 61.36 (NC(CH₃)₃), 121.07 (CH₂NCHCHN), 123.78 (CH₂NCHCHN), 126.63 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 135.76 (NCHN), 145.06 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 172.55 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3427, 3374, 3118, 3071, 2961, 2868, 2004, 1733, 1638, 1552, 1513, 1483, 1467, 1451, 1425, 1407, 1373, 1359, 1348, 1310, 1280, 1241, 1207, 1134, 1120, 1113, 1084, 1056, 1035, 982, 937, 850, 817, 780, 742, 690, 657, 629, 570, 537 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [*M*-I]⁺ calcd for C₁₉H₃₁IN₃: 428.1557, found: 428.1562.

3-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}thiazol-3-ium diiodide (2 d)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **25** (198 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 120 °C. Reaction time: 16 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 10:90) afforded **2 d** (504 mg, 89%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_R = 850$ s (MeOH/H₂O 10:90); mp: 180°C; ¹H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 1.38$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.62 (quin., $J = 7.2$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.66 (dt, $J = 10.1/7.3$ Hz, 4 H, NCH₂), 8.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.39 (dd, $J = 3.7/2.4$ Hz, 1 H, NCHCHS), 8.59 (dd, $J = 3.7/1.3$ Hz, 1 H, NCHCHS), 8.98 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 10.19–10.22 ppm (m, 1 H, NCHS); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 30.02$ (C(CH₃)₃), 31.08 (NCH₂CH₂), 36.80 (C(CH₃)₃), 51.94 (CH₂NCHS), 57.14 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 125.60 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 127.56 (NCHCHS), 137.47 (NCHCHS), 144.74 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 160.35 (NCHS), 170.60 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3099, 3047, 3010, 2966, 2952, 2904, 2872, 1644, 1566, 1545, 1516, 1475, 1455, 1421, 1399, 1371, 1341, 1333, 1290, 1278, 1257, 1206, 1182, 1164, 1154, 1116, 1085, 1049, 915, 873, 853, 841, 815, 741, 734, 614, 604, 574, 552, 523$ cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [M-I]⁺ calcd for C₁₅H₂₂N₂S: 389.0543, found: 389.0565.

3-(tert-Butyl)-1-{3-[4-(tert-butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyrazin-1-ium diiodide (2 e)

According to GP2, with **10 a** (474 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) and **26** (185 mg, 1.32 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 120 °C. Reaction time: 16 h. Recrystallization from EtOH (18 mL) afforded **2 e** (539 mg, 87%) as a yellow solid.

mp: 240°C; ¹H NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 0.67$ (s, 9 H, NC(C(CH₃)₃)), 0.74 (s, 9 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 2.05–2.16 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.08–4.13 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 4.17–4.23 (m, 2 H, CH₂NCHCHN), 7.37–7.43 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.22–8.28 (m, 3 H, NCHCHC(C(CH₃)₃), CH₂NCHCHN), 8.54 (s, 1 H, NCHC(C(CH₃)₃)), 8.64 ppm (q, $J = 3.2/2.7$ Hz, 1 H, CH₂NCHCHN); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 29.77$ (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 30.26 (NC(C(CH₃)₃)), 33.27 (NCH₂CH₂), 37.75 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 39.48 (NC(C(CH₃)₃)), 58.15 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 59.97–60.18 (m, CH₂NCHCHN), 126.96 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 135.07–135.57 (m, NCHC(C(CH₃)₃), CH₂NCHCHN), 145.51 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 151.20 ((CH₂NCHCHN), 173.40 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 173.72 ppm (NCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3420, 3004, 2966, 2869, 1644, 1567, 1517, 1483, 1459, 1367, 1298, 1277, 1262, 1193, 1166, 1137, 1115, 1076, 1022, 992, 920, 864, 847, 822, 806, 765, 745, 634, 568$ cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [M-I]⁺ calcd for C₂₀H₃₁N₃: 440.1557, found: 440.1576.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-2,6-dimethylpyridin-1-ium dichloride (3 a)

According to GP3, with **6** (203 mg, 1.50 mmol, 220 μ L, 1.2 eq.) and **34 a** (473 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (2.5 mL). Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 10:90) afforded **3 a** (347 mg, 78%) as a colorless solid.

RP-MPLC: t_R =700 s (MeOH/H₂O 10:90); mp: 238°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ =1.39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.56–2.66 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.00 (s, 6 H, NCCH₃), 4.77–4.85 (m, 2 H, CH₃CNCH₂), 5.17–5.25 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 7.71 (d, J =7.9 Hz, 2 H, NC(CH₃)CH), 8.04 (d, J =7.1 Hz, 2 H, NCHCH), 8.17 (t, J =7.9 Hz, 1 H, NC(CH₃)CHCH), 9.69 ppm (d, J =7.0 Hz, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): δ =22.41 (NCCH₃), 30.13 (C(CH₃)₃), 30.75 (NCH₂CH₂), 37.35 (C(CH₃)₃), 50.98 (CH₃CNCH₂), 57.15 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 126.23 (NCHCH), 129.05 (CHC(CH₃)N), 145.57 (CHCHC(CH₃)N), 145.86 (NCHCH), 157.45 (NCCH₃), 172.22 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3120, 3023, 2966, 1642, 1625, 1586, 1562, 1517, 1495, 1464, 1374, 1275, 1237, 1191, 1114, 1057, 1035, 856, 840, 801, 585 cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [M -Cl]⁺ calcd for C₁₉H₂₈ClN₂: 319.1936, found: 319.1941.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-2,4,6-trimethylpyridin-1-ium dichloride (3 b)

According to GP3, with **6** (202 mg, 1.50 mmol, 219 μ L, 1.2 eq.) and **34 b** (489 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (2.5 mL). Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 10:90) afforded **3 b** (384 mg, 85%) as a colorless solid.

RP-MPLC: t_R =670 s (MeOH/H₂O 10:90); mp: 230°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ =1.38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.47 (s, 3 H, NC(CH₃)CHCCH₃), 2.58 (quin., J =8.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 2.93 (s, 6 H, NCCH₃), 4.70–4.77 (m, 2 H, CH₂NCCH₃), 5.15–5.22 (m, 2 H, CHNCH₂), 7.54 (s, 2 H, CH₃CCH), 8.04 (d, J =6.8 Hz, 2 H, NCHCH), 9.68 ppm (d, J =6.9 Hz, 2 H, NCHCH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ =21.57 (NC(CH₃)CHCCH₃), 22.10 (NCCH₃), 30.13 (C(CH₃)₃), 30.90 (NCH₂CH₂), 50.21 (CH₂NCCH₃), 57.19 (CHNCH₂), 126.21 (NCHCH), 129.50 (CHCCH₃), 145.86 (NCHCH), 156.07 (NCCH₃), 159.22 (NC(CH₃)CHCCH₃), 172.17 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3013, 2964, 2869, 1639, 1574, 1516, 1468, 1418, 1374, 1354, 1318, 1275, 1240, 1195, 1149, 1118, 1061, 1034, 877, 745, 586, 562 cm⁻¹; HRMS-FAB m/z [M -Cl]⁺ calcd for C₂₀H₃₀ClN₂: 333.2092, found: 333.2094.

1-{3-[4-(*tert*-Butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-2-isopropylpyridin-1-ium dichloride (3 c)

According to GP3, with **6** (230 mg, 1.70 mmol, 249 μ L, 1.2 eq.) and **34 c** (555 mg, 1.42 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (2.8 mL). Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **3 c** (497 mg, 94%) as a colorless solid.

RP-MPLC: $t_R=675$ s (MeOH/H₂O 15:85); mp: 102°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta=1.38$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.40 (d, $J=6.7$ Hz, 6 H, (CH(CH₃)₂), 2.68–2.77 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 3.98 (hept, $J=7.6/7.1$ Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 4.97–5.06 (m, 2 H, CH₂NC(CH(CH₃)₂)), 5.13–5.22 (m, 2 H, CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 7.84 (ddd, $J=7.7/6.4/1.5$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 7.98 (dd, $J=8.3/1.2$ Hz, 1 H, NCHCHCHCH), 8.02–8.06 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 8.36–8.42 (m, 1 H, NCHCHCH), 9.55 (d, $J=6.1$ Hz, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 9.71 ppm (d, $J=6.3$ Hz, 1 H, NCHCHCH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): $\delta=22.73$ (CH(CH₃)₂), 30.12 (C(CH₃)₃), 30.94 (CH(CH₃)₂), 34.72 (NCH₂CH₂), 37.32 (C(CH₃)₃), 55.06 (CH₂NC(CH(CH₃)₂)), 57.59 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃)), 126.31 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 126.57 (NCHCHCH), 127.35 (NCHCHCHCH), 145.60 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 146.65 (NCHCHCH), 147.18 (NCHCHCH), 165.64 (C(CH(CH₃)₂)), 172.11 ppm (C(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3441$, 3374, 3023, 2968, 2871, 1641, 1576, 1515, 1476, 1454, 1388, 1372, 1361, 1279, 1247, 1198, 1173, 1162, 1119, 1092, 1065, 1042, 986, 934, 893, 866, 835, 793, 751, 608, 581, 567, 539, 480 cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [M-Cl]⁺ calcd for C₂₀H₃₀ClN₂: 333.2092, found: 333.2092.

2-(*tert*-Butyl)-1-{3-[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium dichloride (3 d)

According to GP3, with **6** (252 mg, 1.86 mmol, 273 μ L, 1.2 eq.) and **34 d** (630 mg, 1.55 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (3.1 mL). Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) afforded **3 d** (537 mg, 90%) as a slightly hygroscopic and colorless solid.

RP-MPLC: $t_R=800$ s (MeOH/H₂O 10:90); mp: 83°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): $\delta=1.38$ (s, 9 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 1.63 (s, 9 H, NC(C(CH₃)₃)), 2.76–2.86 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 5.08–5.15 (m, 4 H, NCH₂), 7.91 (ddd, $J=7.7/6.3/1.5$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.02–8.08 (m, 3 H, NCHCHC(C(CH₃)₃), NCHCHCHCH), 8.37 (ddd, $J=8.5/7.6/1.6$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.55–9.60 (m, 2 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)),

10.07 ppm (dd, $J=6.4/1.5$ Hz, 1 H, NCHCHCH); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN): $\delta=30.12$ (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 30.64 (NC(C(CH₃)₃)), 35.91 (NCH₂CH₂), 37.35 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 38.60 (NC(C(CH₃)₃)), 56.08 (CH₂NC(C(CH₃)₃))* , 57.44 (CH₂NCHCHC(C(CH₃)₃))* , 126.27 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 127.10 (NCHCHCH), 128.13 (NCHCHCHCH), 145.73 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 146.88 (NCHCHCH), 150.11 (NCHCHCH), 165.47 (NC(C(CH₃)₃)), 172.28 ppm (NCHCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}=2968, 1640, 1624, 1572, 1512, 1468, 1373, 1276, 1253, 1189, 1167, 1115, 1049, 932, 851, 786, 578, 547$ cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [M-Cl]⁺ calcd for C₂₁H₃₂ClN₂: 347.2249, found: 347.2248.

4-(*tert*-Butyl)-1-[3-(2-oxopyridin-1(2*H*)-yl)propyl]pyridin-1-ium chloride (**3 f**)

6 (483 mg, 3.57 mmol, 524 μL , 3.0 eq.) was added to a suspension of **34 e** (453 mg, 1.19 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (2.4 mL) and the resulting mixture was stirred at 90 °C for 16 h under microwave conditions (150 W). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in H₂O bidest. (50 mL). Amberlite® IRA-410 Cl⁻ form ion exchange resin (29.0 g, 60.0 meq) was added to the aqueous solution and the resulting suspension was vigorously stirred for 72 h at room temperature. The resin was removed by filtration, washed with H₂O bidest. (100 mL) and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85), dissolved in H₂O bidest. (10 mL) and lyophilized. Due to its very high hygroscopicity, the purified material was treated repeatedly with EtOAc (3 x 10 mL) and the solvent was removed under reduced pressure affording **3 f** (330 mg, 90%) as a colorless and moderately hygroscopic solid.

RP-MPLC: $t_{\text{R}}=850$ s (MeOH/H₂O 15:85); mp: 183 °C; ^1H NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=1.36$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.34 (quin., $J=7.0$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 3.98 (t, $J=6.9$ Hz, 2 H, OCNCH₂CH₂), 4.63 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H, CH₂NCHCHCC(CH₃)₃), 6.23 (td, $J=6.7/1.4$ Hz, 1 H, OCCHCHCH), 6.33–6.38 (m, 1 H, OCCH), 7.40 (ddd, $J=8.9/6.6/2.1$ Hz, 1 H, OCCHCH), 7.71 (dd, $J=6.8/2.0$ Hz, 1 H, OCNCH), 8.16 (d, $J=7.0$ Hz, 2 H, NCHCHCC(CH₃)₃), 9.05 ppm (d, $J=6.8$ Hz, 2 H, NCHCHCC(CH₃)₃); ^{13}C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO): $\delta=30.00$ (C(CH₃)₃), 30.69 (NCH₂CH₂), 36.69 (NCHCHCC(CH₃)₃), 45.83 (OCNCH₂), 58.05 (CH₂NCHCHCC(CH₃)₃), 106.13 (OCCHCHCH), 120.05 (OCCH), 125.34 (NCHCHCC(CH₃)₃), 139.39 (NCHCHCH), 140.52 (OCCHCH), 144.72 (NCHCHCC(CH₃)₃), 161.96 (CO), 170.29 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3124, 3048, 2971, 1656, 1575, 1541, 1515, 1466, 1375, 1352, 1276, 1191,$

1169, 1153, 1116, 1063, 893, 852, 776, 737, 572 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$: 271.1805, found: 271.1810.

3-Methoxy-1-[3-(4-methylpyridin-1-ium-1-yl)propyl]pyridin-1-ium diiodide (**4 a**)

According to GP2, with **10 b** (405 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **27** (112 mg, 1.20 mmol, 117 μL , 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/ H_2O = 10:90) afforded **4 a** (415 mg, 83%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_{\text{R}}=600$ s (MeOH/ H_2O 10:90); mp: 147°C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): $\delta=2.63$ (s, 3 H, CCH_3), 2.74–2.85 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.07 (s, 3 H, OCH_3), 4.80–4.86 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CCHCHNCH}_2$), 4.87–4.93 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{NCHCOCH}_3$), 7.87 (d, $J=6.4$ Hz, 2 H, NCHCHCCH_3), 7.95 (dd, $J=8.9/5.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.06 (ddd, $J=8.9/2.6/0.8$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.69 (d, $J=5.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.97 (d, $J=6.8$ Hz, 2 H, NCHCHCCH_3), 9.05–9.07 ppm (m, 1 H, NCHCOCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN): $\delta=22.37$ (CCH_3), 33.80 (NCH_2CH_2), 57.63 ($\text{CH}_3\text{CCHCHNCH}_2$), 58.66 ($\text{CH}_2\text{NCHCOCH}_3$), 59.13 (OCH_3), 129.73 (NCHCHCH), 129.91 (NCHCHCCH_3), 132.52 (NCHCHCH), 133.26 (NCHCOCH_3), 138.30 (NCHCHCH), 144.77 (NCHCHCCH_3), 159.96 (NCHCOCH_3), 161.49 ppm (NCHCHCCH_3); IR (KBr): $\tilde{\nu}=3127$, 3014, 2970, 2934, 1639, 1620, 1595, 1569, 1507, 1477, 1449, 1389, 1370, 1344, 1333, 1302, 1285, 1242, 1199, 1165, 1150, 1108, 1040, 1018, 997, 963, 916, 877, 848, 828, 807, 730, 697, 671, 567, 550, 521, 477 cm^{-1} ; HRMS-FAB m/z $[\text{M}-\text{I}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$: 371.0615, found: 371.0636.

1-{3-[4-(Dimethylamino)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}-3-methoxypyridin-1-ium diiodide (**4 b**)

According to GP2, with **10 b** (405 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and **18** (147 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.) in MeCN (2.2 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/ H_2O = 10:90) afforded **4 b** (368 mg, 70%) as a yellow solid.

RP-MPLC: $t_{\text{R}}=800$ s (MeOH/ H_2O 10:90); mp: 147°C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): $\delta=2.58$ –2.69 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 3.18 (s, 6 H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.07 (s, 3 H, OCH_3), 4.38–4.43 (m, 2 H, NCCHCHNCH_2), 4.79–4.84 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{NCHCOCH}_3$), 6.86–6.91 (m, 2 H, NCHCHCN), 7.94 (dd, $J=8.9/5.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.05 (ddd, $J=8.9/2.6/0.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.26–8.31 (m, 2 H, NCHCHCN), 8.63 (d, $J=5.9$ Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.98–9.00 ppm (m, 1 H, NCHCOCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz,

CD₃CN): δ =33.50 (NCH₂CH₂), 40.83 ((CH₃)₂N), 54.55 (NCCHCHNCH₂), 58.98 (CH₂NCHCOCH₃), 59.08 (OCH₃), 108.93 (NCHCHCN), 129.71 (NCHCHCH), 132.36 (NCHCHCH), 133.23 (NCHCOCH₃), 138.24 (NCHCHCH), 142.89 (NCHCHCN), 157.55 (NCHCHCN), 159.94 ppm (NCHCOCH₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3047, 3014, 1947, 1837, 1650, 1577, 1535, 1509, 1480, 1456, 1440, 1376, 1360, 1343, 1292, 1236, 1197, 1174, 1089, 1049, 1041, 1005, 942, 916, 866, 840, 821, 798, 755, 739, 679, 584, 565, 528, 502 cm⁻¹; HRMS-FAB *m/z* [M-I]⁺ calcd for C₁₆H₂₃N₂O: 400.0880, found: 400.0889.

3-Methoxy-1-{3-[4-(trifluoromethyl)pyridin-1-ium-1-yl]propyl}pyridin-1-ium di-iodide (**4 c**)

According to GP2, with **10 c** (886 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq.) and **7** (225 mg, 2.00 mmol, 210 μ L, 1.2 eq.) in MeCN (4 mL) at 90 °C. Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 15:85) and subsequent recrystallization of the resulting residue from EtOH (6 mL) afforded **4 c** (687 mg, 62%) as a yellow solid.

RP-MPLC: t_R =750 s (C18, MeOH/H₂O 15:85); mp: 184 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ =2.84–2.92 (m, 2 H, NCH₂CH₂), 4.08 (s, 3 H, OCH₃), 4.92–4.97 (m, 2 H, CH₂NCHCOCH₃), 5.05–5.10 (m, 2 H, F₃CCCHCHNCH₂), 7.96 (dd, J =8.9/5.9 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.06 (ddd, J =8.9/2.6/0.9 Hz, 1 H, NCHCHCH), 8.41 (d, J =6.4 Hz, 2 H, NCHCHCCF₃), 8.70 (d, J =5.9 Hz, 1 H, NCHCHCH), 9.07–9.10 (m, 1 H, NCHCOCH₃), 9.54 ppm (d, J =6.6 Hz, 2 H, NCHCHCCF₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): δ =33.71 (NCH₂CH₂), 58.49 (CH₂NCHCOCH₃), 59.14 (OCH₃), 59.21 (F₃CCCHCHNCH₂), 122.31 (q, J =274.2 Hz, CF₃), 126.54 (q, J =2.9 Hz, NCHCHCCF₃), 129.77 (NCHCHCH), 132.60 (NCHCHCH), 133.27 (NCHCOCH₃), 138.31 (NCHCHCH), 145.74 (q, J =36.5 Hz, CCF₃), 147.96–148.39 (m, NCHCHCCF₃), 160.02 ppm (COCH₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3029, 3012, 2872, 2849, 1624, 1596, 1583, 1515, 1481, 1470, 1458, 1445, 1415, 1324, 1294, 1250, 1232, 1193, 1172, 1151, 1098, 1082, 1061, 1043, 1005, 878, 864, 831, 767, 735, 685, 644, 612, 590, 567, 512 cm⁻¹; HRMS-ESI *m/z* [M-I]⁺ calcd for C₁₅H₁₇F₃N₂O: 425.0332, found: 425.0330.

1-(*tert*-Butyl)-4-(3-chloropropyl)benzene (**36**)

Triethylsilane (1.78 g, 15.3 mmol, 2.45 mL, 4.0 eq.) was added to a solution of ketone **35** (861 mg, 3.83 mmol, 1.0 eq.) in TFA (22 mL) and the resulting mixture was stirred for 15 h at 75 °C under microwave conditions (100 W). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (40 mL). The organic layer

was washed with H₂O (2 x 40 mL) and the combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by MPLC (SiO₂, *n*-pentane) to afford **36** (725 mg, 90%) as a colorless liquid.

*R*_f=0.4 (*n*-pentane); MPLC: *t*_R=520 s (*n*-pentane); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=1.31 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.04–2.12 (m, 2 H, CH₂CH₂Cl), 2.71–2.77 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂Cl), 3.53 (t, *J*=6.5 Hz, 2 H, CH₂Cl), 7.11–7.15 (m, 2 H, CHCCH₂), 7.30–7.34 ppm (m, 2 H, CHCHCCH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃Cl₃): δ=31.39 (C(CH₃)₃), 32.23 (CH₂CH₂CH₂Cl), 34.01 (CH₂CH₂Cl), 34.38 (C(CH₃)₃), 44.36 (CH₂Cl), 125.35 (CHCHCCH₂), 128.18 (CHCCH₂), 137.58 (CHCCH₂), 148.95 ppm (CC(CH₃)₃); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3092, 3055, 3024, 2961, 2906, 2867, 1517, 1509, 1475, 1462, 1444, 1413, 1393, 1363, 1306, 1291, 1268, 1202, 1139, 1109, 1019, 972, 870, 845, 831, 812, 765, 731, 665, 649 cm⁻¹; HRMS-EI *m/z* [M]⁺ calcd for C₁₃H₁₉Cl: 210.1170, found: 210.1177.

The analytical data were in accordance with those previously reported.¹

4-(*tert*-Butyl)-1-{3-[4-(*tert*-butyl)phenyl]propyl}pyridin-1-ium chloride (**5**)

Nal (102 mg, 0.679 mmol, 1.1 eq.) and **6** (100 mg, 0.740 mmol, 108 μ L, 1.2 eq.) were added to a solution of alkylchloride **36** (130 mg, 0.617 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (1.2 mL) and the resulting mixture was stirred for 16 h at 90 °C under microwave conditions (150 W). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in H₂O bidest./MeOH (1:1, 100 mL). Amberlite® IRA-410 Cl⁻-form ion exchange resin (16.0 g) was added to the solution and the resulting suspension was vigorously stirred for 72 h at room temperature. The resin was removed by filtration and was washed with H₂O bidest. (100 mL). The solvent removed under reduced pressure and the crude product was purified by RP-MPLC (C18, MeOH/H₂O = 50:50). The resulting highly viscous liquid was dissolved in H₂O bidest. (10 mL) and lyophilized to obtain the corresponding chloride salt as a colorless hygroscopic solid. The purified material was treated repeatedly with EtOAc (3 x 15 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to afford **5** (191 mg, 90%) as a colorless and less hygroscopic solid.

[1] J. I. Perlmutter, L. T. Forbes, D. J. Krysan, K. Ebsworth-Mojica, J. M. Colquhoun, J. L. Wang, P. M. Dunman, D. P. Flaherty, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8540–8562.

RP-MPLC: $t_R=1600$ s (MeOH/H₂O 50:50); mp: 202°C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta=1.29$ (s, 9 H, CCHCHC(C(CH₃)₃)), 1.43 (s, 9 H, NCHCHC(C(CH₃)₃)), 2.34 (quin. $J=7.6$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 2.72 (t, $J=7.5$ Hz, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 4.56–4.61 (m, 2 H, NCH₂), 7.13–7.16 (m, 2 H, CH₂CCH), 7.31–7.34 (m, 2 H, CH₂CCHCH), 8.08–8.11 (m, 2 H, NCHCH), 8.80–8.83 ppm (m, 2 H, NCH); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): $\delta=30.24$ (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 31.83 (CCHCHC(C(CH₃)₃)), 32.80 (NCH₂CH₂CH₂), 33.63 (NCH₂CH₂), 35.26 (CCHCHC(C(CH₃)₃)), 37.58 (NCHCHC(C(CH₃)₃)), 61.80 (NCH₂), 126.55 (CCHCH), 126.61 (NCHCH), 129.11 (CH₂CCH), 138.15 (CH₂CCH), 145.24 (NCH), 150.51 (CCHCHC(C(CH₃)₃)), 172.77 ppm (NCHCHC(C(CH₃)₃)); IR (KBr): $\tilde{\nu}=2963, 2867, 1640, 1562, 1516, 1465, 1392, 1364, 1271, 1232, 1189, 1112, 1053, 1021, 929, 850, 581, 567$ cm⁻¹; HRMS-ESI m/z [M]⁺ calcd for C₂₂H₃₂N: 310.2529, found: 310.2527.

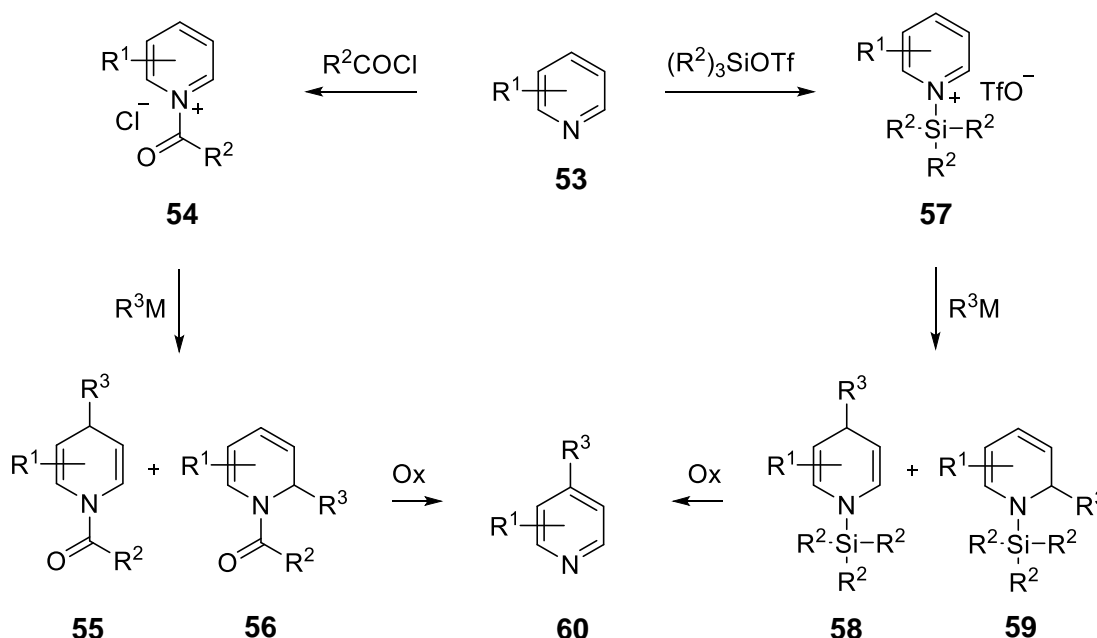
4 Nicht veröffentlichte Experimente

Das folgende Kapitel umfasst nicht veröffentlichte Ergebnisse welche von Relevanz für die Entstehung der vorliegenden Arbeit waren oder in anderen als den in Kapitel 3 vorgestellten Veröffentlichungen publiziert wurden. Hierzu zählten sowohl Vorversuche zur Synthese von 2-Isopropylpyridin sowie von 3,4-disubstituierten Pyridinderivaten mit einer *tert*-Butylgruppe in 4-Position als auch die Überprüfung literaturbekannter Alkylierungsstrategien zur Darstellung von Bispyridiniumsalzen und die Synthese verschiedener MB327 Analoga.

4.1 Die Suche nach einer geeigneten Synthesestrategie für die effiziente Darstellung von 4-*tert*-Butylpyridinderivaten

Um den Anforderungen der Medizinalchemie zu genügen, sollten Syntheserouten in der Lage sein, eine effiziente Erstellung ganzer Molekülbibliotheken zu ermöglichen. Konkret bedeutet dies, dass von einer gewünschten Substanzklasse idealerweise eine große Anzahl an strukturell diversen Zielverbindungen in möglichst wenigen Schritten zugänglich ist. Aufwändige de-Novo-Synthesen finden deshalb nur selten Anwendung. Mit dieser Prämisse wurde die Entwicklung einer Methode zur Darstellung von in 4-Position *tert*-butylsubstituierten Pyridinderivaten **37** (vgl. Abbildung 16, Kapitel 2.2) begonnen. Die Absicht war es, den *tert*-Butylrest direkt in die 4-Position verschiedener Pyridinderivate einzuführen und somit einen effizienten Zugang zu mehrfachsubstituierten Pyridinderivaten zu erhalten, welche neben dem 4-*tert*-Butylrest noch einen oder zwei weitere Substituenten besitzen. Die für die Einführung von Alkylresten weit verbreiteten Kreuzkupplungsreaktionen oder C-H-Aktivierungen schieden für die Realisierung des Synthesevorhabens aus, da bekannt ist, dass die für die Kupplung eines *tert*-Butylrestes benötigten tertiären Alkylolithium- oder Alkylmagnesium-Reagenzien sowohl β -H-Eliminierungen als auch Homokupplungsreaktionen mit sich bringen würden.^{150,151,152,153,154,155} Die daraus resultierenden Nebenprodukte wären aufgrund ihrer zu den Zielverbindungen sehr ähnlichen Struktur nur sehr schwer oder gar nicht von diesen abtrennbar. Aus diesem Grund wurde die Addition von Organometallverbindungen R^3M an *N*-Acyl- (**54**) oder *N*-Silylpyridiniumionen (**57**) mit einer anschließenden Oxidation der *N*-Acyl- bzw. *N*-

Silyl-1,4-dihydropyridine **55** bzw. **58** als die Methode der Wahl für die Darstellung der 4-*tert*-Butylpyridinderivate **60** aus ihren unsubstituierten Vorläufern **53** angesehen (Schema 8). Die Addition sollte hierbei möglichst regioselektiv in 4-Position erfolgen, um eine Bildung der 1,2-Dihydropyridine **56** und **59** zu vermeiden.



Schema 8: Übersicht zur Synthese von in 4-Position substituierten Pyridinderivaten mittels der *N*-Acylpyridinium- bzw. *N*-Silylpyridiniumstrategie.

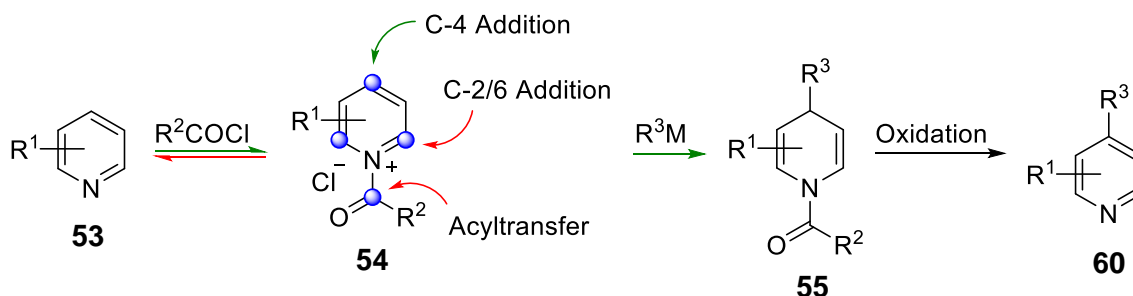
Die Umsetzung des Synthesevorhabens gelang schließlich wie in der in Kapitel 3.1 vorgestellten Veröffentlichung „*Regioselective and Transition-Metal-Free Addition of tert-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives: A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-tert-Butylpyridine Derivatives*“ beschrieben wurde, für in 3-Position substituierte Pyridinderivate nach N-Aktivierung mit TIPSOTf, Addition von *t*-Bu₂Mg an die *in-situ* erzeugten *N*-Triisopropylsilylpyridiniumionen und Oxidation der nach der Abfangreaktion erhaltenen 1,4-Dihydropyridine mit Schwefel und Naphthalin.

Bevor allerdings die Etablierung der Addition an *N*-Silylpyridiniumionen gelang, wurde die *N*-Acylpyridiniumroute für die Darstellung der 4-*tert*-Butylpyridinderivate untersucht. Im Zuge dessen stellte sich die Addition der *tert*-Butylmetallverbindungen an die intermediären *N*-Acylpyridiniumionen als der limitierende Reaktionsschritt heraus und musste umfangreich optimiert werden. Die *N*-Acylpyridiniumstrategie kam letztlich für die Synthese der in der zweiten Publikation „*Synthesis of a Series of Non-Symmetric Bispyridinium and Related Compounds and Their Affinity Characterization at*

the Nicotinic Acetylcholine Receptor“ beschriebenen Verbindungen 4-(*tert*-Butyl)-2-methylpyridin, 4-Isopropylpyridin sowie 4-(2-[²H₃]Methyl[1,1,1,3,3,3-²H₆]propan-2-yl)pyridin zum Einsatz (vgl. Kapitel 3.2). Im Folgenden werden jene Experimente vorgestellt, welche zur Optimierung und Etablierung beider Routen führten.

4.1.1 Die *N*-Acylpyridiniumstrategie

Die Addition von Metallorganen an *N*-Acylpyridiniumionen stellt eine der weitverbreitetsten Methoden zur Synthese von 4-Alkyl- oder 4-Arylpyridinderivaten dar.¹⁵⁶ Für die Aktivierung der Pyridinderivate **53** kommen neben Acetylchlorid^{157,158} vor allem Ethyl- und Phenylchlorformiat^{144,157,159} sowie Pivaloylchlorid¹⁶⁰ zum Einsatz. Entscheidend für den Reaktionserfolg sind eine quantitative Acylierung des Pyridinstickstoffs sowie eine regioselektive Addition des Nucleophils in 4-Position des Pyridiniumions **54** (Schema 9). Um das Gleichgewicht verstärkt auf die Seite des Acylierungsprodukts **54** zu ziehen, kann das nukleophile Chlorid-Gegenion durch die Zugabe von Silyltriflaten gegen Triflat ausgetauscht werden.¹⁶⁰



Schema 9: Die Synthese von in 4-Position alkyl- oder arylsubstituierten Pyridinderivaten über *N*-Acylpyridiniumionen. R¹ = Alkyl, Aryl. R² = Me, *t*-Bu, PhO, EtO. R³ = Cu(I)- oder Cu(I)/Zn(II)-Spezies. Die elektrophilen Zentren am Pyridiniumion **54** sind blau hervorgehoben.

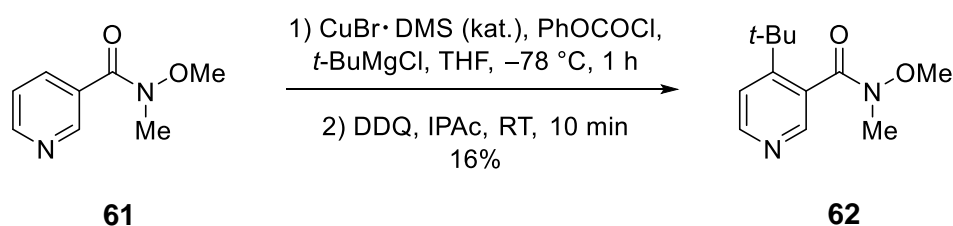
Der zweite entscheidende Faktor ist die Regioselektivität der Addition. Das Pyridiniumion **54** besitzt vier elektrophile Zentren (blau markiert), drei davon in 2-, 4- und 6-Position des Pyridiniumrings sowie eines außerhalb an der Carbonylgruppe des Acylrestes. An welcher Position der Angriff erfolgt hängt maßgeblich von dem nukleophilen Charakter des Metallorganys sowie dem sterischen Anspruch des Acylierungsreagenzes ab und lässt sich qualitativ anhand des HSAB-Konzepts einschätzen.^{156,161} Harte Nucleophile präferieren einen Acyltransfer sowie den Angriff auf die 2- und 6-Position, während weiche Nucleophile bevorzugt an die C4-Position addieren. Für die Synthese von 4-Alkyl- bzw. 4-Arylpyridinen kommen deshalb immer

stöchiometrisch^{159,162} oder katalytisch^{157,144} erzeugte Kupfer- oder Zink-Kupferorganische Spezies zu Einsatz,^{145,163} da reine Zink- oder Magnesiumorganyle in Verbindung mit *N*-Acylpyridiniumionen keine ausreichende 4-Selektivität liefern.^{164,165}

Die Oxidation der nach der Addition erhaltenen *N*-Acyl-1,4-dihydropyridine **55** zu den Pyridinderivaten **60** erfolgt zumeist entweder mit Schwefel in siedendem Toluol,¹⁶⁶ Xylol¹⁴⁵ oder Decalin¹⁴⁹ sowie mit DDQ in CH₂Cl₂¹⁴⁴ oder *o*-Chloranil in Essigsäure.¹⁴⁹

4.1.1.1 Literaturbekannte Beispiele zur Einführung eines *tert*-Butylrests in Pyridinderivate mittels *N*-Acylpyridiniumionen

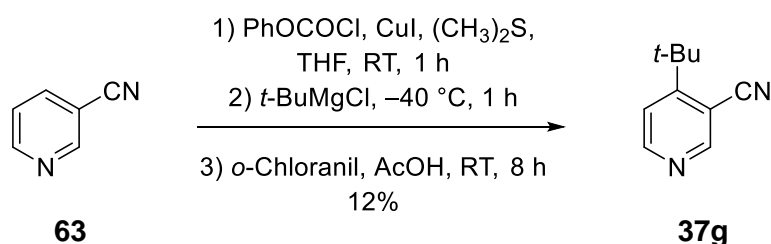
Obwohl die *N*-Acylpyridiniumroute seit Langem Anwendung zur gezielten Alkylierung und Arylierung von Pyridinmolekülen in 4-Position findet, war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über die Addition von *tert*-Butylmetallverbindungen an *N*-Acylpyridiniumionen und die Oxidation der daraus resultierenden *N*-Acyl-4-*tert*-butyldihydropyridine bekannt. Wallace et al. untersuchten beide Schritte an dem Weinreb Amid **61** und fanden nach der Aktivierung mit Phenylchlorformiat keine nennenswerte C4-Regioselektivität für die Addition des katalytisch aus CuBr·DMS und *t*-BuMgCl generierten *tert*-Butylcuprats (C4: 41%, Schema 10). Im Gegensatz dazu verlief der Angriff von Cupraten mit Me- (C4: 87%), Et- (C4: 76%), *i*-Pr- (C4: 59%), *c*-Hex (C4: 77%), Bn- (C4: 86%) oder Ph-Resten (C4: 83%) deutlich regioselektiver.¹⁴⁴



Schema 10: Synthese des 4-*tert*-butylsubstituierten Pyridinderivats **62** nach Wallace et al.¹⁴⁴

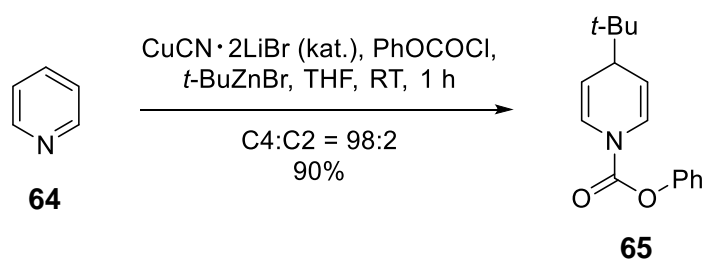
Überraschend stark war auch die Empfindlichkeit des aus dem Angriff des *tert*-Butylcuprats resultierenden *N*-Acyl-1,4-dihydropyridins gegenüber einer Zersetzung durch DDQ, so dass die Ausbeute des 4-*tert*-Butylpyridinderivats **62** über beide Stufen lediglich 16% betrug. Bierer et al. konnten unter ähnlichen Bedingungen, dafür aber mit stöchiometrischen Mengen Cu(I), DMS und *t*-BuMgCl, ebenfalls nur eine

Gesamtausbeute von 12% für die Synthese von 4-(*tert*-Butyl)nicotinnitril (**37g**) aus 3-Cyanopyridin (**63**) erzielen (Schema 11).¹⁴⁹



Schema 11: Synthese von 4-(*tert*-butyl)nicotinnitril (**37g**) nach Bierer et al.¹⁴⁹

Im Gegensatz dazu berichteten Wang et al. (Schema 12), dass die Abfangreaktion des aus Pyridin (**64**) und Phenylchlorformiat *in-situ* generierten *N*-Benzoylpyridiniumions mit *t*-BuCu(CN)ZnBr unter strenger Regiokontrolle erfolgte. Obwohl die Addition des Zink-Cyanocuprats bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, konnte das 1,4-Dihydropyridin **65** demnach mit einer Regioselektivität von 98:2 und einer Ausbeute von 90% erhalten werden.¹⁶³ Die bereits aus zahlreichen Substitutionen, konjugierten Additionen und Carbocuprierungen für ihre hohe Chemo- und Stereoselektivität bekannten Zink-Cyanocuprate besitzen offenbar auch eine ausgeprägte C4-Regioselektivität bei der Addition an *N*-Acylpyridiniumionen.¹⁶⁷ Die Oxidation des Dihydropyridins **65** wurde nicht untersucht.



Schema 12: Regioselektive Addition von Zinkcyanocupraten am Beispiel der Synthese von **65** nach Wang et al.¹⁶³

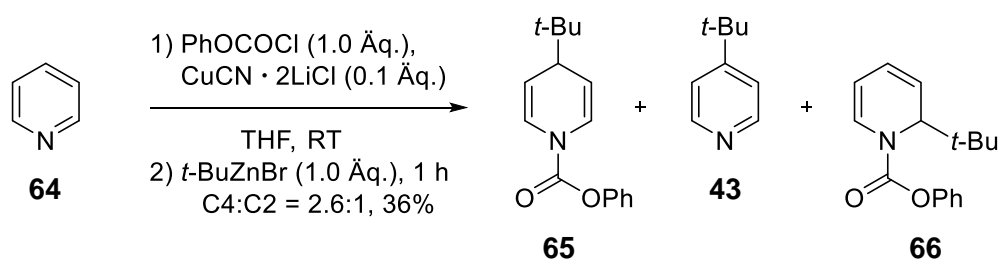
Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass im Fall des *tert*-Butylrestes, die Regioselektivität der Addition stärker von der Reaktivität des Organocuprats abhängt wie dies bei anderen Alkyl- oder Arylcupraten der Fall ist, sodass für das Synthesevorhaben zunächst geeignete Reaktionsbedingungen, Aktivierungsreagenzien und Metallorganyle gefunden werden mussten. Um die Addition sowie die Oxidation möglichst frei von jeglichen elektronischen oder sterischen Effekten

untersuchen zu können, wurde Pyridin als Modellsubstrat ausgewählt. Erst im zweiten Schritt sollten die Versuchsergebnisse auf substituierte Pyridinderivate ausgeweitet werden.

4.1.1.2 Untersuchungen zur Addition von *tert*-Butylmetallverbindungen an *N*-Acylpyridiniumionen

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen zur Abfangreaktion von *N*-Acylpyridiniumionen mit *tert*-Butylmetallverbindungen beschrieben. Die Beurteilung des Reaktionserfolgs wurde anhand der Ausbeute der jeweiligen 1,4-*tert*-butylsubstituierten *N*-Acyldihydropyridine vorgenommen. Aufgrund der generellen Oxidationsempfindlichkeit der 1,4-Dihydropyridine war das nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (SC) erhaltene Regioisomerengemisch aus 1,2- (DHP-C2) und 1,4-Dihydropyridinen (DHP-C4) stets zu einem kleinen Teil mit 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) verunreinigt. Um die Ausbeute aller drei Produkte und damit die Regioselektivität der Abfangreaktion exakt bestimmen zu können, wurde das nach der Säulenchromatographie erhaltene Material ¹H-NMR spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard analysiert.

Für die ersten Testreaktionen wurde Pyridin (**64**) mit Acetylchlorid oder Phenylchlorormat aktiviert und mit katalytisch erzeugten Cyano- und gemischten Zink-Cyanocupraten abgefangen (Schema 13 und Tabelle 2).



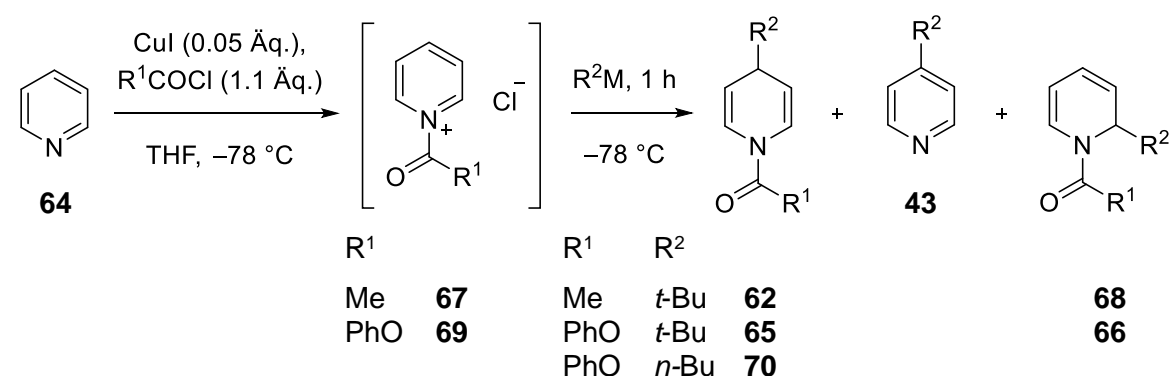
Schema 13: Synthese von *N*-Benzoyl-1,4-*tert*-butylidihydropyridin (**65**) nach Wang et al.¹⁶³

Hierbei zeigte das aus *t*-BuZnBr und CuCN·2LiCl generierte Organocuprat für die nach Wang et al. bei Raumtemperatur durchgeführte Addition in THF eine überraschend moderate C4-Regioselektivität von 73:27 und eine unerwartet niedrige Ausbeute von nur 26% für das 1,4-Dihydropyridin **65** und sein Oxidationsprodukt **43** (Schema 13).¹⁶³ Das Ergebnis steht somit im klaren Widerspruch zu der von Wang et al.

publizierten und in Schema 13 gezeigten regioselektiven Synthese des 1,4-Dihydropyridins **65**.

In Anlehnung an die Arbeiten von Comins und Wallace,^{144,157} wurde Pyridin (**64**) im nächsten Versuch mit Acetylchlorid in THF acyliert und das Pyridiniumion **67** bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Gegenwart katalytischer Mengen CuI mit *t*-BuMgCl in THF umgesetzt. Um eine bestmögliche Regioselektivität zu erreichen erfolgte die Addition des *in-situ* erzeugten Organocuprats bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, statt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wie von Comins und Abdullah beschrieben.¹⁵⁷ Unter diesen Bedingungen verlief der Angriff auf die 4-Position des Pyridiniumions **67** mit einer Regioselektivität von 78:22. Im Vergleich zu der bei Raumtemperatur durchgeführten Abfangreaktion mit dem Zink-Cyanocuprat *t*-BuCuZnBr (Schema 13) konnte die Ausbeute an 1,4-Dihydropyridin **62** und seinem Oxidationsprodukt **43** von 26 auf 43% gesteigert werden (Tabelle 2, Eintrag 1; für den Einsatz von *t*-BuCuZnBr bei niedrigeren Temperaturen siehe Tabelle 3).

Tabelle 2: Cu(I)-katalysierte Abfangreaktionen an *N*-Acyropyridiniumionen.



Eintrag	R ² M	R ¹ COCl	(DHP-C4:Ox-C4): DHP-C2 ^{a)}	Ausbeute ^{a)}	
				C4-Produkte	(%)
1	<i>t</i> -BuMgCl	AcCl	(65:13):22	62/43	48
2	<i>t</i> -BuMgCl	PhOCOCl	(60:0):40	65/43	33
3	<i>n</i> -BuMgCl	PhOCOCl	(100:0):0	70	80

^{a)} Die Ausbeute und das Produktverhältnis des nach der Aufreinigung durch SC erhaltenen Produktgemischs aus 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4), 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) und 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2) wurden ¹H-NMR-spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich hierbei auf die C4-Produkte DHP-C4 und Ox-C4.

Ein Wechsel des Acylierungsreagenzes von Acetylchlorid zu dem von Wallace et al. eingesetzten Phenylchlorformiat führte wiederum zu einer Reduktion der C4-Produktausbeute von 43 auf 33% sowie zu einem Rückgang der C4-Regioselektivität

von 78:22 auf 60:40 (Tabelle 2, Eintrag 2). Dass eine regioselektive Addition mit guter Ausbeute unter den verwendeten Reaktionsbedingungen prinzipiell möglich ist, konnte durch den Wechsel von *t*-BuMgCl zu *n*-BuMgCl gezeigt werden (Tabelle 2, Eintrag 3). Die ebenfalls unter CuI Katalyse bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in THF durchgeführte Abfangreaktion des *N*-Benzoylpyridiniumions **69** mit *n*-BuMgCl lieferte regioselektiv und mit einer guten Ausbeute von 80% das entsprechende *n*-butylsubstituierte 1,4-Dihydropyridin **70**. Sowohl die Ausbeute als auch die C4-Regioselektivität lagen damit deutlich über den für die Reaktion mit *t*-BuMgCl erhaltenen Ergebnissen, so dass die Bildung des Pyridiniumions als limitierender Schritt ausgeschlossen werden konnte. Vielmehr wurde vermutet, dass entweder die Cupratbildung im Fall des *tert*-Butylrestes zu langsam verläuft, so dass das im Überschuss vorhandene Grignard- oder Zinkreagenz unselektiv mit dem *N*-Acylpyridiniumion reagieren kann, oder die *tert*-Butyl-Cu(I) Spezies selbst keine ausgeprägte Präferenz für den Angriff in 4-Position des Pyridiniumions besitzt. Die niedrigen Ausbeuten von 33 und 48% (Tabelle 2, Einträge 1 und 2) in Verbindung mit nicht abreagiertem Pyridin ließen zudem auf eine relativ hohe *N*-Acyltransfertrate schließen, so dass eine Optimierung der Abfangreaktion nötig erschien.

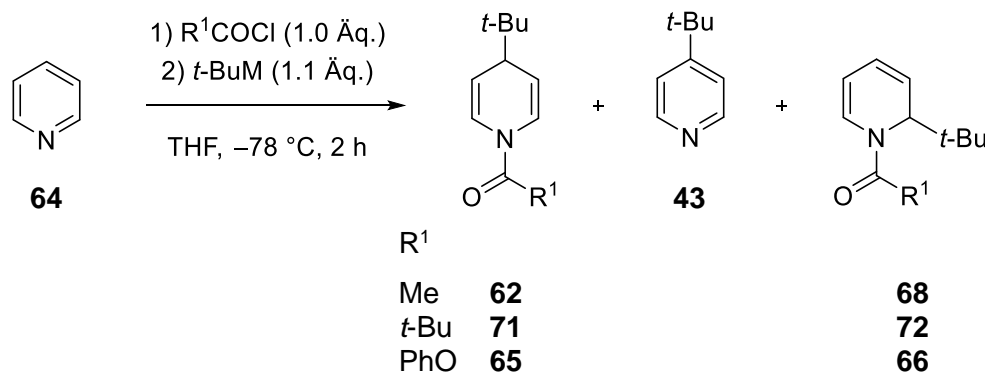
Im nächsten Schritt wurden deshalb unterschiedliche Acylierungsreagenzien und Reaktionsbedingungen sowie verschiedene Cu(I)-Spezies auf ihre Regioselektivität und Ausbeute hin überprüft (Tabelle 3). Um mögliche Selektivitätsprobleme, welche im Zusammenhang mit der Cu(I)-Katalyse stehen könnten, vorzubeugen, erfolgte der Einsatz der Organocuprate stöchiometrisch.

Zur Evaluierung der geeigneten Aktivierungsreagenzien wurde Pyridin (**64**) jeweils mit Acetylchlorid, Phenylchlorformiat und Pivaloylchlorid aktiviert und bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in THF mit dem Cyano-Gilmancuprat aus *t*-BuMgCl und CuCN abgefangen. Die Verwendung stöchiometrisch erzeugter Organocuprate erforderte eine externe Präparation derselben und eine Zugabe zum Pyridiniumion über eine Transferkanüle. Aus diesem Grund fiel die Wahl für die ersten Testreaktionen auf die im Vergleich zu anderen Dialkylcupraten als thermisch besonders stabil geltenden Cyano-Gilmancuprate.¹⁶⁸

Während die C4:C2-Selektivität der Addition bei allen drei Aktivierungsreagenzien auf einem nahezu identischen Niveau lag (AcCl: 78:22, Tabelle 3, Eintrag 1; PivCl: 76:24, Tabelle 3, Eintrag 2; PhOCOCl: 76:24, Tabelle 3, Eintrag 3), zeigten sich leichte Unterschiede bei der Ausbeute der C4-Additionsprodukte. Hierzu zählten sowohl die

1,4-Dihydropyridine **62**, **71** und **65** als auch das gemeinsame Oxidationsprodukt 4-*tert*-Butylpyridin (**43**).

Tabelle 3: Abfangreaktion verschiedener *N*-Acylpyridiniumionen mit Organocupraten.



Eintrag	<i>t</i> -BuM ^{a)}	R ¹ COCl	(DHP-C4:Ox-C4): DHP-C2 ^{b)}	Ausbeute ^{b)}	
				C4-Produkte	(%)
1	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	AcCl	(73:5):22	62/43	57
2	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	PivCl	(69:7):24	71/43	46
3	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	PhOCOCl	(76:0):24	65/43	49
4	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	AcCl	(62:6):32	62/43	50 ^{c)}
5	<i>t</i> -Bu ₂ CuLi·LiCN	AcCl	(70:12):18	62/43	55
6	<i>t</i> -Bu ₂ CuLi·LiI	AcCl	(68:4):28	62/43	24
7	<i>t</i> -BuCu(CN)Li	AcCl	(64:22):14	62/43	43
8	<i>t</i> -Bu ₂ Cu(CN)(ZnCl) ₂ · 2MgCl ₂ ·2LiCl	AcCl	(53:40):7	62/43	56
9	<i>t</i> -BuCu(CN)ZnBr·2LiCl	AcCl	(80:10):10	62/43	62
10	<i>t</i> -BuCu(CN)ZnBr·2LiCl	PhOCOCl	(85:0):15	65/43	47
11	<i>t</i> -BuCu(CN)ZnBr·2LiCl	PhOCOCl	(87:0):13	65/43	59 ^{d)}
12	<i>t</i> -BuCu(CN)ZnBr·2LiCl	AcCl	(61:32):7	62/43	59 ^{d)}

^{a)} Die Formeln für *t*-BuM geben nur die Zusammensetzung der Cuprate und nicht ihre exakte Struktur wieder. ^{b)} Die Ausbeute und das Produktverhältnis des nach der Aufreinigung durch SC erhaltenen Produktgemischs aus 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4), 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) und 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2) wurden ¹H-NMR-spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich hierbei auf die C4-Produkte DHP-C4 und Ox-C4. ^{c)} Cuprat vor Zugabe 5 min bei RT gerührt. ^{d)} Über Nacht langsam von -78 °C auf RT erwärmen lassen.

Die höchste Ausbeute von 57% wurde nach Aktivierung mit Acetylchlorid erhalten (Tabelle 3, Eintrag 1) und reduzierte sich durch den Einsatz von Pivaloylchlorid (Tabelle 3, Eintrag 2) und Phenylchlorformiat (Tabelle 3, Eintrag 3) auf 46 respektive 49%. Wurde die Temperatur der Cupratsuspension erhöht, indem diese vor der Zugabe zu dem *N*-Acylpyridiniumion für fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt

wurde, verschlechterten sich die Regioselektivität leicht von 78:22 auf 68:32 und die Ausbeute sank von 57 auf 50% (Tabelle 3, Eintrag 4). In den folgenden Absätzen wird daher noch genauer auf die Korrelation zwischen der Reaktivität der Organocuprate und der Regioselektivität ihrer Addition eingegangen. Kein nennenswerter Einfluss auf die Reaktionsausbeute konnte hingegen den Alkali- und Erdalkalimetallkationen Li^+ und Mg^{2+} zugeschrieben werden. Obwohl die Reaktivität der in THF über Li^+ oder Mg^{2+} verbrückten Cuprat-Homodimere direkt von der Lewisazidität der Hauptgruppenmetallkationen abhängt,¹⁶⁹ lieferten die aus *t*-BuMgCl oder *t*-BuLi und CuCN hergestellten Cuprate fast identische Ergebnisse, mit einer minimal besseren C4-Regioselektivität für *t*-Bu₂CuLi·LiCN (Tabelle 3, Einträge 1 und 5).

Die bisher verwendeten (Tabelle 3, Einträge 1–5) Cyano-Gilmancuprate gelten als kinetisch besonders reaktiv und vereinen eine ausgesprochen hohe Nukleophilie mit einer für Organocuprate untypischen Basizität. Im Gegensatz zu herkömmlichen Gilman-Cupraten sind sie daher oftmals die erste Wahl für S_N2-Substitutionen, besitzen auf Grund ihrer Reaktivität und Basizität aber eine deutlich geringere Chemoselektivität. Nach Nakamura et al. äußert sich dies beispielweise in der Deprotonierung von terminalen Alkinen oder der 1,2-Addition an α , β -ungesättigte Ester, welche sonst eher Alkyllithium- oder Alkylmagnesiumverbindungen zugeschrieben wird.¹⁷⁰ Im konkreten Fall der Addition an die *N*-Acylpyridiniumionen wurde daher vermutet, dass die hohe *N*-Acyltransferate und die geringe Regioselektivität der besonderen Reaktivität der Cyano-Gilmancuprate geschuldet sein könnte.

Um diese Frage genauer zu untersuchen, wurde Acetylchlorid als das bisher vielversprechendste Aktivierungsreagenz belassen und die Abfangreaktion bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ mit unterschiedlichen *tert*-Butyl-Cupraten durchgeführt (Tabelle 3, Einträge 6–9).

Obwohl Iodo-Gilmancuprate eine geringere Reaktivität und Basizität aufweisen als ihre Cyanid-Analoga, wirkte sich der Wechsel von *t*-Bu₂CuLi·LiCN zu *t*-Bu₂CuLi·LiI unerwartet negativ auf den Reaktionserfolg aus. Gegenüber dem Cyano-Gilmancuprat reduzierte sich die C4-Regioselektivität deutlich von 82:18 auf 72:28 und die Ausbeute ging um mehr als die Hälfte auf nur noch 24% zurück (Tabelle 3, Einträge 5 und 6). Wurde das *N*-Acetylpyridiniumion mit dem nach Jansen und Krause hergestellten Monoalkylcyanocuprat *t*-BuCu(CN)Li abgefangen,¹⁷¹ so zeigte sich zwar eine zu dem Dialkylcuprat *t*-Bu₂CuLi·LiCN sehr ähnliche Regioselektivität von 86:14, die Ausbeute

an 1,4-Dihydropyridin **62** und 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) fiel hingegen mit nur 43% um 12 Prozentpunkte niedriger aus (Tabelle 3, Eintrag 7).

Eine deutliche Steigerung der C4-Regioselektivität sowie der Ausbeute gelang durch den Einsatz von gemischten Zink-Cyanocupraten. Das von Ibuka et al. als besonders mild und selektiv beschriebenen Zink-Cuprat mit der Zusammensetzung $t\text{-Bu}_2\text{Cu}(\text{CN})(\text{ZnCl})_2 \cdot 2\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{LiCl}$ addierte mit einer Regioselektivität von 93:7 in 4-Position des *N*-Acetylpyridiniumions und ermöglichte die Isolierung der beiden C4-Produkte **62** und **43** mit einer Ausbeute von 56% (Tabelle 3, Eintrag 8).¹⁷² Das vielversprechendste Ergebnis mit einer Gesamtausbeute von 62% für das 1,4-Dihydropyridin **62** und 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) konnte mit dem nach Knochel et al. aus $t\text{-BuZnBr}$ und $\text{CuCN} \cdot \text{LiCl}$ erzeugten Zink-Cyanocuprat $t\text{-BuCu}(\text{CN})\text{ZnBr} \cdot \text{LiCl}$ erhalten werden (Tabelle 3, Eintrag 9).¹⁷³

Wurde Pyridin (**64**) vor der Abfangreaktion mit $t\text{-BuCu}(\text{CN})\text{ZnBr} \cdot \text{LiCl}$ nicht mit Acetylchlorid, sondern mit Phenylchlorformiat aktiviert (Tabelle 3, Eintrag 10), kam es, wie auch schon bei der Reaktion mit $t\text{-Bu}_2\text{CuCN}(\text{MgCl})_2$ (vgl. dazu Tabelle 3, Eintrag 1 mit Eintrag 3) zu einem Rückgang der Ausbeute an C4-Produkt um 15 Prozentpunkte auf 47%. Die Regioselektivität der Addition blieb mit 85:15 nahezu unverändert (AcCl: 90:10, Tabelle 3, Eintrag 9). Wurde die Reaktion nicht mehr nach ca. zwei Stunden bei -78°C abgebrochen, sondern langsam innerhalb mehrerer Stunden auf Raumtemperatur erwärmt, konnte der Ausbeuteverlust für die Aktivierung mit Phenylchlorformiat kompensiert werden und die Ausbeute lag mit 59% auf dem selben Niveau wie für die Aktivierung mit Acetylchlorid (vgl. Tabelle 3, Einträge 11 und 12). Die Regioselektivität blieb hierdurch nahezu unverändert und betrug 93:7 für die Aktivierung mit Acetylchlorid und 87:13 im Fall von Phenylchlorformiat. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass durch die Verwendung stöchiometrischer Zink-Cyanocuprate (Tabelle 3), im Vergleich zu den Abfangreaktionen unter Cu(I)-Katalyse (Schema 13 und Tabelle 2), sowohl die C4-Selektivität als auch die Ausbeute der Additionsreaktion and die *N*-Acylpyridiniumionen deutlich verbessert werden konnte.

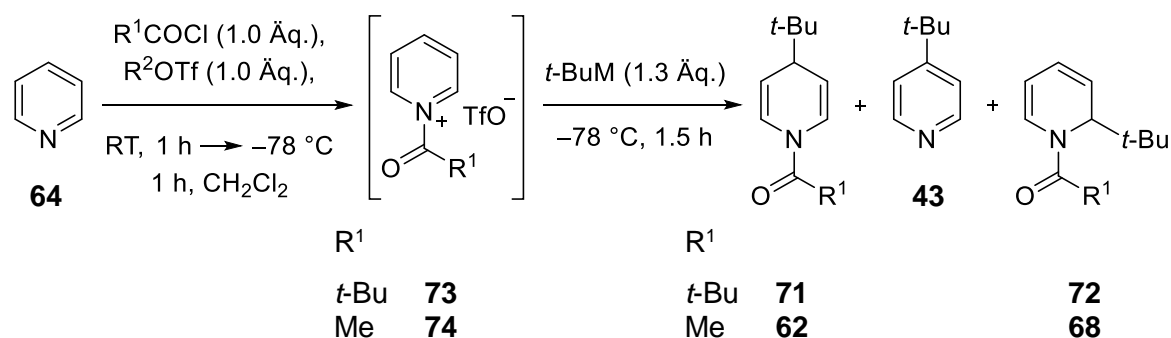
Eine Alternative zu der bisher beschriebenen heterogenen Erzeugung der Pyridiniumionen stellt die von Pabel et al.¹⁶⁰ veröffentlichte Methode zur Generierung von *N*-Acylpyridiniumionen mit Pivaloylchlorid in Gegenwart von Silyltriflats dar.

Durch den Zusatz von TIPSOTf oder TMSOTf wird bei dieser Variante der Abfangreaktion das Chlorid-Gegenion des Pyridiniumions gegen das wesentlich

weniger nukleophile Triflat-Anion ausgetauscht und dadurch das Gleichgewicht auf die Seite des Pyridiniumions gezogen, ohne dass ein Ausfällen desselben nötig wäre. Dadurch, dass das *N*-Acylpyridiniumion in Lösung bleibt, werden schlecht zu kontrollierende Grenzflächenreaktionen am Festkörper unterbunden.

Wurde Pyridin (**64**) in CH₂Cl₂ mit Pivaloylchlorid und TIPSOTf aktiviert und das Pyridiniumion **73** bei -78 °C mit *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ abgefangen (Tabelle 4, Eintrag 1), so konnte das Dihydropyridin **71** mit einer Ausbeute von 53% und einer Regioselektivität von 73:27 erhalten werden. Das Ergebnis lag damit in der gleichen Größenordnung wie das der vergleichbaren heterogenen Abfangreaktion mit *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (Tabelle 3, Eintrag 2, C4:C2 = 76:24, 46% Ausbeute).

Tabelle 4: Abfangreaktion der *N*-Acyl-dihydropyridiniumionen **73** und **74** mit Organocupraten in homogener Lösung.



Eintrag	R ² OTf	R ¹ COCl	<i>t</i> -BuM ^{a)}	(DHP-C4:Ox-C4):		Ausbeute ^{b)} (%)
				DHP-C2 ^{b)}	C4-Produkte	
1	TIPSOTf	PivCl	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	(73:0):27	71/43	53
2	TIPSOTf	PivCl	<i>t</i> -Bu ₂ Cu(CN)(ZnCl) ₂ ·2MgCl ₂ ·2LiCl	(92:0):8	71/43	28
3	TMSOTf	AcCl	<i>t</i> -Bu ₂ Cu(CN)(ZnCl) ₂ ·2MgCl ₂ ·2LiCl	(69:4):27	62/43	33

^{a)} Die Formeln für *t*-BuM geben nur die Zusammensetzung der Cuprate und nicht ihre exakte Struktur wieder. ^{b)} Die Ausbeute und das Produktverhältnis des nach der Aufreinigung durch SC erhaltenen Produktgemischs aus 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4), 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) und 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2) wurden ¹H-NMR-spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich hierbei auf die C4-Produkte DHP-C4 und Ox-C4.

Im Gegensatz zu der heterogenen Abfangreaktion (Tabelle 3, Eintrag 8) lieferte das Zink-Cyanocuprat *t*-Bu₂Cu(CN)(ZnCl)₂·2MgCl₂ keine höhere, sondern eine um die Hälfte auf 28% reduzierte Ausbeute (Tabelle 4, Eintrag 2). Für den nächsten Versuch wurde deshalb PivCl gegen das in den heterogenen Abfangreaktionen überlegene AcCl getauscht (vgl. Tabelle 3 Einträge 1 und 2) sowie TIPSOTf durch TMSOTf ersetzt

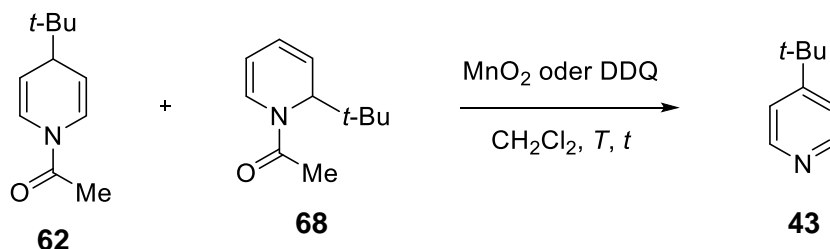
(Tabelle 4, Eintrag 3), da Pabel et al. zeigen konnten, dass TMSOTf in einigen Fällen das effizientere Additiv für die Bildung der *N*-Acylpyridiniumionen ist.¹⁶⁰ Allerdings ließ sich auch hierdurch weder die Regioselektivität noch die Ausbeute der Addition steigern, so dass das Potential der Abfangreaktion der *N*-Acylpyridiniumionen mit Organocupraten ausgeschöpft erschien.

Mit einer Ausbeute von maximal 60% für das *N*-Acyl-1,4-dihydropyridin erfüllte keine der durchgeführten Abfangreaktionen der *N*-Acylpyridiniumionen die eingangs von Kapitel 4.1 beschriebenen Anforderungen an eine medizinalchemische Synthesemethode. Die Ausbeute über beide Stufen, zu der neben der Addition an die Pyridiniumionen auch die Oxidation der 1,4-Dihydropyridine gehört, wäre im Endeffekt zu gering, um eine effiziente Darstellung der Zielverbindungen zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde die Oxidation der *N*-Acyl-dihydropyridine nur stichpunktartig überprüft und der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf die Optimierung der *N*-Silylpyridiniumionenstrategie gelegt.

4.1.1.3 Die Oxidation des *N*-Acetyl-4-*tert*-butyldihydropyridins 62

Um die Oxidation der *N*-Acyl-dihydropyridine zu überprüfen, wurde das nach der Abfangreaktion des *N*-Acetylpyridiniumions mit *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ erhaltene Regioisomerengemisch der 1,4-Dihydropyridine **62** und **68** einer mikrowellengestützten Oxidation mit MnO₂ bei 50, 70 und 100 °C (150 W, Tabelle 5, Eintrag 1)¹⁷⁴ sowie der Reaktion mit DDQ bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂ (Tabelle 5, Eintrag 2)¹⁴⁴ unterworfen.

Tabelle 5: Test der Oxidation des *N*-Acetyldihydropyridins **62** mit MnO₂ und DDQ.



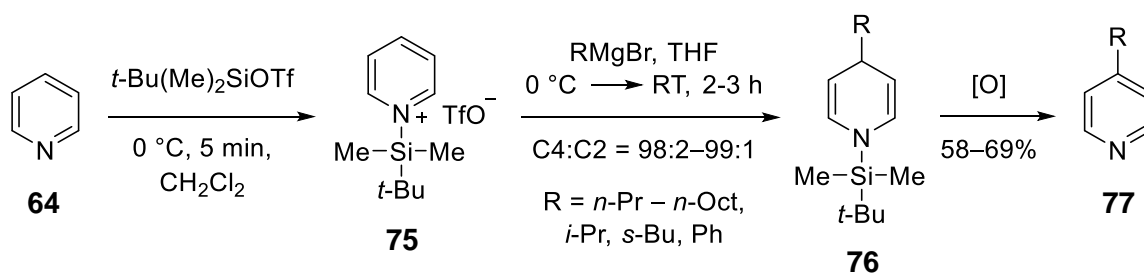
Eintrag	Oxidationsmittel (Äq.)	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	Ausbeute (%)
1	MnO ₂ (10)	50 / 70 / 100 ^{a)}	je 20	---
2	DDQ (1.4)	RT	60	62

Das Regioisomerengemisch aus **62** und **68** (**62:68** = 77:23) war säulenchromatographisch nicht zu trennen weshalb beide Isomere als Gemisch eingesetzt wurden. Während MnO_2 nicht in der Lage war das Dihydropyridin **62** zu oxidieren, lieferte die Reaktion von **62** mit DDQ das Oxidationsprodukt 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) nach säulenchromatographischer Aufreinigung und Destillation mit einer Ausbeute von 62%.

4.1.2 Die *N*-Silylpyridiniumstrategie

Im Gegensatz zur *N*-Acyropyridiniumstrategie wird bei der *N*-Silylpyridiniumstrategie die Regioselektivität der Addition stärker durch die sterische Abschirmung der C2-Position und weniger durch die Reaktivität der metallorganischen Nucleophile gesteuert. Erreicht wird dies durch die *N*-Silylierung der Pyridinderivate mit sterisch anspruchsvollen Silyltriflaten wie *tert*-Butyldimethylsilyltriflat (TBDMSOTf) oder Triisopropylsilyltriflat (TIPSOTf). Statt der aufwändig herzustellenden Organocuprate können somit kommerziell erhältliche bzw. synthetisch leichter zugängliche Grignard-Reagenzien als Nucleophile eingesetzt werden.

Die *N*-Silylpyridiniumroute zur Darstellung von 4-Alkyl- und 4-Arylpyridinderivaten wurde erstmals 1984 von Akiba et al. vorgestellt.¹⁵⁹ Hierzu wurde Pyridin (**64**) in CH_2Cl_2 mit TBDMSOTf silyliert, das Lösungsmittel entfernt und das *N*-Silylpyridiniumion **75** in THF mit den entsprechenden Grignard-Reagenzien regioselektiv zu den 1,4-Dihydropyridinen **76** umgesetzt (Schema 14). Durch die sterische Abschirmung der C2-Position wurden für RMgBr mit $\text{R} = n\text{-Pr}, n\text{-Bu}, n\text{-Pent}, n\text{-Hex}, n\text{-Hep}$ und $n\text{-Oct}$ sowie *i*-Pr, *s*-Bu und Ph Regioselektivitäten zwischen 98:2 und 99:1 erreicht. Die Oxidation der *N*-Silyl-1,4-dihydropyridine **76** erfolgte im Anschluss an die wässrige Aufarbeitung mittels Luftsauerstoff und lieferte die Pyridinderivate **77** mit Ausbeuten von 58–69% über beide Stufen.

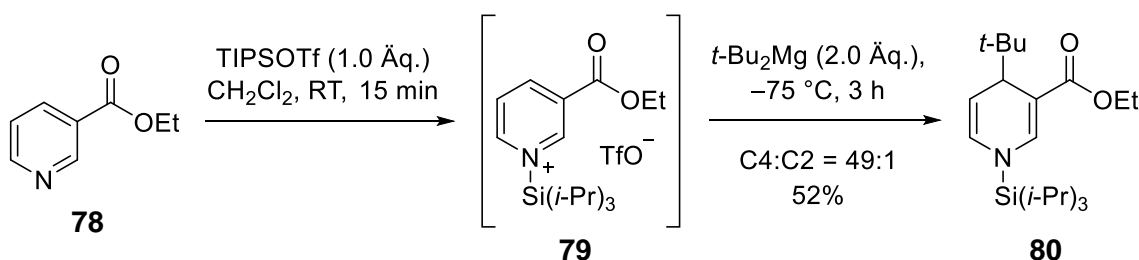


Schema 14: Synthese von 4-Alkyl- und 4-Arylpyridinderivaten nach Akiba et al.¹⁵⁹

4.1.2.1 Literaturbekannte Beispiele zur Einführung eines *tert*-Butylrests in Pyridinderivate mittels *N*-Silylpyridiniumionen

Neben den in Schema 14 dargestellten Reaktionen fanden *N*-Silylpyridiniumionen in der Literatur bisher vor allem Anwendung zur Herstellung von 1,4-Dihydropyridinen bzw. 4,4-disubstituierten Dihydropyridinen. Hierbei lieferte die Kombination aus Triisopropylsilyltriflat als sterisch anspruchsvolles Silylierungsreagenz und Diorganomagnesiumverbindungen als metallorganische Nucleophile hervorragende Selektivitäten für die Addition in 4-Position der Pyridiniumionen.^{190,191}

Aus dieser Versuchsreihe stammt auch das mit der Aktivierung von Nicotinsäureethylester (**78**) durch TIPSOTf und der Abfangreaktion des Pyridiniumions **79** mit der Dialkylmagnesiumverbindung *t*-Bu₂Mg (Schema 15) einzige literaturbekannte Beispiel für die Addition eines *tert*-Butylnucleophils an *N*-Silylpyridiniumionen.



Schema 15: Synthese des Dihydronicotinats **80** durch die Abfangreaktion des *N*-Silylpyridiniumions **79** mit *t*-Bu₂Mg.

Durch die effektive sterische Abschirmung der C2-Position konnte das Dihydronicotinat **80** mit einer sehr guten Regioselektivität von 49:1 und einer Ausbeute von 52% erhalten werden. Da es sich hierbei um einen Vorversuch zur Synthese von 4,4-disubstituierten 1,4-Dihydronicotinaten handelte, wurde die Oxidation des Dihydronicotinats nicht weiter untersucht.

Aufgrund der wenigen literaturbekannten Beispiele für die Einführung eines *tert*-Butylrests in Pyridinderivate bestand das erste Ziel darin, das Potential der *N*-Silylpyridiniumroute hierfür umfassend auszuloten. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Darstellung der 1,4-Dihydropyridine nach Aktivierung von Pyridin mit TBDMSOTf (Schema 14, Akiba et al.)¹⁵⁹ und TIPSOTf (Schema 15, Sperger et al.)¹⁹⁰ untersucht. Als Nucleophile kamen sowohl *t*-BuMgCl mit und ohne zugesetzten Cu(I)-

Salzen als auch die Diorganomagnesiumverbindung *t*-Bu₂Mg zum Einsatz. Im Anschluss daran musste eine möglichst milde und effiziente Methode zur Oxidation der erhaltenen *N*-Silyl-1,4-Dihydropyridine gefunden werden. Die mit der Diorganomagnesiumverbindung *t*-Bu₂Mg durchgeführten Abfangreaktionen sowie die Identifizierung der für die Oxidation der *N*-Silyldihydropyridine geeigneten Oxidationsmittel und Reaktionsbedingungen sind Teil der in Kapitel 3.1 vorgestellten Veröffentlichung „*Regioselective and Transition-Metal-Free Addition of tert-Butyl Magnesium Reagents to Pyridine Derivatives: A Convenient Method for the Synthesis of 3-Substituted 4-tert-Butylpyridine Derivatives*“ und werden daher an dieser Stelle nicht mehr behandelt.

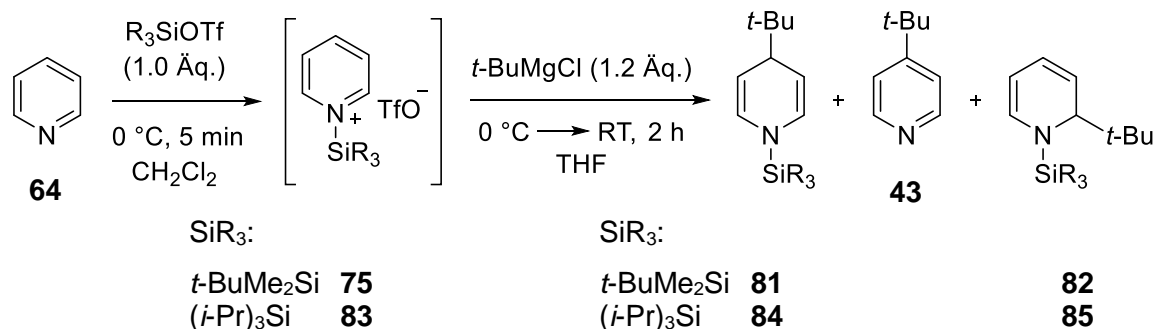
4.1.2.2 Untersuchungen zur Addition von *tert*-Butylmetallverbindungen an *N*-Silylpyridiniumionen

Die Beurteilung des Reaktionserfolgs wurde wie bereits bei der Untersuchung der Addition von *tert*-Butylmetallverbindungen an *N*-Acylpyridiniumionen (vgl. Kapitel 4.1.1.2) anhand der summierten Ausbeute der aus der C4-Addition resultierenden 1,4-*tert*-butylsubstituierten *N*-Silyldihydropyridine sowie dem durch die spontane Oxidation der Dihydropyridine gebildeten 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) vorgenommen. Im Gegensatz zu den *N*-Acyl-1,4-dihydropyridinen weisen die entsprechenden *N*-Silyl-Analoga eine deutlich höhere Oxidationsempfindlichkeit auf, so dass das nach der wässrigen Aufarbeitung erhaltene Produkt stets mit 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) verunreinigt war. Um den Reaktionserfolg unverfälscht analysieren zu können, musste die Ausbeutebestimmung deshalb vor der säulenchromatographischen Reinigung (SC) durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Menge an 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2), 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4) und 4-*tert*-Butylpyridin (Ox-C4) direkt nach der wässrigen Aufarbeitung ¹H-NMR spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Eine Oxidation der 1,2-Dihydropyridine während der wässrigen Aufarbeitung konnte nicht beobachtet werden.

In Anlehnung an die bereits erwähnten Arbeiten von Akiba et al. (vgl. Schema 14, Kapitel 4.1.2)¹⁵⁹ wurde Pyridin (**64**) mit TBDMSOTf aktiviert und das *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)pyridiniumion **75** bei 0 °C in THF mit *t*-BuMgCl umgesetzt. Obwohl die Autoren unter diesen Bedingungen sehr gute Ausbeuten und Regioselektivitäten für die Addition primärer und sekundärer Alkylmagnesiumbromide erhielten, lieferte

die Abfangreaktion von **75** mit *t*-BuMgCl das 1,4-Dihydropyridin **81** nur mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 14% und einer schlechten Regioselektivität von 61:29 (Tabelle 6, Eintrag 1). Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit des 1,4-Dihydropyridins **81** wurden bereits im Zuge der wässrigen Aufarbeitung 56% des Dihydropyridins zu 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) oxidiert, so dass sich ein Gemisch aus dem 1,4-Dihydropyridin **81** und 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) im Verhältnis 31:40 ergab. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Ausbeutebestimmung mittels eines internen Standards.

Tabelle 6: Abfangreaktionen von **75** und **83** mit *t*-BuMgCl nach Akiba et al.¹⁵⁹



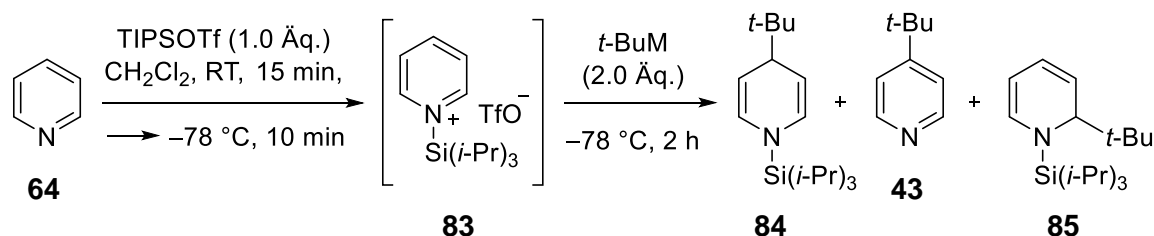
Eintrag	R_3SiOTf	Cu(I)-Salz (0.05 Äq.)	(DHP-C4:Ox-C4): DHP-C2 ^{a)}	Ausbeute ^{a)}	
				C4-Produkte	(%)
1	TBDMSOTf	–	(31:40):29	81/43	14
2	TIPSOTf	–	(77:10):13	84/43	21
3 ^{b)}	TIPSOTf	CuI	(59:36):5	84/43	21

^{a)} Die Ausbeute und das Produktverhältnis des nach der wässrigen Aufarbeitung erhaltenen Produktgemischs aus 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4), 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) und 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2) wurden ¹H-NMR-spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich hierbei auf die C4-Produkte DHP-C4 und Ox-C4. ^{b)} Abfangreaktion bei –20 °C statt bei 0 °C durchgeführt.

Durch einen Wechsel von TBDMSOTf auf das sterisch anspruchsvollere TIPSOTf konnte zwar die C4-Regioselektivität von 61:29 auf 87:13 erhöht werden, nicht aber die Ausbeute der C4-Produkte **84** und **43**, welche weiterhin nur 21% betrug (Tabelle 6, Eintrag 2). In beiden Fällen ließen sich in dem isolierten Rohprodukt mittels ¹H-NMR Spektroskopie große Mengen *tert*-Butyltriisopropylsilan nachweisen, wodurch angenommen werden konnte, dass der Angriff von *t*-BuMgCl bevorzugt auf das Silizium-Atom der *N*-Silylgruppe erfolgt. Wurde dem Pyridiniumion **83** eine katalytische Menge CuI zugesetzt und die Reaktionstemperatur von 0 °C auf –20 °C abgesenkt (Tabelle 6, Eintrag 3), konnte die C4-Regioselektivität von 87:13 auf 95:5 verbessert werden. Die Problematik des Si-Angriffs, welche sich letztendlich in Form

der niedrigen Ausbeute von 21% äußerte, blieb dennoch bestehen und konnte auch nicht wesentlich durch ein Absenken der Reaktionstemperatur auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ verbessert werden (Tabelle 7, Einträge 1 und 3–7).

Tabelle 7: Abfangreaktionen von **83** mit verschiedenen Organometallverbindungen.



Eintrag	<i>t</i> -BuM	Cu(I)-Salz (0.05 Äq.) ^{a)}	Ausbeute C4-Produkte
			∑ 84 und 85 (%) ^{b)}
1	<i>t</i> -BuMgCl	–	31
2	<i>t</i> -Bu ₂ Mg ^{c)}	–	82 ^{d)}
3	<i>t</i> -BuMgCl	CuI	38
4	<i>t</i> -BuMgCl	CuI·2LiCl	35
5	<i>t</i> -BuMgCl	CuCN·2LiCl	33
6	<i>t</i> -Bu ₂ CuCN(MgCl) ₂	–	21
7	<i>t</i> -BuZnBr	CuCN·LiCl	–

^{a)} Cu(I)-Salz und Pyridin wurden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit TIPSOTf und nach weiteren 15 min mit dem Metallorganyl versetzt. ^{b)} Die Ausbeute und das Produktverhältnis des nach der wässrigen Aufarbeitung erhaltenen Produktgemischs aus 1,4-Dihydropyridin (DHP-C4), 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Ox-C4) und 1,2-Dihydropyridin (DHP-C2) wurden ¹H-NMR-spektroskopisch mit 2,4,6-Collidin als internem Standard bestimmt. Die angegebene Ausbeute bezieht sich hierbei auf die C4-Produkte DHP-C4 und Ox-C4. ^{c)} *t*-Bu₂Mg = 0.53 M Lösung in THF/Et₂O (1:1). ^{d)} Kombinierte Ausbeute aus zwei Experimenten, da die Ausbeuten der einzelnen Versuche stark variierten.

Auffällig war auch, dass kein nennenswerter Unterschied zwischen den mit CuI (Tabelle 7, Eintrag 3), CuI·2LiCl (Tabelle 7, Eintrag 4) oder CuCN·2LiCl (Tabelle 7, Eintrag 5) katalytisch erzeugten Organocupraten sowie dem stöchiometrisch eingesetzten Cuprat *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (Tabelle 7, Eintrag 6) zu beobachten war. Mit dem für die Abfangreaktion der *N*-Acylpyridiniumionen erfolgreich eingesetzten Zink-Cyanocuprat aus *t*-BuZnBr und CuCN·2LiCl (Tabelle 7, Eintrag 7) wurde keine Produktbildung beobachtet.

Im Gegensatz dazu lieferte die nach Sperger et al.¹⁹⁰ durchgeführte Abfangreaktion des *N*-Silylpyridiniumions **83** mit der Diorganomagnesiumverbindung *t*-Bu₂Mg bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabelle 7, Eintrag 2) das C4-Additionsprodukt mit einer sehr guten Ausbeute von 82%. Aufgrund des hohen Salzgehalts in dem Rohmaterial der Einträge 1 und 3–7 war

der Anteil des nur in Spuren vorhandenen C-2 Isomers **85** für eine $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Isomerenbestimmung zu gering. Folglich kann die C4-Regioselektivität der Addition mit $t\text{-Bu}_2\text{Mg}$ nur qualitativ, aber nicht quantitativ als sehr gut beschrieben werden. Aufbauend auf diesem vielversprechenden Ergebnis wurde die Abfangreaktion mit $t\text{-Bu}_2\text{Mg}$ genauer untersucht. Die Arbeiten hierzu führten schließlich zu der in Kapitel 3.1 vorgestellten Veröffentlichung.

4.2 Synthese von symmetrischen Bispyridiniumverbindungen mit 1,3-Diiodpropan

Die Bispyridiniumsynthese durch Arylierung von Pyridinderivaten mit Arylbromiden wurde bereits im Jahr 1903 von Gustav Halfpaap in seiner Arbeit „Ueber die Einwirkung von m -Xylylenbromid auf primäre, secundäre und tertiäre Amine, sowie auf Rhodan- und cyansaures Kalium“ beschrieben.¹⁷⁵ Umfangreiche Studien zur Synthese und Charakterisierung von Bispyridiniumssalzen lieferten unter anderem Fritz Kröhnke,¹⁷⁶ Carl Rohmann und Karl Zietan in den 30er-Jahren des letzten Jahrhunderts.¹⁷⁷ Veröffentlichungen aus den letzten Jahren, die sich mit der gezielten Synthese von Bispyridiniumsalzen beschäftigten, nutzten hierfür vor allem Vorschriften von Timperley et al. oder Musilek et al.^{137,138}

In beiden genannten Fällen kommen Dihalogenalkane, oftmals Iodide, seltener Bromide, zur Alkylierung der Pyridinderivate in MeCN oder DMF bei 70–80 °C zum Einsatz. Wie in der Veröffentlichung „*Synthesis of a Series of Structurally Diverse MB327 Derivatives and Their Affinity Characterization at the Nicotinic Acetylcholine Receptor*“ bereits beschrieben wurde (vgl. Kapitel 3.2), erwiesen sich die genannten Synthesemethoden als ineffizient für die Darstellung der in Kapitel 2.2 (Abbildung 15) aufgeführten Bispyridinium Zielverbindungen.

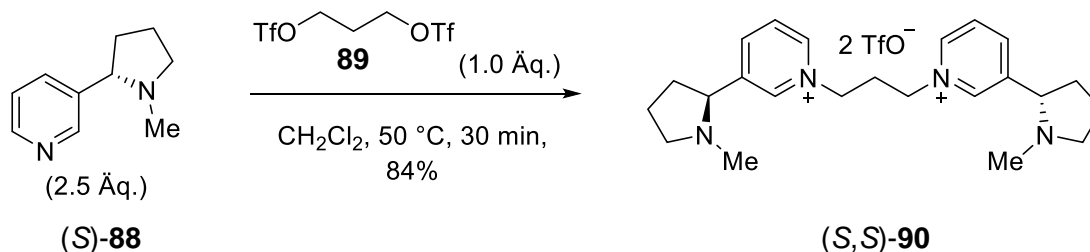
Hauptproblem war die zu geringe Reaktivität von Alkylhalogeniden wie 1,3-Diiodpropan (**86**) gegenüber Pyridinderivaten mit einem Substituenten in 2-Position. So lies sich z. B. nur ein Teil der in Tabelle 8 dargestellten N-Heterocyclen bei 70 °C in DMF alkylieren. Während die Bispyridiniumverbindungen **MB327** und **87a, d** und **f** ausgehend von 4-*tert*-Butylpyridin (**43**, Tabelle 8, Eintrag 1), 3-*tert*-Butylpyridin (**35c**, Tabelle 8, Eintrag 2), 3-Methoxypyridin (**74c**, Tabelle 8, Eintrag 5) und 3-Dimethylaminopyridin (**74e**, Tabelle 8, Eintrag 7) nach Kristallisation problemlos mit Ausbeuten zwischen 54 und 79% erhalten werden konnten, wurde im Fall von 2- und

Pyridinderivate mit einem *tert*-Butyl- oder Dimethylaminosubstituenten in 2-Position (**74a** und **74f**) erwiesen sich als sterisch zu stark abgeschirmt, um mit 1,3-Diodpropan (**86**) in DMF alkyliert werden zu können (Tabelle 8, Einträge 3 und 8). Bei allen Reaktionen aus Tabelle 8 war zudem die Bildung von Iod, vermutlich durch Zersetzung des Alkyljodids, zu beobachten.

In Summe betrachtet, erforderte die Alkylierung mit 1,3-Diodpropan in DMF lange Reaktionszeiten von bis zu 48 h bei nur mäßigen Ausbeuten und der Einschränkung, dass nur Pyridinderivate ohne einen Substituenten in 2- oder 6-Position als Edukte in Frage kamen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Alkylierung mit dem deutlich reaktiveren Propan-1,3-bistriflat untersucht, welches sich schließlich als Alkylierungsmittel der Wahl für eine effiziente und schnelle Darstellung von Bispyridiniumsalzen herausstellte (vgl. hierzu Kapitel 3.2).

4.3 Alkylierung von (*S*)-Nicotin mit Propan-1,3-bistriflat (**89**)

Die Synthese des Bispyridiniumsalzes (*S,S*)-**90** aus (*S*)-Nicotin ((*S*)-**88**) und Propan-1,3-bistriflat (**89**)^{143,178} in CH₂Cl₂ gelang nach Kristallisation aus EtOAc/Isohexan mit einer Ausbeute von 84% (Schema 16).



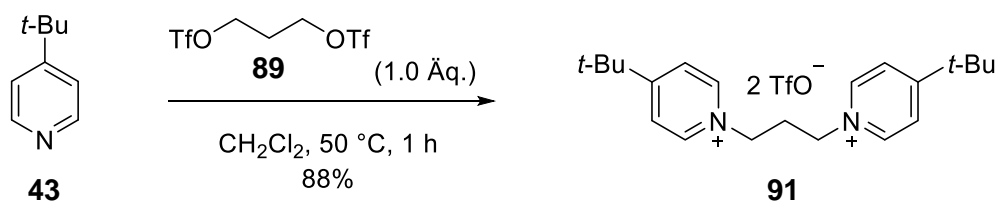
Schema 16: Synthese des Bispyridiniumsalzes (*S,S*)-**90** aus (*S*)-Nicotin (**88**).

Die tertiäre Aminofunktion des *N*-Methylpyrrolidinrings erwies sich als ausreichend sterisch abgeschirmt, um eine selektive Alkylierung des Pyridin-Stickstoffs zu gewährleisten. Eine Öffnung des Pyrrolidinrings wurde daher nicht beobachtet.

4.4 Die Synthese des Triflat-Analogons von MB327 sowie des Diiodids von PTM0002

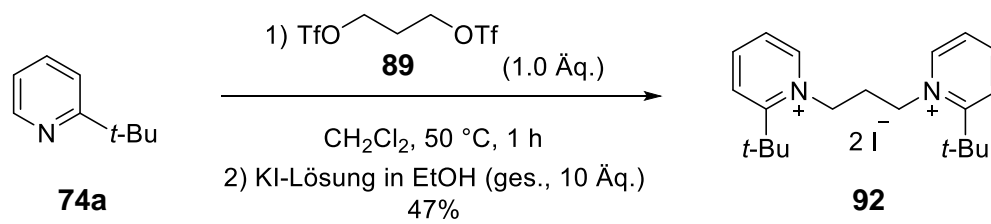
Obwohl die Bispyridiniumtriflate in den MS-Bindungsassays zuverlässige Ergebnisse lieferten, ließen am InstPharmToxBw mit der SURFE²R Plattform durchgeführte elektrophysiologische Messungen der Bispyridiniumiodide **MB327** und **29h** sowie des Bispyridiniumtriflats **29a** (PTM0002) am nAChR des *Torpedo californica* vermuten, dass das Triflat-Gegenion die empfindlichen Messungen durch Störsignale der Eigenladung beeinflussen und somit einen maskierenden Effekt auf die gemessene Stromantwort haben könnte.¹⁹² Um diese Frage abschließend zu klären, wurden für Gegenüberstellungsversuche jeweils das entsprechende Triflat-Salz von MB327 (Iodid: **MB327**, Triflat: **91**) und das Iodid-Analogon zu PTM0002 (Triflat: **29a**, Iodid: **92**) synthetisiert.

Die Synthese des Triflat-Analogons von MB327 (**91**) gelang problemlos mit einer Ausbeute von 88% nach Alkylierung von 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) in CH₂Cl₂ bei 50 °C mit Propan-1,3-bistriflat (**89**) und Reinigung des Salzes mittels RP-MPLC (Schema 17).



Schema 17: Synthese des Triflat-Analogons von MB327 (**91**).

Für die Synthese des Iodid-Analogons von PTM0002 (**29h**) wurde zunächst 2-*tert*-Butylpyridin (**74a**) bei 85 °C mit Propan-1,3-bistriflat (**89**) alkyliert und das Iodid-Salz **92** anschließend zwei Mal aus einer im 10-fachen Überschuss zugegebenen gesättigten ethanolischen KI-Lösung umkristallisiert (Schema 18). Hierfür konnte die sehr gute Löslichkeit des Bispyridiniumtriflats in EtOH bei gleichzeitig sehr schlechter Löslichkeit des Iodids voll ausgenutzt werden. Eine Überprüfung des in 46% Ausbeute kristallisierten Salzes mittels ¹⁹F-NMR zeigte, dass alle Triflationen erfolgreich gegen Iodidionen ausgetauscht worden waren.



Schema 18: Synthese des Iodid Analogons von PTM0002 (**92**).

4.5 Experimental Part

4.5.1 Methods

Anhydrous reactions were carried out in vacuum-dried glassware under argon atmosphere. Microwave reactions were performed in sealed glass vials using a CEM Discover SP microwave synthesizer. Liquid reagents and solvents were added by disposable syringes or oven-dried stainless steel cannulas. Solids were added under argon counterflow or were dissolved in given solvents. Liquid starting materials were dried by three freeze-pump-thaw cycles. Low temperature reactions were carried out in acetone filled dewar vessels by means of a laboratory cryostat.

Solvents and reagents

THF, Et₂O, 1,4-dioxane and CH₂Cl₂ were distilled prior to use under nitrogen atmosphere and dried according to standard procedures.¹⁷⁹ Dry DMF and dry pyridine were purchased over molecular sieves from Acros-Organics or Sigma-Aldrich. *n*-Pentane, EtOAc, CH₂Cl₂, hexanes, *i*-PrOH, MeOH and Et₂O, which were used for extraction, crystallization or column chromatography, were purchased in technical grade and distilled prior to use. All other chemicals were used as purchased from commercial sources.

Chromatography

Thin layer chromatography (TLC) for qualitative reaction and fraction control was carried out using plates purchased from Merck (silica gel 60 F₂₅₄ on aluminum sheet). Analytes were visualized by the following methods or staining solutions:

- Irradiation with UV-light ($\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$).
- Immersion of the TLC plate into a cerium-ammonium-molybdate (CAM) solution followed by heating with a heat gun (350–500 °C). Preparation of the staining solution: Ce(SO₄)₂ (5 g) and (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (25 g) were dissolved in a mixture of conc. H₂SO₄ (50 mL) and H₂O (450 ml).
- Immersion of the TLC plate into a potassium permanganate solution followed by heating with a heat gun (350–500 °C). Preparation of the staining solution:

KMnO₄ (3 g) and K₂CO₃ (20 g) were dissolved in a mixture of 5% aq. NaOH (5 mL) and H₂O (300 mL)

- Immersion of the TLC plate into a solution containing Dragendorff's reagent followed by heating with a heat gun (350–500 °C). Preparation of the staining solution: Bi(NO₃)₃ (3 g) was dissolved in a mixture of H₂O (40 mL) and glacial acetic acid (10 mL) and treated with a solution of KI (8 g) in H₂O (20 mL).

Flash column chromatography (FC) was performed using Merck Geduran® silica gel 60 (40–63 µm mesh size) or neutral/basic alumina Brockman I (50–200 µm) purchased from Acros Organics as stationary phase which was adjusted to the given activity grade.¹⁸⁰ Medium pressure liquid chromatography (MPLC) was carried out using a Büchi preparative chromatography system with YMC-Triart Prep C18-S (reversed phase, 20 µm mesh size) or YMC SIL-HG (normal phase, 20 µm mesh size) silica gel as stationary phase.

NMR spectroscopy

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded by the analytical division of the Department of Pharmacy of the Ludwig-Maximilians-Universität Munich using Bruker BioSpin Avance III HD 400 and 500 MHz (equipped with a Prodigy™ cryo probe) spectrometers. Chemical shifts (δ) were reported to TMS as internal standard and are given in ppm, followed by the multiplicity, the coupling constants (given in Hz), the integral intensity and the atom assignment. Signal multiplicities were abbreviated with s (singlet), br. s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin. (quintet), sept. (septet) and m (multiplet). Except for multiplets, chemical shifts are reported with the center of the signal. In case of combined multiplicities, the multiplicity with the larger coupling constant is stated first. Signals were assigned by means of COSY, HMQC und HMBC 2D NMR spectra. If two signals could not be assigned unambiguously, they were highlighted with „*“, „**“ etc. and can be interchanged with each other. All spectra were integrated with MestReNova (Version 10.0.2), Mestrelab Research S.L. 2015. The purity of the test compounds was determined by means of quantitative NMR using Sigma Aldrich TraceCERT® maleic acid or dimethylsulfone as internal calibrants.^{181,182} The purity of all tested compounds was > 95%.

Mass spectrometry

High-resolution (HR) mass spectrometry was performed by the analytical divisions of the Departments of Chemistry and Pharmacy of the Ludwig-Maximilians-Universität Munich on a Finnigan MAT 95 (EI), a Finnigan LTQ FT (ESI) or a Jeol JMS 700 MStation (FAB). Only characteristic molecule ion peaks were reported.

IR spectroscopy

IR spectroscopy was performed using an FT-IR Spectrometer 1600 and Paragon 1000 (PerkinElmer); oils were measured as film and solid samples as KBr pellets. The measured wave numbers $\tilde{\nu}$ are given in cm^{-1} .

Melting point measurements

Melting points were determined with a BÜCHI 510 melting point apparatus and are uncorrected.

Determination of the optical rotation

Optical rotation was measured with a PerkinElmer polarimeter 241 MC. For specific rotation measurement, the analyte was dissolved in CH_2Cl_2 . Specific rotation was calculated using the following equation:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot d}$$

In this, d is the length of the vessel in dm, α is the observed angle of optical rotation in $^\circ$ and c is the concentration of the analyte in g/100 mL. The measurement was performed at room temperature (20 $^\circ\text{C}$) and the wavelength of the used light was 589 nm (sodium D-line),

4.5.2 General Procedures

Synthesis of 4-alkyl-*N*-acyl-1,4-dihydropyridines in heterogenous phase by addition of organocuprates to *N*-acylpyridinium ions (GP1)

Phenylchloroformate, acetyl- or trimethylacetylchloride (1.0 eq.) was added to a solution of the corresponding pyridine derivative (1.0 eq.) in THF (1.75 mL/mmol) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the mixture was stirred for 1 h before the organocuprate (1.1 eq., prepared according to GP7–11) was added via a transfer cannula. The reaction mixture was stirred for the given period at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the reaction was quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1, 4 mL/mmol) or H_2O (4 mL/mmol). The mixture was extracted with the given solvent (3 x 10 mL/mmol) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (10 mL/mmol). The organic layer was dried over MgSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the crude dihydropyridine was purified by flash column chromatography (FCC). The yield was determined by means of quantitative $^1\text{H-NMR}$ using 2,4,6-collidine as internal standard.

Synthesis of 4-*tert*-butyl-*N*-acyl-1,4-dihydropyridines in homogenous phase by addition of organocuprates to *N*-acylpyridinium ions in the presence of silyltriflates (GP2)

According to Pabel et al.,¹⁶⁰ a solution of pyridine (1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (5 mL/mmol) at room temperature was successively treated with the corresponding acyl chloride (1.0 eq.) and after 5 min with TIPSOTf or TMSOTf (1.0 eq.). The solution was stirred for 60 min at rt, cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the corresponding organocuprate (1.3 eq., prepared according to GP10 or GP11) was added via a transfer cannula. After the given period the reaction was quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1, 5 mL/mmol) or H_2O (5 mL/mmol) and diluted with H_2O (5 mL/mmol). The mixture was extracted with Et_2O (3 x 15 mL/mmol) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (15 mL/mmol). The organic layer was dried over MgSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by FCC. The yield was determined by means of quantitative $^1\text{H-NMR}$ using 2,4,6-collidine as internal standard.

Synthesis of 4-*tert*-butyl-1-trialkylsilyl-1,4-dihydropyridines by addition of *t*-BuMgCl to *N* trialkylsilylpyridinium ions (GP3)

Following Akiba et al.,¹⁵⁹ the corresponding silyltriflate (1.0 eq.) was added to a solution of pyridine (1.0–1.1 eq.) in CH₂Cl₂ at 0 °C and the mixture was stirred for 5 min before it was allowed to warm to rt. The solvent was removed under reduced pressure and THF was added to the resulting colorless pyridinium salt. The solution was cooled to 0 °C, treated with *t*-BuMgCl (1.2 eq.) and stirred for the given period of time. The reaction was quenched by addition of H₂O and the mixture was extracted with Et₂O or CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (10 mL/mmol), dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The yield was determined by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard.

Synthesis of 4-*tert*-butyl-1-triisopropylsilyl-1,4-dihydropyridine in homogenous phase by addition of *t*-BuMgCl to *N*-triisopropylsilyl activated pyridine in the presence of Cu(I) (GP4)

Pyridine (1.0 eq.) was added to a suspension of the corresponding Cu(I) salt (0.05 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL/mmol) at rt and the resulting mixture was cooled to –78 °C. Successively, TIPSOTf (1.1 eq.) and after 15 min *t*-BuMgCl were added (2 M solution in Et₂O, 1.1 eq.) and the reaction was quenched after 1 h by addition of H₂O (6 mL/mmol). The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL/mmol), the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (20 mL/mmol) and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was analyzed by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard.

Synthesis of 4-*tert*-butyl-1-triisopropylsilyl-1,4-dihydropyridine in homogenous phase by addition of *t*-BuMgCl or *t*-Bu₂Mg to *N*-triisopropylsilyl activated pyridine (GP5)

Following Sperger et al.,¹⁹⁰ TIPSOTf (1.05 eq.) was added to a solution of pyridine (1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL/mmol) and the mixture was stirred at rt for 15 min. The solution was cooled to –78 °C and the magnesium reagent (2.0 eq.) was added via transfer cannula. After the given period the reaction was quenched by addition of H₂O (6 mL/mmol), the resulting mixture was allowed to warm to rt and extracted with

CH₂Cl₂ (3 x 15 mL/mmol). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (15 mL/mmol), dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. Determination of the product yield in the crude material was performed by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard. If mentioned, the crude material was further purified by FCC.

Synthesis of symmetric bispyridinium compounds by N-alkylation of pyridine derivatives with propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (89) (GP6)

Propane-1,3-diyl bis(trifluoromethanesulfonate) (**89**) was added to a solution of the corresponding pyridine derivative in CH₂Cl₂ at rt and the mixture was stirred for the given period of time at 50 °C. Residual CH₂Cl₂ was removed under reduced pressure and the crude material was either purified by crystallization from the given solvent or by RP-MPLC.

Preparation of *t*-Bu₂CuLi·LiI and *t*-BuCu(CN)Li (GP7)

t-BuLi (solution in *n*-pentane) was added to a suspension of CuI or CuCN in THF at -78 °C and the resulting mixture was stirred for 45 min.

Preparation of *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (GP8)

t-BuZnBr (solution in THF) was added to a solution of CuCN and LiCl in THF at -10 °C and the resulting mixture was stirred for 10 min at 0 and -78 °C each.

Preparation of *t*-Bu₂CuLi·LiCN (GP9)

t-BuLi (solution in *n*-pentane) was added to a suspension of CuCN in THF at -78 °C and the resulting mixture was stirred for 45 min at -78 °C, for 4.5 min at rt and again for 10 min at -78 °C.

Preparation of *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (GP10)

t-BuMgCl (solution in Et₂O) was added to a suspension of CuCN in THF at -78 °C and the resulting mixture was stirred for 45 min at -78 °C, for 5 min at rt and again for 10 min at -78 °C.

Preparation of *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂·2LiCl (GP11)

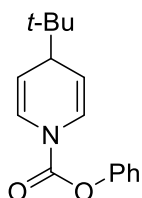
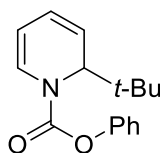
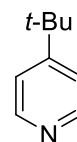
t-BuMgCl (solution in Et₂O) was added to a suspension of CuCN and LiCl in THF at -78 °C and the resulting mixture was stirred for 45 min at -78 °C, for 5 min at rt and again for 10 min at -78 °C.

Preparation of *t*-Bu₂Mg (GP12)¹⁸³

1,4-Dioxane (1.2 eq.) was added to a 1 M solution of *t*-BuMgCl in Et₂O at rt, the resulting colorless precipitate was centrifuged (2 h at 4000 u/min) and the clear supernatant containing *t*-Bu₂Mg was carefully removed. The molarity of the reagent was determined by titration according to Chong et al.¹⁸⁴

4.5.3 Experimental Procedures

Phenyl 4-(*tert*-butyl)pyridine-1(4*H*)-carboxylate (**65**) and phenyl 2-(*tert*-butyl)pyridine-1(2*H*)-carboxylate (**66**)

**65****66****43**

A) Phenylchloroformate (348 mg, 2.20 mmol, 279 μ L, 1.1 eq.) was added to a solution of pyridine (159 mg, 2.00 mmol, 162 μ L, 1.0 eq.) and CuI (19.2 mg, 100 μ mol, 0.05 eq.) in THF (5 mL) at -78 °C and the mixture was stirred for 20 min before *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 2.20 mmol, 1.10 mL, 1.1 eq.) was added. The resulting solution was stirred for further 60 min at -78 °C and the reaction was quenched by addition of H₂O (10 mL). The mixture was extracted with Et₂O (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by FCC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 4:1). The yield was determined by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard.

65: 170 mg (33%), **66**: 114 mg (22%), overall yield: 55%. Colorless oil. TLC: R_f = 0.94 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 4:1). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): δ = 0.92 (s, 9 H, C(CH₃)₃, **65**), 0.95 (s, 0.7 x 9 H, C(CH₃)₃, **66**), 2.72 (tt, J = 4.1/1.2 Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, **65**), 4.68 (d, J = 6.0 Hz, 0.7 x 1 H, CHC(CH₃)₃, **66**), 5.02–5.07 (m, 1 H, NCH, **65**), 5.09–5.15 (m, 1 H, NCH, **65**), 5.36–5.41 (m, 0.7 x 1 H, NCHCH, **66**), 5.69 (ddt, J = 9.7/6.0/1.1 Hz, 0.7 x 1 H, CHCHC(CH₃)₃, **66**), 6.09 (dd, J = 9.9/5.6 Hz, 0.7 x 1 H, NCHCHCH, **66**), 6.89–6.94 (m, 1.7 x 1 H, NCHCH, **65**, **66**), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, NCHCH, **65**), 7.11–7.17 (m, 1.7 x 2 H, OCCH, **65**, **66**), 7.22–7.27 (m, 1.7 x 2 H, OCCHCHCH, **65**, **66**), 7.36–7.42 (m, 1.7 x 2 H, OCCHCH, **65**, **66**) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): δ = 25.65 (C(CH₃)₃, **66**), 26.70 (C(CH₃)₃, **65**), 35.62 (C(CH₃)₃, **65**), 39.92 (C(CH₃)₃, **66**), 43.90 (CHC(CH₃)₃, **65**), 60.42 (CHC(CH₃)₃, **66**), 108.82 (NCHCH, **66**), 108.95 (NCHCH, **65**), 109.65 (NCHCH, **65**), 121.83 (CHCHC(CH₃)₃, **66**), 122.02 (OCCH, **65**), 122.09 (OCCH, **66**), 122.71 (NCHCHCH, **66**), 123.73 (NCHCH, **65**), 123.85 (NCHCH, **65**), 125.91

(OCCHCHCH, 66), 126.20 (OCCHCHCH, 65), 127.06 (NCHCH, 66), 129.68 (OCCHCH, 66), 129.76 (OCCHCH, 65), 150.30 (NCO, 65), 151.28 (OCCH, 65), 151.71 (OCCH, 66), 153.75 (NCO, 66) ppm. $M(C_{16}H_{19}NO_2) = 257.33$.

B) Phenylchloroformate (0.32 g, 2.0 mmol, 0.25 mL, 1.0 eq.) and pyridine (0.24 g, 3.0 mmol, 0.24 mL, 1.5 eq.) were added to a solution of CuCN (18 mg, 0.20 mmol, 0.1 eq.) and LiCl (17 mg, 0.40 mmol, 0.2 eq.) in THF (8 mL). The resulting suspension was stirred for 10 min at rt, treated with *t*-BuZnBr (0.5 M solution in THF, 2.0 mmol, 4.0 mL, 1.0 eq.) and was stirred for further 60 min. The reaction was quenched by addition of saturated aqueous NH₄Cl (5 ml) and diluted with Et₂O (20 mL) resulting in a biphasic mixture. The layers were separated, the aqueous phase was extracted with Et₂O (2 x 10 mL) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 10 mL), H₂O (2 x 7 mL), 2 M HCl (2 x 7 mL), H₂O (2 x 7 mL) and saturated aqueous NaCl (2 x 7 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1). The yield was determined by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard.

65: 131 mg (26%), **66:** 49 mg (10%), **43:** 1.2 mg (0.4%), overall yield: 36%. Colorless oil.

C) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), phenylchloroformate (0.32 g, 2.0 mmol, 0.26 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (1.1 eq.) in THF. The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 4.4 mmol, 2.2 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 2 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1). Extraction with CH₂Cl₂. FCC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 15:1).

65: 253 mg (49%), **66:** 79 mg (15%), overall yield: 64%. Colorless oil.

D) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), phenylchloroformate (0.32 g, 2.0 mmol, 0.26 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP8

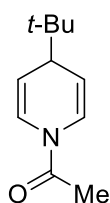
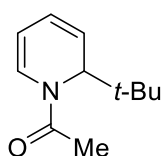
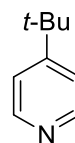
from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.), LiCl (0.19 g, 4.4 mmol, 2.2 eq.) and *t*-BuZnBr (0.5 M solution in THF, 2.2 mmol, 4.4 mL, 1.1 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 2 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 h at rt by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1). Extraction with CH_2Cl_2 . FCC (SiO_2 , *n*-pentane/ Et_2O = 15:1).

65: 240 mg (47%), **66**: 43 mg (8%), overall yield: 55%. Colorless oil.

E) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), phenylchloroformate (0.32 g, 2.0 mmol, 0.26 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP8 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.), LiCl (0.19 g, 4.4 mmol, 2.2 eq.) and *t*-BuZnBr (0.5 M solution in THF, 2.2 mmol, 4.4 mL, 1.1 eq.) in THF (10 mL). The reaction was allowed to warm slowly from -78 to $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ within 17 h and was quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1). Extraction with Et_2O . FCC (SiO_2 , *n*-pentane/ Et_2O = 15:1).

65: 304 mg (59%), **66**: 46 mg (9%), overall yield: 68%. Colorless oil.

1-(4-(*tert*-Butyl)pyridin-1(4*H*)-yl)ethan-1-one (62) and 1-(2-(*tert*-butyl)pyridin-1(2*H*)-yl)ethan-1-one (68)

**62****68****43**

A) According to GP2 with pyridine (158 mg, 2.00 mmol, 161 μL , 1.0 eq.), acetylchloride (157 mg, 2.00 mmol, 143 μL , 1.0 eq.), TMSOTf (449 mg, 2.00 mmol, 366 μL , 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂·2LiCl (1.3 eq.) in CH_2Cl_2 (10 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP11 from CuCN (235 mg, 2.60 mmol, 1.3 eq.), LiCl (220 mg, 5.20 mmol, 2.6 eq.) and *t*-BuMgCl (1.8 M solution in Et_2O , 5.20 mmol, 2.89 mL, 2.6 eq.) in THF (13 mL). The reaction was quenched after 1.5 h by addition of H_2O . FCC (SiO_2 , *n*-pentane/ Et_2O = 4:1).

62: 110 mg (31%), **68**: 44 mg (12%), **43**: 5 mg (2%), overall yield: 48%. Colorless oil. TLC: $R_f = 0.44$ (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 4:1). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): $\delta = 0.86$ (s, 0.4 x 9 H, C(CH₃)₃, **68**), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃, **62**), 1.31 (s, 0.06 x 9 H, CH₃, **43**), 2.15 (s, 3 H, COCH₃, **62**), 2.15 (s, 0.4 x 3 H, COCH₃, **68**), 2.68 (tt, $J = 4.2/1.1$ Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, **62**), 4.97–5.00 (m, 1.4 x 1 H, NCHCH, **62**, CHC(CH₃)₃, **68**), 5.09 (ddd, $J = 8.6/4.1/2.5$ Hz, 1 H, NCHCH, **62**), 5.36 (ddd, $J = 7.5/5.3/1.1$ Hz, 0.4 x 1 H, NCHCH, **68**), 5.67 (ddt, $J = 9.7/6.0/1.1$ Hz, 0.4 x 1 H, CHCHC(CH₃)₃, **68**), 6.04 (ddt, $J = 9.7/5.3/0.9$ Hz, 0.4 x 1 H, NCHCHCH, **68**), 6.53–6.56 (m, 0.4 x 1 H, NCHCH, **68**), 6.62 (dt, $J = 8.5/1.3$ Hz, 1 H, NCH, **62**), 7.17 (dt, $J = 8.6/1.4$ Hz, 1 H, NCH, **62**), 7.27–7.28 (m, 0.06 x 2 H, NCHCH, **43**), 8.46–8.47 (m, 0.06 x 2 H, NCH, **43**) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): $\delta = 21.59$ (COCH₃, **62**), 22.05 (COCH₃, **68**), 25.77 (C(CH₃)₃, **62**), 25.93 (C(CH₃)₃, **68**), 26.66 (C(CH₃)₃, **62**), 30.64 (CH₃, **43**), 35.66 (C(CH₃)₃, **68**), 44.32 (CHC(CH₃)₃, **62**), 57.30 (CHC(CH₃)₃, **68**), 109.08 (NCHCH, **62**), 109.33 (NCHCH, **68**), 109.80 (NCHCH, **62**), 122.52 (NCHCHCH, **68**), 122.67 (NCH, **62**), 123.19 (CHCHC(CH₃)₃, **68**), 124.81 (NCH, **62**), 127.83 (NCHCH, **68**), 166.24 (NCO, **62**), 170.75 (NCO, **68**) ppm. $M(C_{11}H_{17}NO) = 179.26$.

B) Acetylchloride (173 mg, 2.20 mmol, 157 μ L, 1.1 eq.) was added to a solution of pyridine (158 mg, 2.00 mmol, 161 μ L, 1.0 eq.) and CuI (19.2 mg, 100 μ mol, 0.05 eq.) in THF (5 mL) at -78 °C and the mixture was stirred for 10 min before *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 2.20 mmol, 1.10 mL, 1.1 eq.) was added. The resulting solution was stirred for further 60 min at -78 °C and the reaction was quenched by addition of H₂O (10 mL). The mixture was extracted with Et₂O (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 10:1). The yield was determined by means of quantitative ¹H-NMR using 2,4,6-collidine as internal standard.

62: 143 mg (40%), **68**: 48 mg (13%), **43**: 22 mg (8%), overall yield: 61%. Colorless oil.

C) According to GP1 with pyridine (158 mg, 2.00 mmol, 161 μ L, 1.0 eq.), acetylchloride (157 mg, 2.00 mmol, 143 μ L, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN

(199 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (1.88 M solution in Et₂O, 4.40 mmol, 2.34 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 2 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1). Extraction with CH₂Cl₂. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 190 mg (53%), **68**: 57 mg (16%), **43**: 11 mg (4%), overall yield: 73%. Colorless oil.

D) According to GP1 with pyridine (159 mg, 2.00 mmol, 162 μL, 1.0 eq.), acetylchloride (159 mg, 2.00 mmol, 144 μL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN (199 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (1.88 M solution in Et₂O, 4.40 mmol, 2.34 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). Unlike what is reported in GP10, the organocuprate solution was not recooled to -78 °C, but added directly to the reaction mixture after stirring at rt for 5 min. The reaction was quenched after 2.5 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1). Extraction with CH₂Cl₂. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 165 mg (46%), **68**: 85 mg (24%), **43**: 11 mg (4%), overall yield: 74%. Colorless oil.

E) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), acetylchloride (0.16 g, 2.0 mmol, 0.14 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuLi·LiCN (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP9 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuLi (1.6 M solution in *n*-pentane, 4.4 mmol, 2.8 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 1.5 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1). Extraction with CH₂Cl₂. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 168 mg (47%), **68**: 42 mg (12%), **43**: 22 mg (8%), overall yield: 67%. Colorless oil.

F) According to GP1 with pyridine (159 mg, 2.00 mmol, 162 μL, 1.0 eq.), acetylchloride (157 mg, 2.00 mmol, 143 μL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuLi·LiI (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP7 from CuI (423 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuLi (1.77 M solution in *n*-pentane, 4.40 mmol, 2.49 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 1.5 h by addition of H₂O. Extraction with Et₂O. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 81 mg (23%), **68**: 33 mg (9%), **43**: 4 mg (1%), overall yield: 33%. Colorless oil.

G) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), acetylchloride (0.16 g, 2.0 mmol, 0.14 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuCu(CN)Li (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP7 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuLi (1.8 M solution in *n*-pentane, 2.2 mmol, 1.2 mL, 1.1 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 1.5 h by addition of H₂O. Extraction with Et₂O. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 113 mg (32%), **68:** 25 mg (7%), **43:** 30 mg (11%), overall yield: 50%. Colorless oil.

H) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), acetylchloride (0.16 g, 2.0 mmol, 0.14 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂Cu(CN)(ZnCl)₂·2MgCl₂·2LiCl (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The zinc-cynocuprate was prepared according to Ibuka et al.¹⁷² as follows: A suspension of LiCl (0.19 g, 4.4 mmol, 2.2 eq.) in THF (11 mL) was cooled to 0 °C and treated with ZnCl₂ (0.5 M solution in Et₂O, 4.4 mmol, 8.8 mL, 2.2 eq.) and *t*-BuMgCl (1.8 M solution in Et₂O, 4.4 mmol, 2.4 mL, 2.2 eq.). The colorless mixture was stirred for 30 min before CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) was added. The resulting brownish zinc-cyanocuprate solution was allowed to stir for further 30 min at 0 °C and was dropwise added to the reaction mixture within 20 min. The reaction was quenched after 1 h at -78 °C and 30 min at rt by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1). Extraction with Et₂O. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

62: 115 mg (32%), **68:** 14 mg (4%), **43:** 66 mg (24%), overall yield: 60%. Colorless oil.

I) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), acetylchloride (0.16 g, 2.0 mmol, 0.14 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP8 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.), LiCl (0.19 g, 4.4 mmol, 2.2 eq.) and *t*-BuZnBr (0.5 M solution in THF, 2.2 mmol, 4.4 mL, 1.1 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 2 h at -78 °C and 1 h at rt by addition of H₂O. Extraction with Et₂O. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 9:1).

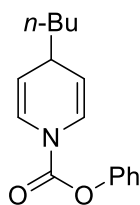
62: 195 mg (55%), **68:** 25 mg (7%), **43:** 19 mg (7%), overall yield: 69%. Colorless oil.

J) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), acetylchloride (0.16 g, 2.0 mmol, 0.14 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuCu(CN)ZnBr·2LiCl (1.1 eq.) in THF

(3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP8 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.), LiCl (0.19 g, 4.4 mmol, 2.2 eq.) and *t*-BuZnBr (0.5 M solution in THF, 2.2 mmol, 4.4 mL, 1.1 eq.) in THF (10 mL). The reaction was allowed to warm slowly from -78 to 14 °C within 17 h and was quenched by addition of saturated aqueous $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{conc. NH}_3$ (1:1). Extraction with Et_2O . FCC (SiO_2 , *n*-pentane/ EtOAc = 4:1).

62: 138 mg (39%), **68**: 17 mg (5%), **43**: 54 mg (20%), overall yield: 64%. Colorless oil.

Phenyl 4-butylpyridine-1(4*H*)-carboxylate (**70**)



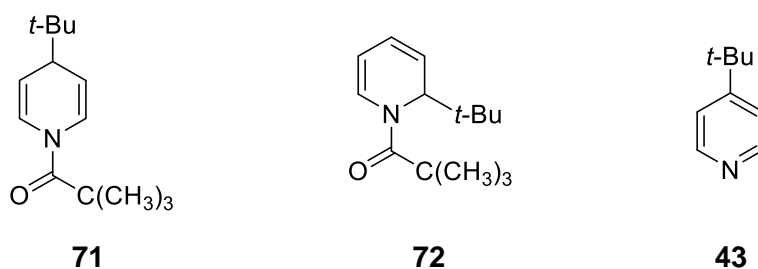
70

Phenylchloroformate (348 mg, 2.20 mmol, 279 μL , 1.1 eq.) was added to a solution of pyridine (158 mg, 2.00 mmol, 161 μL , 1.0 eq.) and CuI (19.2 mg, 100 μmol , 0.05 eq.) in THF (5 mL) at -78 °C and the mixture was stirred for 20 min. The resulting pyridinium ion was treated with *n*-BuMgCl (1.95 M solution in THF, 2.20 mmol, 1.13 mL, 1.1 eq.) and the reaction was quenched after 2 h at -78 °C by addition of H_2O (8 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (4 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with saturated NaCl (30 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by FCC (Al_2O_3 -neutral, activity grade III, *n*-pentane/ Et_2O = 9:1).

70: 412 mg (80%). Colorless oil. TLC: R_f = 0.54 (Al_2O_3 , *n*-pentane/ Et_2O = 9:1). IR (film): $\tilde{\nu}$ = 3067, 3045, 2957, 2927, 2857, 1732, 1691, 1633, 1592, 1495, 1466, 1456, 1417, 1377, 1341, 1316, 1199, 1163, 1147, 1103, 1077, 1024, 968, 951, 910, 845, 828, 741, 688 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C, TMS): δ = 0.89–0.95 (m, 3 H, CH_2CH_3), 1.30–1.39 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.41–1.49 (m, 2 H, CHCH_2), 2.96–3.03 (m, 1 H, CHCH_2), 4.92–4.98 (m, 1 H, NCHCH), 4.99–5.06 (m, 1 H, NCHCH), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, NCH), 6.92 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, NCH), 7.11–7.16 (m, 2 H, OCCH), 7.22–7.28 (m, 1 H, OCCHCHCH), 7.36–7.42 (m, 2 H, OCCHCH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C, TMS): δ = 14.26

(CH₃), 23.21 (CH₂CH₂CH₃)*, 28.35 (CH₂CH₂CH₃)*, 32.92 (NCHCHCH), 38.24 (CHCH₂), 111.59 (NCHCH), 112.33 (NCHCH), 122.03 (OCCH), 122.67 (NCH), 122.77 (NCH), 126.19 (OCCHCHCH), 129.76 (OCCHCH), 150.29 (NCOO), 151.29 (OCCH) ppm. M (C₁₆H₁₉NO₂) = 257.33. HRMS (EI): [M]⁺ calcd. for C₁₆H₁₉NO₂: 157.1410, found: 157.1401.

1-(4-(*tert*-Butyl)pyridin-1(4*H*)-yl)-2,2-dimethylpropan-1-one (71) and 1-(2-(*tert*-butyl)pyridin-1(2*H*)-yl)-2,2-dimethylpropan-1-one (72)



A) According to GP2 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), trimethylacetylchloride (0.25 g, 2.0 mmol, 0.25 mL, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.63 g, 2.0 mmol, 0.55 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (1.3 eq.) in CH₂Cl₂ (10 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN (0.24 g, 2.6 mmol, 1.3 eq.) and *t*-BuMgCl (1.8 M solution in Et₂O, 5.2 mmol, 2.9 mL, 2.6 eq.) in THF (14.5 mL). The reaction was quenched after 1 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 8 mL). FCC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 8:1).

71: 233 mg (53%), **72:** 86 mg (19%), overall yield: 72%. Colorless oil. TLC: *R*_f = 0.78 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 8:1). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): δ = 0.85 (s, 0.4 x 9 H, CHC(CH₃)₃, 72), 0.87 (s, 9 H, CHC(CH₃)₃, 71), 1.30 (s, 9 H, COC(CH₃)₃, 71), 1.31 (s, 0.4 x 9 H, COC(CH₃)₃, 72), 2.63 (tt, *J* = 4.5/0.9 Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, 71), 5.01 (dd, *J* = 8.7/4.5 Hz, 2 H, NCHCH, 71), 5.06 (dt, *J* = 6.2/1.1 Hz, 0.4 x 1 H, CHC(CH₃)₃, 72), 5.28 (ddd, *J* = 7.7/5.2/1.2 Hz, 0.4 x 1 H, NCHCH, 72), 5.70 (ddt, *J* = 9.6/6.1/1.1 Hz, 0.4 x 1 H, CHCHC(CH₃)₃, 72), 6.02 (ddt, *J* = 9.6/5.2/0.8 Hz, 0.4 x 1 H, NCHCHCH, 72), 6.92 (dq, *J* = 7.7/1.1 Hz, 0.4 x 1 H, NCHCH, 72), 7.06–7.12 (m, 2 H, NCH, 71) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): δ = 25.90 (CHC(CH₃)₃, 72), 26.56 (CHC(CH₃)₃, 71), 28.30 (COC(CH₃)₃, 71), 28.41 (COC(CH₃)₃, 72), 36.03 (CHC(CH₃)₃, 71), 39.60 (CCO, 71), 39.66 (CCO, 72)*, 40.16 (CHC(CH₃)₃, 72)*, 44.19 (CHC(CH₃)₃, 71), 108.11 (NCHCH, 72), 108.77

(NCHCH, 71), 122.41 (NCHCHCH, 72), 123.73 (CHCHC(CH₃)₃, 72), 125.46 (NCH, 71), 128.88 (NCHCH, 72), 173.81 (NCO, 71), 177.70 (NCO, 72) ppm. M (C₁₄H₂₃NO) = 221.34.

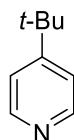
B) According to GP2 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), trimethylacetylchloride (0.25 g, 2.0 mmol, 0.25 mL, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.63 g, 2.0 mmol, 0.55 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂Cu(CN)(ZnCl)₂·2MgCl₂·2LiCl (1.1 eq.) in CH₂Cl₂ (10 mL). The zinc-cynocuprate was prepared according to Ibuka et al.¹⁷² as follows: A suspension of LiCl (0.22 g, 5.2 mmol, 2.6 eq.) in THF (13 mL) was cooled to 0 °C and treated with ZnCl₂ (0.5 M solution in Et₂O, 5.2 mmol, 10 mL, 2.6 eq.) and *t*-BuMgCl (1.8 M solution in Et₂O, 5.2 mmol, 2.9 mL, 2.6 eq.). The colorless mixture was stirred for 30 min before CuCN (0.24 g, 2.6 mmol, 1.3 eq.) was added. The resulting brownish zinc-cyanocuprate solution was allowed to stir for further 30 min at 0 °C and was dropwise added to the reaction mixture within 25 min. The reaction was quenched after 1.5 h at -78 °C, 3 h at -15 °C and 17 h at rt by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 10 mL). FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 18:1).

71: 122 mg (28%), **72**: 11 mg (3%), overall yield: 31%. Colorless oil.

C) According to GP1 with pyridine (0.16 g, 2.0 mmol, 0.16 mL, 1.0 eq.), trimethylacetylchloride (0.25 g, 2.0 mmol, 0.25 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (1.1 eq.) in THF (3.5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN (0.20 g, 2.2 mmol, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (2.0 M solution in Et₂O, 4.4 mmol, 2.2 mL, 2.2 eq.) in THF (10 mL). The reaction was quenched after 1.5 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 8 mL). Extraction with CH₂Cl₂. FCC (Al₂O₃-neutral, activity grade III, *n*-pentane/Et₂O = 18:1).

71: 186 mg (42%), **72**: 65 mg (15%), **43**: 12 mg (4%), overall yield: 61%. Colorless oil.

4-*tert*-Butylpyridine (43)



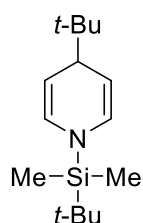
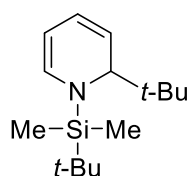
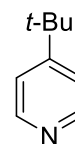
43

DDQ (0.45 g, 2.0 mmol, 1.4 eq.) was added to a solution containing a mixture of both regioisomeric 1,2- and 1,4-*tert*-butyl-*N*-acyldihydropyridines **68** and **62** (0.267 g; **68**: 57 mg, 0.32 mmol, 0.23 eq.; **62**: 0.21 g, 1.1 mmol, 0.77 eq.) in CH₂Cl₂ (7 mL) and the resulting dark brown suspension was stirred for 60 min at rt. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL), extracted with 2 M HCl (3 x 20 mL) and the combined aqueous layers were washed with Et₂O (20 mL). The aqueous phase was neutralized by addition of K₂CO₃, adjusted to pH 10 by treatment with 1 M NaOH and extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by FFC (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 5:1 → 1:1) and subsequently by vacuum distillation (5·10⁻² mbar, 200 °C).

43: 95 mg (62%). Colorless liquid. TLC: *R*_f = 0.33 (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1). IR (film): $\tilde{\nu}$ = 3077, 3024, 2965, 2904, 2869, 1935, 1848, 1777, 1688, 1597, 1546, 1494, 1470, 1409, 1366, 1274, 1238, 1225, 1202, 1121, 1098, 1074, 995, 959, 928, 870, 842, 821, 767, 749, 712 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 1.32 (s, 9 H, (CH₃)₃), 7.28–7.31 (m, 2 H, NCHCH), 8.48–8.54 (m, 2 H, NCH) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 30.50 ((CH₃)₃), 34.71 (C(CH₃)₃), 120.81 (NCHCH), 149.38 (NCH), 160.27 (NCHCHC) ppm. M (C₉H₁₃N) = 135.21. HRMS (EI): [M]⁺ calcd. for C₉H₁₃N: 135.1043, found: 135.1048.

The analytical data were consistent with those reported in literature.¹⁸⁵

4-(*tert*-Butyl)-1-(*tert*-butyldimethylsilyl)-1,4-dihydropyridine (**81**) and 2-(*tert*-butyl)-1-(*tert*-butyldimethylsilyl)-1,2-dihydropyridine (**82**)

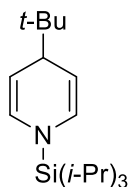
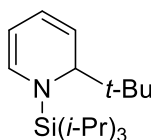
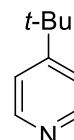
**81****82****43**

According to GP3 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 μ L, 1.0 eq.) and TBDMSOTf (0.26 g, 1.0 mmol, 0.23 mL, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (2.5 mL). The addition to the pyridinium ion was performed in THF (2 mL) with *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 1.2 mmol,

0.60 mL, 1.2 eq.). The reaction was quenched after 2 h by addition of H₂O (6 mL). Extraction with Et₂O (3 x 15 mL)

81: 19 mg (8%), **82**: 14 mg (6%), **43**: 8.4 mg (6%), overall yield: 20%. Yellowish oil. TLC: $R_f = 0.95$ (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): $\delta = 0.16$ (s, 6 H, Si(CH₃)₂, **81**), 0.17 (s, 0.7 x 3 H, SiCH₃, **82**), 0.24 (s, 0.7 x 3 H, SiCH₃, **82**), 0.82 (s, 0.7 x 9 H, CHC(CH₃)₃, **82**), 0.82 (s, 9 H, CHC(CH₃)₃, **81**), 0.86 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃, **81**), 0.88 (s, 0.7 x 9 H, SiC(CH₃)₃, **82**), 1.31 (s, 0.7 x 9 H, CH₃, **43**), 2.65 (tt, $J = 4.1/0.7$ Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, **81**), 3.43–3.45 (m, 0.7 x 1 H, CHC(CH₃)₃, **82**), 4.47–4.51 (m, 2 H, NCHCH, **81**), 5.04 (ddd, $J = 6.7/5.3/1.2$ Hz, 0.7 x 1 H, NCHCH, **82**), 5.14 (ddt, $J = 9.3/6.2/1.2$ Hz, 0.7 x 1 H, CHCHC(CH₃)₃, **82**), 5.98–6.03 (m, 0.7 x 1 H, NCHCHCH, **82**), 6.05–6.08 (m, 2 H, NCH, **81**), 6.25 (dq, $J = 7.0/1.1$ Hz, 0.7 x 1 H, NCHCHCH, **82**), 7.55–7.56 (m, 0.8 x 2 H, NCHCH, **43**), 8.70–8.71 (m, 0.8 x 2 H, NCH, **43**) ppm. $M(C_{15}H_{29}NSi) = 251.49$.

4-(*tert*-Butyl)-1-(triisopropylsilyl)-1,4-dihydropyridine (**84**) and 2-(*tert*-butyl)-1-(triisopropylsilyl)-1,2-dihydropyridine (**85**)

**84****85****43**

A) According to GP3 with pyridine (158 mg, 2.00 mmol, 161 μ L, 1.0 eq.) and TIPSOTf (632 mg, 2.0 mmol, 554 μ L, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (4 mL). Addition to the pyridinium ion was performed in THF (4 mL) with *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 2.4 mmol, 1.20 mL, 1.2 eq.). The reaction was quenched after 2 h by addition of H₂O (6 mL). Extraction with Et₂O (3 x 15 mL)

84: 107 mg (18%), **85**: 18 mg (3%), **43**: 6 mg (2%), overall yield: 23%. Colorless oil. TLC: $R_f = 0.95$ (SiO₂, *n*-pentane/Et₂O = 1:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): $\delta = 0.83$ (s, 9 H, C(CH₃)₃, **84**), 0.87 (s, 0.2 x 9 H, C(CH₃)₃, **85**), 1.08 (d, $J = 7.3$ Hz, 18 H, CH(CH₃)₂, **84**), 1.10 (d, $J = 7.3$ Hz, 0.2 x 9 H, CH(CH₃)₂, **85**), 1.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 0.2 x 9 H, CH(CH₃)₂, **85**), 1.19–1.28 (m, 1.2 x 3 H, CH(CH₃)₂, **84**, **85**), 1.32 (s, 0.1 x 9 H, CH₃, **43**), 2.67 (t, $J = 4.3$ Hz, 1 H, CHC(CH₃)₃, **84**), 3.39 (dd, $J = 6.3/1.2$ Hz, 0.2 x 1 H, NCHC(CH₃)₃,

85), 4.52 (ddd, $J = 8.4/4.2/2.1$ Hz, 2 H, NCHCH, 84), 5.09–5.13 (m, 0.2 x 1 H, NCHCH, 85), 5.16 (ddt, $J = 9.2/6.3/1.2$ Hz, 0.2 x 1 H, CHCHC(CH₃)₃, 85), 6.00 (ddd, $J = 9.3/5.3/0.7$ Hz, 0.2 x 1 H, NCHCHCH, 85), 6.03–6.09 (m, 2 H, NCH, 84), 6.23 (dq, $J = 7.0/1.1$ Hz, 0.2 x 1 H, NCHCHCH, 85), 7.26–7.28 (m, 0.1 x 2 H, NCHCH, 43), 8.50–8.52 (m, 0.1 x 2 H, NCH, 43) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): $\delta = 11.40$ (CH(CH₃)₂, 84), 12.63 (CH(CH₃)₂, 85), 17.84 (CH(CH₃)₂, 84), 18.59 (CH(CH₃)₂, 85), 18.92 (CH(CH₃)₂, 85), 26.05 (C(CH₃)₃, 84), 30.51 (C(CH₃)₃, 43), 34.65 (C(CH₃)₃, 43), 36.12 (C(CH₃)₃, 84), 43.40 (CC(CH₃)₃, 84), 60.22 (CC(CH₃)₃, 84), 101.13 (NCHCH, 84), 105.80 (NCHCH, 85), 112.66 (CHCHCC(CH₃)₃, 85), 120.71 (NCHCH, 43), 123.58 (NCHCHCH, 85), 130.07 (NCH, 84), 136.82 (NCHCH, 85), 149.66 (NCH, 43), 159.92 (NCHCHCH, 43) ppm. M (C₁₈H₃₅NSi) = 293.57.

B) According to GP3 with pyridine (174 mg, 2.20 mmol, 178 μ L, 1.1 eq.) and TIPSOTf (632 mg, 2.0 mmol, 554 μ L, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (3.5 mL). Addition to the pyridinium ion was performed in THF (5 mL) with *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 2.4 mmol, 1.20 mL, 1.2 eq.) at –20 °C in the presence of CuI (19.2 mg, 100 μ mol, 5.0·10⁻² eq.). The reaction was quenched after 30 min by addition of H₂O (10 mL). Extraction with CH₂Cl₂ (4 x 20 mL).

84: 77 mg (13%), **85:** 8 mg (1%), **43:** 22 mg (8%), overall yield: 22%. Yellowish oil.

C) According to GP5 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 μ L, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.32 g, 1.0 mmol, 0.28 mL, 1.0 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 2.0 mmol, 1.0 mL, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL). Reaction time: 3 h.

84: 80 mg (27%), **43:** 6 mg (4%), overall yield: 31%. Yellowish oil.

D) According to GP5 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 μ L, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.32 g, 1.0 mmol, 0.28 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂Mg (prepared according to GP12, 0.53 M solution in THF:Et₂O = 1:1, 2.0 mmol, 3.8 mL, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL). Reaction time: 1.5 h.

84: 264 mg (90%), **85:** 4.4 mg (1.5%), **43:** 6 mg (5%), overall yield: 96%. Colorless oil.

E) According to GP5 with pyridine (71 mg, 0.90 mmol, 73 μ L, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.28 g, 0.90 mmol, 0.25 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂Mg (prepared according to GP12, 0.37 M

solution in THF:Et₂O = 1:1, 2.0 mmol, 4.9 mL, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL). Reaction time: 1.5 h.

84: 142 mg (54%), **43**: 8 mg (14%), overall yield: 68%. Colorless oil.

F) According to GP4 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 µL, 1.0 eq.), CuI (9.6 mg, 50 µmol, 0.05 eq.), TIPSOTf (0.34 g, 1.1 mmol, 0.30 mL, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 1.1 mmol, 0.55 mL, 1.1 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL).

84: 22 mg (8%), **43**: 41 mg (30%), overall yield: 38%. Greenish oil.

G) According to GP4 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 µL, 1.0 eq.), LiCl (4.2 mg, 0.10 mmol, 0.1 eq.), CuI (9.6 mg, 50 µmol, 0.05 eq.), TIPSOTf (0.34 g, 1.1 mmol, 0.30 mL, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 1.1 mmol, 0.55 mL, 1.1 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL).

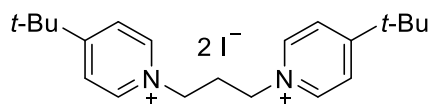
84: 41 mg (14%), **43**: 29 mg (21%), overall yield: 35%. Greenish oil.

H) According to GP4 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 µL, 1.0 eq.), LiCl (4.2 mg, 0.10 mmol, 0.1 eq.), CuCN (4.5 mg, 50 µmol, 0.05 eq.), TIPSOTf (0.34 g, 1.1 mmol, 0.30 mL, 1.1 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 1.1 mmol, 0.55 mL, 1.1 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL).

84: 31 mg (11%), **43**: 30 mg (22%), overall yield: 33%. Greenish oil.

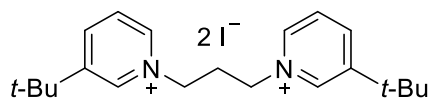
I) Following GP5 with pyridine (79 mg, 1.0 mmol, 81 µL, 1.0 eq.), TIPSOTf (0.32 g, 1.0 mmol, 0.28 mL, 1.0 eq.) and *t*-Bu₂CuCN(MgCl)₂ (2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL). The organometallic reagent was prepared according to GP10 from CuCN (0.18 g, 2.0 mmol, 2.0 eq.) and *t*-BuMgCl (2 M solution in Et₂O, 4.0 mmol, 2.0 mL, 4.0 eq.) in THF (9 mL). The reaction was quenched after 3 h by addition of saturated aqueous NH₄Cl/conc. NH₃ (1:1, 6 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL).

84: 55 mg (19%), **43**: 3 mg (2%), overall yield: 21%. Yellowish oil.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (MB327)**MB327**

1,3-Diiodopropane (**86**, 3.35 g, 11.2 mmol, 1.30 mL, 1.0 eq.) was added to a solution of 4-*tert*-butylpyridine (**43**, 3.37 g, 24.6 mmol, 3.65 mL, 2.2 eq.) in DMF (20 mL) and the resulting mixture was stirred for 50 h at 70 °C under the exclusion of light. Most of the solvent was removed from the reaction mixture under reduced pressure, acetone (20 mL) was added and the brownish solution was allowed to stay at 5 °C for 15 h. The thus formed precipitate was removed by filtration, washed with EtOAc (20 mL) and recrystallized from EtOH (15 mL) to yield **MB327**.

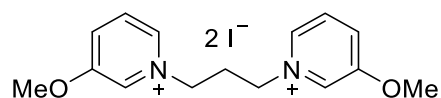
MB327: 3.39 g (54%). Orange crystals. Mp.: 253 °C. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3162, 3120, 3074, 3015, 2966, 2868, 1964, 1853, 1819, 1643, 1566, 1516, 1471, 1375, 1349, 1276, 1248, 1229, 1197, 1116, 1067, 1029, 990, 972, 945, 851, 751, 585, 567, 535, 521 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS): δ = 1.38 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 2.64 (quin., *J* = 7.5 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 4.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 4 H, NCH₂), 8.20–8.28 (m, 4 H, NCHCH), 8.98–9.05 (m, 4 H, NCH) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS): δ = 29.39 (C(CH₃)₃), 31.35 (NCH₂CH₂), 36.17 (C(CH₃)₃), 56.45 (NCH₂), 124.99 (NCHCH), 144.11 (NCHCH), 169.96 (CC(CH₃)₃) ppm. M (C₂₁H₃₂I₂N₂) = 566.31. HRMS (FAB⁺): [M-I]⁺ calcd. for C₂₁H₃₂IN₂: 439.1605, found: 439.1621.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (87a)**87a**

1,3-Diiodopropane (**86**, 395 mg, 1.32 mmol, 153 μ L, 1.0 eq.) was added to a solution of 3-*tert*-butylpyridine (**35c**, 393 mg, 2.91 mmol, 2.2 eq.) in DMF (2.4 mL) and the resulting mixture was stirred for 72 h at 70 °C under the exclusion of light. The solvent was removed under reduced pressure, the residue was dissolved in DMF (1 mL) and **87a** was brought to crystallization (rt \rightarrow -20 °C) by addition of acetone (10 mL).

87a: 592 mg (79%). Yellow crystals. Mp.: 243 °C. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3429, 3142, 3063, 3036, 3019, 2985, 2961, 2866, 2009, 1968, 1933, 1794, 1628, 1508, 1479, 1462, 1449, 1400, 1374, 1365, 1353, 1325, 1282, 1248, 1222, 1195, 1180, 1148, 1064, 1043, 903, 893, 821, 750, 688 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 1.39 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.71 (quin., J = 7.3 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.77 (t, J = 7.1 Hz, 4 H, NCH_2), 8.13–8.20 (m, 2 H, NCHCH), 8.70–8.76 (m, 2 H, NCHCHCH), 8.94–8.98 (m, 2 H, NCHCH), 9.06 (s, 2 H, $\text{NCHC}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 29.91 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.85 (NCH_2CH_2), 34.51 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.54 (NCH_2), 127.54 (NCHCH), 142.03 ($\text{NCHC}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$), 142.24 (NCHCH), 143.13 (NCHCHCH), 150.93 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$) ppm. M ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_2$) = 566.31. HRMS (ESI): $[\text{M-I}]^+$ calcd. for: $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{IN}_2$: 439.1605, found: 439.1601.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(3-methoxypyridin-1-ium) diiodide (**87d**)



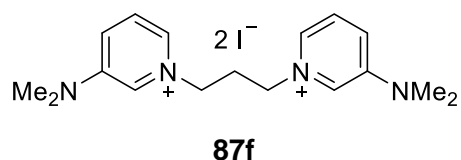
87d

1,3-Diiodopropane (**86**, 157 mg, 525 μmol , 60.9 μL , 1.0 eq.) was added to a solution of 3-methoxypyridine (**74c**, 130 mg, 1.16 mmol, 120 μL , 2.2 eq.) in DMF (900 μL) and the reaction mixture was stirred for 72 h at 70 °C. The resulting suspension was cooled to rt, acetone (10 mL) was added and the mixture was stored at 5 °C for 20 h. The thus formed precipitate was removed by filtration, washed with acetone (20 mL) and recrystallized from EtOH/DMF (1.5:1, 8.4 mL) to yield **87d**.

87d: 169 mg (63%). Yellow crystals. Mp.: 208 °C (decomposition). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3140, 3070, 3035, 2945, 2838, 1978, 1927, 1878, 1797, 1749, 1718, 1624, 1595, 1583, 1512, 1477, 1466, 1455, 1443, 1376, 1352, 1295, 1255, 1204, 1191, 1170, 1098, 1070, 1042, 1033, 1008, 904, 862, 817, 809, 763, 755, 746, 682, 586, 563 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 2.70 (quin., J = 7.3 Hz, 2 H, NCH_2CH_2), 4.03 (s, 6 H, CH_3), 4.71 (t, J = 7.3 Hz, 4 H, NCH_2), 8.13 (dd, J = 8.8/5.9 Hz, 2 H, NCHCH), 8.27–8.31 (m, 2 H, NCHCHCH), 8.72 (d, J = 5.9 Hz, 2 H, NCHCH), 8.94–8.97 (m, 2 H, NCHCO) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 31.36 (NCH_2CH_2), 57.37 (CH_3), 57.56 (NCH_2), 128.41 (NCHCH), 130.47 (NCHCHCH), 132.70 (NCHCO), 137.10 (NCHCH), 157.87

(NCHCO) ppm. M ($C_{15}H_{20}IN_2O_2$) = 514.15. HRMS (ESI): $[M-I]^+$ calcd. for $C_{15}H_{20}IN_2O_2$: 387.0564, found: 387.0567.

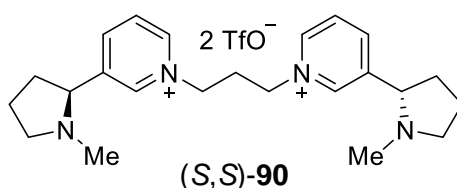
1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-(dimethylamino)pyridin-1-ium] diiodide (**87f**)



1,3-Diiodopropane (**86**, 149 mg, 500 μ mol, 58.0 μ L, 1.0 eq.) was added to a solution of 3-(dimethylamino)pyridine (**74e**, 137 mg, 1.10 mmol, 2.2 eq.) in DMF (900 μ L) and the reaction mixture was stirred for 72 h at 70 °C. The suspension was cooled to rt and treated with acetone (10 mL). The formed precipitate was removed by filtration, washed with acetone (20 mL) and recrystallized from EtOH/DMF (6:1, 7 mL).

87f: 172 mg (64%). Brown crystals. Mp.: 244–245 °C. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3042, 2985, 2915, 2819, 1618, 1581, 1525, 1493, 1442, 1385, 1360, 1270, 1247, 1205, 1165, 1125, 1071, 1030, 1024, 974, 895, 867, 847, 790, 744, 723, 676, 568, 555, 461 cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ = 2.68 (quin., J = 7.2 Hz, 2 H, NCH₂CH₂), 3.08 (s, 12 H, N(CH₃)₂), 4.64 (t, J = 7.2 Hz, 4 H, NCH₂CH₂), 7.78 (dd, J = 8.9/2.5 Hz, 2 H, NCHCHCH), 7.84 (dd, J = 9.0/5.6 Hz, 2 H, NCHCH), 8.23 (d, J = 5.6 Hz, 2 H, NCHCH), 8.34 (dd, J = 2.3/1.1 Hz, 2 H, NCHCN) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS): δ = 31.51 (NCH₂CH₂), 39.47 (NC(CH₃)₂), 57.72 (NCH₂), 125.43 (NCHCHCH), 127.29 (2 C, NCHCH, NCHCN), 130.17 (NCHCH), 148.01 (CN(CH₃)₂) ppm. M ($C_{17}H_{26}I_2N_4$) = 540.23. HRMS (ESI): $[M-I]^+$ calcd. for $C_{17}H_{26}IN_4$: 413.1197, found: 413.1198.

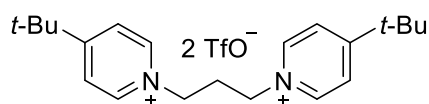
1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[3-((S)-1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin-1-ium] bis-(trifluoromethanesulfonate) (**(S,S)-90**)



According to GP6 with (*S*)-nicotine ((*S*)-**88**, 328 mg, 2.00 mmol, 0.323 mL, 2.5 eq.) and propane-1,3-bistriflate (**89**, 272 mg, 800 μ mol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (1.6 mL). Reaction time: 30 min. The residue was dissolved in EtOAc (2.75 mL) and crystallization was initiated by dropwise addition of hexanes (0.93 mL). The suspension was stored at 5 °C for 16 h, further hexanes (0.5 mL) were added and the mixture was stored for 16 h at -20 °C to yield (*S,S*)-**90** as slightly yellow crystals.

(*S,S*)-**90**: 446 mg (84%). Slightly yellow crystals. Mp.: 121–122 °C. $\alpha_D^{20} = -118$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂). IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3061, 2973, 2880, 2848, 2794, 1636, 1505, 1483, 1467, 1318, 1257, 1276, 1224, 1155, 1089, 1048, 1029, 820, 755, 693, 638, 572, 517$ cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS): $\delta = 1.59$ – 1.70 (m, 2 H, NCHCHH), 1.82 – 2.02 (m, 4 H, CH₃NCH₂CH₂), 2.22 (s, 6 H, NCH₃), 2.35 – 2.51 (m, 4 H, NCHCHH, CH₃NCHH), 2.91 – 3.02 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂N), 3.27 (ddd, $J = 9.5/7.6/2.4$ Hz, 2 H, CH₃NCHH), 3.51 (t, $J = 8.1$ Hz, 2 H, NCHCH₂), 4.93 – 5.02 (m, 4 H, NCH₂CH₂CH₂N), 7.93 (dd, $J = 8.0/6.0$ Hz, 2 H, NCHCH), 8.47 – 8.53 (m, 2 H, NCHCHCH), 9.25 – 9.28 (m, 2 H, NCHCH), 9.29 (s, 2 H, NCHCCHNCH₃) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS): $\delta = 23.26$ (CH₃NCH₂CH₂), 34.75 (NCH₂CH₂CH₂N), 35.78 (NCHCH₂), 40.32 (NCH₃), 56.73 (CH₃NCH₂), 57.75 (NCH₂CH₂CH₂N), 66.78 (NCHCH₂), 120.57 (q, $J = 319.6$ Hz, CF₃), 128.24 (NCHCH), 143.68 (NCHCCHNCH₃), 144.05 (NCHCHCH), 144.51 (NCHCH), 147.91 (NCHCCHNCH₃) ppm. M (C₂₅H₃₄F₆N₄O₆S₂) = 664.68. HRMS (FAB): [M-OTf]⁺ calcd. for C₂₄H₃₄F₃N₄O₃S: 515.2298, found: 515.2303.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[4-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] bis-(trifluoromethanesulfonate) (**91**)



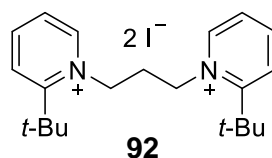
91

According to GP6 with 4-*tert*-butylpyridine (**43**, 338 mg, 2.50 mmol, 2.5 eq.) and propane-1,3-bistriflate (**89**, 340 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (2 mL). Reaction time: 1 h. Purification by RP-MPLC (YMC-Triart Prep C18-S, MeOH/H₂O = 50:50).

91: 537 mg (89%). Colorless solid. Mp.: 143 °C. RP-MPLC: $t_R = 750$ s. (C18, MeOH/H₂O = 50:50). IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3556, 3490, 3138, 3067, 2970, 2913, 2877, 1648,$

1571, 1519, 1466, 1374, 1286, 1255, 1225, 1193, 1149, 1115, 1029, 996, 931, 889, 847, 825, 807, 770, 756, 638, 584, 573, 518 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN , 25 °C, TMS): δ = 1.40 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.56–2.66 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 4.57–4.65 (m, 4 H, NCH_2), 8.00–8.08 (m, 4 H, NCHCH), 8.61–8.68 (m, 4 H, NCH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN , 25 °C, TMS): δ = 30.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.94 (NCH_2CH_2), 37.43 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.09 (NCH_2), 122.13 (q, J = 320.5 Hz, CF_3), 126.75 (NCHCH), 144.95 (NCH), 172.88 ($\text{C}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$) ppm. M ($\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$) = 610.63. HRMS (ESI): $[\text{M}-\text{OTf}]^+$ calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 461.2080, found: 461.2085.

1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis[2-(*tert*-butyl)pyridin-1-ium] diiodide (92)



According to GP6 with 2-*tert*-butylpyridine (**74a**, 267 mg, 1.90 mmol, 2.5 eq.) and propane-1,3-bistriflate (**89**, 258 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) at 85 °C without a solvent. Reaction time: 1.5 h. The reaction mixture was allowed to cool to rt, the resulting solid was washed with Et_2O (3 x 5 mL) and dissolved under heating in an ethanolic solution containing KI (1.96 mmol/mL, 7.7 mL, 10 eq.). The solution was stored at 5 °C for 16 h and the thus formed solid was recrystallized from EtOH/MeOH (7:1, 16 mL).

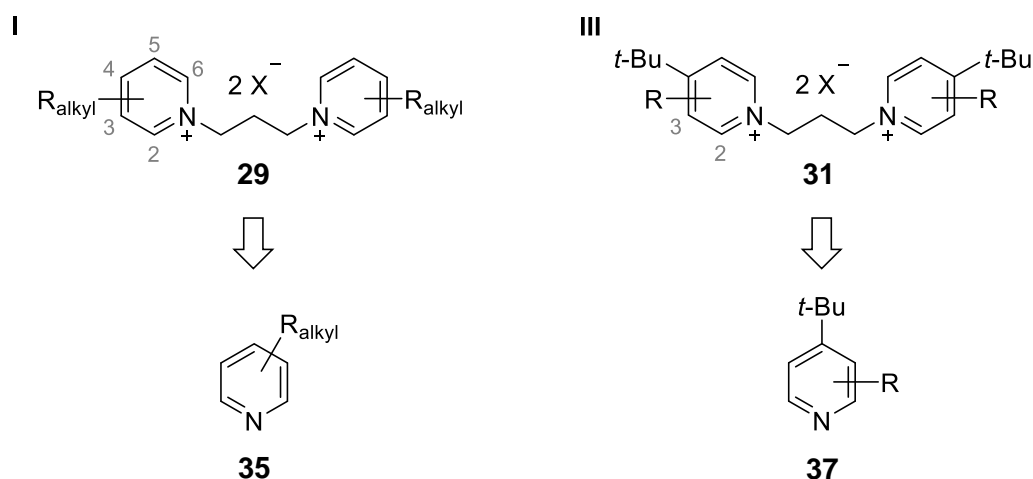
92: 198 mg (46%). Yellow crystals. Mp.: 236 °C. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3138, 3010, 2973, 2878, 1621, 1569, 1500, 1488, 1445, 1407, 1384, 1373, 1342, 1300, 1252, 1235, 1180, 1167, 1148, 1129, 1115, 1076, 1064, 1035, 978, 937, 902, 890, 850, 800, 781, 705, 621, 542, 466 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 °C, TMS): δ = 1.61 (s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.58–2.67 (m, 2 H, NCH_2CH_2), 5.00–5.08 (m, 4 H, NCH_2), 8.12 (ddd, J = 7.6/6.4/1.3 Hz, 2 H, NCHCH), 8.19 (dd, J = 8.4/1.2 Hz, 2 H, NCHCHCHCH), 8.53–8.59 (m, 2 H, NCHCHCHCH), 9.20 (dd, J = 6.3/1.5 Hz, 2 H, NCH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 °C, TMS): δ = 29.55 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.72 (NCH_2CH_2), 37.26 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 54.64 (NCH_2), 125.90 (NCHCH), 126.95 (NCHCHCHCH), 146.06 (NCHCHCHCH), 148.18 (NCH), 163.41 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$) ppm. M ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_2$) = 566.31. HRMS (ESI): $[\text{M}-\text{I}]^+$ calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_2$: 439.1605, found: 439.1599.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese neuer potentieller Resensitizer der nAChR mit dem Bispyridiniumsalz **MB327** als Leitstruktur. Hierzu wurde die Struktur des Bispyridiniumsalzes zielgerichtet und schrittweise modifiziert und die neuen Zielverbindungen wurden mittels MS-Bindungsassays hinsichtlich ihrer Affinität zur Bindungsstelle von MB327 am nAChR des *Torpedo californica* charakterisiert. Dieser stellt aufgrund seiner hohen Homologie zum humanen nAChR ein übliches Modellsystem für den Muskeltyp-nAChR dar.¹⁸⁶ Ziel war es, erste Struktur-Wirkungsbeziehungen zu entwickeln, um eine valide Basis für das rationale Design neuer Resensitizer zu schaffen. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Synthese der als Edukt für die bisquaternären Zielverbindungen ausgewählten Pyridinderivate sowie auf der Synthese zweier deuterierter MB327-Analoga (d_6 und d_{18} markiert), welche für den Einsatz als MS-Marker bzw. Kompetitor in den MS-Bindungsassays benötigt wurden.

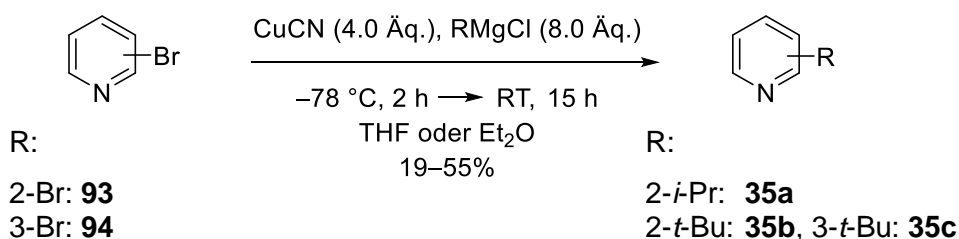
5.1 Die Synthese kommerziell nicht erhältlichlicher Pyridin-Bausteine

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Synthese der kommerziell nicht erhältlichen *tert*-butyl- und isopropylsubstituierten Pyridinderivate **35** (R_{alkyl}) und **37** (2,4- bzw. 3,4-disubstituiert), welche als Bausteine für die Synthese der potentiellen Resensitizer vom Typ I (**29**) und Typ III (**31**) benötigt wurden (vgl. Kapitel 2.2, Abbildung 15 und Abbildung 16).



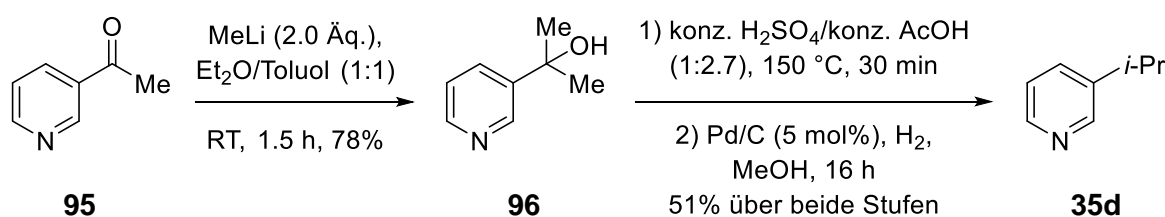
Schema 19: Die Pyridinderivate **35** und **37**. Bausteine für die Darstellung der Bispyridiniumverbindungen **29** und **31**.

Die Darstellung von 2-Isopropylpyridin (**35a**) sowie 2- und 3-*tert*-Butylpyridin (**35b**, **35c**) gelang durch eine cupratvermittelte Substitution aus 2- (**93**) und 3-Brompyridin (**94**) (Schema 20).¹⁸⁷ Die Ausbeuten beliefen sich auf 19–55% und waren von der Bildung von Pyridin begleitet. Denkbare Nebenreaktionen, welche die teils bevorzugte Bildung von Pyridin erklären könnten, wären ein Halogen-Metallaustausch des *in-situ* gebildeten Isopropylcuprats mit 2-Brompyridin (**93**) sowie eine β -H-Eliminierung des intermediären $(t\text{-Bu})_2\text{Cu(III)pyridyl}$ -Komplexes nach Bromid-Substitution von **94** durch $(t\text{-Bu})_2\text{CuCN(MgCl)}_2$.



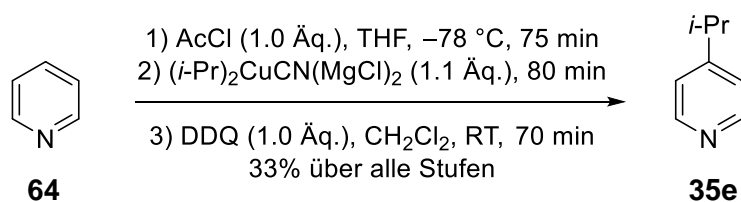
Schema 20: Synthese von 2-Isopropylpyridin (**35a**) sowie 2- und 3-*tert*-Butylpyridin (**35b** und **c**).

3-Isopropylpyridin (**35d**) war nicht über eine einstufige Substitutionsreaktion aus seinen Pyridyl- und Isopropylbausteinen zugänglich und wurde in drei Stufen durch Addition von MeLi an Acetylpyridin (**95**),¹⁸⁸ Dehydratisierung des tertiären Alkohols **96** und Reduktion des resultierenden Alkens mit Pd/C und H₂ mit einer Ausbeute von 40% synthetisiert (Schema 21).¹⁸⁹



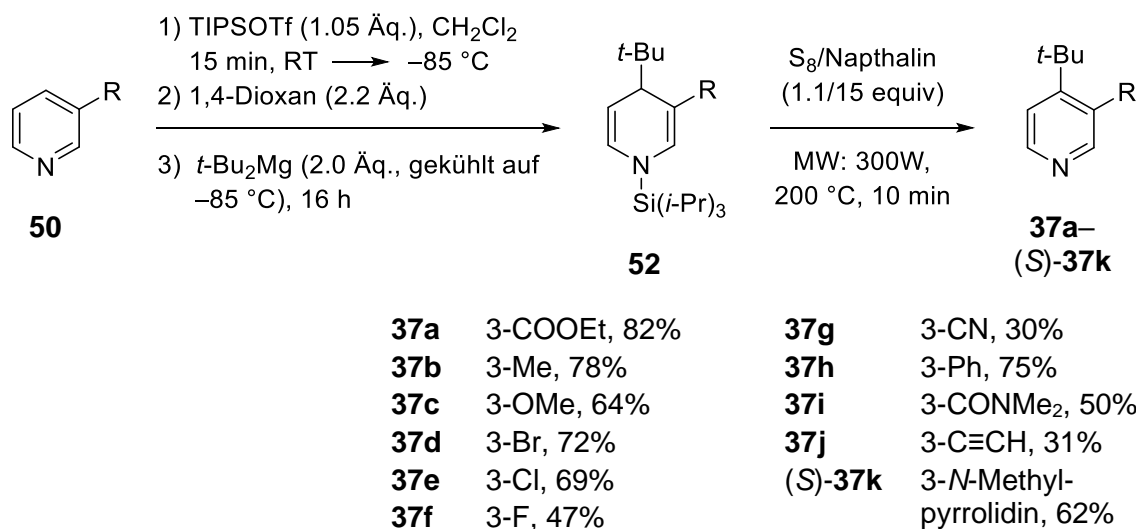
Schema 21: Synthese von 3-Isopropylpyridin (**35d**).

4-Isopropylpyridin (**35e**) konnte aus Pyridin (**64**) durch Aktivierung mit Acetylchlorid, Addition von $(i\text{-Pr})_2\text{CuCN(MgCl)}_2$ an das intermediäre Pyridiniumion und Oxidation des daraus erhaltenen 1,4-Dihydropyridins mit DDQ in einer Gesamtausbeute von 33% erhalten werden (Schema 22).^{144,145}



Schema 22: Synthese von 4-Isopropylpyridin (**35e**).

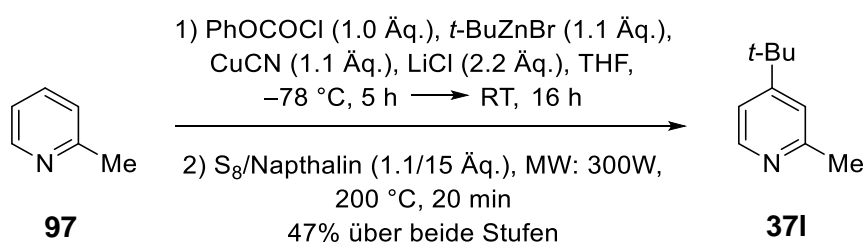
Des Weiteren gelang es, auf Basis der Abfangreaktion von *N*-Silylpyridiniumionen mit Diorganomagnesiumverbindungen,^{190,191} ein zweistufiges Verfahren zur übergangsmetallfreien Synthese von 3,4-disubstituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivaten zu etablieren (Schema 23). Der erste Schritt besteht aus einer Abfangreaktion der mit TIPSOTf aktivierten Pyridinderivate **50**, der zweite Schritt aus einer Oxidation der *N*-Silyl-1,4-dihydropyridine **52** mit Schwefel in Naphthalin. Besonders hervorzuheben sind hierbei die exzellente Regioselektivität der C4-Addition, die hohe Chemoselektivität beider Reaktionsschritte sowie die Möglichkeit die intermediären 1,4-Dihydropyridine vor der Oxidation über eine Säulenchromatographie reinigen zu können. Die Synthese der Zielverbindungen **37a**–(*S*)-**37k** gelang mit Ausbeuten zwischen 31 und 87%. Hierbei wurden mit einem Alkylarylether, einem Ester, einem Amid, drei Halogenen, einem Nitril, einem Alkin und einem tertiären Amin synthetisch wichtige funktionelle Gruppen toleriert.



Schema 23: Die Synthese der 3,4-disubstituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivate **37a**–(*S*)-**37k**.

Die Synthese von 2,4-disubstituierten 4-*tert*-Butylpyridinderivaten gelang hingegen ausschließlich für 2-Picolin (**97**) nach Aktivierung mit PhOCOCl und Abfangreaktion mit einem Zink-Cyanocuprat (Schema 24). Die Oxidation des resultierenden *N*-Acyl-

1,4-dihydropyridins mit Schwefel in Naphthalin lieferte 4-(*tert*-Butyl)-2-methylpyridin (**371**) mit einer Ausbeute von 47% über beide Stufen.



Schema 24: Synthese von **371**.

Im Fall von 2,6-Lutidin, 2-Chlorpyridin oder 2-Fluorpyridin konnte keine Aktivierung der Heterocyclen durch TIPSOTf, PhOCOCl oder AcCl beobachtet werden. Ferner führte die Abfangreaktion von *N*-Acetyl-aktiviertem 2-Methoxypyridin mit dem für die Synthese von **371** genutzten Zink-Cyanocuprat zu einer Zersetzung der Reaktanden.

5.2 Synthese der potentiellen Resensitizer

Strukturell handelt es sich bei den synthetisierten Resensitizerkandidaten um *N*-heteroaromatische bisquaternäre Salze mit einem Propan-1,3-diyl-Linker. Je nachdem ob zwei identische oder zwei unterschiedliche *N*-Heterocyclen über den Linker verknüpft wurden, wurden diese als symmetrisch oder nicht-symmetrisch bezeichnet. Während sich die symmetrischen Verbindungen direkt von **MB327** (Abbildung 18) als Leitstruktur ableiteten (vgl. Kapitel 2.2), basierte das Design und die Entwicklung der nicht-symmetrischen Vertreter auf Ergebnissen aus dem Molecular-Modeling (vgl. Kapitel 2.1.1).

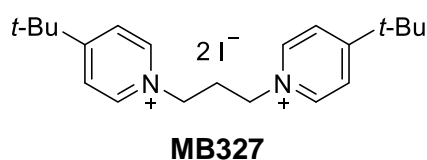


Abbildung 18: Das Bispyridiniumsalz **MB327**.

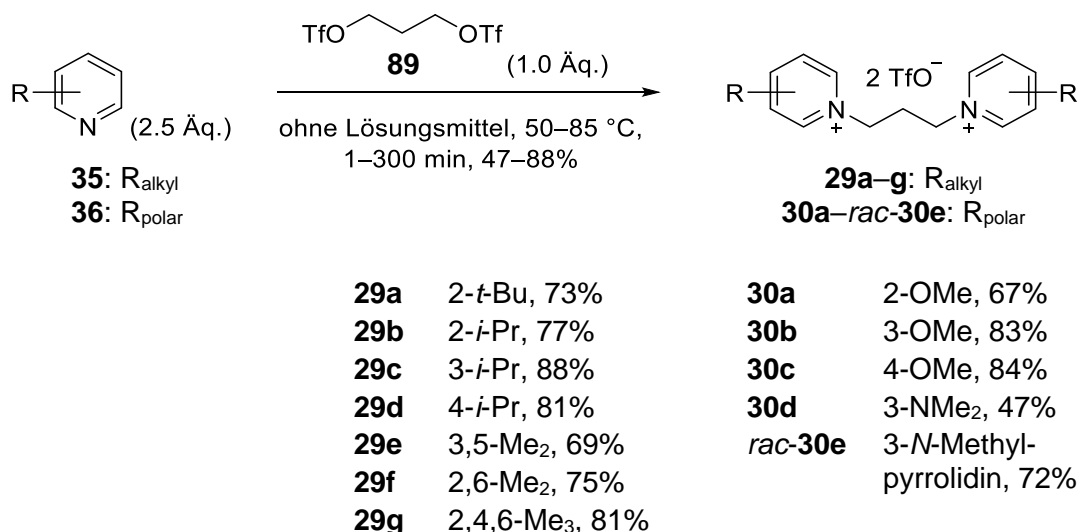
Dr. Thomas Wein konnte zeigen, dass die potentielle Bindungsstelle für **MB327** am nAChR des *Torpedo californica* in einen lipophilen (Phe, Val, Tyr, Trp, Leu) und einen eher hydrophilen Bereich (Asp, Thr, Tyr) zweigeteilt ist,¹³² sodass die Synthese von

komplementären Molekülen mit zwei unterschiedlichen heterocyclischen Systemen äußerst interessant erschien.

5.2.1 Zielverbindungen mit symmetrischer Struktur

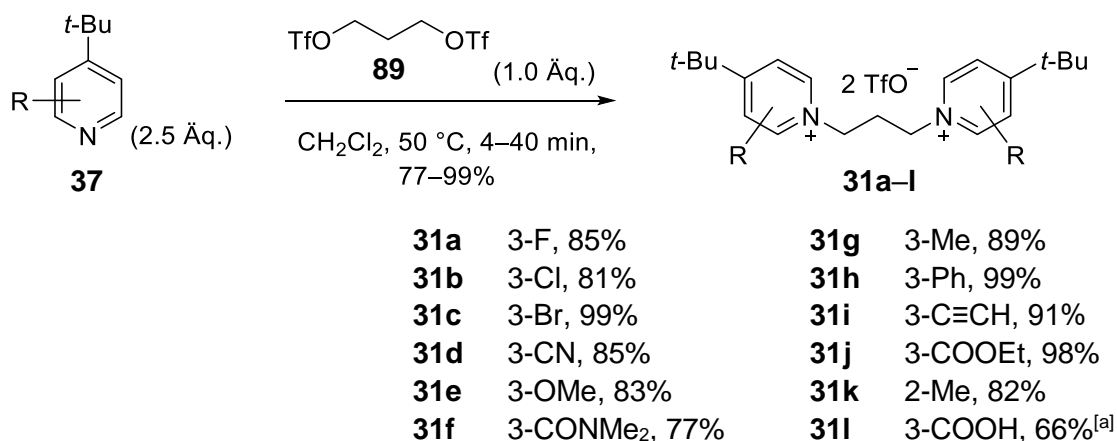
5.2.1.1 Synthesen

Die Synthese der von der Leitstruktur **MB327** abgeleiteten symmetrischen Verbindungen **29a-g**, **30a-rac-30e**, und **31a-l** gelang durch Alkylierung der aromatischen N-Heterocyclen **35** (R_{alkyl}), **36** (R_{polar}) und **37** (2,4- und 3,4-disubstituiert) mit Propan-1,3-bistriflat (**89**) in guten bis sehr guten Ausbeuten (Schema 25 und Schema 26).



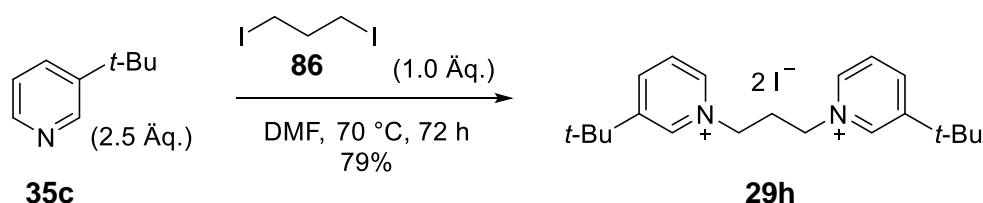
Schema 25: Synthese der Bispyridiniumsalze **29a-g** und **30a-rac-30e**.

Hierbei zeigte sich das reaktive Bistriflat **89** als flexibles und synthetisch wertvolles Reagenz zur Synthese der bisquaternären Zielverbindungen, indem es eine Vielzahl wichtiger funktioneller Gruppen wie z.B. einen Ester, ein Amid, tertiäre und sekundäre Amine, ein Alkin oder Arylether tolerierte, gleichzeitig aber kurze Reaktionszeiten ermöglichte und im Stande war, selbst sterisch stark abgeschirmte Pyridinderivate wie 2-*tert*-Butylpyridin zuverlässig zu alkylieren.



Schema 26: Synthese der Bispyridiniumsalze **31a-l**. [a] Die freie Säure **3l** wurde aus dem Ester **3j** (1.0 Äq.) durch basische Hydrolyse der Esterfunktion mit wässriger NaOH (0.1 M, 2.5 Äq.) in H₂O/MeCN (5:1) nach 16 h bei RT gewonnen.

Die ursprünglich für die Synthese der Bispyridiniumverbindungen (vgl. Kapitel 2.2) vorgesehene literaturbekannte Alkylierung mit 1,3-Diodpropan (**86**) in DMF bei 70 °C erwies sich hingegen als ungeeignet für die Darstellung einer breiten Produktpalette an **MB327**-Derivaten.^{137,138} Mit dem Bispyridiniumsalz **29h** wurde deshalb nur ein einziger für die biologische Prüfung vorgesehener potentieller Resensitizer durch die Alkylierung von 3-*tert*-Butylpyridin (**35c**) mit **86** synthetisiert (Schema 27).



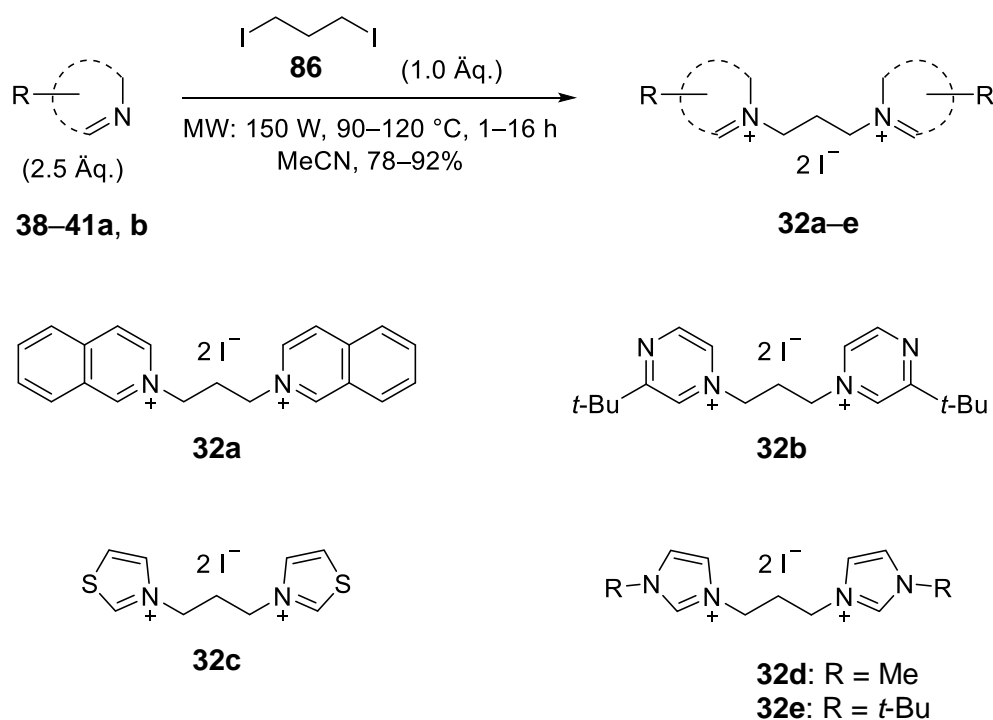
Schema 27: Alkylierung von 3-*tert*-Butylpyridin (**35c**) mit 1,3-Diodpropan (**86**).

Nachteile dieser Methode waren die sehr langen Reaktionszeiten bis zum quantitativen Reaktionsumsatz (72 h im Fall von **35c**) sowie die zu geringe Reaktivität von 1,3-Diodpropan für die Alkylierung von in 2-Position substituierten Pyridinderivaten. Dies führte in vielen Fällen zu einer Zersetzung des Alkyljodids. Bei 2- und 4-Methoxypyridin wurde nach erfolgter N-Alkylierung zusätzlich eine, vermutlich durch Iodidionen verursachte, Demethylierung der Methoxygruppen beobachtet.

Obwohl die Triflatsalze in den MS-Bindungsassays zuverlässige Ergebnisse lieferten, wurde nach Auswertung der funktionalen Messungen von **MB327**, **29a** und **h** auf der SURFE²R Plattform vermutet, dass Triflationen den Ladungstransfer der empfindlichen elektrophysiologischen Messung durch Störsignale der Eigenladung

maskieren könnten.¹⁹² Aus diesem Grund erfolgte die Isolierung aller weiteren Zielverbindungen mit Iodid- oder Chloridgegenionen. Hierzu wurde entweder nach erfolgreicher Alkylierung mit Alkyltriflaten ein Triflat/Chlorid-Ionenaustausch mit einem Chlorid beladenen Anionenaustauscher vorgenommen (vgl. Kapitel 5.2.2) oder die Alkylierung direkt mit 1,3-Diodpropan (**86**) in MeCN bei 90–120 °C in der Labormikrowelle durchgeführt. Gegenüber der bereits erwähnten und in der Literatur etablierten Alkylierung mit Dihalogalkanen bei 70 °C in DMF konnten dadurch sowohl die Reaktionszeiten als auch die Nebenreaktionen drastisch reduziert und die Ausbeuten maximiert werden.

Die Darstellung der Bisisoquinolinium- (**32a**), Bispyrazinium- (**32b**), Bisthiazolium- (**32c**) oder Bisimidazolium- (**32d, e**) Salze vom Typ IV (vgl. Kapitel 2.2) gelang somit problemlos mit Ausbeuten von 78–92% (Schema 28).



Schema 28: Synthese der bisquaternären Zielverbindungen vom Typ IV (**32a–e**).

5.2.1.2 Biologische Prüfung

Die potentiellen Resensitizer **29–32** wurden mittels MS-Bindungsassays hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zum Target, dem nAChR des *Torpedo californica*, untersucht und mit der Affinität der Leitstruktur **MB327** ($pK_i = 4.72 \pm 0.03$) verglichen. Tendenziell wurden für polar (OMe, COOEt, CONMe₂, COOH, *N*-Methylpyrrolidin)

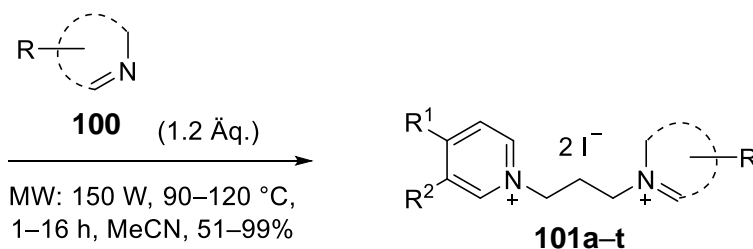
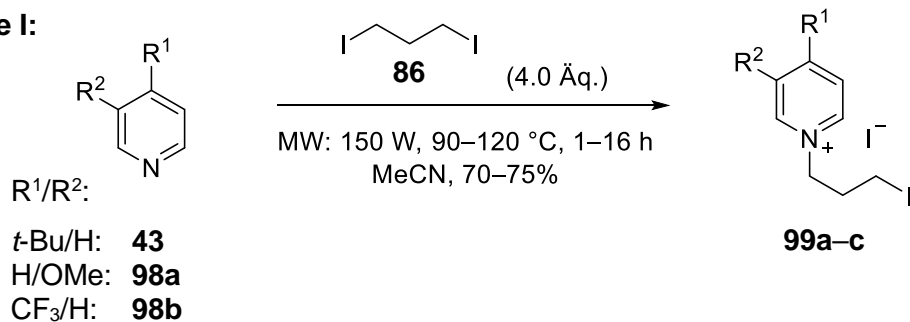
substituierte Bispyridiniumverbindungen geringere Bindungsaffinitäten als für ihre lipophil substituierten ($C\equiv CH$, *t*-Bu, *i*-Pr, Ph) Pendants gefunden. Die niedrigste Bindungsaffinität wies das in 3-Position COOH substituierte **MB327**-Derivat **31i** ($pK_i = 2.74 \pm 0.13$) auf. Formal resultierte die Addition von zwei COOH Gruppen an **MB327** somit in einer Reduktion der Bindungsaffinität um den Faktor 100. Nennenswerte Ausnahme war das 3-NMe₂ substituierte Bispyridiniumsalz **30d** ($pK_i = 4.78 \pm 0.05$), welches einen deutlich höheren pK_i Wert als sein 3-*tert*-butylsubstituiertes Analogon **29h** aufwies ($pK_i = 4.44 \pm 0.10$). Dies lässt vermuten, dass die polare NMe₂-Gruppe ein potentieller isosterer Ersatz für den lipophilen *tert*-Butylrest sein könnte, zeigt aber auch, dass zusätzliche Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen mit der richtigen räumlichen Anordnung einen positiven Einfluss auf die Bindungsaffinität haben können. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass lipophile Wechselwirkungen eine besondere Bedeutung für die Affinität der Biskationen zum Target haben, wurde für das 3-phenyl-4-*tert*-butylsubstituierte Bispyridiniumsalz **31h** die höchste Bindungsaffinität aller symmetrischen Testverbindungen gemessen. Mit einem pK_i Wert von 5.16 ± 0.07 lag diese sogar um 0.44 log Einheiten über der Affinität von **MB327** ($pK_i = 4.72 \pm 0.03$) und stellt somit einen deutlichen Fortschritt in der Entwicklung potenterer Resensitizer dar.

5.2.2 Zielverbindungen mit nicht-symmetrischer Struktur

5.2.2.1 Synthesen

Nach visueller Inspektion der potentiellen MB327-Bindungsstelle waren vor allem solche Verbindungen von primärem Interesse, welche einen 4-*tert*-Butylpyridinium- (**101a-q**) oder 3-Methoxypyridiniumring (**101r-t**) über den Propan-1,3-diyl-Linker mit verschiedenen aromatischen N-Heterocyclen kombinierten. Die Synthesroute der Zielverbindungen richtete sich danach, ob diese am variablen Heterocyclen einen Substituenten in 2-Position zum Ringstickstoff besaßen (Route II) oder nicht (Route I). Verbindungen ohne einen Substituenten in 2-Position wurden ausgehend von 4-*tert*-Butyl- (**43**), 3-Methoxy- (**98a**) oder 3-Trifluormethylpyridin (**98b**) über die *N*-(3-Iodpropyl)pyridinium Vorstufen **99a-c**, mit den Heterocyclen **100** zu den bisquaternären Diiodiden **101a-t** umgesetzt (Route I, Schema 29).

Route I:

Schema 29: Synthese der Zielverbindungen **101a-t**.

Neben Bispyridiniumsalzen (**101a-l** und **101r-t**) befanden sich hierunter auch Verbindungen mit einer Thiazolium- (**101p**), Imidazolium- (**101n, o**), Isoquinolinium- (**101m**) oder Pyrazinium- (**101q**) Partialstruktur (Abbildung 19).

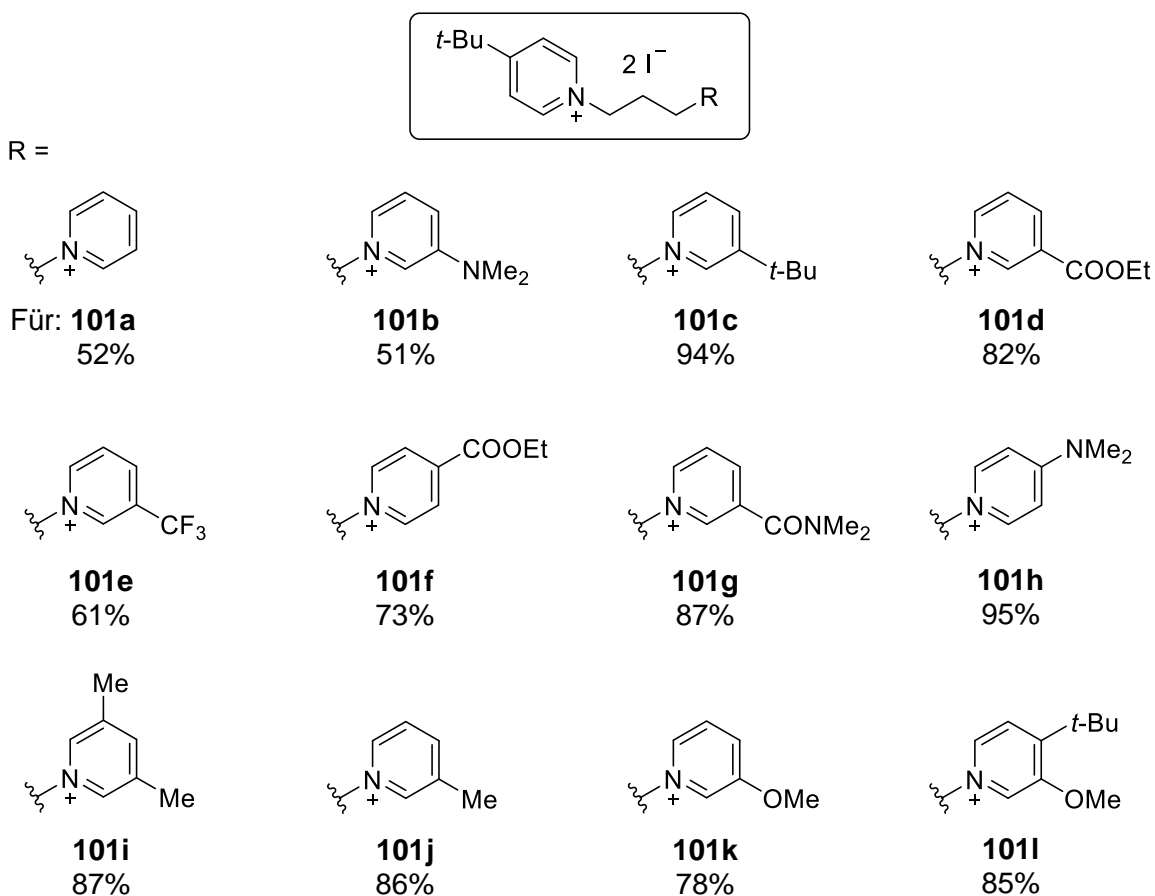
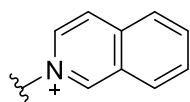
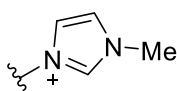
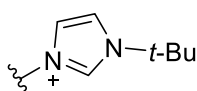
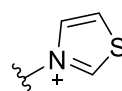
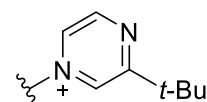
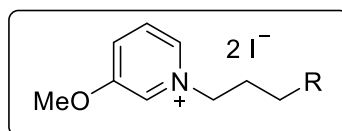
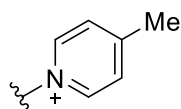
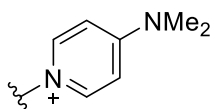
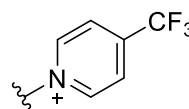


Abbildung 19: Nach Route I synthetisierte potentielle Resensitizer **101a-t**.

R =

Für: **101m**
96%**101n**
80%**101o**
99%**101p**
89%**101q**
87%

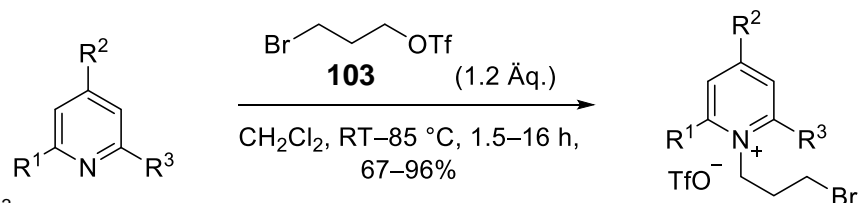
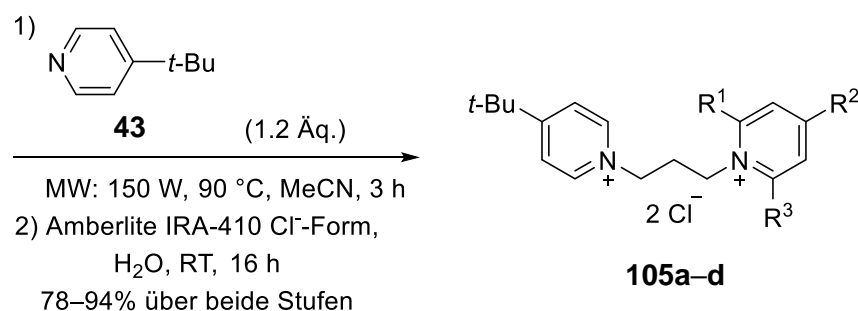
R =

**101r**
83%**101s**
70%**101t**
62%

Fortsetzung Abbildung 19: Nach Route I synthetisierte potentielle Resensitizer **101a-t**.

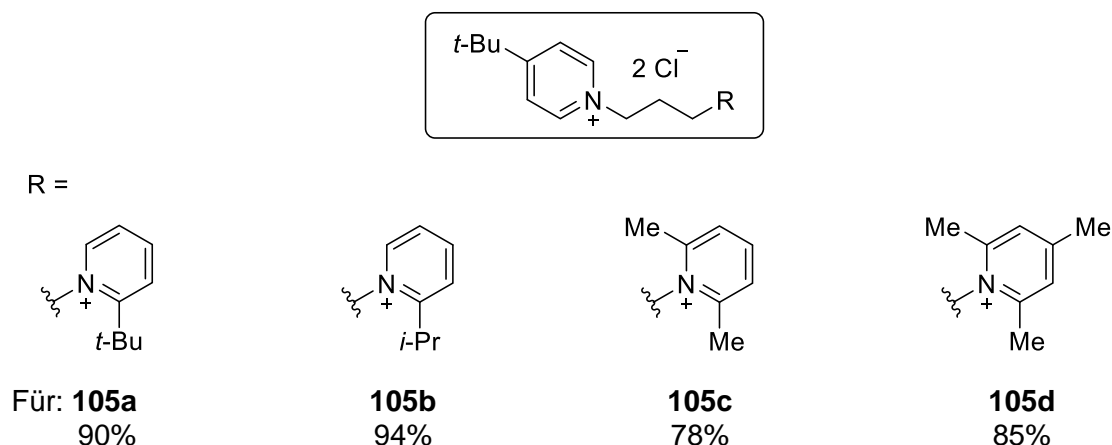
Besaßen die Zielverbindungen hingegen einen Substituenten in 2-Position, so wurden die sterisch gehinderten Heterocyclen (**102a-e**) mit dem weitaus reaktiveren 3-Brompropyltriflat (**103**) zu den *N*-(3-Brompropyl)pyridiniumionen **104a-e** umgesetzt (Schema 30).

Route II:

R¹/R²/R³:*t*-Bu/H/H: **102a***i*-Pr/H/H: **102b**Me/H/Me: **102c**Me/Me/Me: **102d**OMe/H/H: **102e**

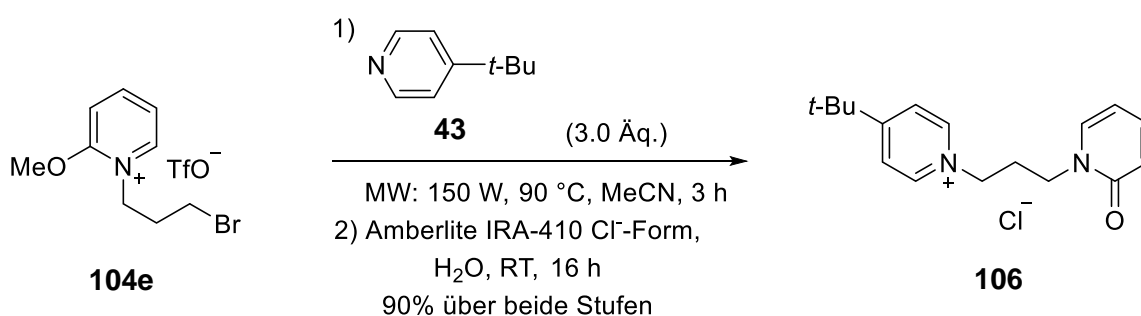
Schema 30: Synthese der Bispyridiniumsalze **105a-d**.

Diese wurden anschließend einer Substitution mit 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) unterzogen, um nach einem Ionenaustausch die Bispyridiniumdichloride **105a–d** zu liefern (Schema 31, Route II).



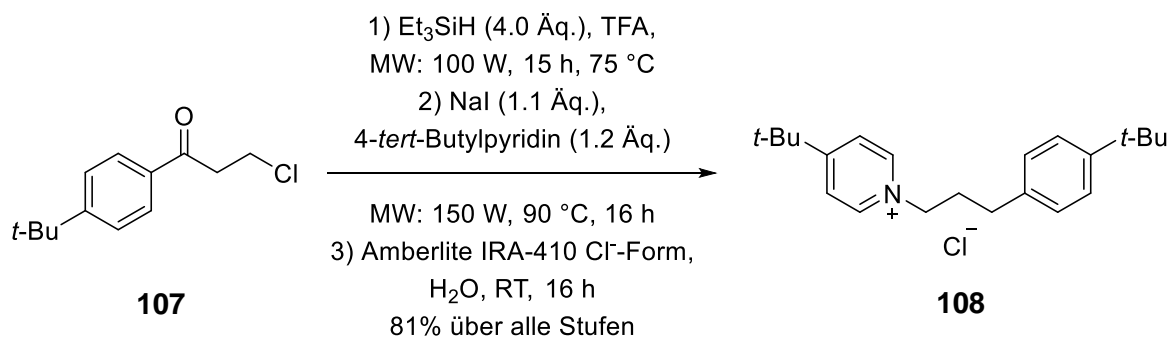
Schema 31: Darstellung der nach Route II synthetisierten Bispyridiniumsalze **105a–d**.

Im Fall des 2-methoxysubstituierten Pyridiniumsalzes **104e** führte eine parallel zur Substitution ablaufende Demethylierung der Methoxygruppe durch 4-*tert*-Butylpyridin (**43**) hingegen zu der Bildung des Pyridiniumpropylpyridons **106**, welches nach Optimierung der Demethylierungsreaktion mit einer Ausbeute von 90% isoliert werden konnte (Schema 32).



Schema 32: Synthese des Pyridiniumpropylpyridons **106**.

Um die Strukturvielfalt der Zielverbindungen über die bisquaternären Spezies **101** und **105** hinaus zu erweitern, wurde ausgehend von dem Chlorpropanonderivat **107** in zwei Stufen das Desaza-MB327-Analogon **108** synthetisiert (Schema 33).



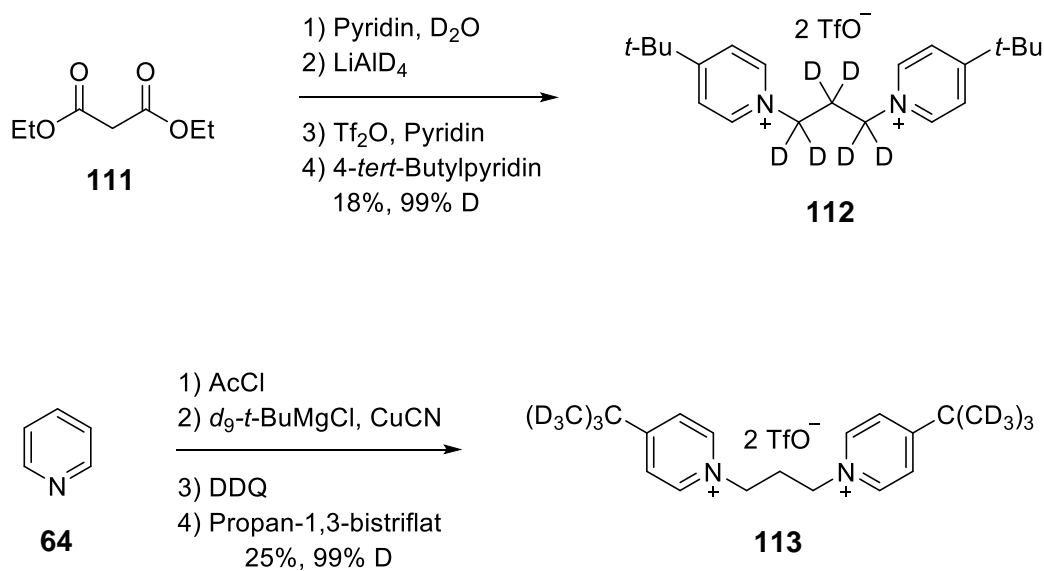
Schema 33: Synthese des Desaza MB327-Analogons **108**.

5.2.2.2 Biologische Prüfung

Die Bindungsaffinitäten der nicht-symmetrischen Zielverbindungen **101a-t**, **105a-d**, **106** und **108** zur MB327-Bindungsstelle des nAChR wurden mit der Affinität der Leitstruktur **MB327** ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$) verglichen. Zusätzlich erlaubte die Gegenüberstellung mit dem unsubstituierten Bispyridiniumsalz **101a** ($pK_i = 4.52 \pm 0.06$) eine Beurteilung der einzelnen Substituenteneffekte. Die höchsten Bindungsaffinitäten wurden für Verbindungen mit einem 4-*tert*-Butylpyridiniummotiv auf der einen Seite und einem Isoquinolin-2-ium- (**101m**: $pK_i = 4.90 \pm 0.06$), 3-Dimethylamino- (**101b**: $pK_i = 4.92 \pm 0.09$), 4-Dimethylamino (**101h**: $pK_i = 4.90 \pm 0.06$) oder 3-Methoxy-4-*tert*-butylpyridiniumring (**101i**: $pK_i = 4.97 \pm 0.02$) auf der anderen Seite gefunden. Einmal mehr lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es sich bei der NMe₂-Gruppe um ein potentes Bioisoster für die lipophile *tert*-Butylgruppe handelt. Wie am Beispiel **101i** gezeigt werden konnte, scheint das Zusammenspiel mehrerer funktioneller Gruppen ein vielversprechender Ansatz zu Erhöhung der absoluten Bindungsaffinität zu sein. Die Affinität des zweifachsubstituierten Bispyridiniumsalzes **101i** liegt mit einem pK_i Wert von 4.97 ± 0.02 deutlich über dem des einfachsubstituierten 3-Methoxypyridiniumderivats **101k** ($pK_i = 4.35 \pm 0.08$) und leicht über dem Wert für **MB327**. Von den fünf verschiedenen Gruppen an N-Heterocyclen (Isoquinolin, Pyrazin, Imidazol, Pyridin und Thiazol) welche mit dem 4-*tert*-Butylpyridiniummotiv kombiniert wurden, zeigten Verbindungen mit zwei Pyridiniumsystemen die höchsten Bindungsaffinitäten. Eine entscheidende Rolle für die Bindungsaffinität scheinen darüber hinaus auch ionische, Ion-Dipol- oder Kation- π -Wechselwirkungen zu haben, da das Desaza MB327-Analogon **108** ($pK_i = 4.34 \pm 0.04$) eine deutlich niedrigere Bindungsaffinität als **MB327** ($pK_i = 4.73 \pm 0.03$) besitzt.

5.3 Synthese deuterierter MB327-Analoga für die Entwicklung von MS-Bindungsassays

Die Synthese der für die MS-Bindungsassays benötigten d_6 - und d_{18} -MB327-Analoga **112** und **113** gelang ausgehend von Malonsäurediethylester (**111**) bzw. Pyridin (**64**) innerhalb weniger Schritte mit einem exzellenten Deuterierungsgrad von über 99%.



Schema 34: Synthese der d_6 - und d_{18} -MB327-Analoga **112** und **113**.

5.4 Ausblick und Weiterentwicklung der Leitstruktur

Obwohl die Molecular Modeling Ergebnisse eine Zweiteilung der potentiellen MB327-Bindungsstelle in eine lipophile und eine hydrophile Seite nahelegen,¹³² weist das lipophile und symmetrische 3-phenyl-4-*tert*-butylsubstituierte Bispyridiniumsalz **31h** ($pK_i = 5.16 \pm 0.07$) die höchste Bindungsaffinität aller Testverbindungen auf. Dies lässt mehrere Rückschlüsse zu. Zum einen kann eine zusätzliche Stabilisierung des Moleküls über ausgedehnte π - π -, Charge-Transfer- sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen (VdW) mit der lipophilen Seite der Bindungstasche vermutet werden. Diese könnten dominant genug sein, um potentiell entgangene Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen mit polaren Substituenten auf der lipophilen Seite zu kompensieren. Darüber hinaus ist auch denkbar, dass die Wechselwirkung des Moleküls mit der hydrophilen Seite ein sehr spezifisches Substitutionsmuster benötigt, damit die zusätzlich gewonnene Bindungsenergie den Verlust der Hydrathülle der an der Bindung beteiligten polaren Gruppen übersteigt. Äußerst interessant wäre deshalb, die beiden affinsten

symmetrischen und nicht-symmetrischen Testverbindungen **31h** und **1011** miteinander in einer Struktur zu verschmelzen und gegebenenfalls die *tert*-Butylgruppe der polaren Seite durch eine bioisostere Dimethylaminogruppe zu ersetzen.

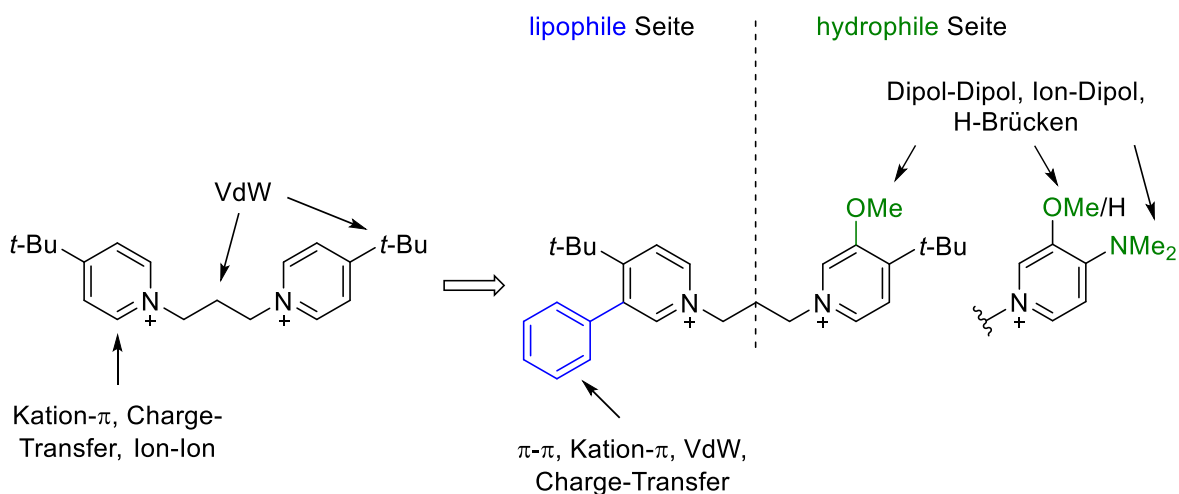


Abbildung 20: Neue Zielstrukturen auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Struktur-Affinitätsbeziehungen und potentielle Wechselwirkungen mit der Bindungstasche.

Auf diese Weise könnten im Idealfall beide Seiten der Bindungstasche besser adressiert werden und die Bindungsaffinität durch zusätzliche H-Brücken, Ion-Dipol- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Methoxy- und/oder Aminogruppe mit lipophilen Aminosäureseitenketten gesteigert werden (Abbildung 20). Zur weiteren Optimierung der Molekülstruktur stellt sich zusätzlich die Frage der geometrischen Anordnung sowie der bioaktiven Konformation des Moleküls in der Bindungstasche. Um dies klären zu können, wäre neben weiteren Molecular-Modeling Studien die Synthese und Prüfung von Molekülen hilfreich, welche wie die beiden tetrazyklischen Spiro-Verbindungen **109** und **110** statt eines flexiblen Propan-1,3-diyl-Linker ein steifes Molekülgerüst besitzen und somit nur definierte Konformationen zulassen.

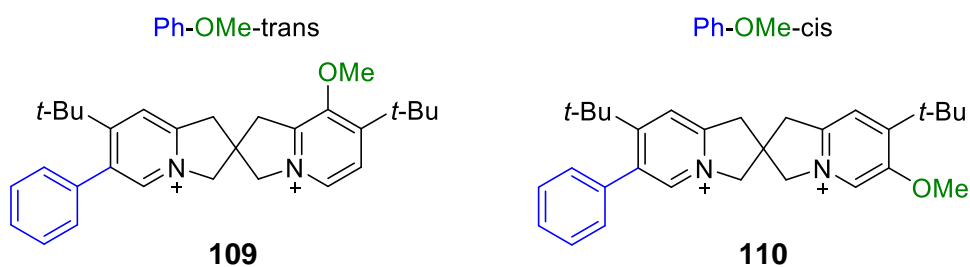
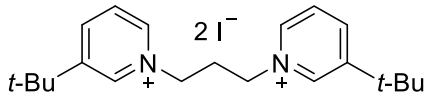
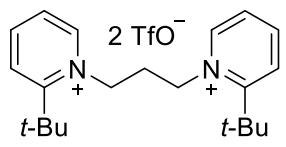
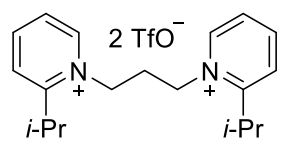
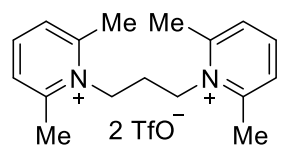
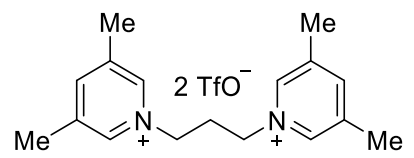
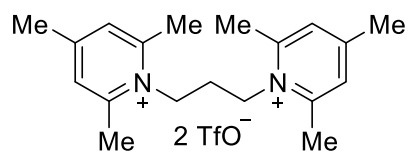


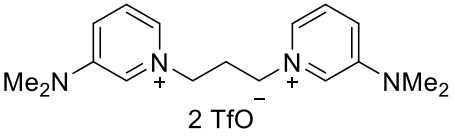
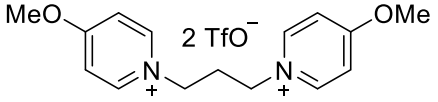
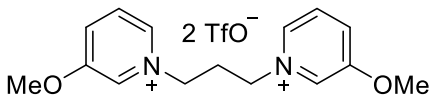
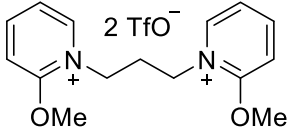
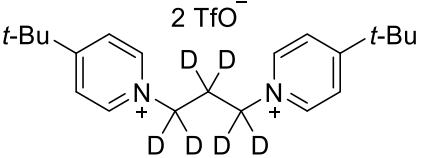
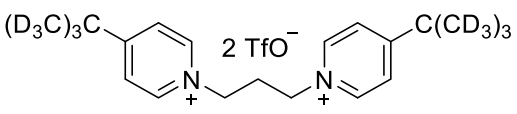
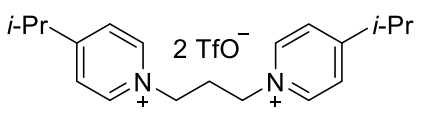
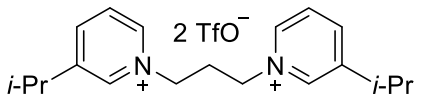
Abbildung 21: Mögliche Versteifung und Restriktion der Molekülkonformation.

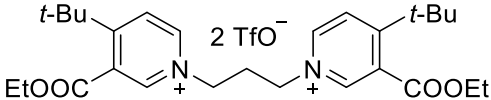
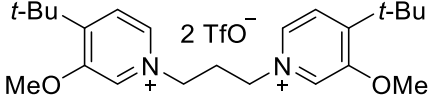
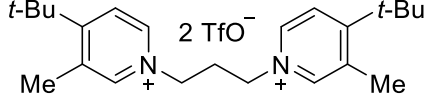
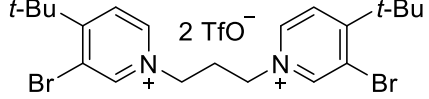
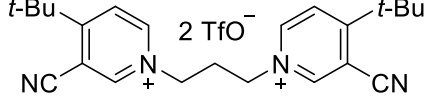
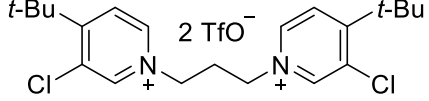
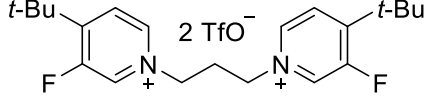
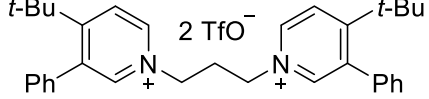
6 Verzeichnis der synthetisierten PTM Substanzen

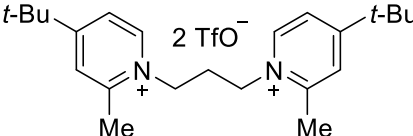
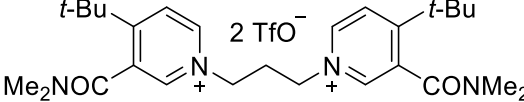
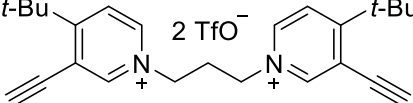
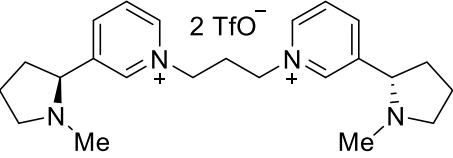
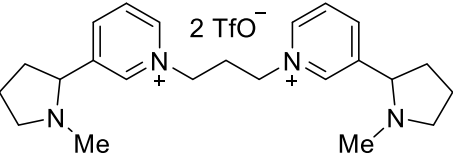
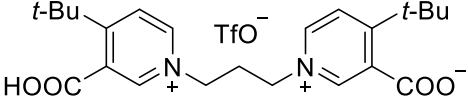
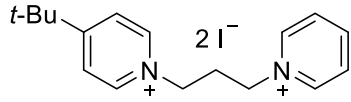
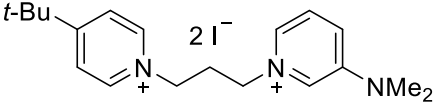
Im Folgenden sind alle im Laufe des Forschungsprojekts synthetisierten PTM-Verbindungen aufgelistet (Tabelle 9). Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels quantitativem $^1\text{H-NMR}$ mit Sigma-Aldrich TraceCERT® Maleinsäure oder Dimethylsulfon als internem Standard.

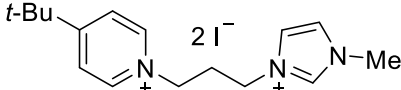
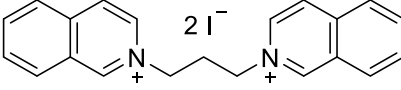
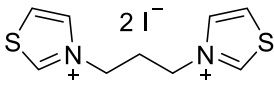
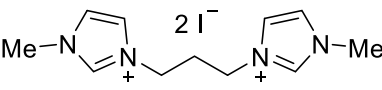
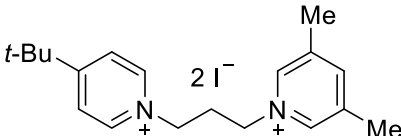
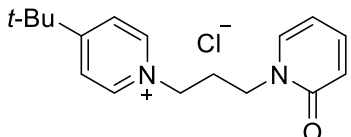
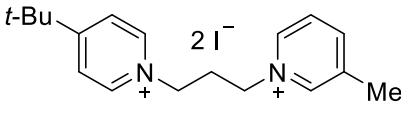
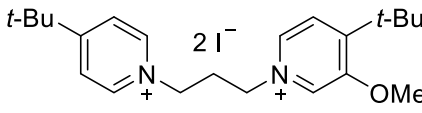
Tabelle 9: Synthetisierte PTM Substanzen.

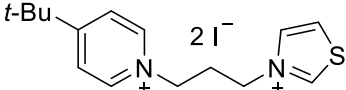
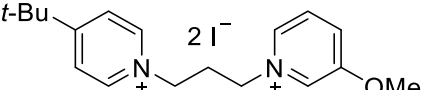
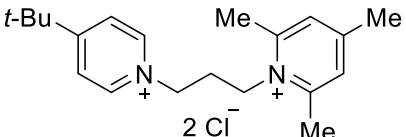
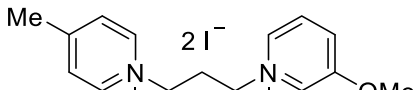
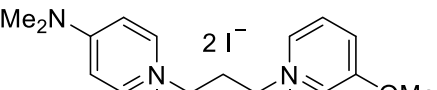
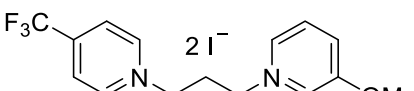
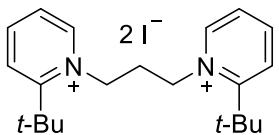
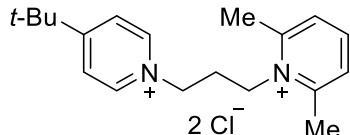
Formeln und Molekulargewicht	Reinheit (Gew.-% ^{a)})	PTM-Code	Nr.
 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_2$: 566.30 g/mol	97.40	0001	29h
 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 610.63 g/mol	97.31	0002	29a
 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 582.58 g/mol	97.63	0003	29b
 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 554.52 g/mol	99.02	0004	29f
 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 554.52 g/mol	98.35	0005	29e
 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 582.58 g/mol	96.06	0006	29g

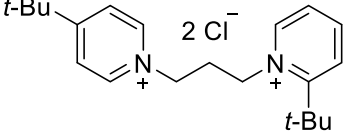
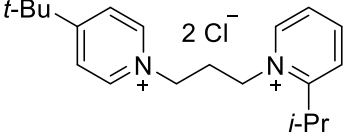
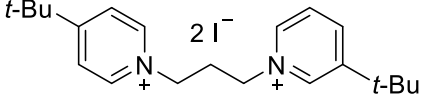
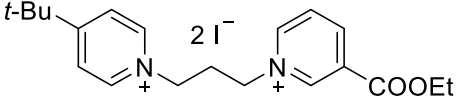
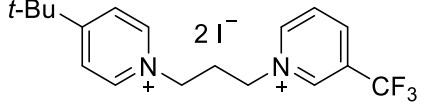
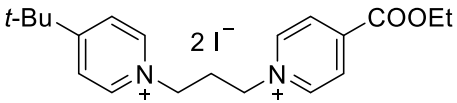
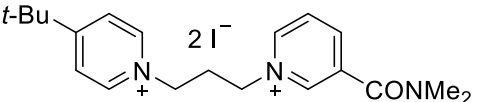
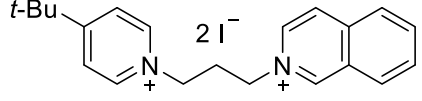
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	98.45	0007	30d
C ₁₉ H ₂₆ F ₆ N ₄ O ₆ S ₂ : 584.55 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	99.02	0008	30c
C ₁₇ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₈ S ₂ : 558.47 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	98.64	0009	30b
C ₁₇ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₈ S ₂ : 558.47 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	99.16	0010	30a
C ₁₇ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₈ S ₂ : 558.47 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	98.57	0011	112
C ₂₃ H ₂₆ D ₆ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 616.55 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	96.98	0012	113
C ₂₃ H ₁₄ D ₁₈ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 628.74 g/mol			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	98.93	0013	29d
C ₂₁ H ₂₈ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 582.57			
 <p style="text-align: center;">2 TfO⁻</p>	98.96	0014	29c
C ₂₁ H ₂₈ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 582.57			

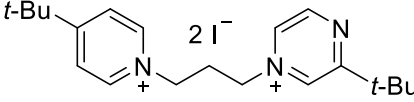
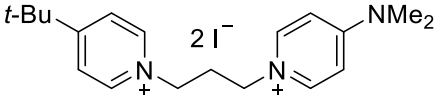
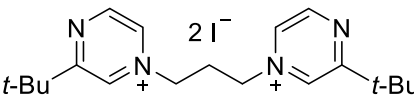
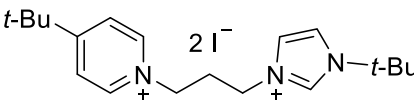
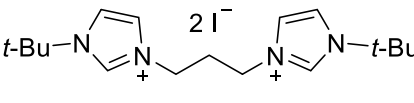
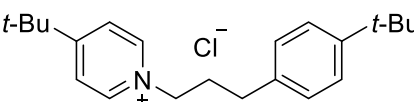
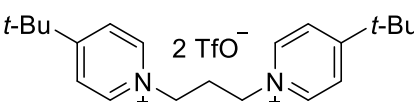
	98.33	0015	31j
C ₂₉ H ₄₀ F ₆ N ₂ O ₁₀ S ₂ : 754.75			
	97.73	0016	31e
C ₂₅ H ₃₆ F ₆ N ₂ O ₈ S ₂ : 670.68			
	97.86	0017	31g
C ₂₅ H ₃₆ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 638.68			
	97.77	0018	31c
C ₂₃ H ₃₀ Br ₂ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 768.42			
	97.40	0019	31d
C ₂₅ H ₃₀ F ₆ N ₄ O ₆ S ₂ : 660.65			
	97.68	0020	31b
C ₂₃ H ₃₀ Cl ₂ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 679.51			
	98.46	0021	31a
C ₂₃ H ₃₀ F ₈ N ₂ O ₆ S ₂ : 646.61			
	99.66	0022	31h
C ₃₅ H ₄₀ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 762.82			

 <p style="text-align: center;">$C_{25}H_{36}F_6N_2O_6S_2$: 638.68</p>	97.56	0023	31k
 <p style="text-align: center;">$C_{29}H_{42}F_6N_4O_8S_2$: 752.79</p>	97.79	0024	31f
 <p style="text-align: center;">$C_{27}H_{32}F_6N_2O_6S_2$: 658.67</p>	96.83	0025	31i
 <p style="text-align: center;">$C_{25}H_{34}F_6N_4O_6S_2$: 664.68</p>	97.62	0026	<i>(S,S)</i> -90
 <p style="text-align: center;">$C_{25}H_{34}F_6N_4O_6S_2$: 664.68</p>	96.91	0027	<i>rac</i> -30e
 <p style="text-align: center;">$C_{24}H_{31}F_3N_2O_7S$: 548.57</p>	92.60	0028	31l
 <p style="text-align: center;">$C_{17}H_{24}I_2N_2$: 510.20</p>	99.80	0029	101a
 <p style="text-align: center;">$C_{19}H_{29}I_2N_3$: 553.27</p>	96.65	0030	101b

	98.57	0031	101n
C ₁₆ H ₂₅ I ₂ N ₃ : 513.21			
	98.69	0032	32a
C ₂₁ H ₂₀ I ₂ N ₂ : 554.21			
	99.36	0033	32c
C ₉ H ₁₂ I ₂ N ₂ S ₂ : 466.14			
	99.52	0034	32d
C ₁₁ H ₁₈ I ₂ N ₄ : 460.10			
	96.77	0035	101i
C ₁₉ H ₂₈ I ₂ N ₂ : 538.26			
	97.98	0036	106
C ₁₇ H ₂₃ ClN ₂ O: 306.84			
	97.89	0037	101j
C ₁₈ H ₂₆ I ₂ N ₂ : 524.23			
	96.80	0038	101l
C ₂₂ H ₃₄ I ₂ N ₂ O: 596.34			

	99.09	0039	101p
$C_{15}H_{22}I_2N_2S$: 516.22			
	98.97	0040	101k
$C_{18}H_{26}I_2N_2O$: 540.23			
	95.39	0041	105d
$C_{20}H_{30}Cl_2N_2$: 369.37			
	97.76	0042	101r
$C_{15}H_{20}I_2N_2O$: 498.15			
	96.75	0043	101s
$C_{16}H_{23}I_2N_3O$: 527.19			
	97.14	0044	101t
$C_{15}H_{17}F_3I_2N_2O$: 552.12			
	97.80	0045	92
$C_{21}H_{32}I_2N_2$: 566.31			
	95.31	0046	105c
$C_{19}H_{28}Cl_2N_2$: 355.35			

 $C_{21}H_{32}Cl_2N_2$: 383.40	96.40	0047	105a
 $C_{20}H_{30}Cl_2N_2$: 369.37	97.50	0048	105b
 $C_{21}H_{32}I_2N_2$: 566.31	97.58	0049	101c
 $C_{20}H_{28}I_2N_2O_2$: 582.26	97.62	0050	101d
 $C_{18}H_{23}F_3I_2N_2$: 578.20	98.43	0051	101e
 $C_{20}H_{28}I_2N_2O_2$: 582.26	97.02	0052	101f
 $C_{20}H_{29}I_2N_3O_2$: 581.28	97.96	0053	101g
 $C_{21}H_{26}I_2N_2$: 560.26	97.24	0054	101m

	98.22	0055	101q
C ₂₀ H ₃₁ I ₂ N ₃ : 567.30			
	97.90	0056	101h
C ₁₉ H ₂₉ I ₂ N ₃ : 553.27			
	98.15	0057	32b
C ₁₉ H ₃₀ I ₂ N ₄ : 568.29			
	96.62	0058	101o
C ₁₉ H ₃₁ I ₂ N ₃ : 555.29			
	99.53	0059	32e
C ₁₇ H ₃₀ I ₂ N ₄ : 544.26			
	99.18	0060	108
C ₂₂ H ₃₂ ClN: 345.96			
	97.94	0061	91
C ₂₃ H ₃₂ F ₆ N ₂ O ₆ S ₂ : 610.63			

7 Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
5-HT	5-Hydroxytryptamin
Å	Ångström
°C	Grad Celsius
δ	Chemische Verschiebung
μM	Mikromolar
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
AcCl	Acetylchlorid
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AcOH	Essigsäure
Asp	Aspartat
Äq.	Äquivalente
BP	Bispyridinium
Bn	Benzyl
br. s	breites Singulett (NMR)
calcd.	engl.: <i>calculated</i>
CAM	engl.: <i>cerium-ammonium-molybdate</i>
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
c-Hex	Cyclohexyl
C-Waffen	chemische Waffen
CoA	Coenzym A
COOEt	Ethoxycarbonyl
CONMe ₂	Dimethylcarbamoyl
COSY	engl.: <i>correlation spectroscopy</i>
Cys	Cystein
d	Dublett (NMR)

DC6C	Dansyl-C6-cholin
DHP	Dihydropyridin
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
ED ₅₀	mittlere Effektivdosis
EI	Elektronenstoßionisation
eq.	engl.: <i>equivalents</i>
ESI	engl.: <i>elektrospray ionisation</i>
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
FAB	engl.: <i>fast atom bombardment</i>
FCC	engl.: <i>flash column chromatography</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GP	engl.: <i>general procedure</i>
h	Stunde
HEK	engl.: <i>Human Embryonic Kidney</i>
HMBC	engl.: <i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	engl.: <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
<i>i</i> -Pr	Isopropyl
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	engl.: <i>Imperial Chemical Industries</i>
kg	Kilogramm
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
Leu	Leucin

log	dekadischer Logarithmus
M	Molar
m	Multiplett (NMR)
[M] ⁺	Molekülionenpeak
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeLi	Methylithium
MeOH	Methanol
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mmHG	Millimeter-Quecksilbersäule
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
n	Anzahl der Methylengruppen
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
<i>n</i> -Oct	<i>n</i> -Octyl
NMe ₂	Dimethylamino
NMR	Kernmagnetresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NS	Nervensystem
OMe	Methoxy
OP	Organophosphat/Organophosphonat
OPCW	engl.: <i>Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons</i>
Ox	Oxidation
PAM	Positiver allosterischer Modulator
PDB	engl.: <i>Protein Data Bank</i>
PivCl	Pivaloylchlorid
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin

PhOCOCl	Phenylchlorformiat
PTM	engl.: <i>Pharmacy and Toxicology Munich</i>
q	Quartett (NMR)
quin.	Quintett (NMR)
<i>rac</i>	racemisch
RP-MPLC	engl.: <i>reversed phase medium pressure liquid chromatography</i>
rt	engl.: <i>room temperature</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
s-Bu	<i>sec</i> -Butyl
SC	Säulenchromatographie
sept.	Septett (NMR)
SURFE ² R	engl.: <i>Surface Electronic Event Reader</i>
T	Temperatur
<i>t</i>	Zeit
t	Triplett (NMR)
<i>t</i> _{1/2}	Halbwertszeit
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBDMSOTf	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyltriflat
THF	Tetrahydrofuran
TIPSOTf	Triisopropylsilyltriflat
TLC	engl.: <i>thin layer chromatography</i>
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat
Trp	Tryptophan
TRPV	engl.: <i>transient receptor potential channels of the vanilloid subtype</i>
Tyr	Tyrosin
UN	engl.: <i>United Nations</i>
Val	Valin

VdW Van-der-Waals

vgl. vergleiche

W Watt

WHO engl.: *World Health Organization*

ZNS Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

- [1] Salem, H.; Ternay, A. L.; Smart, J. K. Brief History and Use of Chemical Warfare Agents in Warfare and Terrorism. In *Chemical Warfare Agents*; Romano J. A., Lukey B. J., Salem H., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008; second edition, S. 10–11.
- [2] Shoam, D., *The Nonproliferation Review* **1998**, 5 (3), 48–58.
- [3] Ali, J., *The Nonproliferation Review* **2001**, 8 (1), 43–58.
- [4] Wietzker, W. Die Zensur in Deutschland und der erste deutsche Gasangriff im Mai 1915. *Newsletter Arbeitskreis Militärgeschichte e.V.*, Sept. 2003, S. 14.
- [5] Wietzker, W. Giftgas im Ersten Weltkrieg. Was konnte die deutsche Öffentlichkeit wissen? *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2006**.
- [6] Der Bundesrat, das Portal der Schweizer Regierung. *Protokoll über das Verbot der Verwendung von erstickenden, giftigen oder ähnlichen Gasen sowie von bakteriologischen Mitteln im Kriege*. <https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/19250020/index.html> (online abgerufen am 06.02.2018).
- [7] Höfer, M., *Chem. Unserer Zeit* **2002**, 36, 148–155.
- [8] Homepage der Organisation für das Verbot chemischer Waffen. <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/genesis-and-historical-development/> (online abgerufen am 06.02.2018).
- [9] Homepage der Organisation für das Verbot chemischer Waffen. *Status of Participation in the Chemical Weapons Convention as at 17 October 2015*. https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/S_series/2015/en/s-1315-2015_e_.pdf (online abgerufen am 06.02.2018).
- [10] Neidhart, C.; Strittmatter, K. Geruchlos und extrem tödlich. *Süddeutsche Zeitung*, 24.02.2017.
- [11] Kahlweit, C. Nato und USA springen Großbritannien bei – Giftanschlag auf Ex-Spion. *Süddeutsche Zeitung*, 12.03.2018.
- [12] Worek, F.; Wille, T.; Koller, M.; Thiermann, H. *Arch Toxicol* **2016**, 90, 2131–2145.
- [13] Homepage des französischen Ministeriums für Europa und auswärtige Angelegenheiten. *Syria/Syrian chemical programme – National executive summary of declassified intelligence*. https://www.diplomatie.gouv.fr/IMG/pdf/Syrian_Chemical_Programme.pdf (online abgerufen am 07.02.2018).
- [14] BBC Homepage. <http://www.bbc.com/news/world-middle-east-39500947> (online abgerufen am 7.02.2018).
- [15] John, H.; van der Schans, M. J.; Koller, M.; Spruit, H. E. T.; Worek, F.; Thiermann, H.; Noort D. *Forensic Toxicol.* **2018**, 36, 61–71.
- [16] Okudera, H.; Morita, H.; Iwashita, T.; Shibata T.; Otagiri, T.; Kobayashi, S.; Yanagisawa, N. *Am. J. Emerg. Med.* **1997**, 15 (5), 527–528.

- [17] Ogawa, Y.; Yamamura, Y.; Ando, H.; Kadokura, M.; Agata, T.; Fukumoto, M.; Satake, T.; Machida, K.; Sakai, O.; Miyata, Y.; Nonaka, H.; Nakajima, K.; Hamaya, S.; Miyazaki, S.; Ohida, M.; Yoshioka, T.; Takagi, S.; Shimizu, H. *ACS Symp. Ser.* **2000**, *745*, 333–355.
- [18] Reichl, F. X.; Taschenatlas der Toxikologie: Substanzen, Wirkung, Umwelt; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2002; S. 232.
- [19] Gunnell, D.; Eddleston, M.; Phillips, M. R.; Konradsen, F. *BMC Public Health* **2007**, *7*, 357.
- [20] Bertolote, J.M.; Fleischmann, A.; Eddleston, M.; Gunnell, D. *Br J Psychiatry.* **2006**, *189*, 201–203.
- [21] Jeyaratnam, J. *World Health Stat Q.* **1990**, *43* (3), 139–144.
- [22] Baker, D. J. *Toxic Trauma, A Basic Clinical Guide*; Springer: Cham, 2016; S. 20.
- [23] Schrader, G. *Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen*; Verlag Chemie, GmbH: Weinheim, 1951; S. 5.
- [24] Murphy, D. F.; Peet, C. H. *J. Econ. Entomol.* **1932**, *25*, 123–129.
- [25] Schrader, G. *Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen*; Verlag Chemie, GmbH: Weinheim, 1951; S. 9–14.
- [26] Quitschau, M.; Schuhmann, T.; Piel, J.; Zezschwitz, P.; Grond, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5117–5124.
- [27] Preuss, J. The Reconstruction of Production and Storage Sites for Chemical Warfare Agents and Weapons from Both World Wars in the Context of Assessing Former Munition Sites. In *One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences*; Friedrich, B., Hoffmann, D., Renn, J., Schmaltz, F., Wolf, M., Eds.; Springer Open: Cham, 2017; S. 317.
- [28] Thiermann, H.; Gonder, S.; John, H.; Kehe, K.; Koller, M.; Steinritz, D.; Worek, F. Chemische Kampfstoffe. In *Toxikologie Band 2: Toxikologie der Stoffe*; Voehr, H.-W., Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 2010; S. 213.
- [29] Schmaltz, F. *Kampfstoff-Forschung im Nationalsozialismus; Zur Kooperation von Kaiser-Wilhelm-Instituten, Militär und Industrie*; Wallstein Verlag: Göttingen, 2005; S. 486–488.
- [30] Spradling, K. D.; Dillmann, J. F. The Molecular Toxicology of Chemical Warfare Nerve Agents. In *Advances in Molecular Toxicology Volume 5*; Fishbein, J. C., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2011; S. 112.
- [31] Watson, A.; Opresko, D.; Young, R. A.; Hauschild, V.; King, J.; Bakshi, K. Organophosphate Nerve Agents. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2015; S. 88–89.
- [32] Schrader, G. *Angew. Chem.* **1950**, *20*, 471–490.
- [33] Schrader, G. *Angew. Chem.* **1954**, *10*, 265–284.
- [34] Schrader, G. *Angew. Chem.* **1957**, *3*, 86–90.
- [35] Schrader, G. *Angew. Chem.* **1961**, *10*, 331–334.

- [36] Ghosh, R. New Basic Esters of Phosphorus-Containing Acids. GB Patent 738839, 19. Oktober 1955.
- [37] Ghosh, R. Manufacture of Basic Esters of Phosphorothiolic Acid. GB Patent 763516, 12. Dezember 1956.
- [38] Fest, C.; Schmidt, K.-J. *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides: Reactivity, Synthesis, Mode of Action, Toxicology*; Springer-Verlag: New-York, Heidelberg, Berlin, 1973; S. 117
- [39] Tammelin, L. E. *Acta Chem. Scand.* **1957**, *11* (8), 1340–1349.
- [40] Garrett, B. C. *Historical Dictionary of Nuclear, Biological and Chemical Warfare*; Rowman & Littlefield: Maryland, 2017; S. 20.
- [41] Croddy, E. A. V-Agents. In *Weapons of Mass Destruction: An Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History*; Croddy, E. A., Wirtz, J. J., Larsen, J. A. Eds.; ABC-Clio: Santa Barbara; 2005; S. 313–314.
- [42] Salem, H.; Ternay, A. L.; Smart, J. K. Brief History and Use of Chemical Warfare Agents in Warfare and Terrorism. In *Chemical Warfare Agents*; Romano J. A., Lukey B. J., Salem H., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008; second edition, S. 14.
- [43] Kuca, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Hrabínova, M.; Bartosova, L.; Opletalova, V. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *98*, 389–394.
- [44] Black, R. Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents. In *Chemical Warfare Toxicology: Volume 1: Fundamental Aspects*; Worek, F., Jenner, J., Thiermann, H., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; S. 18–19.
- [45] Antonijević, B.; Stojiljković, M. P. *Clin. Med. Res.* **2007**, *5* (1), 71–82.
- [46] Sidell, F. R. Nerve Agents. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*; Sidell, F. R., Takafuji, E. T., Franz, D. R., Eds.; Office of The Surgeon General at TMM Publications: Washington, 1997; S. 139–144.
- [47] Croddy, E. A. V-Agents. In *Weapons of Mass Destruction: An Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History*; Croddy, E. A., Wirtz, J. J., Larsen, J. A. Eds.; ABC-Clio: Santa Barbara; 2005; S. 201–202.
- [48] Kuca, K.; Jun, D.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Karasova, J. Z.; Soukup, O. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13* (14), 2102–2115.
- [49] Bajgar, J.; Kassa, J.; Fusek, J.; Kuca, K.; Jun, D. Other Toxic Chemicals as Potential Chemical Warfare Agents. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sidney, Tokyo, 2015; S. 340.
- [50] Aurbek, N.; Worek, F.; Thiermann, H. *Wehrmed. Mschr.* **2009**, *11*, 340–349.
- [51] Thiermann, H.; Gonder, S.; John, H.; Kehe, K.; Koller, M.; Steinritz, D.; Worek, F. Chemische Kampfstoffe. In *Toxikologie Band 2: Toxikologie der Stoffe*; Voehr, H.-W., Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 2010; S. 206–208.
- [52] Fujii, T.; Mashimo, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Ono, S.; Horiguchi, K.; Kawashima, K.; *Front. Immunol.* **2017**, *8*:1085.

- [53] Augustine, G. J. Neurotransmitters and Their Receptors. In *Neuroscience: Third Edition*; Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., La Mantia, A.-S., McNamara, J. O., Williams, S. M., Eds.; Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 2004; S. 131–132.
- [54] Vegetatives Nervensystem. *Lexikon der Neurowissenschaft* [online]; Copyright 2000 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. <https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/vegetatives-nervensystem/13542> (online abgerufen am 12.04.2018).
- [55] Soreq, H.; Seidman, S. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 294–302.
- [56] Thiermann, H.; Aurbek, N.; Worek, F. Treatment of Nerve Agent Poisoning. In *Chemical Warfare Toxicology: Volume 2: Management of Poisoning*; Worek, F., Jenner, J., Thiermann, H., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; S. 4–6.
- [57] Marrs, T. C. *Pharmacology & Therapeutics* **1993**, *58*, 51–66.
- [58] Zhou, Y.; Wang, S.; Zhang, Y. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8817–8825.
- [59] Thiermann, H.; Aurbek, N.; Worek, F. Treatment of Nerve Agent Poisoning. In *Chemical Warfare Toxicology: Volume 2: Management of Poisoning*; Worek, F., Jenner, J., Thiermann, H., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; S. 12–29.
- [60] Zilker, T.; *Toxicology* **2005**, *214*, 221–231.
- [61] Grob, D. *Arch. Intern. Med.* **1956**, *98* (2), 221–239.
- [62] Dunn, M. A.; Sidell, F. R. *J. Am. Med. Assoc.* **1989**, *262* (5), 649–652.
- [63] Shih, T.-M.; Rowland, T. C.; McDonough, J. H. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 154–161.
- [64] McDonough, J. H.; Shih, T. M. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **1997**, *21*, 559–579.
- [65] Wetherell, J.; Price, M.; Mumford, H. *NeuroToxicology* **2006**, *27*, 485–491.
- [66] Gordon, J. J.; Leadbeater, L.; Maidment, M. P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1978**, *43*, 207–216.
- [67] Herkert, N. M.; Eckert, S.; Eyer, P.; Bumm, R.; Weber, G.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicology* **2008**, *246*, 188–192.
- [68] Ring, A.; Strom, B. O.; Turner, S. R.; Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, A. C.; Chad, J. E.; Worek, F.; Tattersall, J. E. H. *PLoS ONE* **2015**, *10* (8): e0135811.
- [69] Sheridan, R. D.; Smith, A. P.; Turner, S. R.; Tattersall, J. E. H. *J. R. Soc. Med.* **2005**, *98*, 114–115.
- [70] Eyer, P. *Toxicol. Rev.* **2003**, *22* (3), 165–190.
- [71] Childs, A. F.; Davies, D. R.; Green, A. L.; Rutland, J. P. *Brit. J. Pharmacol.* **1955**, *10*, 462–465.
- [72] Wilson, I. B.; Ginsburg, S. *Biophys Acta* **1955**, *18*, 168–170.
- [73] Thiermann, H.; Worek, F.; Kehe, K. *Chem.-Biol. Interact.* **2013**, *206*, 435–443.
- [74] Worek, F.; Aurbek, N.; Koller, M.; Becker, C.; Eyer, P.; Thiermann, H. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1807–1817.

- [75] Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237–2248.
- [76] Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 93–98.
- [77] Sine, S. M.; Engel, A. G. *Nature* **2006**, *440*, 448–455.
- [78] Lummis, S. C. R. *J. Bio. Chem.* **2012**, *287* (48), 40239–40245.
- [79] Miyazawa, A.; Fujiyoshi, Y.; Unwin, N. *Nature* **2003**, *423*, 949–955.
- [80] Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F. R.; Alkondon, M.; Rogers, S. W. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 73–120.
- [81] Cooper, E.; Couturier, S.; Ballivet, M. *Nature* **1991**, *350*, 235–238.
- [82] Mishina, M.; Takai, T.; Imoto, K.; Noda, M.; Takahashi, T.; Numa, S.; Methfessel, C.; Sakmann, B. *Nature* **1986**, *321*, 406–411.
- [83] Unwin, N. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989.
- [84] Rose, A. S.; Hildebrand, P. W. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W576–W579.
- [85] Rose, A. S.; Bradley, A. R.; Valasatava, Y.; Duarte, J. M.; Prlić, A.; Rose, P. W. In *Web-based molecular graphics for large complexes*, Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology, Anaheim, California, 22–24 Juli, 2016; ACM: New York, 2016, S. 185–186.
- [86] Hurst, R.; Rollema, H.; Bertrand, D. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *137*, 22–54.
- [87] Brejc, K.; van Dijk, W. J.; Klaassen, R. V.; Schuurmans, M.; van der Oost, J.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. *Nature* **2001**, *411*, 269–276.
- [88] Sine, S. M. *J. Neurobiol.* **2002**, *53* (4), 431–446.
- [89] Zhong, W.; Gallivan, J. P.; Zhang, Y.; Li, L.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12088–12093.
- [90] Celie, P. H. N.; van Rossum-Fikkert, S. E.; van Dijk, W. J.; Brejc, K.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. *Neuron* **2004**, *41*, 907–914.
- [91] Hansen, S. B.; Sulzenbacher, G.; Huxford, T.; Marchot, P.; Taylor, P.; Bourne, Y.; *EMBO J.* **2005**, *24*, 3635–3646.
- [92] Karlin, A. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 102–114.
- [93] Katz, B.; Thesleff, S. *J. Physiol.* **1957**, *138*, 63–80.
- [94] Heidmann, T.; Changeux, J.-P. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *94*, 255–279.
- [95] Giniatullin, R.; Nistri, A.; Yakel, J. L.; *Trends Neurosci.* **2005**, *28* (7), 371–378.
- [96] Reitstetter, R.; Lukas, R. J.; Gruener, R. *J. Pharmacol.* **1999**, *289* (2), 656–660.
- [97] Quick, M. W.; Lester, R. A. J. *J. Neurobiol.* **2002**, *53*, 457–458.
- [98] Prince, R. J.; Sine, S. M. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (28), 19623–19629.
- [99] Auerbach, A.; Akk, G. *J. Gen. Physiol.* **1998**, *112*, 181–197.
- [100] Changeux, J.-P. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (48), 40207–40215.
- [101] Sakman, B.; Patlak, J.; Neher, E. *Nature* **1980**, *286*, 71–73.
- [102] Naranjo, D.; Brehm, P. *Science* **1993**, *260*, 1811–1814.

- [103] Sine, S. M.; Steinbach, J. H. *J. Physiol.* **1987**, *385*, 325–359.
- [104] Elenes, S.; Auerbach, A. *J. Physiol.* **2002**, *541*, 367–383.
- [105] Andreeva, I. E.; Nirthanan, S.; Cohen, J. B.; Pedersen, S. E. *Biochemistry* **2006**, *45*, 195–204.
- [106] Yamodo, I. H.; Chiara, D. C.; Cohen, J. B.; Miller, K. W. *Biochemistry* **2010**, *49* (1), 156–165.
- [107] Unwin, N. *Nature* **1995**, *373*, 37–43.
- [108] Cymes, G. D.; Grosman, C. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (4), 389–396.
- [109] Cohen, B. N.; Labarca, C.; Davidson, N.; Lester, H. A. *J. Gen. Physiol.* **1992**, *100*, 373–400.
- [110] Dwyer, T. M.; Adams, D. J.; Hille, B. *J. Gen. Physiol.* **1980**, *75*, 469–492.
- [111] Jackson, M. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2199–2203.
- [112] Grosman, C.; Auerbach, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (24), 14102–14107.
- [113] Colquhoun, D.; Sackmann, B. *Nature* **1981**, *294*, 464–466.
- [114] Papke, R. L. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 1–11.
- [115] Tattersall, J. E. H. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *101*, 349–357.
- [116] Akasu, T.; Karczmar, A. G. *Neuropharmacology* **1980**, *19*, 393–403.
- [117] Magleby, K. L.; Pallotta, B. S. *J. Physiol.* **1981**, *316*, 225–250.
- [118] Oldiges, H.; Schoene, K. *Arch. Toxikol.* **1970**, *26*, 293–305.
- [119] Schoene, K.; Steinhanses, J.; Oldiges, H. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1955–1958.
- [120] Lundy, P. M.; Tremblay, K. P. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, *60*, 47–53.
- [121] Su, C.-T.; Tang, C.-P.; Ma, C.; Shih, Y.-S.; Liu, C.-Y.; Wu, M.-T. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1983**, *3* (4), 271–277.
- [122] Broomfield, C.; Dembure, I. J.; Cuculis, J. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36* (7), 1017–1022.
- [123] Alkondon, M.; Albuquerque, E. X. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *250* (3), 842–852.
- [124] Tattersall, J. E. H. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 1006–1015.
- [125] Seeger, T.; Eichhorn, M.; Lindner, M.; Niessen, K. V.; Tattersall, J. E. H.; Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, A. C.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicology* **2012**, *294*, 80–84.
- [126] Turner, S. R.; Chad, J. E.; Price, M.; Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, A. C.; Tattersall, J. E. H. *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 105–111.
- [127] Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, C.; Price, M. E.; Chad, J. E.; Turner, S. R.; Tattersall, J. E. H. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 352–356.
- [128] Price, M. E.; Docx, C. J.; Rice, H.; Fairhall, S. J.; Poole, S. J. C.; Bird, M.; Whiley, L.; Flint, D. P.; Green, A. C.; Timperley, C. M.; Tattersall, J. E. H. *Toxicol. Lett.* **2016**, *244*, 154–160.

- [129] Niessen, K. V.; Tattersall, J. E. H.; Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, C.; Seeger, T.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 100–104.
- [130] Niessen, K. V.; Muschik, S.; Langguth, F.; Rappenglück, S.; Seeger, T.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicol. Lett.* **2016**, *247*, 1–10.
- [131] Gronlien, J. H.; Hakerud, M.; Ween, H.; Thorin-Hagene, K.; Briggs, C. A.; Gopalakrishnan, M.; Malysz, J. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72* (3), 715–724.
- [132] Wein, T.; Höfner, G.; Rappenglück, S.; Sichler, S.; Niessen, K. V.; Seeger, T.; Worek, F.; Thiermann, H.; Wanner, K. T. *Toxicol. Lett.* **2018**, *293*, 184–189.
- [133] Seeger, T.; Worek, F.; Thiermann, H. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2013**, *386*, S. 77.
- [134] Niessen, K. V.; Seeger, T.; Tattersall, J. E. H.; Timperley, C. M.; Bird, M.; Green, C.; Thiermann, H.; Worek, F. *Chem.-Biol. Interact.* **2013**, *206*, 545–554.
- [135] Millar, N. S.; *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 869–874.
- [136] Navedo, M.; Nieves, M.; Rojas, L.; Lasalde-Dominicci, J. A.; *Biochemistry* **2004**, *43* (1), 78–84.
- [137] Musilek, K.; Roder, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (1), 150–154.
- [138] Timperley, C. M.; Bird, M.; Heard, S. C.; Notman, S.; Read, R. W.; Tattersall, J. E. H.; Turner, S. R. *J. Fluor. Chem.* **2005**, *126* (8), 1160–1165.
- [139] Dickschat, J. S.; Citron, C. A.; Brock, N. L.; Riclea, R.; Kuhz, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3339–3346.
- [140] Cocker, W.; Geraghty, N. W. A.; McMurry, T. B. H.; Shannon, P. V. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, (10), 2245–2254.
- [141] Menard, D.; St-Jacques, M. *Can. J. Chem.* **1981**, *59* (7), 1160–1168.
- [142] Ogasawara, M.; Takizawa, K.-I.; Hayashi, T. *Organometallics* **2002**, *21* (22), 4853–4861.
- [143] Corr, M. J.; Gibson, K. F.; Kennedy, A. R.; Murphy, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (26), 9174–9175.
- [144] Wallace, D. J.; Gibb, A. D.; Cottrell, I. F.; Kennedy, D. J.; Brands, K. M. J.; Dolling, U. H. *Synthesis* **2001**, *12*, 1784–1789.
- [145] Shiao, M. J.; Chia, W. L.; Peng, C. J.; Shen, C. C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (11), 3162–3164.
- [146] Doherty, E. M.; Fotsch, C.; Bo, Y.; Chakrabarti, P.; Chen, N.; Gavva, N.; Han, N.; Kelly, M. G.; Kincaid, J.; Klionsky, L.; Liu, Q.; Ognyanov, V. I.; Tamir, R.; Wang, X.; Zhu, J.; Norman, M. H.; Treanor, J. J. *S. J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 71–90.
- [147] Hopkins, B. T.; Ma, B.; Chan, T. R.; Kumaravel, G.; Miao, H.; Bertolotti-Ciarlet, A.; Otipoby, K. PCT Int. Appl WO 2015/089327, **2015**.
- [148] Eatherthon, A. J.; Giblin, G. M. P.; Jandu, K. S.; Mitchell, W. L.; Naylor, A.; Palombi, G.; Rawlings, D. A.; Slingsby, B. P.; Whittington, A. R. PCT Int. Appl WO 2004/029026, **2004**.

- [149] Bierer, D.; McClure, A.; Fu, W.; Achebe, F.; Ladouceur, G. H.; Burke, M. J.; Bi, C.; Hart, B.; Dumas, J.; Sibley, R.; Scott, W. J.; Johnson, J.; Asgari, D. *PCT Int. Appl WO 03/027085*, **2003**.
- [150] Doebelin, C.; Wagner, P.; Bertin, I.; Simonin, F.; Schmitt, M.; Bihel, F.; Bourguignon, J.-J. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 10296–10300.
- [151] Dias Pires, M. J.; Poeira, D. L.; Marques, M. B. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7197–7234.
- [152] Tamao, K.; Komada, S.; Nakajima, I.; Kumada, M. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347–3354.
- [153] Hintermann, L.; Xiao, L.; Labonne, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8246–8250.
- [154] Piller, F. M.; Appukkuttan, P.; Gavryushin, A.; Helm, M.; Knochel, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6802–6806.
- [155] Chen, X.; Goodhue, C. E.; Yu, J.-Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12634–12635.
- [156] Bull, J. A.; Mousseau, J. J.; Pelletier, G.; Charette, A. B. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2642–2713.
- [157] Comins, D. L.; Abdullah, A. H. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (22), 4315–4319.
- [158] Pabel, J.; Höfner G.; Wanner, K. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (12), 1377–1380.
- [159] Akiba, K.; Iseki, Y.; Wada, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57* (7), 1994–1999.
- [160] Pabel, J.; Hoesl, C. E.; Maurus, M.; Ege, M.; Wanner, K. T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (26), 9272–9275.
- [161] Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533–3539.
- [162] Piers, E.; Soucy, M. *Can. J. Chem.* **1974**, *52* (20), 3563–3564.
- [163] Wang, X.; Kauppi, A. M.; Olsson, R.; Almqvist, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, (23), 4586–4592.
- [164] Comins, D. L.; O'Connor, S. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (17), 1843–1846.
- [165] Yamaguchi, R.; Nakazono, Y.; Kawanisi, M. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (17), 1801–1804.
- [166] Comins, D. L.; King, L. S.; Smith, E. D.; Février, F. C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5059–5062.
- [167] Knochel, P.; Singer, R. D. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2117–2188.
- [168] Lipshutz, B. H.; Wilhelm, R. S.; Kozłowski, J. A. *Tetrahedron* **1984**, *40* (24), 5005–5038.
- [169] Henze, W.; Vyater, A.; Krause, N.; Gschwind, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17335–17342.
- [170] Nakamura, E.; Yamanaka, M.; Yoshikai, N.; Mori, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (10), 1935–1938.
- [171] Jansen, A.; Krause, N. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1761–1766.
- [172] Ibuka, T.; Yoshizawa, H.; Habashita, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (26), 3783–3786.
- [173] Knochel, P.; Yeh, M. C. P.; Berk, S. C.; Talbert, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2390–2392.

- [174] Bagley, M. C.; Lubinu, M. C. *Synthesis* **2006**, (8), 1283–1288.
- [175] Halfpaap, G. *Chem. Ber.* **1903**, 36, 1672–1682.
- [176] Kröhnke, F. *Chem. Ber.* **1938**, 71B, 2583–2593.
- [177] Rohmann, C.; Zietan, K. *Chem. Ber.* **1938**, 296–302.
- [178] Lindner, E.; von Au, G.; Eberle, H. J. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 810–813.
- [179] Armarego, W. L. F.; Chai, C. *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier: Oxford, 2009.
- [180] Hünig, S.; Kreitmeier, P.; Märkl, G.; Sauer, J. *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*, Lehmanns: Berlin, 2006.
- [181] Cushman, M.; Georg, G. I.; Holzgrabe, U.; Wang, S. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 9219.
- [182] Pauli, G. F.; Chen, S.-N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 9220–9231.
- [183] Wakefield, B. J. *Organomagnesium Methods in Organic Synthesis*, Academic: New York, 1995.
- [184] Yong, K. H.; Taylor, N. J.; Chong, J. M. *Org. Lett.* **2002**, 4 (21), 3553–3556.
- [185] Ioachim, E.; Medlycott, E. A.; Hanan, G. S. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, 359 (9), 2599–2607.
- [186] Sichler, S.; Höfner, G.; Rappenglück, S.; Wein, T.; Niessen, K. V.; Seeger, T.; Worek, F.; Thiermann, H.; Paintner, F. F.; Wanner, K. T. *Toxicol. Lett.* **2018**, 293, 172–183.
- [187] Bell, T. W.; Hu, L. Y.; Patel, S. V. *J. Org. Chem.* **1987**, 52 (17), 3847–3850.
- [188] Epszajn, J.; Bieniek, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, (2), 213–219.
- [189] Brown, H. C.; Murphey, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3308–3312.
- [190] Sperger, C. A.; Wanner, K. T. *Tetrahedron* **2009**, 65, 5824–5833.
- [191] Bräckow, J.; Wanner, K. T. *Tetrahedron* **2006**, 62 (10), 2395–2404.
- [192] Niessen, K. V.; Seeger, T.; Rappenglück, S.; Wein, T.; Höfner, G.; Wanner, K. T.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicol. Lett.* **2018**, 293, 190–197.