

**Synthese und Evaluierung  
RNA-spaltender Guanidinanaloga  
und ihrer PNA-Konjugate**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

von  
Friederike Danneberg  
aus Köln

Frankfurt am Main  
2015

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Engels

Datum der Disputation: 08.07.2015

Meiner Familie

*„Patience is hard to practise; you are eager to see immediate results; but I think patience can be acquired if you look forward to the ulterior aim and realize how necessary must be the intermediate steps.“*

Robert Baden-Powell

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2010 bis Dezember 2014 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Michael W. Göbel möchte ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die sehr interessante Themenstellung, die ausgezeichneten experimentellen Bedingungen sowie für die hervorragende Betreuung und die zahlreichen Anregungen danken. Zudem bin ich dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte, an den Netzwerktreffen des EU-Netzwerkes "PhosChemRec" teilzunehmen und die Ergebnisse dieser Arbeit dort einzubringen.

Madeleine Anzmann und Frank Wurster sowie Stefan Bernhardt möchte ich für die Aufreinigungen und analytischen Messungen mittels HPLC danken. Plamena Dogandzhiyski danke ich für die Unterstützung bei der HPLC-Aufreinigung von PNA-Konjugaten und Daniela Wirth-Hamdoune für die kompetente Hilfe bei Fragestellungen rund um die HPLC.

Der NMR-Abteilung danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur zum Messen von NMR-Spektren, den Mitarbeitern der Chemikalienausgabe für die Beschaffung von Chemikalien und dem Werkstattteam für die Wartung von Laborgeräten. Ich danke Elisabeth Kalden, Madeleine Anzmann und Marianne Christof für das Anfertigen von Elementaranalysen sowie Ilona Prieß, Dr. Uwe Hener, Hannelore Brill, Simon Zenglein und Andreas Münch für die Messung von Massen-Spektren.

Für die Festphasensynthese von PNA-15meren danke ich Alice Ghidini aus der Arbeitsgruppe von Roger Strömberg (Karolinska-Institut, Stockholm) sowie Plamena Dogandzhiyski. Elisabeth Kalden gebührt mein Dank für die Unterstützung bei den FCS-Messungen sowie insbesondere für die Durchführungen eines Großteils der in diese Arbeit eingeflossenen Spaltexperimente. Ebenfalls eine große Hilfe bei diesen Experimenten war Dr. Ute Scheffer, der ich zudem für die anregenden Diskussionen danke.

Dr. Cristiano Pinto Gomes, Dr. Gerhard Danneberg und Kristina Danneberg danke ich für ihr kritisches Lesen der vorliegenden Arbeit und ihre hilfreichen Anmerkungen.

Für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die den Arbeitsalltag bereichernden Gespräche über chemische und nicht-chemische Themen danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises, nämlich Bettina Ackermann, Abdullah Akpinar, Madeleine Anzmann, Mathias Bolz, Silke Brüß, Plamena Dogandzhiyski, Manuel Fischer, Verena Friehmelt, Mariano Goldberg, Frauke Jacob, Elisabeth Kalden, Margitta Knöß, Thomas Meyer, Dr. Masaki Nakajima, Turgay Parlar, Dr. Cristiano Pinto Gomes, Theodora Ruppenthal, Denis Sartakov, Dr. Ute Scheffer, Michael Sheremet, Arezoo Shoja Bazargani, Ibrahim Seven, Dr. Tina Stark, Timo Weinrich, Daniela Wirth-Hamdoune, Frank Wurster und Mirco Zeiger sowie aus den Nachbar-Arbeitskreisen Angelika Schneider, Tamara Beisel, Nai-Wei Liu und Manuela Fichte.

Plamena Dogandzhiyski möchte ich für die intensive Zusammenarbeit auf dem Gebiet der RNA-Spaltung, anregende Diskussionen und ihre große Hilfsbereitschaft danken. Silke Brüß, Bettina Ackermann sowie allen kurzzeitigen "Mitbewohnern" danke ich für das gute Miteinander in Labor 401.

Ein Dank für ihre praktische Hilfe bei der Synthese verschiedenster Verbindungen gebührt meinen ehemaligen Forschungspraktikanten Katharina Sophie Dähne, Claudius Klose, Frauke Jacob, Andrej Shemet, Alexandra Gresika, Isam Elamri, Jan-Erik Hornung, Simon Berghofer, Diana Müller, Mirko Joppe und Tobias Santowski.

Claudia Ament, Britta Kämpken, Nadine Rademacher und Hannah Sophie Steinert danke ich für die gute Gemeinschaft über das Studium hinaus und für die den Laboralltag bereichernden montäglichen Mensa-Mittagessen.

Ebenfalls nicht fehlen darf an dieser Stelle ein Dank an meine Freunde – insbesondere an meinen Hauskreis – und an meine Eltern und Geschwister für ihre Unterstützung, ihre ermutigenden Worte und für ihr offenes Ohr.

## Kurzfassung

Künstliche Ribonucleasen, die sequenzspezifisch und effizient die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen katalysieren, könnten potenziell nicht nur als biochemische Werkzeuge dienen, sondern auch als Wirkstoffe gegen eine Vielzahl von Erkrankungen, bei denen mRNA oder miRNA involviert sind, eine wichtige Rolle spielen. Obwohl in den letzten beiden Jahrzehnten zahlreiche sequenzspezifische RNA-Spalter entwickelt wurden, bleibt die Spaltaktivität dieser Verbindungen nach wie vor deutlich hinter der ihrer natürlichen Äquivalente zurück. Die Optimierung künstlicher Ribonucleasen und grundlegend dafür die Erforschung der Faktoren, die die Spaltaktivität einer Verbindung beeinflussen, sind daher weiterhin von großem Interesse. Zwar enthalten die meisten künstlichen Ribonucleasen Metallionen, doch sind auch metallfreie RNA-Spalter, zum Beispiel auf der Basis heterocyclischer Guanidine, bekannt.

Prinzipiell kann die Hydrolyse des RNA-Rückgrates durch Deprotonierung der nucleophil am Phosphoratom angreifenden 2'-OH-Gruppe, durch Protonierung der als Abgangsgruppe fungierenden 5'-OH-Gruppe sowie durch Stabilisierung des bei der Spaltung durchlaufenen dianionischen Phosphorans katalysiert werden. Daher sollten potenzielle RNA-Spalter in der Lage sein, sowohl als Base als auch als Säure wirken zu können, was bei einem  $pK_a$ -Wert im Bereich von 7 am besten gegeben ist. Fungiert ein und dasselbe Molekül als Protonenakzeptor und -donor, so kommt es im Fall von Guanidinanaloga zu einer Tautomerisierung vom Amino- zum Iminoisomer. Eine möglichst kleine Energiedifferenz zwischen beiden Formen sollte sich daher positiv auf die Spaltaktivität auswirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe heterocyclischer Guanidine synthetisiert, deren  $pK_a$ -Werte bestimmt und die jeweiligen Energiedifferenzen zwischen Amino- und Iminotautomer grob mittels AM1-Rechnungen abgeschätzt. In Spaltexperimenten wurden Cy5-markierte RNA-Substrate mit den verschiedenen Verbindungen inkubiert (Spalter-Konzentration: 2 bzw. 10 mM). Die Analyse und Quantifizierung der Spaltprodukte erfolgten anschließend mithilfe eines DNA-Sequenziergerätes.

Alle untersuchten und ausreichend löslichen Substanzen, die sowohl einen geeigneten  $pK_a$ -Wert (6 – 8) als auch eine niedrige Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer ( $\leq 5$  kcal/mol) aufwiesen bzw. bei denen nur der  $pK_a$ -Wert oder nur die Energiedifferenz in geringem Maße vom Idealwert abwich, spalteten RNA, wenn auch teilweise nur mit einer

geringen Aktivität. In den Spaltexperimenten erwiesen sich Guanidinanaloga mit einem großen aromatischen System als besonders aktiv, allen voran 2-Aminoperimidin und seine Derivate, die auch bei Konzentrationen unter 50  $\mu\text{M}$  Spaltaktivität zeigten. Gleichzeitig offenbarten diese Verbindungen in Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Experimenten eine große Tendenz zur Aggregation mit RNA, so dass die Spaltung in diesen Fällen möglicherweise nicht durch Einzelmoleküle, sondern durch Aggregate erfolgte.

Um RNA-Substrate auch sequenzspezifisch spalten zu können, wurden PNA-Konjugate des bereits bekannten RNA-Spalter Tris(2-aminobenzimidazol) hergestellt, wobei der Spalter über eine neue, quecksilberfreie Route synthetisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese PNA-Konjugate RNA sequenzspezifisch mit einer Halbwertszeit von etwa 11 h spalten, was im Rahmen der Halbwertszeit vergleichbarer DNA-Konjugate liegt. Um zu untersuchen, ob 2-Aminoperimidine auch als Einzelverbindungen aktiv sind, wurden zwei PNA-Konjugate von am Naphthylring substituierten 2-Aminoperimidin-Derivaten synthetisiert. Beide Konjugate zeigten keinerlei Spaltaktivität, was darauf hindeuten könnte, dass die Hydrolyse des RNA-Rückgrates nur durch mehrere Spalter-Einheiten – kovalent verknüpft oder in Form von Aggregaten – effizient katalysiert werden kann.



## Abstract

Artificial ribonucleases that catalyze the cleavage of the RNA backbone site-specifically and efficiently could be used not only as biochemical tools but also as drugs against various diseases involving mRNA or miRNA. Although many sequence-specific RNA cleavers have been developed in the last two decades, the cleavage activity of their natural equivalents still remains much higher. Therefore, the optimization of artificial ribonucleases and the research on factors that affect the capability to cleave RNA are still highly relevant. Though most artificial ribonucleases contain metal ions, metal-free RNA cleavers have been described as well, for example based on heterocyclic guanidines.

In principle, the hydrolysis of the RNA backbone can be catalyzed in three different ways: By deprotonation of the 2'-OH-group attacking the phosphorus atom as a nucleophile, by protonation of the 5'-OH-group acting as a leaving group or by stabilization of the transitionally formed dianionic phosphorane. Thus, potential RNA cleavers should be able to serve as both acid and base catalyst. This is possible if the  $pK_a$  value is in the range of 7. If one molecule acts as a base and as an acid simultaneously, it will – in the case of guanidine analogues – tautomerize from the amino into the imino isomer. Hence, an energy difference as low as possible should promote the cleavage activity.

In this work, several heterocyclic guanidines were synthesized, their  $pK_a$  values determined and the energy differences between amino and imino tautomer calculated roughly by AM1 method. To evaluate the degree of cleavage, Cy5-labeled RNA substrates were incubated with different compounds (cleaver concentrations: 2 or 10 mM). Analysis and quantification of cleavage products were achieved using a DNA sequencer.

All sufficiently soluble compounds exhibiting both an appropriate  $pK_a$  value (6 – 8) and a low energy difference ( $\leq 5$  kcal/mol), as well as substances for which only the  $pK_a$  value or the energy difference is varying slightly from the ideal, were able to cleave RNA. However, some of them cleaved only a low percentage. Cleavage experiments showed that compounds with an expanded aromatic system are particularly active, especially 2-aminoperimidine and its derivatives, for which cleavage activity could be demonstrated even at concentrations below 50  $\mu$ M. At the same time, these compounds exhibited a high tendency towards aggregation detected in fluorescence correlation spectroscopy experiments. Therefore, in these cases

the hydrolysis of the RNA backbone might have been catalyzed by aggregates instead of individual molecules.

In order to cleave RNA substrates in a site-specific way, the known metal-free RNA cleaver tris(2-aminobenzimidazole) was conjugated to PNA oligomers. For the synthesis of the cleaver, a new and mercury-free route was established. It was shown that the PNA conjugates cleave RNA sequence-specific with a half-life of about 11 h. This is in the range of the half-life of similar DNA conjugates. To investigate whether 2-aminoperimidines are active as single molecules as well, two PNA conjugates of 2-aminoperimidine derivatives substituted at the naphthyl ring were synthesized. Both conjugates showed no cleavage activity at all, which might indicate that for an efficient hydrolysis of the RNA backbone, more than one cleaver unit is needed – either covalently bound or in a loose aggregate.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Spaltung von RNA durch natürliche und künstliche Ribonucleasen .....	3
2.1	Mechanismus der Hydrolyse der RNA-Phosphodiesterbindung .....	3
2.2	Katalyse der Spaltung von RNA-Phosphodiesterbindungen .....	5
2.3	Künstliche Ribonucleasen.....	8
2.3.1	Assays zur Messung der Spaltaktivität künstlicher Ribonucleasen .....	9
2.3.2	Metallhaltige künstliche Ribonucleasen.....	11
2.3.3	Metallfreie künstliche Ribonucleasen .....	22
3	Eigene synthetische Arbeiten .....	29
3.1	Quecksilberfreie Synthese von 2-Aminobenzimidazolderivaten .....	29
3.1.1	Synthese von konjugierbarem 2-Aminobenzimidazol.....	30
3.1.2	Synthese von konjugierbarem Tris(2-aminobenzimidazol).....	31
3.2	Synthese verschiedener 2-Aminoperimidin-Derivate .....	33
3.2.1	Modifikation der 2-Aminogruppe .....	33
3.2.2	Modifikation des Naphthylrings .....	34
3.2.3	Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten.....	39
3.3	Synthese von 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol und seine Derivatisierung .....	43
3.3.1	Synthese von 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol 56.....	43
3.3.2	Versuch der Synthese eines konjugierbaren 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol-Derivats.....	44
3.4	Synthese von 5 <i>H</i> -Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol-Verbindungen .....	46
3.4.1	Synthese von 5 <i>H</i> -Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol 115 .....	46
3.4.2	Synthese von konjugierbarem 5 <i>H</i> -Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol 116 .....	48
3.5	Synthese weiterer cyclischer Guanidine .....	49
3.5.1	Synthese von 9 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol 132 .....	49
3.5.2	Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol-2-on 134 .....	50
3.5.3	Synthese von 3,4,6,7,8,9-Hexahydro-2 <i>H</i> -pyrimido[1,2- <i>a</i> ]pyrimidin-2,8-dion 135 .....	50
3.5.4	Synthese von 2,6,8-Triaminopurin 139 .....	51
4	Konjugation der RNA-Spalter .....	52
4.1	Konjugation an DNA .....	52
4.2	Konjugation an PNA.....	54
4.2.1	Konjugation von Tris- und Mono(2-aminobenzimidazol) an PNA.....	56
4.2.2	Konjugation von 2-Aminoperimidin-Derivaten an PNA .....	58
5	Unspezifische RNA-Spaltung durch Guanidinanaloga .....	61

5.1	Eigenschaften verschiedener Guanidinaloga .....	61
5.1.1	pK <sub>a</sub> -Werte der untersuchten Guanidinaloga.....	62
5.1.2	Energiebarrieren zwischen Amino- und Imino-Tautomer.....	65
5.1.3	Aggregationsverhalten der untersuchten Verbindungen .....	69
5.1.4	Stabilität der Guanidinaloga .....	74
5.2	Spaltexperimente mit Guanidinaloga.....	76
5.2.1	Durchführung der Spaltexperimente .....	76
5.2.2	Mögliche Fehler und deren Vermeidung .....	79
5.2.3	Ergebnisse der Spaltexperimente mit symmetrischen Guanidinaloga .....	81
5.2.4	Ergebnisse der Spaltexperimente mit weiteren Guanidinaloga.....	84
5.2.5	Ergebnisse der Spaltexperimente mit 2-Aminoperimidin und seinen Derivaten .....	87
6	Spaltexperimente mit PNA-Konjugaten .....	95
6.1	RNA-Spaltung mit Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugaten .....	96
6.1.1	Einfluss von Linker und PNA-Länge auf die RNA-Spaltung.....	97
6.1.2	Spaltung unterschiedlicher RNA-Substrate und Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung.....	99
6.1.3	Untersuchung des Aggregationsverhaltens von PNA-Konjugaten und Nucleinsäuren mittels FCS .....	101
6.1.4	Substratspezifität der PNA-Spalter-Konjugate .....	104
6.1.5	Kinetik der RNA-Spaltung durch Konjugat K4.....	105
6.1.6	Spaltexperimente mit höheren RNA-Konzentrationen.....	106
6.2	Spaltexperimente mit Mono-2-aminobenzimidazol- und Mono-2-aminoperimidin-PNA-Konjugaten .....	108
7	Zusammenfassung und Ausblick .....	112
7.1	Zusammenfassung.....	112
7.2	Ausblick.....	117
8	Experimenteller Teil .....	120
8.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen .....	120
8.2	Synthese von 2-Aminobenzimidazolderivaten.....	124
8.2.1	6-Aminohexansäuremethylester-Hydrochlorid 61 <sup>[88]</sup> .....	124
8.2.2	6-[3-(2-Aminophenyl)thioureido]hexansäuremethylester 62.....	124
8.2.3	6-(1 <i>H</i> -Benzimidazol-2-ylamino)hexansäuremethylester-Hydroiodid 63 .....	125
8.2.4	6-(1 <i>H</i> -Benzimidazol-2-ylamino)hexansäure-Hydrochlorid 59.....	126
8.2.5	3,4-Diaminobenzoessäuremethylester 66 <sup>[7]</sup> .....	127
8.2.6	Bis[2-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin 64 <sup>[7]</sup> .....	128
8.2.7	4-Amino(3-{2-[bis-(2-{ <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl}amino)ethyl]-thioureido}benzoessäuremethylester 67 <sup>[7]</sup> .....	129

8.2.8 2-[2-[Bis-(2{ <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl)amino]ethylamino]-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 68 .....	130
8.2.9 2-[2-(Bis-[2-[3-(2-nitrophenyl)thioureido]ethyl)amino]ethylamino]-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 69 <sup>[7]</sup> .....	131
8.2.10 2-[2-(Bis-[2-[3-(2-aminophenyl)thioureido]ethyl)amino]ethylamino]-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 70 <sup>[7]</sup> .....	132
8.2.11 2-(2-{Bis-[2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 57 .....	133
8.2.12 2-(2-{Bis-[2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäure 144 <sup>[7]</sup> .....	134
8.3 Synthese von 2-Aminoperimidinderivaten.....	134
8.3.1 1 <i>H</i> -Perimidin-2(3 <i>H</i> )-on 73 <sup>[90]</sup> .....	134
8.3.2 2-Chlorperimidin 71 <sup>[91]</sup> .....	135
8.3.3 6-(2-Aminoperimidin)hexansäuremethylester 75.....	136
8.3.4 6-(2-Aminoperimidin)hexansäure-Hydrochlorid 76.....	137
8.3.5 2-Amino-6-bromperimidin 77 <sup>[92]</sup> .....	138
8.3.6 2-( <i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)-6-bromperimidin 78.....	139
8.3.7 1-Naphthoesäuremethylester 83a <sup>[98,99]</sup> .....	139
8.3.8 4,5-Diamino-1-naphthoesäuremethylester 87a <sup>[102]</sup> .....	140
8.3.9 2-Amino-6-carbonsäuremethylesterperimidin-Hydrobromid 88a.....	141
8.3.10 1-Naphthylessigsäuremethylester 83b <sup>[100]</sup> .....	142
8.3.11 2-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)essigsäuremethylester 86b.....	143
8.3.12 2-(4,5-Diaminonaphth-1-yl)essigsäuremethylester 87b .....	144
8.3.13 2-Amino-6-(essigsäuremethylester)perimidin-Hydrobromid 88b .....	145
8.3.14 2-[[9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxy]carbonyl]amino}-6-(essigsäuremethylester)-perimidin .....	146
8.3.15 3-(1-Naphthyl)acrylsäuremethylester 85 .....	146
8.3.16 3-(1-Naphthyl)propionsäuremethylester 83c .....	147
8.3.17 3-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)propionsäuremethylester 86c .....	148
8.3.18 3-(4,5-Diaminonaphth-1-yl)propionsäuremethylester 87c.....	149
8.3.19 2-Amino-6-(propionsäuremethylester)perimidin-Hydrobromid 88c.....	150
8.3.20 2-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)essigsäure 90 .....	151
8.3.21 1-Methyl-4,5-dinitronaphthalin 91 .....	151
8.3.22 4,5-Diamino-1-methylnaphthalin 92 .....	152
8.3.23 2-Amino-6-methylperimidin-Hydrobromid 89.....	153
8.3.24 Tris-[2-(perimidin-2-ylamino)ethyl]amine-Hydrochlorid 93 .....	154

8.3.25 2-(2-{Bis-[2-(perimidin-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester-Hydrochlorid 94 .....	155
8.3.26 3-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)propionsäure 96 .....	156
8.3.27 3-(4,5-Dinitro-1-naphthyl)-1-{2-[3-(4,5-dinitro-1-naphthyl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon 97 .....	156
8.3.28 3-(4,5-Diamino-1-naphthyl)-1-{2-[3-(4,5-diamino-1-naphthyl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon 98.....	157
8.3.29 3-(2-Amino-1 <i>H</i> -perimidin-6-yl)-1-{2-[3-(2-amino-1 <i>H</i> -perimidin-6-yl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon 99 .....	158
8.3.30 2-(2-{Bis-[2-(3-{4,5-Dinitro-1-naphthyl}-1-propanamid)ethyl]amino}ethylamino)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 100 .....	159
8.4 Synthese von 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol-Derivaten.....	160
8.4.1 2-Aminoimidazol-Hemisulfat 103 <sup>[108]</sup> .....	160
8.4.2 1-(2,2-Diethoxyethyl)-2-aminoimidazol 107 .....	161
8.4.3 1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol 56 <sup>[8]</sup> .....	161
8.4.4 7-Brom-6-oxoheptansäuremethylester 110 .....	162
8.4.5 7-(2-Amino-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-6-oxoheptansäuremethylester 112 .....	163
8.4.6 5-(1 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]imidazol-6-yl)-pentansäuremethylester 113 .....	164
8.5 Synthese von 5 <i>H</i> -Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol-Verbindungen .....	165
8.5.1 Bis-(2-nitrophenyl)amin 123 <sup>[120]</sup> .....	165
8.5.2 Bis-(2-aminophenyl)amin 125 <sup>[120]</sup> .....	166
8.5.3 1-(2-Aminophenyl)-2-mercaptobenzimidazol 126 .....	166
8.5.4 5 <i>H</i> -Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol 115.....	167
8.5.5 4-Chlor-3-nitrobenzoesäuremethylester 128 <sup>[122]</sup> .....	168
8.5.6 4-(2-Nitrophenylamino)-3-nitrobenzoesäuremethylester 129 .....	169
8.5.7 4-(2-Aminophenylamino)-3-aminobenzoesäuremethylester 130 .....	170
8.5.8 Mischung aus 3-Amino-4-(1,2-dihydro-2-thioxobenzo[ <i>d</i> ]imidazol-3-yl)benzoesäuremethylester und 1-(2-Aminophenyl)-2,3-dihydro-2-thioxo-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol-5-carboxymethylester 131a und 131b .....	171
8.5.9 Benzimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol-3-carbonsäuremethylester 116 .....	171
8.6 Synthese weiterer cyclischer Guanidine .....	172
8.6.1 2-Amino-1-(2,2-diethoxyethyl)benzimidazol 133 <sup>[110]</sup> .....	172
8.6.2 9 <i>H</i> -Imidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol 132 <sup>[110]</sup> .....	173
8.6.3 Imidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol Hydrochlorid 132b <sup>[110]</sup> .....	174
8.6.4 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazol-2-on 134 <sup>[124]</sup> .....	175
8.6.5 3-Amino-3-(3-propionsäureguanidin)-6-oxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin 138 <sup>[126]</sup> .....	176
8.6.6 3,4,6,7,8,9-Hexahydro-2 <i>H</i> -pyrimido[1,2- <i>a</i> ]pyrimidin-2,8-dion Hydrochlorid 135 <sup>[126]</sup> .....	177

8.6.7 2,6,8-Triaminopurin 139 <sup>[128,129]</sup> .....	177
8.7 Sonstige Synthesen.....	179
8.7.1 4-Pentensäuremethylester 81 <sup>[155]</sup> .....	179
8.7.2 6-[[ <i>9H</i> -Fluoren-9-ylmethoxy]carbonyl]amino}hexansäure 145 .....	179
8.8 Synthese der PNA-Konjugate .....	181
8.8.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von PNA-10meren an Festphase.....	181
8.8.2 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von PNA-15meren an Festphase.....	181
8.8.3 Synthese des PNA-Konjugats K1.....	182
8.8.4 Synthese der PNA-Konjugate K2 – K6.....	183
8.8.5 Synthese des PNA-Konjugats K7.....	185
8.8.6 Synthese des PNA-Konjugats K8.....	186
8.8.7 Synthese des PNA-Konjugats K9.....	187
8.9 Experimentelle Bedingungen für Spaltexperimente und Aggregationsstudien.....	189
9 Anhang.....	192
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	192
9.2 Zusätzliche Kreuz-Spaltexperimente .....	195
9.3 Literaturverzeichnis .....	196
9.4 Lebenslauf .....	204
9.5 Publikationsliste .....	206
9.6 Wissenschaftliche Vorträge.....	206
9.7 Posterbeiträge .....	206
9.8 Eidesstattliche Erklärung .....	207

## 1 Einleitung

RNA spielt in zahlreichen zellulären Prozessen eine Schlüsselrolle. Als mRNA ist sie Übermittlerin genetischer Information und dient als Informationsvorlage für die Proteinbiosynthese; in der Form von rRNA und snRNA ist sie katalytisch aktiv und vermittelt die Translation und das Spleißen von mRNA; als tRNA erfüllt sie eine wichtige Hilfsfunktion bei der Synthese von Proteinen. Darüber hinaus existieren mit miRNA und siRNA kurze Ribonucleinsäuren, die für die Regulation der Genexpression von großer Bedeutung sind.<sup>[1]</sup> Entsprechend stark ist das Interesse an RNA als Target-Molekül bei der Entwicklung von Wirkstoffen gegen verschiedenste Erkrankungen.<sup>[2,3]</sup> So sind miRNAs und andere nicht-codierende RNAs (ncRNA) zunehmend in den Fokus der Krebsforschung gerückt, spielen sie doch bei der Tumorentstehung häufig eine wichtige Rolle und sind daher ein geeignetes Target für Chemotherapeutika. Die Forschung konzentriert sich dabei bisher vor allem auf Oligonucleotid-basierte Wirkstoffe, die durch Wechselwirkung mit der Target-ncRNA direkt deren Funktion blockieren oder aber zelleigene Nucleasen zum Abbau der ncRNA rekrutieren, was häufig auch zu einem Abbau des Wirkstoffs selbst führt.<sup>[3]</sup>

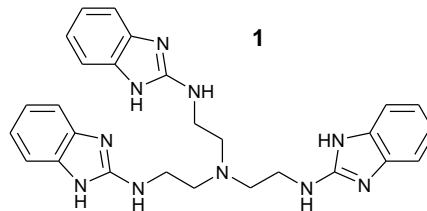
Einen anderen möglichen und zumindest in der Theorie weitaus eleganteren und effizienteren Weg stellt die Verwendung künstlicher Ribonucleasen dar, die spezifisch die Hydrolyse des jeweiligen ncRNA-Targets katalysieren könnten und somit nicht in stöchiometrischen, sondern nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden müssten. Für eine tatsächliche Anwendbarkeit dieses Konzeptes ist neben einer ausreichenden Spezifität für die Ziel-RNA allerdings auch eine hohe katalytische Effizienz des RNA-Spalters nötig. Auch wenn in den letzten Jahren wichtige Schritte in diese Richtung gemacht wurden,<sup>[4]</sup> bleibt doch die Effizienz der künstlichen Ribonucleasen weit hinter denen von Enzymen oder Ribozymen zurück,<sup>[5,6]</sup> so dass nach wie vor ein großer Optimierungsbedarf besteht.

Bei den meisten RNA-Spaltern handelt es sich um Metallkomplexe auf der Basis von Lanthanoid-, Kupfer- oder Zinkionen. Auch kleine organische Moleküle können die Hydrolyse von RNA katalysieren und haben gerade in Hinblick auf ihre mögliche Anwendbarkeit *in vivo* gegenüber den metallhaltigen Spaltern den Vorteil, dass ihre Aktivität nicht von der Stabilität des Metallkomplexes abhängt, die in biologischen Systemen möglicherweise reduziert ist. Die Spezifität einer künstlichen Ribonuclease wird in beiden Fällen durch die Verknüpfung



des RNA-Splatters mit einer Sequenz-erkennenden Einheit, in der Regel einem kurzen Desoxynucleotid oder Nucleinsäureanalogon, erreicht.

Die Arbeitsgruppe Göbel befasst sich schon seit vielen Jahren mit der Erforschung neuer, guanidinbasierter RNA-Splatter und konnte mit dem Tris(2-aminobenzimidazol) **1** einen der effizientesten metallfreien RNA-Splatter überhaupt entwickeln.<sup>[7][6]</sup> Im Zentrum der neueren Forschung steht die Frage, welche Eigenschaften Guanidinanaloga besitzen sollten, um effizient RNA spalten zu können.<sup>[8]</sup> Ziel der dazu durchgeführten Untersuchungen ist es, die Spaltaktivität neuer Verbindungen vorhersagen und so gezielter wirksame künstliche Ribonucleasen entwickeln zu können. Dieses Ziel wurde auch in der vorliegenden Arbeit weiterverfolgt. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Synthese biologisch stabiler künstlicher Ribonucleasen durch Konjugation bereits bekannter RNA-Splatter an PNA.



**Abbildung 1:** Struktur des in der Arbeitsgruppe Göbel entwickelten RNA-Splatters Tris(2-aminobenzimidazol) **1**.

## 2 Spaltung von RNA durch natürliche und künstliche Ribonucleasen

Betrachtet man die Stabilität einer einzelnen Phosphordiesterbindung der RNA, für die die geschätzte Halbwertszeit der Spaltung durch Umesterung bei pH 7 und einer Temperatur von 37 °C in der Größenordnung von Jahren liegt,<sup>[9]</sup> so wird deutlich, dass eine gezielte Spaltung von RNA in für medizinische Zwecke oder biochemische Anwendungen relevanten Zeiträumen nur durch die Katalyse dieser Reaktion möglich ist. Um zu verstehen, welche Möglichkeiten es für die Katalyse dieser Spaltreaktion gibt, ist ein Blick auf die Struktur des RNA-Rückgrates und den Mechanismus von dessen Hydrolyse nötig.

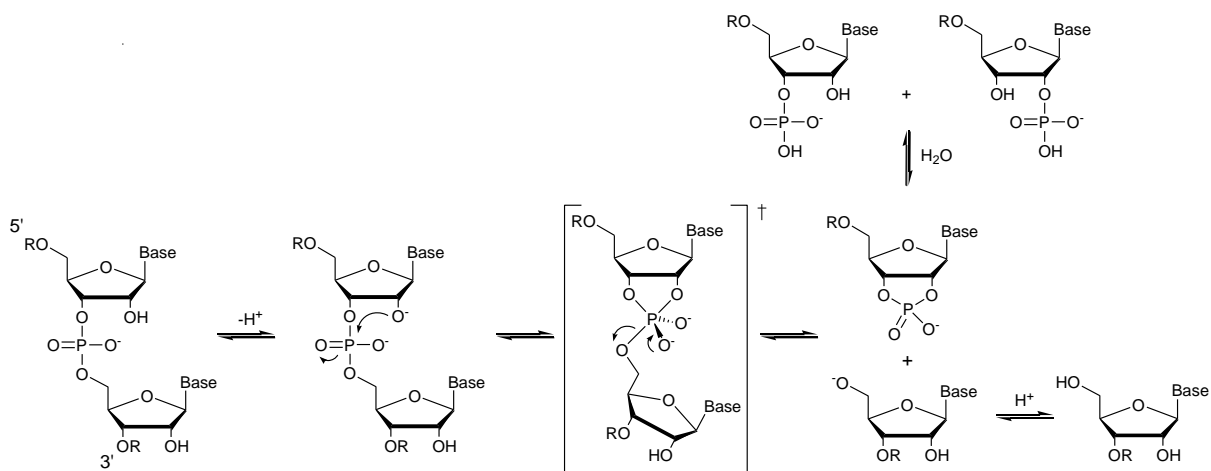
### 2.1 Mechanismus der Hydrolyse der RNA-Phosphordiesterbindung

Genau wie die DNA besteht die RNA aus einzelnen Nucleosiden, die über 3'-5'-Phosphordiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Dennoch ist die Stabilität der Phosphordiesterbindungen der RNA um viele Größenordnungen kleiner als die der DNA-Phosphordiesterbindungen: Die Halbwertszeit der Hydrolyse einer DNA-Phosphordiesterbindung unter physiologischen Bedingungen wird auf 30 Millionen Jahre geschätzt.<sup>[10]</sup> Dieser enorme Unterschied in den Halbwertszeiten ist dadurch bedingt, dass RNA und DNA nicht die gleichen Zuckereinheiten enthalten: Während es sich bei den Zuckerbausteinen der DNA um D-2'-Desoxyribose handelt, enthält die RNA D-Ribose. Die bei den RNA-Zuckern somit zusätzlich vorhandene 2'-OH-Gruppe kann bei der Spaltung der Phosphordiesterbindung als internes Nucleophil wirken, während für die Spaltung des DNA-Rückgrats ein externes Nucleophil benötigt wird.

Der generelle Ablauf der Hydrolyse des RNA-Rückgrates ist schon seit den 50er-Jahren bekannt:<sup>[11]</sup> Die 2'-OH-Gruppe greift nucleophil am Phosphoratom an, woraufhin sich ein trigonal-bipyramidales Phosphoran abhängig vom pH-Wert entweder als Übergangszustand oder als Zwischenstufe bildet. Beim Zerfall dieses Phosphorans entsteht ein 2',3'-Cyclophosphat, das zu einem Gemisch aus 2'- und 3'-Phosphat hydrolysiert wird. Damit das 5'-Sauerstoffatom als Abgangsgruppe fungieren kann, muss es sich in einer apikalen Position befinden (vgl. Abbildung 2).<sup>[12]</sup> Diese colineare Anordnung von 2'- und 5'-Sauerstoffatom ist in doppelsträngiger RNA unmöglich, was erklärt, warum die Spaltung von Phosphordiesterbindungen in RNA-Duplexen extrem verlangsamt ist.<sup>[9]</sup> Auch in einzelsträngiger RNA kann die

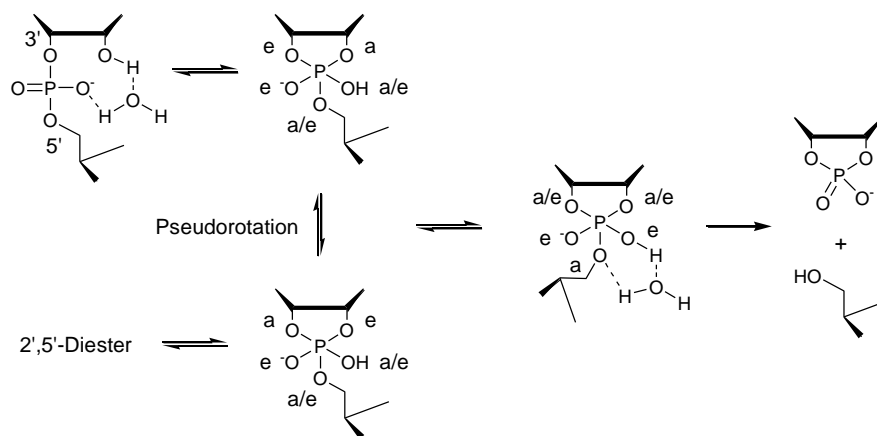
colineare Anordnung durch *stacking*-Wechselwirkungen, z.B. von purinreichen Sequenzen, verhindert und die Geschwindigkeit der RNA-Spaltung damit stark verlangsamt werden.<sup>[13]</sup>

Die genauere Betrachtung der Hydrolyse der RNA-Phosphordiesterbindung in Wasser zeigt, dass hierfür zwei Mechanismen existieren.<sup>[6]</sup> Bei pH-Werten  $> 7$  erfolgt die Spaltung überwiegend durch Hydroxidionen-katalysierte Umesterung (Abbildung 2). Dabei wird zunächst die 2'-OH-Gruppe in einem schnell ablaufenden Schritt deprotoniert und greift dann als Oxyanion mit erhöhter Nucleophilie am Phosphoratom an. Von dem als Übergangszustand durchlaufenen Phosphoran spaltet sich das 5'-verknüpfte Nucleosid als Anion ab, wobei das 2',3'-Cyclophosphat zurückbleibt, das wie bereits beschrieben zu einem Gemisch der beiden Monophosphate hydrolysiert wird. Theoretisch wäre auch eine Spaltung des dianionischen Phosphoranintermediats zum 2',5'-Ester denkbar, die jedoch nicht beobachtet wird. Für diesen Verlauf müsste das 3'-Sauerstoffatom zunächst durch Pseudorotation um das Phosphoratom in eine apikale Position gebracht werden, um als Abgangsgruppe fungieren zu können. Dies scheint jedoch dadurch verhindert zu werden, dass die beiden Oxyanionen als elektronenreiche Substituenten des Phosphors in ihrer äquatorialen Position fixiert sind.<sup>[6]</sup> Zudem ist die Pseudorotation nur bei einer ausreichenden Lebensdauer des Phosphorans möglich, welches bei pH 7 jedoch nur als Übergangszustand durchlaufen wird. In saurem Milieu hingegen erfolgt durch Protonierung eine Stabilisierung des Phosphorans, welches nun als Zwischenstufe vorliegt und Pseudorotation eingehen kann. Experimentell erkennbar ist dies durch das Auftreten einer  $3',5' \leftrightarrow 2',5'$ -Isomerisierung, die bei pH 7 nicht erfolgt.



**Abbildung 2:** Spaltung der RNA-Phosphordiesterbindung durch spezifische Basenkatalyse.

Neben der RNA-Spaltung durch spezifische Basenkatalyse ist auch die spontane, pH-unabhängige Spaltung der Phosphordiesterbindung möglich. Diese läuft langsamer ab als die Isomerisierung von 3',5'- zum 2',5'-Diester und kann nur in einem relativ engen pH-Bereich um pH 5 beobachtet werden.<sup>[14]</sup> Die pH-unabhängige Spaltung läuft wahrscheinlich über einen durch ein Wassermolekül vermittelten Protonentransfer von der 2'-OH-Gruppe auf das Phosphoryloxyanion und den konzertierten Angriff des sich dabei ausbildenden 2'-Oxyanions auf das Phosphoratom ab. Im dabei entstehenden monoanionischen Phosphoranintermediat ist eine Pseudorotation möglich, durch die das 3'-Sauerstoffatom in eine apikale Position gelangen und der Zerfall des Intermediats zum 2',5'-Diester stattfinden kann. Alternativ ist die Ausbildung des 2',3'-Cyclophosphats durch wasservermittelte Protonenübertragung vom Phosphoran-Sauerstoffatom auf das als Abgangsgruppe fungierende 5'-Sauerstoffatom bei gleichzeitiger Spaltung der P-O-Bindung möglich.<sup>[6]</sup>



**Abbildung 3:** pH-unabhängige Spaltung und Isomerisierung der Phosphordiesterbindungen. Äquatoriale Substituenten sind durch „e“, apikale durch „a“ markiert.

Dieser zweite Mechanismus verdeutlicht noch stärker, welche Katalysiermöglichkeiten es für die Spaltung der RNA-Phosphordiesterbindung gibt.

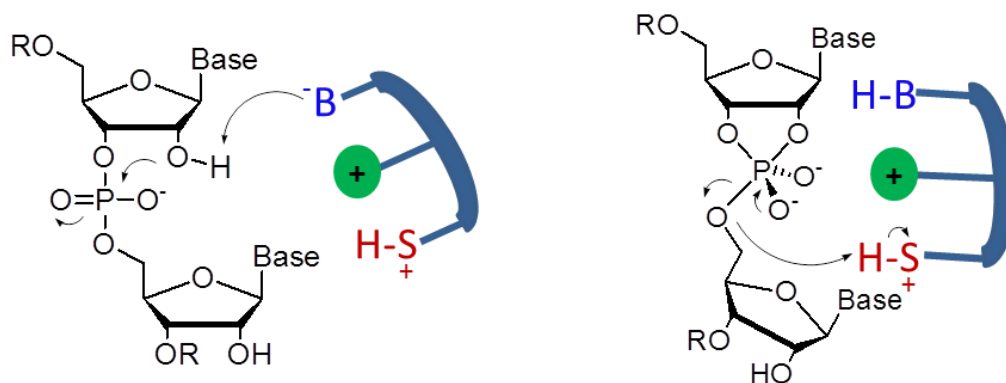
## 2.2 Katalyse der Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen

Die Betrachtung des Hydrolyse-Mechanismus zeigt, dass es drei Möglichkeiten gibt, die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen zu katalysieren.<sup>[5]</sup>

- 1) Erhöhung der Nucleophilie der 2'-OH-Gruppe (z.B. durch Deprotonierung)

- 2) Stabilisierung des Phosphoran-Intermediats durch Reduzierung der Elektronendichte am Phosphoratom (z.B. durch ein positiv geladenes Ion/Molekül oder durch Protonierung)
- 3) Reduzierung der Elektronendichte am 5'-Sauerstoffatom, um eine bessere Abgangsgruppe zu erhalten (z.B. durch Protonierung des Sauerstoffatoms)

Idealerweise sollte ein RNA-Spalter so aufgebaut sein, dass er all diese Forderungen erfüllen und die Spaltung der Phosphordiesterbindung dadurch optimal beschleunigen kann.

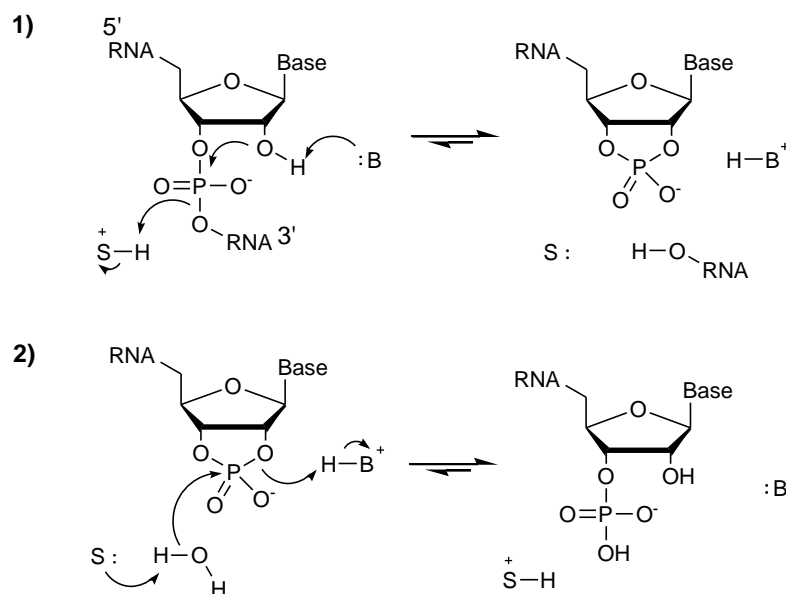


**Abbildung 4:** Möglichkeiten der Katalyse der RNA-Hydrolyse (schematische Darstellung).

Während es nicht einfach ist, diese drei katalytischen Eigenschaften in einem kleinen organischen Molekül oder Metallkomplex zu vereinen, findet man RNA-Spalter, die die drei oben genannten Forderungen erfüllen, in der Natur zuhauf: Bei der enzymatischen Spaltung von RNA wirken die verschiedenen Aminosäuren im aktiven Zentrum als Protonendonoren oder -akzeptoren und stabilisieren – häufig gemeinsam mit metallionischen Co-Faktoren – den dianionischen Übergangszustand. Ein besonders beeindruckendes Beispiel für eine solche natürliche Nuclease ist die Ribonuclease A (kurz RNase A), die zu einem der am besten untersuchten Enzyme des 20. und 21. Jahrhunderts zählt.<sup>[15]</sup>

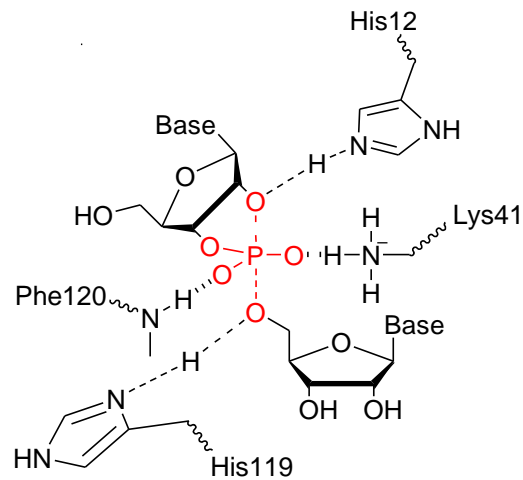
Schon vor 75 Jahren gelang es M. Kunitz, die RNase A zu kristallisieren;<sup>[16]</sup> die Aminosäuresequenz wurde Anfang der 60er-Jahre bestimmt<sup>[17]</sup> und nur wenige Jahre später wurde die dreidimensionale Struktur des Enzyms durch Röntgenbeugungsanalyse ermittelt.<sup>[18]</sup> RNase A ist keine sequenzspezifische Ribonuclease, zeigt jedoch eine deutlich erhöhte Spezifität für Pyrimidinbasen. Die Bindung der RNA-Substrate durch das Enzym erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, was durch den höheren sterischen Anspruch von Purinbasen erschwert wird.<sup>[19]</sup>

Der Mechanismus der durch RNase A katalysierten Spaltung von Phosphordiesterbindungen wurde bereits 1961 von Findlay *et al.* vorgeschlagen<sup>[20]</sup>: Eine Histidin-Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms erhöht durch generelle Basenkatalyse die Nucleophilie der 2'-OH-Gruppe und beschleunigt so den Angriff auf das Phosphoratom, während gleichzeitig ein weiterer Histidin-Rest durch generelle Säurekatalyse die Abspaltung der 5'-OH-Gruppe erleichtert. Die langsame Hydrolyse des dabei entstehenden 2',3'-Cyclophosphats wird ebenfalls durch die beiden Histidin-Reste katalysiert. Ein Metallion als Co-Faktor wird nicht benötigt.



**Abbildung 5:** Mutmaßlicher Mechanismus der Spaltung einer Phosphordiesterbindung durch RNase A. Bei der Säure „S“ und der Base „B“ handelt es sich jeweils um einen Histidin-Rest.<sup>[20]</sup>

Betrachtet man den dreidimensionalen Aufbau des aktiven Zentrums, so lässt sich der Mechanismus noch genauer entschlüsseln. Abbildung 6 zeigt den mutmaßlichen Übergangszustand der Spaltung der Phosphordiesterbindung: His12 wirkt bei der Reaktion als Base, His119 zur gleichen Zeit als Säure. His119 bildet dabei mit Asp121 eine katalytische Diade. Durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen His119 und Asp121 wird das richtige Tautomer von His119 in Position gebracht und so die konformative Stabilität des Enzyms erhöht. Der anionische Übergangszustand wird durch die positive Ladung von Lys41 stabilisiert.<sup>[19]</sup> Auch eine Stabilisierung durch starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Lys41 sowie zur peptidischen NH-Gruppe des Phe120 wurde postuliert.<sup>[21]</sup>



**Abbildung 6:** Mutmaßlicher Übergangszustand der Umesterungsreaktion im katalytischen Zentrum der RNase A.<sup>[19]</sup>

Andere natürliche Ribonucleasen – wie die RNase H<sup>[22]</sup> – oder Nucleasen, die sowohl DNA als auch RNA spalten, z.B. die Staphylokokken-Nuclease,<sup>[23]</sup> enthalten in ihren aktiven Zentren häufig Metallionen als Co-Faktoren (in der Regel  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$ ). Der Angriff auf das Phosphoratom läuft dabei oftmals nicht durch die 2'-OH-Gruppe als internes, sondern durch ein Wassermolekül als externes Nucleophil ab.<sup>[24]</sup> Bei der Katalyse der Phosphordiesterbindungsspaltung spielen bei diesen Enzymen, wie schon im Fall der RNase A, basische (His, Lys und Arg) sowie saure (Asp, Glu) Aminosäuren eine große Rolle.

### 2.3 Künstliche Ribonucleasen

Ausgehend vom Mechanismus der RNA-Hydrolyse in Wasser und von den Wirkmechanismen natürlicher Nucleasen wurden eine Vielzahl künstlicher Nucleasen entwickelt.<sup>[5,6,25,26]</sup> Bei diesen handelt es sich um kleine organische Moleküle oder Metallkomplexe mit organischen Liganden, die zunächst einmal sequenzunspezifisch spalten. Da für die meisten biochemischen oder medizinischen Anwendungen jedoch eine Sequenzspezifität wünschenswert ist, werden künstliche RNA-Spalter häufig mit sequenzerkennenden Strukturen – in der Regel kurze DNA-Oligonucleotide (Oligodesoxynucleotide, ODN) oder Oligomere von Nucleinsäureanaloga wie 2'-O-Methyloligonucleotide oder PNA<sup>[27]</sup> – verknüpft. Auf den folgenden Seiten wird – nach einer kurzen Einführung der üblichen Testverfahren zur Untersuchung künstlicher Ribonucleasen – ein Überblick über die wichtigsten metallhaltigen und metallfreien künstlichen Ribonucleasen gegeben, wobei vor allem die sequenzspezifischen Ribonucleasen behandelt werden. Auf zwei weitere Klassen künstlicher Ribonucleasen, die RNA-Stränge oxi-

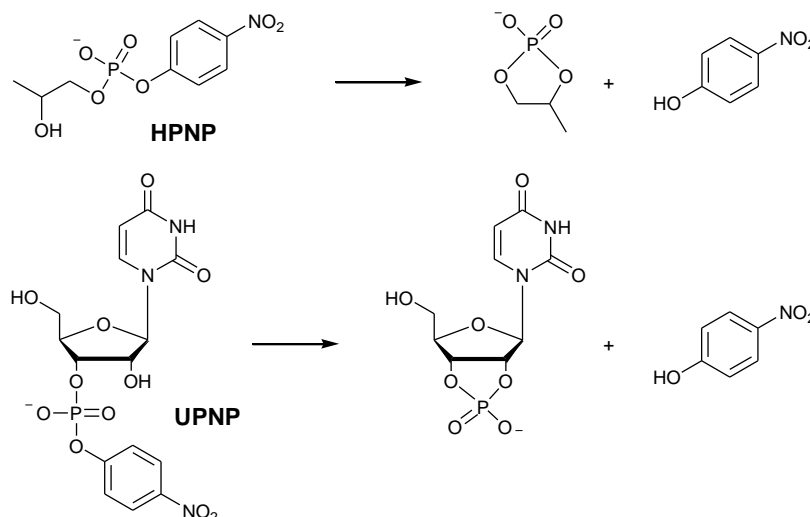
dativ<sup>[28,29]</sup> bzw. über einen Radikalmechanismus<sup>[30]</sup> spalten, soll an dieser Stelle aufgrund der völlig anderen Wirkmechanismen nicht näher eingegangen werden.

### 2.3.1 Assays zur Messung der Spaltaktivität künstlicher Ribonucleasen

Zur Messung der Spaltaktivität künstlicher Ribonucleasen existieren verschiedene Assays. Welcher davon Anwendung findet, hängt neben der apparativen Ausstattung einer Forschergruppe auch von der Art und Aktivität der potentiellen Spalter sowie vom Ziel des Experimentes ab.

#### 2.3.1.1 Spaltexperimente mit Modellphosphaten

Neue potentielle Spalter werden häufig zuerst an künstlichen Substraten getestet. Dabei handelt es sich um Phosphordiester-Verbindungen mit einem Alkylrest mit Hydroxyl-Gruppe, der die Zuckereinheit mit ihrer 2'-OH-Gruppe imitiert, sowie einem weiteren Rest – meist ein Arylrest, – der als Abgangsgruppe fungiert. Abbildung 7 zeigt die beiden häufig verwendeten Modellphosphate 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) und Uridin-3'-*p*-nitrophenylphosphat (UPNP), die beide 4-Nitrophenolat als Abgangsgruppe besitzen.



**Abbildung 7:** Die beiden Modellphosphate **HPNP** und **UPNP** und ihre Spaltprodukte.

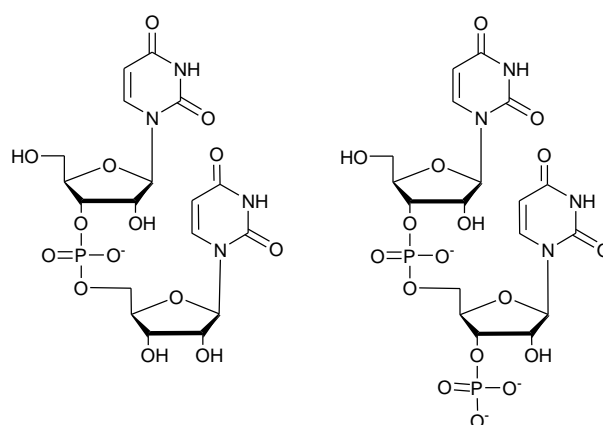
Spaltexperimente mit Modellphosphaten bieten einige Vorteile: So bilden sich – anders als bei der unspezifischen Hydrolyse von RNA – lediglich zwei Spaltprodukte. Die meist aromatischen Abgangsgruppen lassen sich zudem über UV/vis leicht photometrisch detektieren, so dass sich die Spaltversuche relativ leicht über HPLC oder colorimetrisch verfolgen und auswerten lassen. Allerdings sind die Ergebnisse von Spaltexperimenten mit Modellphos-



phaten nicht eins zu eins auf die Spaltung von RNA übertragbar. Durch elektronenziehende Reste und die Anwesenheit einer guten Abgangsgruppe wird die Stabilität des Phosphordiesterers erheblich gesenkt, so dass die Spaltung von Modellphosphaten auch mit Verbindungen gelingen kann, die nicht aktiv genug sind, um RNA zu spalten. Auch die Spaltmechanismen können verschieden sein. Hinzu kommt, dass RNA-Oligonucleotide sehr viel größer sind, viele negative Ladungen tragen und Sekundärstrukturen ausbilden können. All diese Unterschiede zu Modellphosphaten erschweren die Übertragung von Ergebnissen von einem Fall auf den anderen zusätzlich.<sup>[25]</sup>

### 2.3.1.2 Spaltexperimente mit Dinucleosidmono- und Dinucleosiddiphosphaten

Ebenfalls häufig bei Spaltexperimenten eingesetzt werden Dinucleosidmono- (NpN) sowie Dinucleosiddiphosphate (NpNp). Die Analogie zu RNA-Oligonucleotiden ist hier sehr viel größer als im Fall der Modellphosphate, handelt es sich doch um „echte“ Nucleosidphosphordiester. Dennoch bleibt der Vorteil der leichten Analysierbarkeit der Spaltversuche bestehen: Bei der Hydrolyse entstehen lediglich zwei Produkte, deren Entstehung sich per HPLC leicht verfolgen lässt. Aufgrund des fehlenden Polymercharakters und der deutlich geringeren negativen Ladung von NpN oder NpNp ist jedoch auch hier keine völlige Vergleichbarkeit gegeben. Insbesondere bei Spaltexperimenten mit Metallionen oder Metallkomplexen zeigen sich Unterschiede in der Reaktivität, die teilweise schon beim Vergleich von NpN- mit NpNp-Spaltung auftreten.<sup>[25]</sup>



**Abbildung 8:** Struktur von Dinucleosidmono- und Dinucleosiddiphosphaten am Beispiel von UpU und UpUp.

### 2.3.1.3 Spaltexperimente mit RNA

Um die Spaltaktivität eines RNA-Splatters einwandfrei zeigen zu können, sind Spaltexperimente mit RNA-Oligonucleotiden unabdingbar. Zudem lassen sich Effekte wie Sequenz-

spezifität nur mit RNA als Spaltsubstrat zeigen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Anzahl der Spaltprodukte insbesondere bei unspezifischer Spaltung sehr viel höher ist als bei der Spaltung von Modellphosphaten, NpN oder NpNp. Meist werden daher radioaktiv oder fluoreszenzmarkierte RNA-Substrate verwendet. Die Spaltprodukte werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und so einzeln detektiert. Bei genauer Trennung und Detektion ist mit dieser Methode eine exakte Aussage über die gespaltenen Bindungen möglich. Zur Auswertung der Spaltung von fluoreszenzmarkierten RNA-Substraten kann auch ein DNA-Sequenziergerät verwendet werden. Eine genauere Erläuterung dieser Methode findet sich in Kapitel 5.2.1.

Ist die Anzahl der Spaltprodukte aufgrund von spezifischer Spaltung überschaubar, ist auch eine Auswertung der Spaltexperimente mittels HPLC möglich. Um Aussagen über die exakten Spaltstellen treffen zu können, ist es dabei aber erforderlich, die Spaltprodukte einzeln zu isolieren und mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Dieses Verfahren wird insbesondere von der Gruppe um R. Strömberg verwendet.<sup>[31]</sup>

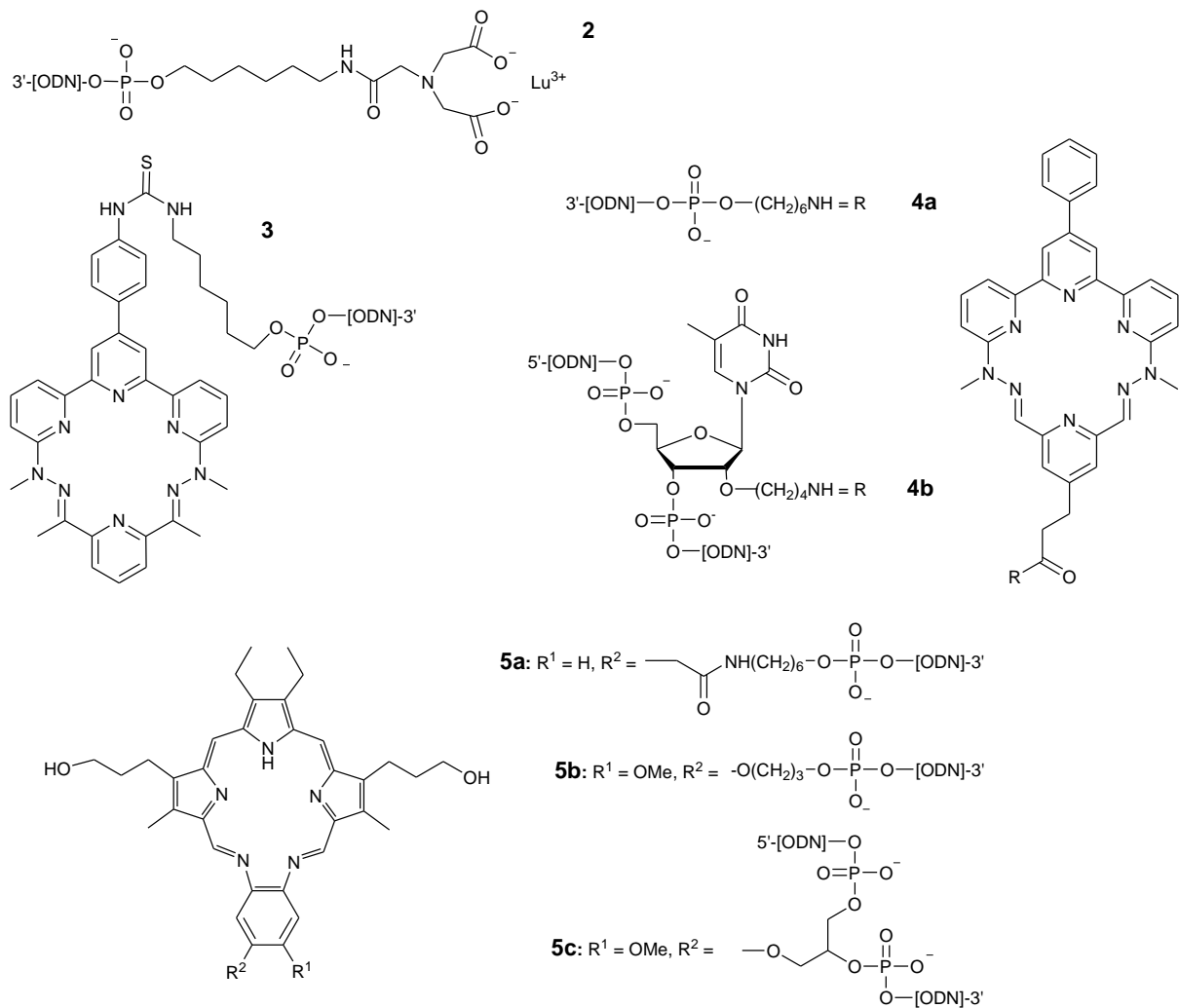
### 2.3.2 Metallhaltige künstliche Ribonucleasen

Dass viele zweiwertige Metallionen wie  $\text{Pb}^{2+}$ <sup>[32]</sup>,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$ <sup>[33]</sup> sowie dreiwertige Lanthanoidionen<sup>[34]</sup> die Hydrolyse von RNA im physiologischen pH-Bereich stark beschleunigen, ist bereits seit den 1950er- und 1960er-Jahren bekannt. Dies ist – zusammen mit der Tatsache, dass viele enzymatische Nucleasen ein oder mehrere Metallionen enthalten<sup>[24]</sup> – der Grund dafür, dass in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von metallbasierten künstlichen Ribonucleasen entwickelt wurden. Diese setzen sich aus einem Liganden, der ein oder mehrere Metallionen komplexieren kann, sowie dem entsprechenden Metallion bzw. den entsprechenden Metallionen zusammen. Über den Liganden ist häufig die Verknüpfung mit einem sequenzerkennenden Strukturelement möglich.

Freie und komplexierte Metallionen können die Spaltung einer Phosphordiesterbindung auf alle drei in Kapitel 2.2 genannten Weisen katalysieren: Eine Erhöhung der Nucleophilie des 2'-Sauerstoffatoms ist durch Deprotonierung über ein metallgebundenes Hydroxidion möglich; die dianionische Zwischenstufe wird durch die positive Ladung des Metallions stabilisiert; die Reduzierung der Elektronendichte an dem als Abgangsgruppe fungierenden 5'-Sauerstoffatom kann durch direkte Koordination des Metallions oder durch Protonierung über ein metallgebundenes Wassermolekül erfolgen.<sup>[6,26]</sup>

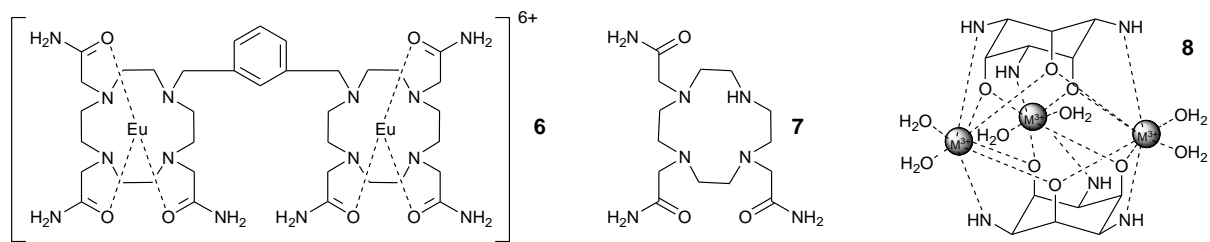
### 2.3.2.1 Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Lanthanoidionen

Da Lanthanoidionen die Hydrolyse von RNA besonders effizient katalysieren,<sup>[34]</sup> basieren viele metallhaltige künstliche Ribonucleasen auf Lanthanoidkomplexen. In einigen Fällen wurden diese Komplexe bereits an DNA-Oligonucleotide konjugiert und auf diese Weise sequenzspezifische RNA-Spalter erzeugt. Der erste Spalter dieser Art ist das von Komiyama *et al.* synthetisierte Konjugat **2**, das aus einem an das 5'-Ende eines DNA-15mers gebundenen Lu<sup>3+</sup>-Komplex besteht.<sup>[35]</sup> **2** zeigt zwar sequenzspezifische RNA-Spaltung, die Halbwertszeit der Reaktion bei pH 8 und 37 °C ist mit 30 h jedoch relativ groß. Ein Grund dafür sind vermutlich die negativen Ladungen des Liganden, die zwar für eine feste Bindung des Lu<sup>3+</sup>-Ions sorgen, gleichzeitig aber die katalytische Aktivität des Ions erniedrigen.<sup>[5]</sup> Folgerichtig zeigen ähnliche DNA-Konjugate von Lanthanoid-Komplexen mit einem neutralen Liganden teilweise sehr viel niedrigere Halbwertszeiten für die Spaltung von RNA. So liegen diese für die Europium-Komplex-Konjugate **3**-Eu<sup>3+</sup> und **4**-Eu<sup>3+</sup><sup>[36]</sup> bei 4 bzw. 10 h und bei den Dysprosium-Texaphyrin-Komplexen **5a**-Dy<sup>3+</sup> und **5b**-Dy<sup>3+</sup><sup>[37]</sup> bei 10 bzw. 2.1 h (alle Werte bei pH 7.5, 37 °C).<sup>[5]</sup> Der Spalter wurde dabei jeweils im Überschuss zum RNA-Substrat eingesetzt. Setzt man z.B. **5b**-Dy<sup>3+</sup> im Unterschuss ein, so ist kaum Spaltaktivität feststellbar.<sup>[38]</sup> Scheinbar ist der DNA-RNA-Hybridstrang so stabil, dass eine Loslösung des DNA-Konjugats von der RNA nach deren Spaltung nicht stattfindet. Dadurch kann jedes Konjugat nur ein RNA-Molekül spalten, es findet kein *turnover* statt. Um Lanthanoid-Komplex-Konjugate zu erhalten, die *turnover* erzielen, wurden die Komplexe daher innerhalb des DNA-Oligomers angebracht. Die auf diese Weise erhaltenen Konjugate **4b**-Eu<sup>3+</sup><sup>[39]</sup> und **5c**-Dy<sup>3+</sup><sup>[38]</sup> zeigen beide *turnover*. Wie zu erwarten, wurde die zum jeweiligen Konjugat komplementäre RNA dabei nur dann gespalten, wenn im Bereich des Spalters ein *bulge* eingebaut wurde. Lag die RNA im zu spaltenden Bereich hingegen vollständig als Doppelhelix vor, so dass eine colineare Anordnung von angreifender 2'-OH-Gruppe und 5'-OH-Abgangsgruppe nicht möglich war (vgl. Kapitel 2.1), konnte nur eine sehr geringe Spaltaktivität beobachtet werden.<sup>[39]</sup>



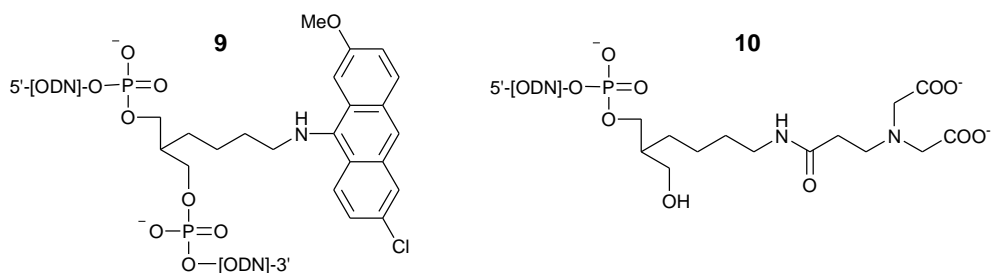
**Abbildung 9:** Auf Lanthanoid-Komplexen basierende sequenzspezifische künstliche Ribonucleasen.

In den letzten Jahren wurden zunehmend auch di- oder trinucleare Lanthanoidkomplexe als Katalysatoren für die Hydrolyse von Phosphordiesterbindungen entwickelt. So konnte gezeigt werden, dass der dinucleare Europium-Komplex **6**, der aus zwei über einen Linker verbrückten neutralen Liganden besteht, das Diribonucleosid UpU 46mal schneller spaltet als der entsprechende mononucleare Europium-Komplex **7**-Eu<sup>3+</sup>.<sup>[40]</sup> Der trinucleare Komplex **8** katalysiert die Spaltung des Modellphosphats HPNP (vgl. Kapitel 2.3.1), wurde bisher jedoch weder an Diribonucleosiden noch an RNA getestet.<sup>[41]</sup> Sequenzspezifische RNA-Spalter auf der Basis di- oder trinuclearer Lanthanoid-Komplexe existieren bisher noch nicht.



**Abbildung 10:** Mono-, di- bzw. trinucleare Lanthanoidkomplexe.  $M^{3+}$  (**8**):  $Y^{3+}$  oder  $La^{3+}$ .

Neben der sequenzspezifischen Spaltung von RNA durch Komplex-gebundene Lanthanoidionen lässt sich RNA auch durch freie Lanthanoidionen sequenzspezifisch spalten, wenn eine bestimmte Phosphordiesterbindung spezifisch aktiviert wird. Dies ist z.B. durch DNA-Oligonucleotide möglich, in die ein Acridin-Baustein eingebaut ist (**9**). Das diesem Baustein im RNA/DNA-Hybriden gegenüberliegende Nucleotid ist ungepaart und seine 5'-Phosphordiesterbindung wird durch Wechselwirkungen mit dem Acridinrest aktiviert, so dass sie durch die Zugabe von  $LuCl_3$  effizient gespalten werden kann.<sup>[42]</sup> Durch die Optimierung des Linkers<sup>[43]</sup> sowie des Acridin-Substituenten<sup>[44]</sup> lässt sich die Spaltaktivität weiter steigern. Eine noch höhere Spaltaktivität bei geringeren  $Lu^{3+}$ -Konzentrationen lässt sich allerdings auch in diesem Fall durch die Komplexbildung des  $Lu^{3+}$ -Ions erzielen. Dafür wurde ein Acridin-DNA-Konjugat in Kombination mit einem DNA-Oligonucleotid eingesetzt, das an seinem 3'-Ende einen Liganden zur Komplexbildung des  $Lu^{3+}$ -Ions trug (**10**).<sup>[45]</sup>

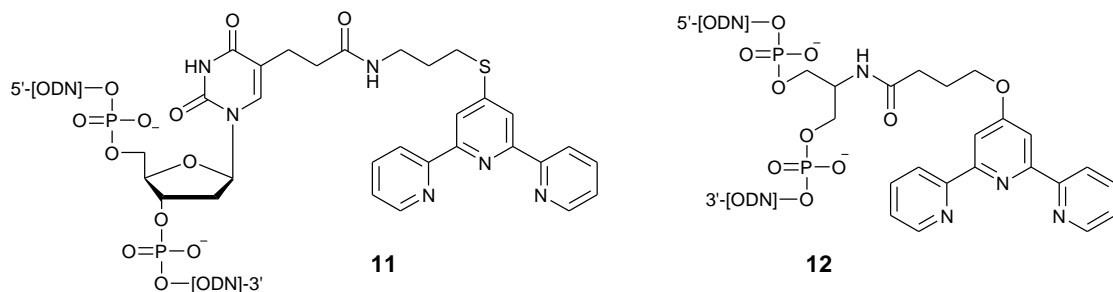


**Abbildung 11:** DNA-Konjugate zur sequenzspezifischen RNA-Spaltung durch Acridin-Aktivierung von Phosphordiesterbindungen.

### 2.3.2.2 Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Kupferionen

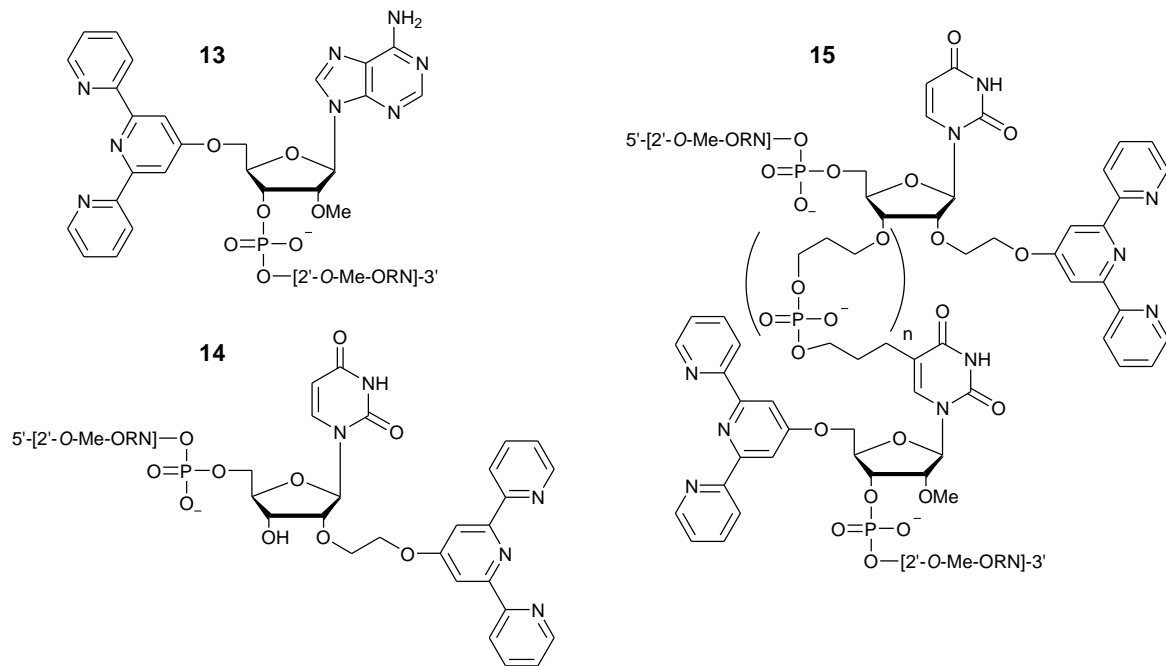
Auch wenn für die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen die katalytische Aktivität von Kupferionen niedriger ist als die von Lanthanoidionen, wurden viele RNA-Spalter entwickelt, die auf Kupferkomplexen basieren. Die erste sequenzspezifische künstliche Ribonuclease dieser Art (Konjugat **11**- $Cu^{2+}$ ) wurde 1994 von Bashkin *et al.* synthetisiert. Es handelte sich dabei um ein DNA-17mer, in dessen Sequenz ein mit einem Kupfer-Terpyridin-Komplex verknüpfter Uracilbaustein integriert ist.<sup>[46]</sup> Dieser spaltete zwar eine zu dem DNA-

17mer komplementäre RNA an der dem Spalter gegenüberliegenden 5'-Phosphordiesterbindung, die Halbwertszeit dieser Reaktion war mit 400 h (pH 7.5, 37 °C) bei einem Überschuss an **11**-Cu<sup>2+</sup> jedoch sehr hoch.<sup>[5]</sup> Ein Ersetzen der modifizierten Uracileinheit durch einen mit dem gleichen Spalter verbundenen Serinol-Baustein (**12**-Cu<sup>2+</sup>) führte zu einer dreifachen Beschleunigung der Spaltreaktion.<sup>[47]</sup> Eine noch stärkere Beschleunigung konnte durch den Einbau von Propandiol-Linkern zu beiden Seiten des Serinol-Bausteins erreicht werden.<sup>[48]</sup> Diese führten zur Bildung eines *bulges* aus drei Basenpaaren gegenüber dem Spalter, wodurch die Halbwertszeit unter gleichen Bedingungen auf 40 h gesenkt werden konnte. Auch wurde beobachtet, dass der Spalter bei einem Überschuss des Substrats *turnover* erzielt.<sup>[5]</sup>



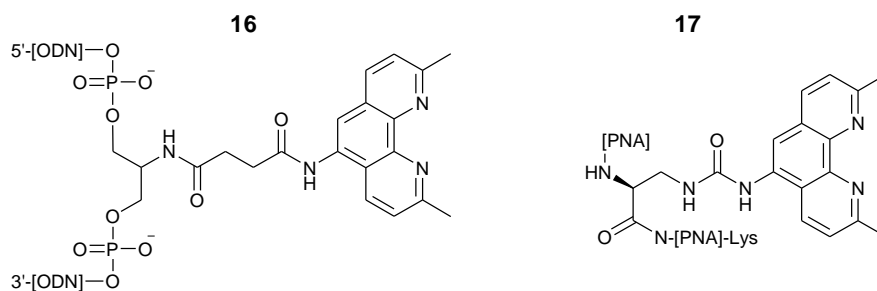
**Abbildung 12:** Sequenzspezifische RNA-Spalter auf Basis von Terpyridin-Kupfer-Komplexen nach Bashkin *et al.*

Dass die Position der Spalter-Einheit innerhalb bzw. an einem Ende des sequenz-erkennenden Oligonucleotids für die Aktivität des Konjugats von großer Bedeutung ist, zeigt die Tatsache, dass ein am 5'-Ende eines 2'-*O*-Methyloligonucleotids angebrachter Cu<sup>2+</sup>-Terpyridin-Komplex (**13**-Cu<sup>2+</sup>) lediglich eine geringe Spaltaktivität gegenüber der komplementären RNA zeigt.<sup>[49]</sup> Konjugat **14**-Cu<sup>2+</sup>, das den Kupferkomplex am 3'-Ende eines 2'-*O*-Methyloligonucleotids trägt, ist als RNA-Spalter sogar komplett inaktiv. Interessanterweise verstärkt das 3'-Konjugat aber die Aktivität des 5'-Konjugats, wenn beide so mit dem RNA-Substrat hybridisieren, dass die beiden Kupferkomplexe in direkter Nachbarschaft zueinander liegen.<sup>[50]</sup> Diese Kooperativität der beiden Komplexe wird noch erhöht, wenn die beiden Nucleoside, an die die Terpyridin-Komplexe gebunden sind, über einen Linker verknüpft werden (**15**-2 Cu<sup>2+</sup>).<sup>[51]</sup>



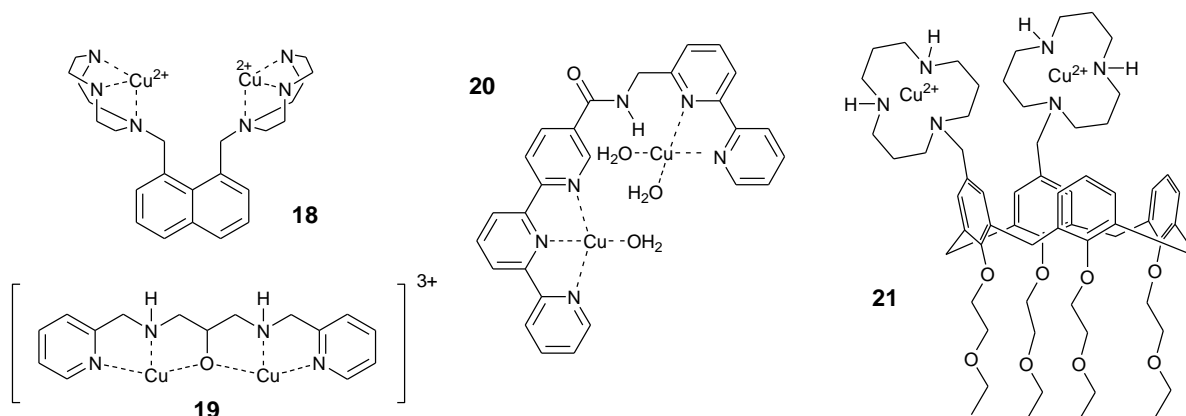
**Abbildung 13:** Sequenzspezifische RNA-Spalter auf Basis von Terpyridin-Kupfer-Komplexen nach Inoue *et al.*

Höhere Spaltraten als für Terpyridin-Kupfer-basierte RNA-Spalter lassen sich mit Konjugaten von Neocuproin-Kupfer-Komplexen erreichen. So zeigt das DNA-Konjugat **16**-Cu<sup>2+</sup> eine etwa fünffach höhere Spaltaktivität als der vergleichbare RNA-Spalter **12**.<sup>[52]</sup> Es wird vermutet, dass der Neocuproin-Ligand die Konzentration von Kupfer-gebundenen Hydroxidionen erhöht und gleichzeitig die Dimerisierung der Kupfer-Chelate verhindert, welche eine Absenkung der Spaltaktivität zur Folge hätten.<sup>[53]</sup> Die hohe Spaltaktivität des Kupfer-Neocuproin-Komplexes nutzt auch die derzeit effizienteste künstliche Ribonuclease, das von Strömberg *et al.* entwickelte sogenannte PNAzym **17**-Cu<sup>2+</sup>. Dieses besteht aus einem in eine PNA-Sequenz integrierten Diaminopropionsäure-Baustein, der mit einem Neocuproin-Liganden verknüpft ist. Die PNA-Sequenz wird so gewählt, dass sich an der Spaltstelle des RNA-Substrats ein *bulge* aus vier Nucleotiden bildet. **17**-Cu<sup>2+</sup> spaltet extrem spezifisch mit Halbwertszeiten von teilweise nur 30 min bei stöchiometrischer Verwendung des Konjugats. Bei Verwendung eines Überschusses des RNA-Substrats zeigt der Spalter mehrfachen *turn-over*. Allerdings ist die Aktivität stark von der Basensequenz im *bulge* abhängig und auch die Ausbildung eines G-T-Wobble-Basenpaares neben dem *bulge* ist für die Spaltaktivität essentiell.<sup>[4]</sup>



**Abbildung 14:** Sequenzspezifische RNA-Spalter auf Basis von Neocuproin-Komplexen.

Neben den in den Konjugaten **13** bis **17** als RNA-Spalter verwendeten mononuclearen Terpyridin- und Neocuproin-Kupfer-Komplexen spielen bei der Suche nach effizienten Kupfer-basierten RNA-Spaltern auch binucleare Komplexe eine große Rolle. Die Kooperativität der beiden Kupfer-Zentren in solchen Komplexen bei der Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen konnte schon 1995 von Chin *et al.* anhand des Komplexes **18** gezeigt werden.<sup>[54]</sup> Weitere Beispiele für diese Klasse von RNA-Spaltern sind die Komplexe **19**,<sup>[55]</sup> **20**<sup>[56]</sup> und **21**. Letzterer wurde – anders als die anderen drei aufgeführten Komplexe – nicht nur an Diribonucleotiden wie ApA oder UpU getestet, sondern auch an verschiedenen RNA-Substraten. Der binucleare Kupfer-Komplex zeigte dabei, ebenso wie der entsprechende Komplex mit zwei distal an das Calixaren-Gerüst angebrachten Kupferkomplexen, eine große Selektivität für die Spaltung von CpA-Phosphordiesterbindungen. Da RNase A die gleiche Selektivität besitzt, ist dieses Ergebnis jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Lediglich die Spaltung von enantiomerer RNA mit gleicher Selektivität könnte sicher zeigen, dass die Selektivität nicht durch Kontamination mit RNase A bedingt ist (vgl. Kapitel 5.2.2). Die Anbringung eines dritten Kupfer-Komplexes an das Calixaren-Grundgerüst führte zu keiner bedeutenden Steigerung der Spaltaktivität.<sup>[57]</sup>



**Abbildung 15:** Binucleare Kupferkomplexe als Spalter von RNA-Phosphordiesterbindungen.



### 2.3.2.3 Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Zinkionen

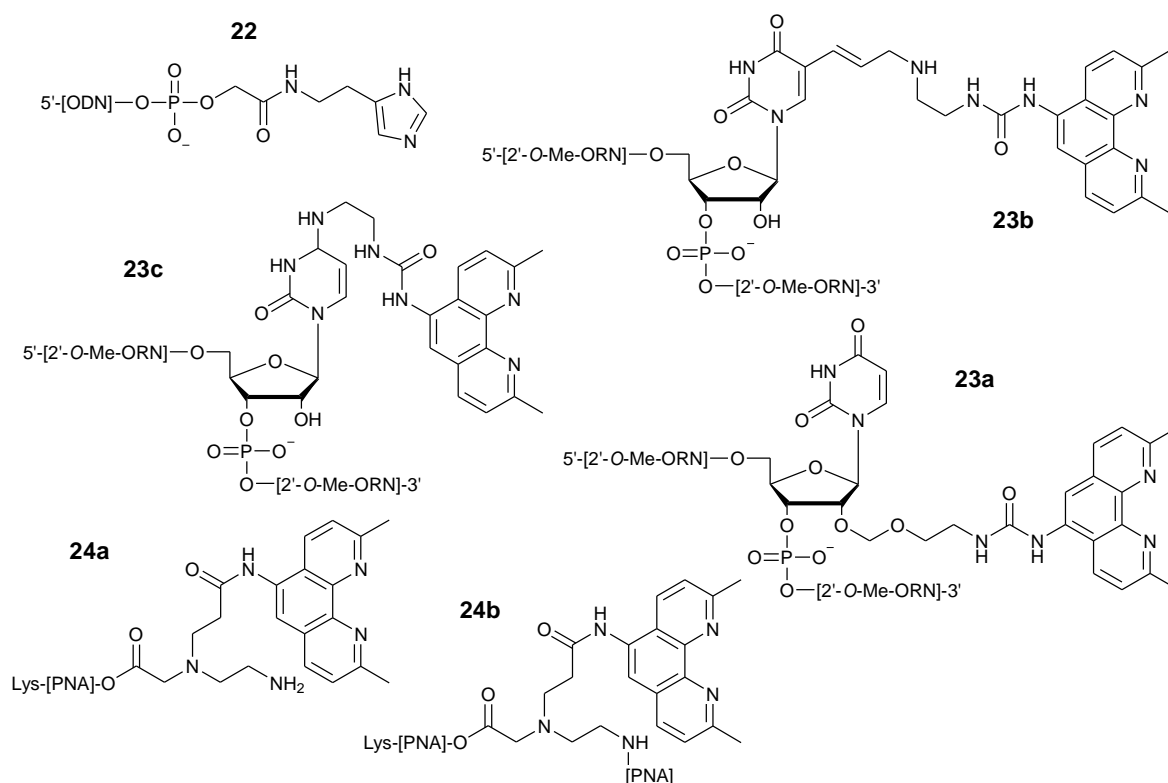
Die dritte große Klasse von metallhaltigen künstlichen Ribonucleasen bilden die Ribonucleasen auf  $\text{Zn}^{2+}$ -Basis. Diese zeigen in Spaltexperimenten mit RNA in der Regel eine niedrigere Aktivität als vergleichbare RNA-Spalter auf Basis von Kupfer- oder Lanthanoidionen. Die Tatsache, dass die intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration im mikromolaren Bereich liegt, während sie für Kupfer- und Lanthanoidionen gegen null geht, spricht jedoch für die Verwendung von Zn-Komplexen als RNA-Spalter, gerade auch im Hinblick auf mögliche *in vivo*-Experimente.<sup>[52]</sup> Eine  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration im mikromolaren Bereich sollte ausreichen, um die Bildung von spaltaktiven Komplexen mit Bildungskonstanten im nanomolaren Bereich zu ermöglichen.<sup>[5]</sup>

Der erste sequenzspezifische RNA-Spalter auf Basis von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen war das 1995 von Lönnerberg *et al.* synthetisierte Konjugat von Histamin an das 3'-Ende eines Oligodesoxyribonucleotids (**22**). Die Spaltraten waren mit 2 – 5 % nach 19 h (pH 7, RT) jedoch relativ niedrig und die Halbwertszeit mit 300 h sehr hoch. Auch mussten  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen im großen Überschuss zugegeben werden.<sup>[58]</sup> Die Verwendung von Liganden, die stabilere  $\text{Zn}^{2+}$ -Komplexe bilden, führte zu künstlichen Ribonucleasen mit höherer Aktivität. So lag die Spaltrate für das Neocuproin-Konjugat **16**- $\text{Zn}^{2+}$  bei 25 % nach 15 h (pH 7.4, 37 °C). Der Vergleich mit dem entsprechenden Kupfer-Konjugat **16**- $\text{Cu}^{2+}$  zeigte eine um 40 % niedrigere Aktivität bei gleichen Spaltbedingungen.<sup>[52]</sup>

Die Weiterentwicklung der auf Zink-Neocuproin-Komplexen basierenden Ribonucleasen erfolgte durch Strömberg *et al.* Zunächst wurden verschiedene Konjugate synthetisiert, bei denen der Komplex über einen Linker mit der 2'-OH-Gruppe (**23a**- $\text{Zn}^{2+}$ ) oder dem C-5 eines Uridin-Bausteins (**23b**- $\text{Zn}^{2+}$ )<sup>[59]</sup> bzw. mit dem N-4 eines Cytidin-Bausteins (**23c**- $\text{Zn}^{2+}$ ) verknüpft ist.<sup>[60]</sup> Diese modifizierten Bausteine wurden in der Mitte bzw. am 5'-Ende eines 2'-O-Methyl-Oligoribonucleotids eingebaut und die so erhaltenen Konjugate mit verschiedenen RNA-Substraten, bei denen sich durch Hybridisierung mit dem Konjugat *bulges* verschiedener Größe (ein bis fünf Nucleotide) bildeten, getestet. Am effizientesten war die Spaltung bei der Ausbildung eines drei oder vier Nucleotide großen *bulges*, während bei *bulge*-Größen unter drei Nucleotiden kaum oder gar keine Spaltung zu beobachten war. Zwar zeigten alle drei Konjugate *turnover*, doch lagen die Halbwertszeiten für die beiden Konjugate **23b**- $\text{Zn}^{2+}$  und **23c**- $\text{Zn}^{2+}$  mit 11 bzw. 14 h deutlich unter der für das Konjugat **23a**- $\text{Zn}^{2+}$  (40 h; alle Spaltexperimente bei pH 7.4 und 37 °C). Offenbar ist die Anbringung des Zink-Komplexes an

der Nucleobase für die Spaltung der RNA-Phosphordiesterbindungen günstiger als die Anbringung am Zucker. Für ein zu **23b**-Zn<sup>2+</sup> analoges Konjugat mit dem Komplex am 5'-Ende des 2'-O-Methyl-Oligoribonucleotids beträgt die Spaltaktivität nur etwa ein Drittel der Spaltaktivität von **23b**-Zn<sup>2+</sup>.<sup>[59,60]</sup>

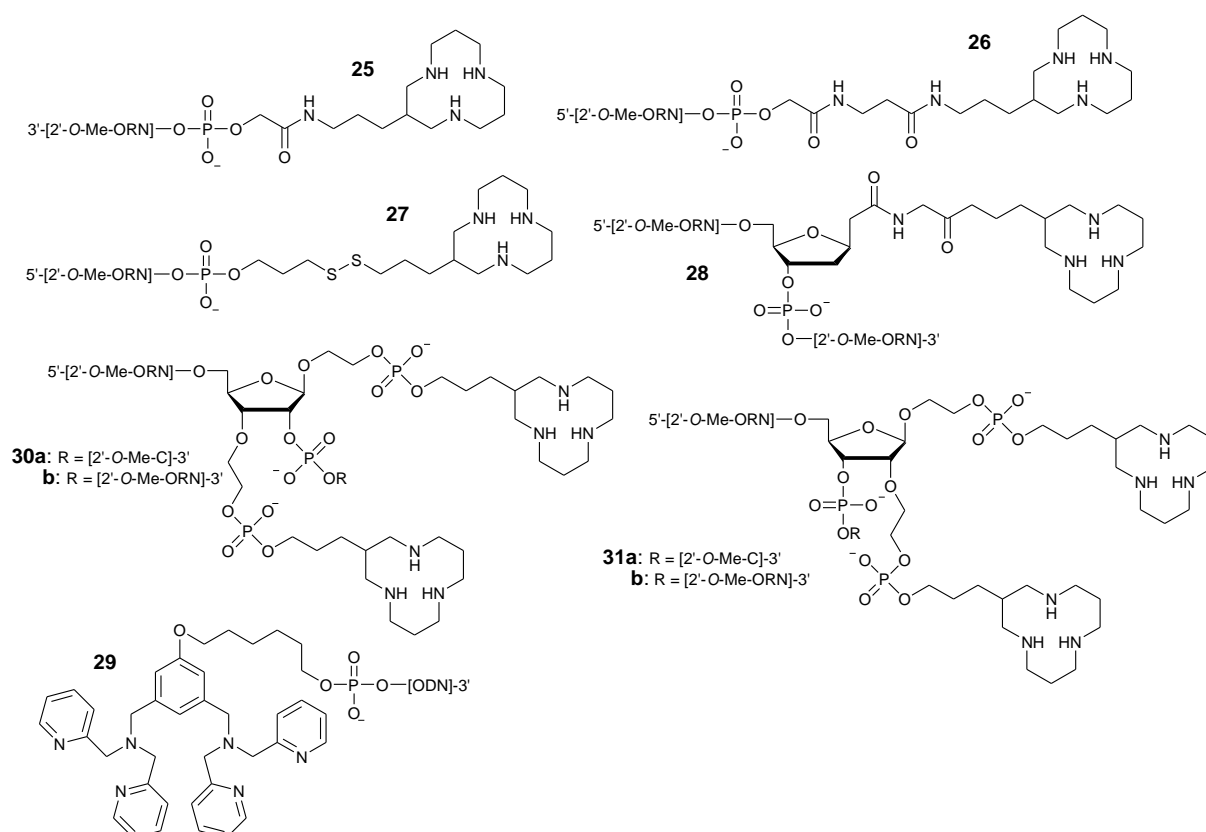
Konjugate von Neocuproin-Zink-Komplexen wurden nicht nur mit DNA oder 2'-O-Methyl-Oligoribonucleotiden als sequenzerkennende Einheit synthetisiert, sondern auch mit PNA. Die ersten Konjugate dieser Art, das N-terminale Konjugat **24a**-Zn<sup>2+</sup> und das mit einer internen Spalteinheit versehene Konjugat **24b**-Zn<sup>2+</sup>, blieben dabei allerdings hinter den Aktivitäten von **23b**-Zn<sup>2+</sup> und **23c**-Zn<sup>2+</sup> zurück.<sup>[61]</sup> Durch Optimierung der Linkerlänge und der Größe des im PNA/RNA-Hybriden geformten *bulges* lassen sich jedoch Spaltaktivitäten im Bereich der Aktivitäten von **23b**-Zn<sup>2+</sup> und **23c**-Zn<sup>2+</sup> erzielen. So spaltet **17**-Zn<sup>2+</sup> das komplementäre RNA-Substrat mit einer Halbwertszeit von 11 h. Auch zeigte der Spalter *turnover*.<sup>[31]</sup> Verglichen mit dem Kupfer-basierten Spalter **17**-Cu<sup>2+</sup> ist diese Halbwertszeit allerdings immer noch recht hoch (siehe 2.3.2.2).



**Abbildung 16:** Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Histidin- oder Neocuproin-Zink-Komplexen.

Ein Nachteil der Konjugate mit Neocuproin-Komplexen ist die gegenüber anderen Zn(II)-Komplexen relativ niedrige Komplex-Stabilität, die zur Erzielung eines optimalen Spaltergebnisses den Einsatz von Zn<sup>2+</sup>-Ionen im großen Überschuss in Bezug auf den Spalter nötig

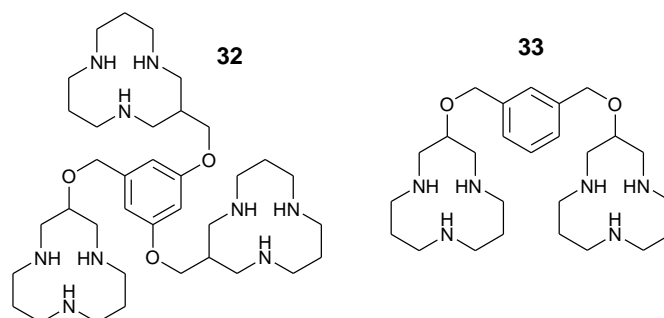
macht.<sup>[5]</sup> So wurden die  $Zn^{2+}$ -Ionen bei der RNA-Spaltung mit **17**- $Zn^{2+}$  im 45fachen Überschuss eingesetzt.<sup>[31]</sup> Zu den stabileren Zn(II)-Komplexen zählen die Azakronenether- $Zn^{2+}$ -Komplexe, die von Lönnberg *et al.* an 2'-O-Methyl-Oligoribonucleotide konjugiert wurden. Dabei wurden sowohl 3'- und 5'-Konjugate als auch Konjugate, bei denen die Spalter-Einheit in die 2'-O-Methyl-Oligoribonucleotid-Sequenz eingebaut ist, synthetisiert. Während das 5'-Konjugat **25**- $Zn^{2+}$  keinerlei Spaltaktivität zeigte, spalteten die beiden 3'-Konjugate **26**- $Zn^{2+}$  und **27**- $Zn^{2+}$  das RNA-Substrat mit *turnover*. **27**- $Zn^{2+}$  spaltete dabei trotz des nur minimal kürzeren Linkers achtmal so schnell wie **26**- $Zn^{2+}$ . Auch **28**- $Zn^{2+}$  mit einer internen  $Zn^{2+}$ -Komplex-Einheit zeigt *turnover* und spaltet RNA effizient, wenn auch mit leicht niedrigerer Aktivität als die 3'-Konjugate.<sup>[62]</sup> Experimente mit unterschiedlichen RNA-Substraten zeigten eine höhere Spaltaktivität bei der Ausbildung eines fünf Nucleotide großen *bulges* als bei der Ausbildung eines Drei-Nucleotid-*bulges*.<sup>[63]</sup> Im Vergleich zu den Neocuproin-Konjugaten benötigen die Azakronenether-Konjugate sehr viel geringere  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen, um ihre volle Aktivität zu entfalten.



**Abbildung 17:** Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Azakronenether-Zink-Komplexen bzw. TPBA-Zink-Komplexen.

Bereits 1998 hatten Komiyama *et al.* gezeigt, dass Konjugate von binuclearen Zink-Komplexen eine höhere Spaltaktivität besitzen als Konjugate entsprechender mononuclearer Komplexe.<sup>[64]</sup> Das damals synthetisierte Konjugat **29**-Zn<sup>2+</sup> zeigte ähnlich hohe Aktivitäten wie die Neocuproin-Konjugate **23a-c**-Zn<sup>2+</sup>, benötigte dafür allerdings nur ein Zehntel der Zn<sup>2+</sup>-Konzentration.<sup>[5]</sup> Noch höhere Spaltraten lassen sich erzielen, wenn zwei Zn<sup>2+</sup>-Azakronenether-Komplexe an ein Nucleosid geknüpft werden. Die Aktivität ist um mehr als eine Größenordnung höher als bei Konjugaten mit nur einem solchen Komplex und die Konjugate zeigten *turnover*. Wieder erwiesen sich 3'-Konjugate wie **30a**-Zn<sup>2+</sup> als effizienter als sequenzinterne Konjugate wie **30b**-Zn<sup>2+</sup>. So ließen sich mit dem 3'-Konjugat **30a**-Zn<sup>2+</sup> sogar Halbwertszeiten unter 10 h erzielen. Die Anbringung der Spalteinheiten in 1'- und 3'-Position des Nucleotids scheinen dabei von großer Bedeutung zu sein. So zeigten die Konjugate **31a**-Zn<sup>2+</sup> und **31b**-Zn<sup>2+</sup> mit den Spalteinheiten in 1'- und 2'-Position eine sehr viel niedrigere Spaltaktivität. Möglicherweise erlaubt die Anordnung der beiden Komplexe in den Konjugaten **30a/b** Kooperativität der beiden Zinkionen oder aber eine optimale Annäherung an die Phosphordiesterbindung des Substrats.<sup>[65]</sup>

Di- und Triazakronenether-Zink-Komplexe sind auch in unkonjugierter Form interessante RNA-Spalter, zeigen sie doch eine hohe Selektivität für die beiden Phosphordiesterbindungen neben U-Nucleotiden. Der Grund für diese Selektivität liegt in der starken Bindung von kleinen Azakronenether-Zn<sup>2+</sup>-Komplexen an das deprotonierte N3-Atom von Uracil- und Thymin-Bausteinen.<sup>[66]</sup> Während ein Komplex an eine Uracil-Base bindet, kann der andere die Spaltung der benachbarten Phosphordiesterbindung katalysieren. UpU hingegen wird nur durch Triazakronenether-Komplexe wie **32**-Zn<sup>2+</sup> gespalten, nicht aber durch Diazakronenether-Komplexe wie **33**-Zn<sup>2+</sup>, da UpU beide Spalteinheiten von **33**-Zn<sup>2+</sup> bindet, so dass keine Katalyse der Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen mehr erfolgen kann.<sup>[67]</sup>



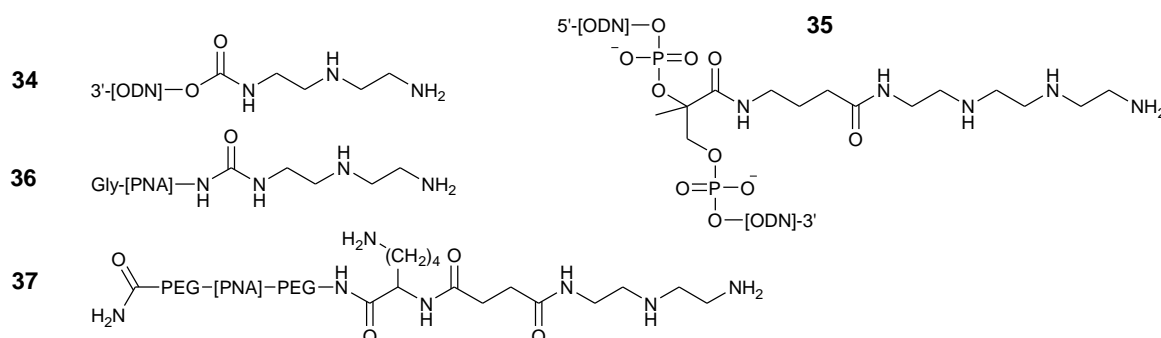
**Abbildung 18:** Liganden mit mehreren Azakronenether-Einheiten.

### 2.3.3 Metallfreie künstliche Ribonucleasen

Neben den beschriebenen Metallkomplexen wurde auch eine Vielzahl an rein organischen Molekülen gefunden, die die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen katalysieren. Beim Design dieser metallfreien Spalter orientieren sich die meisten Forschergruppen an den Aminosäuren, die in den katalytischen Zentren von natürlichen Ribonucleasen eine wichtige Rolle spielen. So enthalten die künstlichen metallfreien RNA-Spalter häufig Amino-, Imidazol- oder Guanidingruppen, die eine saure oder basische Katalyse der Phosphordiesterhydrolyse erlauben.

#### 2.3.3.1 Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Diethylentriamin

Eine wichtige Gruppe unter den metallfreien künstlichen Ribonucleasen stellen auf Diethylentriamin (DETA) basierende Verbindungen dar. Bereits 1994 gelang es Komiyama *et al.*, durch die 5'-Konjugation von DETA an ein DNA-19mer einen sequenzspezifischen metallfreien RNA-Spalter (**34**) zu erhalten, der sowohl lineare RNA<sup>[68]</sup> als auch tRNA<sup>[69]</sup> spaltet. Die Halbwertszeit war mit 40 h bei pH 8 und 50 °C (schätzungsweise mindestens 200 h bei pH 7.5 und 37 °C)<sup>[5]</sup> allerdings relativ hoch. Das DNA-Konjugat **35**, bei dem ein Baustein mit Triethylentetraamin-Rest in die Sequenz eingebaut worden war, spaltete RNA mit ähnlich hohen Halbwertszeiten, allerdings ist die Spaltstelle in diesem Fall spezifischer und auf lediglich zwei Phosphordiesterbindungen begrenzt.<sup>[70]</sup>



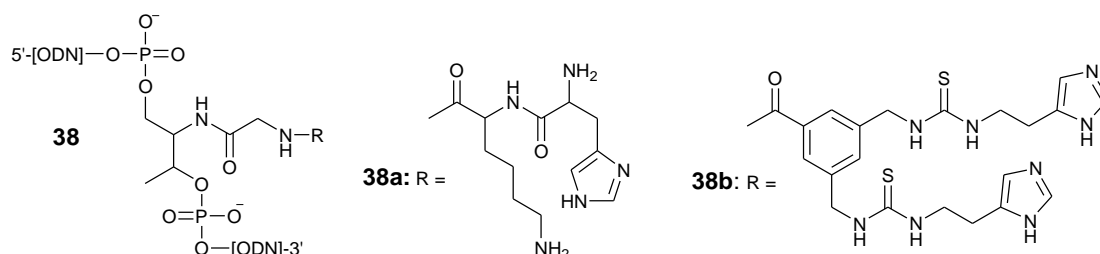
**Abbildung 19:** Sequenzspezifische RNA-Spalter mit DETA bzw. Triethylentetraamin als katalytische Einheit.

Interessanterweise ist die Spaltaktivität von Konjugaten aus PNA und DETA sehr viel höher. So spaltet ein Konjugat aus einem PNA-10mer und DETA mit einem Harnstofflinker (**36**) RNA sequenzspezifisch mit einer Halbwertszeit von 8 h bei pH 7 und 40 °C.<sup>[71]</sup> Für die Spaltung von RNA durch das Konjugat **37**, das sich aus einem PNA-14mer, DETA und zwei PEG-Linkern zusammensetzt, wurden sogar Halbwertszeiten von unter einer Stunde ermittelt: Nach Inku-

bation des RNA-Substrats mit einer äquimolaren Menge des Konjugats für 60 min bei pH 7 und 37 °C lag die Spaltrate bereits bei 90 %. Das gleiche Konjugat ohne die PEG-Linker zeigte eine weitaus geringere Aktivität. Erstaunlicherweise zeigte unter den gleichen Bedingungen auch das Konjugat aus DETA und zwei PEG-Linkern ohne das PNA-14mer eine deutliche, wenn auch sequenzunspezifische Spaltung von RNA.<sup>[29]</sup>

### 2.3.3.2 Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Imidazol

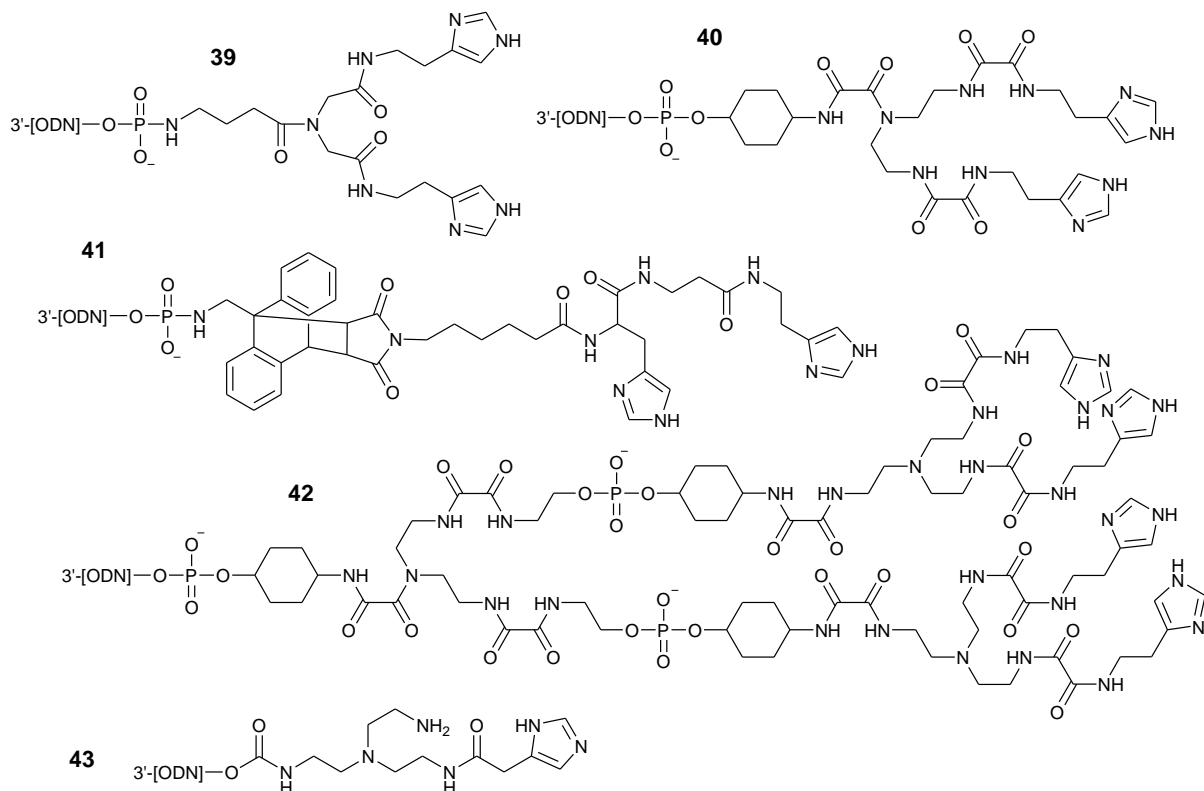
Neben DETA dienen – abgeleitet vom aktiven Zentrum der RNase A mit seinen beiden Histidin-Resten – auch Imidazol-Einheiten häufig als spaltaktive Einheit von sequenzspezifischen RNA-Spaltern. Dabei scheint die Aktivität allerdings stark von dem zu spaltenden Substrat abhängig zu sein. Lineare RNA wird von Imidazol-basierten Konjugaten gar nicht oder nur in einem sehr geringen Maße gespalten. Die beiden DNA-Konjugate **38a** und **38b**, bei denen in der Mitte der DNA-Sequenz ein Lysin- und ein Imidazol-Baustein bzw. zwei Imidazol-Bausteine angebracht sind, spalten lineare RNA mit einer Halbwertszeit von etwa 130 h bei pH 7.5 und 37 °C.<sup>[5,72]</sup> Für die von Herdewijn *et al.* hergestellten 5'-DNA-Konjugate mit einer oder zwei Imidazol-Einheiten konnte keinerlei Spaltaktivität festgestellt werden.<sup>[73]</sup>



**Abbildung 20:** DNA-Konjugate mit Imidazol-Einheiten.

Deutlich höhere Spaltaktivitäten hingegen wurden bei der Verwendung von tRNA<sup>Phe</sup> als RNA-Substrat erzielt, wobei der sequenzerkennende Teil jeweils so gewählt wurde, das die Spaltstelle in einem für seine Hydrolyseempfindlichkeit bekannten einzelsträngigen Bereich der tRNA liegt.<sup>[5]</sup> Imidazol-basierte Spalter für tRNA<sup>Phe</sup> wurden von der Gruppe um Vlassov entwickelt. Ein erstes 5'-DNA-Konjugat mit zwei Imidazol-Einheiten (**39**) spaltete nach 8 h bei pH 7 und 37 °C 60 % des tRNA<sup>Phe</sup>-Substrats sequenzspezifisch. Allerdings waren die Konjugate unter den gewählten Spaltbedingungen instabil.<sup>[74]</sup> Um die Stabilität und die Spaltaktivität der Konjugate zu verbessern, wurde der Linker optimiert. Das DNA-Konjugat **40** spaltete tRNA<sup>Phe</sup> mit einer Halbwertszeit von 1.5 h bei einem 20fachen Überschuss des Konjugats gegenüber dem Substrat bzw. mit einer Halbwertszeit von 4 h bei einem zweifachen Über-

schuss (pH 7, 37 °C).<sup>[75]</sup> Für Konjugat **41** lag die Halbwertszeit unter den gleichen Bedingungen bei nur 30 min (20facher Überschuss des Spalters gegenüber dem Substrat).<sup>[76]</sup> Vlassov *et al.* entwickelten auch sequenzspezifische Spalter von tRNA<sup>Phe</sup> mit vier bis 24 Imidazol-Einheiten. Die höchste Spaltaktivität wurde mit dem vier Imidazol-Einheiten enthaltenden Konjugat **42** erzielt, für das eine Halbwertszeit von einer Stunde für die RNA-Spaltung ermittelt wurde. Mehr Imidazol-Einheiten führten zu einer verminderten Spaltaktivität, was die Autoren auf die vermehrte sterische Hinderung der größeren Konjugate zurückführten.<sup>[77]</sup> Neben tRNA<sup>Phe</sup> wurde auch tRNA<sup>Asp</sup> erfolgreich mit einem DNA-Konjugat mit Imidazol-Einheit (**43**) gespalten: Die Halbwertszeit dieser Reaktion lag bei pH 7 und 37 °C allerdings bei 18 h und ist damit wesentlich höher als bei der Spaltung von tRNA<sup>Phe</sup> mit den künstlichen Ribonucleasen von V. Vlassov.<sup>[78]</sup>

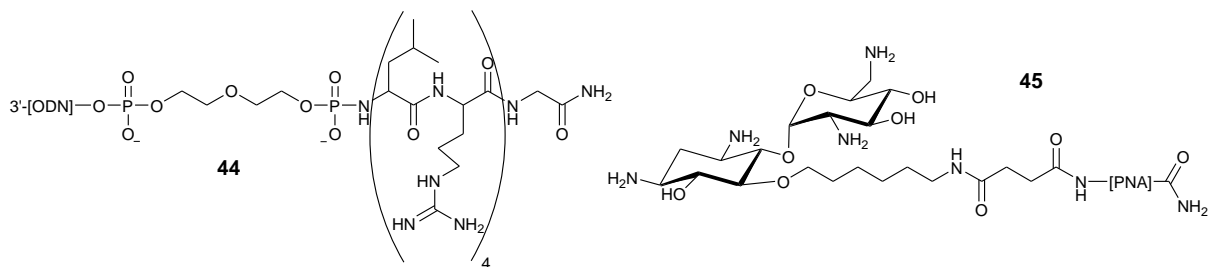


**Abbildung 21:** Sequenzspezifische Spalter von tRNA<sup>Phe</sup> bzw. tRNA<sup>Asp</sup> mit ein bis vier Imidazol-Einheiten.

### 2.3.3.3 Weitere metallfreie RNA-Spalter

Außer diesen beiden großen Klassen von metallfreien RNA-Spaltern wurden nur vereinzelt andere Struktureinheiten als Spalter verwendet. Versuche, RNA mit Konjugaten aus DNA und kurzen Peptiden zu spalten, führten in der Regel nicht zu sequenzselektiver Spaltung. Eine solche wurde lediglich im Fall des 5'-DNA-Konjugats von (Leu-Arg)<sub>4</sub>Gly (**44**) erreicht, aller-

dings lag die Spaltrate nach 42 h bei pH 7 und 37 °C nur bei 17 %.<sup>[79]</sup> Höhere Spaltaktivität zeigte ein Konjugat aus einem PNA-16mer und dem Antibiotikum Neamin (**45**), das nach 5 h bei pH 7.4 und 25 °C bereits einen großen Teil des RNA-Substrats – die TAR-RNA von HIV-1 – gespalten hatte. Gleichzeitig ermöglichte die Neamin-Einheit die Aufnahme des Konjugats in Zellen. Bei *in vivo*-Experimenten wurde eine Inhibierung der viralen Replikation durch das Konjugat festgestellt.<sup>[80]</sup> PNA-Neamin-Konjugate mit anderen Linkerlängen bzw. einer anderen Verknüpfung von Linker und Neamin besaßen keinerlei Spaltaktivität. Mechanistische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass bei der Hydrolyse der RNA-Phosphordiesterbindung die nicht protonierte Aminogruppe an Position 3 von Ring I als Base und die protonierte Aminogruppe an Position 6' von Ring II als Säure fungiert.<sup>[81]</sup>



**Abbildung 22:** Sequenzspezifische RNA-Spalter auf der Basis von Peptiden bzw. Neamin.

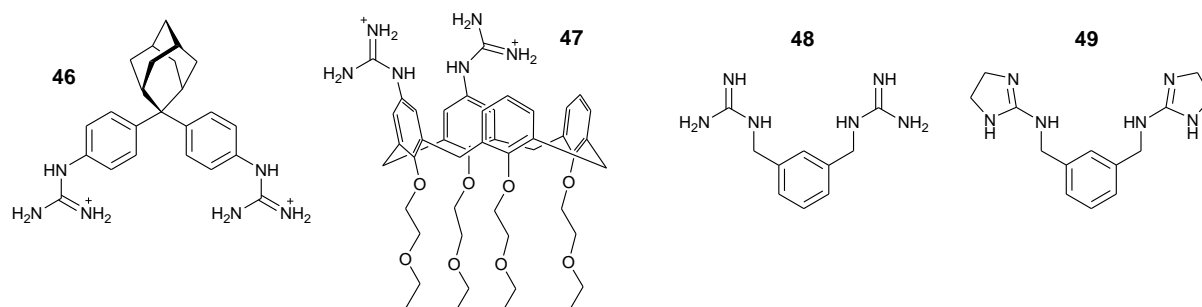
#### 2.3.3.4 Künstliche Ribonucleasen auf der Basis von Guanidin

Viele natürliche Nucleasen, wie z.B. die Staphylokokken-Nuclease,<sup>[23]</sup> enthalten in ihren aktiven Zentren Arginin-Reste. Aus diesem Grunde stehen auch Verbindungen mit Guanidinium-Gruppen sowie Guanidin-Analoga als katalytisch aktive Einheiten in metall-freien künstlichen Ribonucleasen im Fokus der Forschung.

Beispiele für spaltaktive Verbindungen mit Guanidinium-Gruppen sind die Verbindungen **46**<sup>[82]</sup> und **47**<sup>[83]</sup> der Gruppe um R. Salvio. Die Versuche zur Spaltung von Phosphordiesterbindungen wurden jedoch in beiden Fällen nicht mit RNA, sondern mit dem Modellphosphat HPNP (**46**) bzw. mit Dinucleosidmonophosphaten (**47**) durchgeführt. Auch waren die für die Experimente gewählten Bedingungen weit von physiologischen Bedingungen entfernt. So erwies sich **46** bei 25 °C und pH 10.2 in 80%igem DMSO als effektiver Spalter von HPNP<sup>[82]</sup>. Die Spaltung von Dinucleosiden durch **47** wurde bei 50 °C und pH 10.8 in 80%igem DMSO durchgeführt.<sup>[83]</sup>

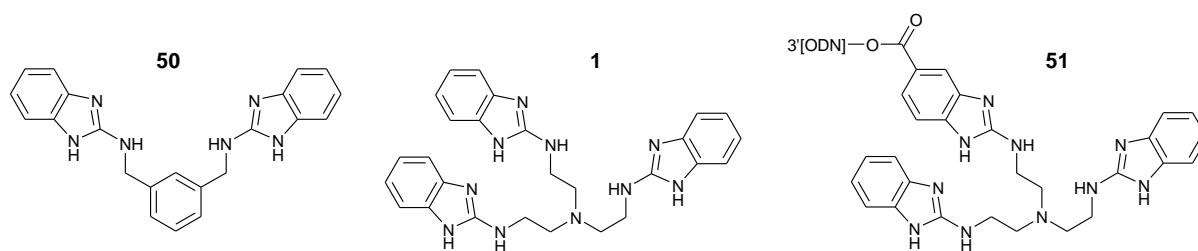


Verbindungen mit Guanidinium-Gruppen katalysieren zwar häufig die Spaltung der Phosphordiesterbindung von Modellphosphaten bzw. Umesterungs-Reaktionen an Phosphordiestern, doch geschieht dies meist in nicht wässrigen Lösungsmitteln. Der Wechsel von Modellphosphaten hin zu RNA und von nicht wässriger Lösung hin zu wässriger Lösung führt in der Regel zu einem kompletten oder zumindest starken Rückgang der katalytischen Aktivität.<sup>[7]</sup> Auch in unserer Gruppe wurde diese Beobachtung gemacht: Die Bisguanidinium-Verbindungen **48** und **49** katalysierten zwar die Umesterung eines Phosphordiesters in DMF effektiv,<sup>[84]</sup> die Katalyse der RNA-Hydrolyse in wässriger Lösung gelang jedoch nicht.<sup>[7][79][77]</sup> Der Grund dafür ist – neben der verringerten Ionenpaarstabilität in Wasser und der Solvathülle der reagierenden Phosphate, die eine Annäherung der Guanidinium-Gruppe erschwert – wohl vor allem der zu hohe  $pK_a$ -Wert der Guanidinium-Gruppen im Bereich von 14, der dafür sorgt, dass die Guanidinium-Gruppen bei einem neutralen pH-Wert vollständig protoniert vorliegen und daher nicht an Protonentransferschritten teilhaben können.<sup>[7]</sup>



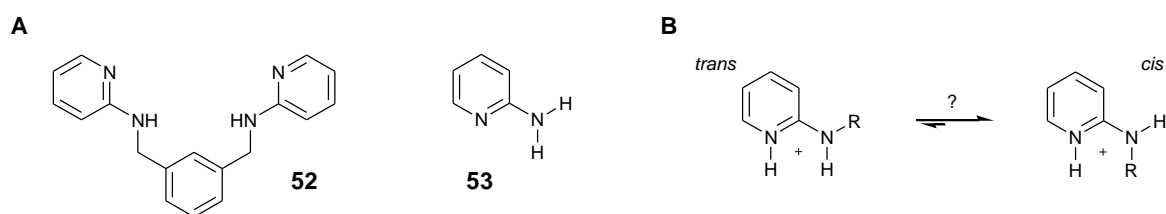
**Abbildung 23:** Bisguanidine zur Katalyse von Transphosphorylierungsreaktionen.

Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Forschung in unserer Gruppe Guanidinanaloga mit einem  $pK_a$ -Wert im Bereich von  $7 \pm 1$  als Spalter getestet. Zu diesen gehörten auch Bis- und Tris(2-aminobenzimidazol) **50** und **1**. Beide spalteten in wässriger Lösung sowohl lineare RNA als auch RNA mit einer Sekundärstruktur (37 °C, pH 6), wobei **1** mit der zusätzlichen 2-Aminobenzimidazol-Einheit die höhere Spaltaktivität besaß und in 20 h über 90 % des linearen RNA-Substrats spaltete. Das Anfügen einer Carbonsäuregruppe an eine der Benzimidazol-Gruppen ermöglichte die Konjugation des Spalters an Oligodesoxyribonucleotide (**51**). Konjugate vom Typ **51**, bei denen Länge und Sequenz der verwendeten DNA variierten, spalteten das jeweils komplementäre RNA-Substrat effizient und sequenzspezifisch mit Halbwertszeiten im Bereich von 12 bis 17 h.<sup>[85]</sup>



**Abbildung 24:** RNA-Spalter auf der Basis von 2-Aminobenzimidazol.

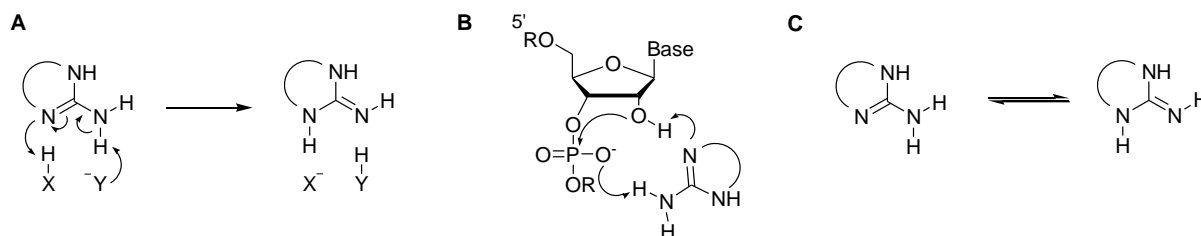
Spaltexperimente mit weiteren Verbindungen mit einem  $pK_a$ -Wert im Bereich von 6 – 8 zeigten, dass ein  $pK_a$ -Wert im annähernd neutralen Bereich allein offenbar nicht ausreicht, um hohe Spaltaktivitäten zu erzielen. So spalteten Verbindungen mit 2-Aminopyridin-Einheiten wie das Bis(2-aminopyridin) **52** ( $pK_a \approx 6.2$ ) verschiedene RNA-Substrate nur in äußerst geringen Mengen. Eine möglichere Erklärung hierfür schien zunächst die fehlende  $C_2$ -Symmetrie der exocyclischen C-N-Bindung zu sein. Aufgrund der fehlenden Symmetrie existieren zwei Konformere, von denen lediglich das *trans*-Konformer über zwei parallele N-H-Bindungen verfügt, um stabile Ionenpaare mit den Phosphatgruppen der RNA zu bilden. Geht man davon aus, dass – analog zur Peptid-Bindung – die *cis*-Konformation bevorzugt ist, wäre der Anteil an aktivem Katalysator möglicherweise zu gering, um höhere Spaltaktivitäten zu erzielen.<sup>[7]</sup>



**Abbildung 25:** 2-Aminopyridin-Derivate (A) und mögliches Konformerengleichgewicht (B).

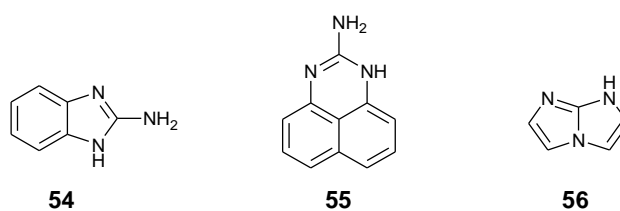
Gegen diese Erklärung spricht jedoch die Tatsache, dass auch das an der Amino-Gruppe unsubstituierte 2-Aminopyridin **53** ( $pK_a \approx 6.7$ ) selbst bei hohen Konzentrationen keine signifikante Spaltaktivität zeigt,<sup>[8]</sup> obwohl die exocyclische C-N-Bindung in diesem Fall  $C_2$ -symmetrisch ist und daher keine unterschiedlichen Konformere vorliegen. Die Betrachtung des möglichen Katalysemechanismus liefert eine Hypothese, mit der die mangelnde Spaltaktivität in beiden Fällen erklärt werden könnte: Verbindungen mit einem  $pK_a$ -Wert im annähernd neutralen Bereich können grundsätzlich sowohl als Säure als auch als Base fungieren. Geschieht beides zur gleichen Zeit – wird also das cyclische Stickstoffatom protoniert und die exocyclische Aminogruppe gleichzeitig deprotoniert – so kommt es zu einem

sogenannten Protonenshuttle und das Molekül geht vom Amino- in das Imino-Tautomer über (Abbildung 26 **A**). Ein solcher Mechanismus ist auch für die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen durch Guanidinanaloga denkbar (Abbildung 26 **B**). Damit der doppelte Protonentransfer möglich ist, sollte die Energiebarriere zwischen der Amino- und der Iminoform möglichst gering sein (Abbildung 26 **C**).



**Abbildung 26:** Möglicher Mechanismus eines Protonenshuttles. **A:** Allgemeiner Mechanismus. **B:** Protonenshuttle bei der Spaltung einer Phosphordiesterbindung. **C:** Energiebarriere zwischen Amino- und Iminoform.

Um die Tragfähigkeit dieser Hypothese zu überprüfen, wurden im Rahmen der Doktorarbeit von K. Dörr die Energiebarrieren verschiedener Guanidinanaloga berechnet und die Spaltaktivitäten dieser Verbindungen getestet. Die Bestimmung der Energiebarrieren erfolgte dabei mittels einfacher AM1-Rechnungen, da diese zuvor die gleiche Tendenz wie komplexere *ab initio*-Rechnungen von R. Berger gezeigt hatten. Die Ergebnisse der Rechnungen und Spaltexperimente von K. Dörr stützen die Hypothese, dass für eine hohe Spaltaktivität gegenüber RNA die Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer einer Verbindung möglichst klein sein sollte. So zeigten Verbindungen mit eher kleinen Energiedifferenzen wie 2-Aminobenzimidazol **54** oder 2-Aminoperimidin **55** hohe Spaltraten, während 2-Aminopyridin **53**, das keine Spaltung von RNA zeigte, eine vergleichsweise hohe Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer aufweist. Die Spaltaktivität von Imidazoimidazol **56** ist zwar signifikant, jedoch deutlich niedriger als für **55**, obwohl die Energiebarriere aufgrund der Symmetrie des Moleküls bei 0 liegt. Die geringere Spaltaktivität könnte jedoch dadurch bedingt sein, dass **56** – anders als **55** – nach Befunden aus FCS-Experimenten unter den Bedingungen der Spaltexperimente nicht aggregiert, sondern als Einzelmolekül vorliegt.<sup>[8]</sup>



**Abbildung 27:** Im Rahmen der Doktorarbeit von K. Dörr getestete Guanidinanaloga.

### 3 Eigene synthetische Arbeiten

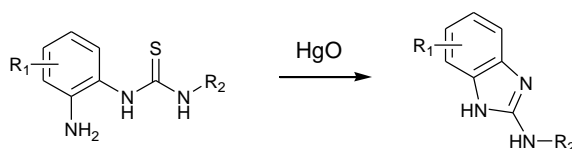
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Synthesen verfolgten mehrere Ziele:

- Die Entwicklung einer quecksilberfreien Syntheseroute für den konjugierbaren RNA-Spalter Tris(2-aminobenzimidazol) **57**
- Die Derivatisierung bekannter RNA-Spalter, insbesondere durch die Anbringung von zur Konjugation geeigneten Gruppen
- Die Synthese neuer, potentiell RNA spaltender Guanidinaloga
- Die Synthese sequenzspezifischer RNA-Spalter durch Konjugation an PNA

Die genaue Vorgehensweise zum Erreichen dieser Ziele ist in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

#### 3.1 Quecksilberfreie Synthese von 2-Aminobenzimidazolderivaten

In der Vergangenheit wurde konjugierbares Tris(2-aminobenzimidazol) **57** in unserer Gruppe über eine sechsstufige Synthese ausgehend von Tris(2-aminoethyl)amin **58** hergestellt.<sup>[7]</sup> Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die Verwendung von giftigem HgO in den beiden Schritten zur Cyclisierung der 2-Aminobenzimidazoleinheiten ausgehend von den entsprechenden Thioharnstoffen. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf mögliche zukünftige *in vivo*-Spaltexperimente, für die eine Kontamination des Spalters mit Quecksilberverbindungen ausgeschlossen werden müsste. Hinzu kommt, dass beide Syntheseschritte die Verwendung mehrerer Äquivalente Quecksilber(II)oxids erfordern und die Ausbeuten teilweise stark schwanken.



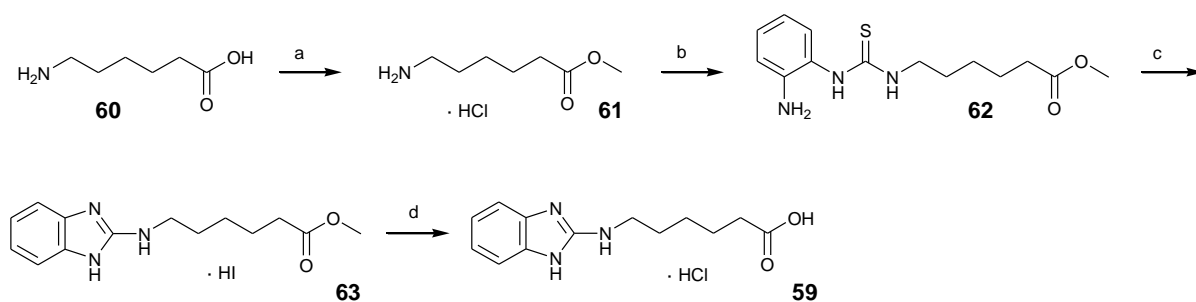
**Abbildung 28:** Ringschluss eines 2-Aminobenzimidazolderivates unter Verwendung von HgO.

Für die Umwandlung von Thioharnstoffen in Guanidine existieren verschiedene alternative Reagenzien zu HgO, die sowohl in Flüssig- als auch an Festphase verwendet werden können. Zu diesen Alternativen gehören neben anderen Schwermetallsalzen wie HgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> oder AgNO<sub>3</sub> auch Carbodiimide wie DIC oder EDCI.<sup>[86]</sup> Letztere haben jedoch den Nachteil, dass

sich die bei der Reaktion als Nebenprodukt gebildeten Harnstoffe häufig nur schlecht vom Produkt abtrennen lassen. Ein weiteres metallfreies Reagenz ist 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid, das sogenannte Mukaiyama-Reagenz, das erstmals von Lipton *et al.* zur Synthese von Guanidinen aus Thioharnstoffen verwendet wurde.<sup>[87]</sup> Um zu überprüfen, ob und unter welchen Bedingungen diese Methode auch zur Darstellung cyclischer Guanidine wie 2-Aminobenzimidazol anwendbar ist, wurde zunächst das konjugierbare Mono(2-aminobenzimidazol)-Derivat **59** synthetisiert.

### 3.1.1 Synthese von konjugierbarem 2-Aminobenzimidazol

Als Edukt für die Cyclisierungsreaktion wurde ein gemischter Thioharnstoff mit einem Diaminophenylrest und einem Aminoalkylrest, über den später die Konjugation des 2-Aminobenzimidazolderivats erfolgen sollte, benötigt. Da in unserer Gruppe in der Vergangenheit für über eine Amidbindung an DNA konjugierte RNA-Spalter meist ein C<sub>6</sub>-Aminolinker als Verbindung zwischen Spalter und Biomolekül verwendet worden war,<sup>[85]</sup> wurde im vorliegenden Fall auf 6-Amino-hexansäure **60** als Alkylrest zurückgegriffen. Diese wurde zunächst mit SOCl<sub>2</sub> in MeOH in den Methylester **61** umgewandelt.<sup>[88]</sup> Für die Darstellung des gemischten Thioharnstoffs **62** wurde TCDI in MeCN zunächst mit **61**, dann mit *o*-Phenylendiamin umgesetzt. Für den ersten Schritt war dabei die Gegenwart einer Base (in diesem Fall DIPEA) nötig, da **61** als Hydrochlorid eingesetzt wurde. Zudem erforderte die schlechte Löslichkeit des Esters **61** im verwendeten Lösungsmittel (MeCN) ein Erwärmen der Reaktionslösung auf 50 °C.



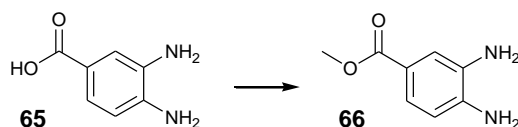
**Abbildung 29:** Synthese von konjugierbarem 2-Aminobenzimidazol. a: SOCl<sub>2</sub>, MeOH (abs.), RT, 24 h, 100 %; b: 1) TCDI, DIPEA, Imidazol, MeCN (abs.), 50 °C, 4.5 h, RT, über Nacht, 2) *o*-Phenylendiamin, MeCN (abs.), 50 °C, 3 h, RT, über Nacht, 75 %; c: Mukaiyama-Reagenz, NEt<sub>3</sub>, DMF (abs.), RT, 4.5 h; 69 %; d: 6 N HCl, 100 °C, 2 h, 70 %.

Der folgende Ringschluss mit dem Mukaiyama-Reagenz zum gewünschten 2-Aminobenzimidazolderivat **63** gelang bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 4.5 h mit einer

Ausbeute von 69 %. Das dabei aus dem Mukaiyama-Reagenz entstehende Nebenprodukt *N*-Methylpyridin-2(1*H*)-thion ist löslich und ließ sich mittels Säulenchromatographie leicht abtrennen. Diese erfolgreiche Übertragung von Liptons Methode auf die Synthese von cyclischen Guanidinen und insbesondere die im Vergleich zum Ringschluss mit HgO sehr milden Reaktionsbedingungen ließen eine Verwendung des Mukaiyama-Reagenzes auch in der Synthese von Tris(2-aminobenzimidazol) **57** sinnvoll erscheinen. Um eine Konjugation von **63** an Nucleinsäuren bzw. Nucleinsäureanaloge zu ermöglichen, wurde der Methylester mit HCl zur freien Carbonsäure **59** hydrolysiert.

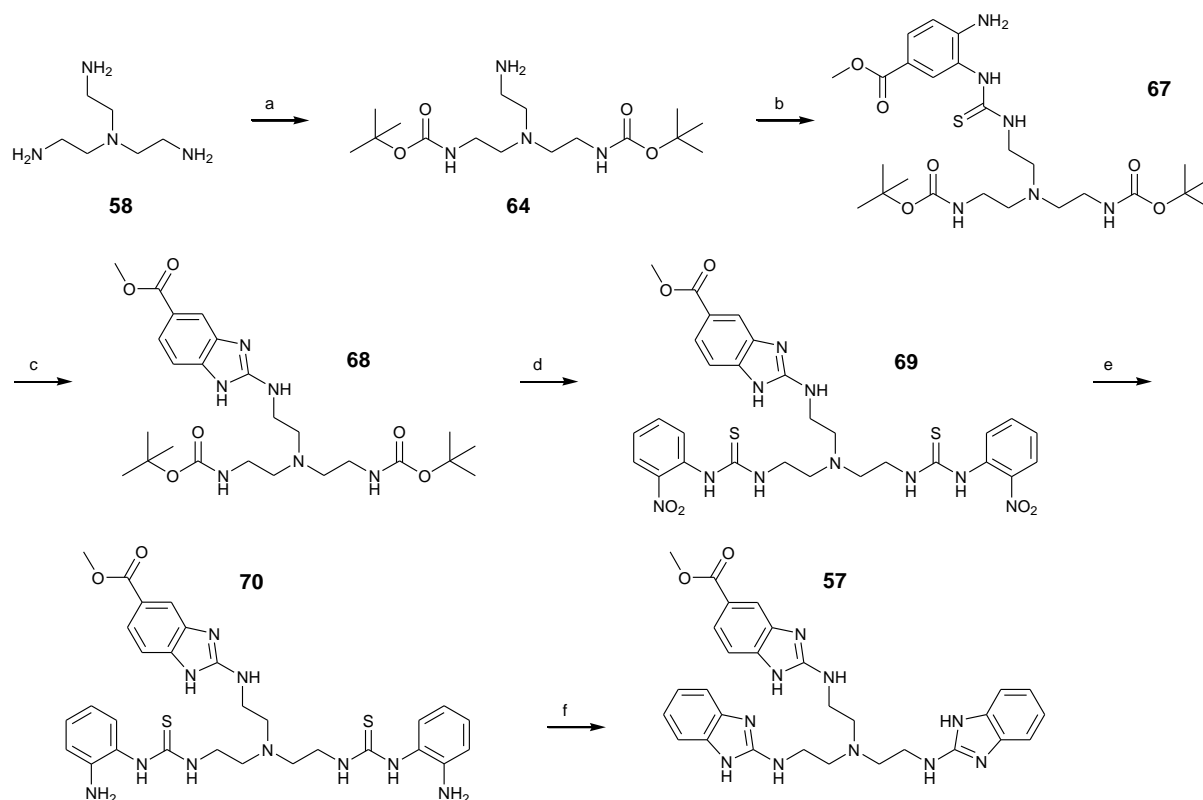
### 3.1.2 Synthese von konjugierbarem Tris(2-aminobenzimidazol)

Für die Synthese von Tris(2-aminobenzimidazol) **57** wurde zunächst analog zum bisherigen Syntheseweg<sup>[7]</sup> Tris(2-aminoethyl)amin **58** an zwei der drei Aminogruppen Boc-geschützt. Aufgrund der dabei ebenfalls entstehenden einfach bzw. dreifach Boc-geschützten Nebenprodukte beträgt die Ausbeute für das gewünschte Produkt **64** nur 45 %. Über die verbliebene freie Aminogruppe wurde durch Umsetzung mit TCDI und Zugabe von 3,4-Diaminobenzoessäuremethylester **66** zum nicht isolierten Zwischenprodukt der gemischte Thioharnstoff **67** erhalten. **66** war zuvor durch Veresterung von 3,4-Diaminobenzoessäure **65** mit SOCl<sub>2</sub> in MeOH erhalten worden.



**Abbildung 30:** Veresterung von 3,4-Diaminobenzoessäure **65**. Reaktionsbedingungen: SOCl<sub>2</sub>, MeOH (abs.), 65 °C, 4 h, 84 %.

Die Cyclisierung der ersten 2-Aminobenzimidazoleinheit wurde nun wie zuvor im Fall von Verbindung **63** durch Umsetzung des Thioharnstoffs mit Mukaiyama-Reagenz in Gegenwart von NEt<sub>3</sub> bei Raumtemperatur erreicht. Nach einer im Vergleich zur Darstellung von **63** etwas längeren Reaktionszeit von 22 h wurde das gewünschte Produkt **68** mit einer Ausbeute von 88 % erhalten. Diese liegt nur geringfügig unter der bei Verwendung von HgO erhaltenen Ausbeute von 97 %.<sup>[7]</sup> Erneut der bisherigen Syntheseroute folgend wurden im nächsten Schritt die beiden Boc-geschützten Aminogruppen entschützt und mit 2-Nitrophenylisothiocyanat zur Reaktion gebracht. Die Nitrogruppen des so erhaltenen Thioharnstoffs **69** wurden mit Wasserstoff unter Katalyse von Palladium auf Aktivkohle reduziert.



**Abbildung 31:** Quecksilberfreie Synthese von Tris(2-aminobenzimidazol) **57**. a: Boc-ON, THF (abs.), 0 °C - RT, 46 h, 45 %; b: 1) TCDI, Imidazol, MeCN (abs.), 0 °C - RT, 1 h; 2) **66**, MeCN (abs.), 50 °C, 4 h, RT, über Nacht, 79 %; c: Mukaiyama-Reagenz, NEt<sub>3</sub>, DMF (abs.), 22 h, RT, 88 %; d: 1) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C - RT, 3 h; 2) 2-Nitrophenylisothiocyanat, NEt<sub>3</sub>, EtOH, 0 °C - RT, über Nacht, 90 %; e: 45 bar H<sub>2</sub>, Pd/C (10 %), MeOH ges. mit NH<sub>3</sub>, 60 °C, 5 h, RT, über Nacht, 37 %; f: Mukaiyama-Reagenz, NEt<sub>3</sub>, DMF (abs.), 22 h, RT, 56 %.

Nun wurden durch erneute Umsetzung mit dem Mukaiyama-Reagenz in Gegenwart von NEt<sub>3</sub> bei Raumtemperatur die beiden noch fehlenden 2-Aminobenzimidazoleinheiten gebildet. Dies gelang nach einer Reaktionszeit von 22 h mit einer Ausbeute von 56 % nach HPLC-Aufreinigung. Die entsprechende Reaktion unter Verwendung von HgO wird in der Literatur mit einer Ausbeute von 58 % beschrieben.<sup>[7]</sup> Somit wurde eine quecksilberfreie Methode zur Synthese von Tris(2-aminobenzimidazol) **57** entwickelt, bei der die Ausbeuten im gleichen Bereich wie bei Synthese unter Verwendung von HgO liegen. Gleichzeitig sind die Reaktionsbedingungen der beiden Cyclisierungsschritte im vorliegenden Fall sehr viel milder. Hinzu kommt, dass das Problem der schwankenden Ausbeuten bei der Cyclisierung mit HgO, das in der Vergangenheit häufig aufgetreten war, bei Verwendung des Mukaiyama-Reagenzes nicht beobachtet werden konnte: Die guten Ausbeuten konnten mehrfach reproduziert werden.

## 3.2 Synthese verschiedener 2-Aminoperimidin-Derivate

Im Rahmen der Dissertation von K. Dörr<sup>[8]</sup> war 2-Aminoperimidin **55** als ein bereits bei Konzentrationen im  $\mu\text{M}$ -Bereich sehr aktiver RNA-Spalter identifiziert worden. Die nähere Untersuchung dieser Verbindung machte die Synthese verschiedener – möglichst konjugierbarer – 2-Aminoperimidin-Derivate erforderlich. Die Darstellung und Umsetzung von 2-Aminoperimidinderivaten erwies sich als äußerst schwierig; häufig wurden statt des erwünschten Produkts nur schwerlösliche, grünschwarze Feststoffe erhalten. Möglicherweise handelte es sich dabei um trotz der Arbeit unter Argon als Schutzgas entstandene Oxidationsprodukte des 2-Aminoperimidins, das aufgrund seiner hohen Elektronendichte für seine Oxidationsempfindlichkeit als freie Base bekannt ist.<sup>[89]</sup> Die Hydrochloride, Hydrobromide bzw. TFA-Salze der 2-Aminoperimidinderivate erwiesen sich als sehr viel stabiler und ließen sich problemlos auch über einen längeren Zeitraum aufbewahren.

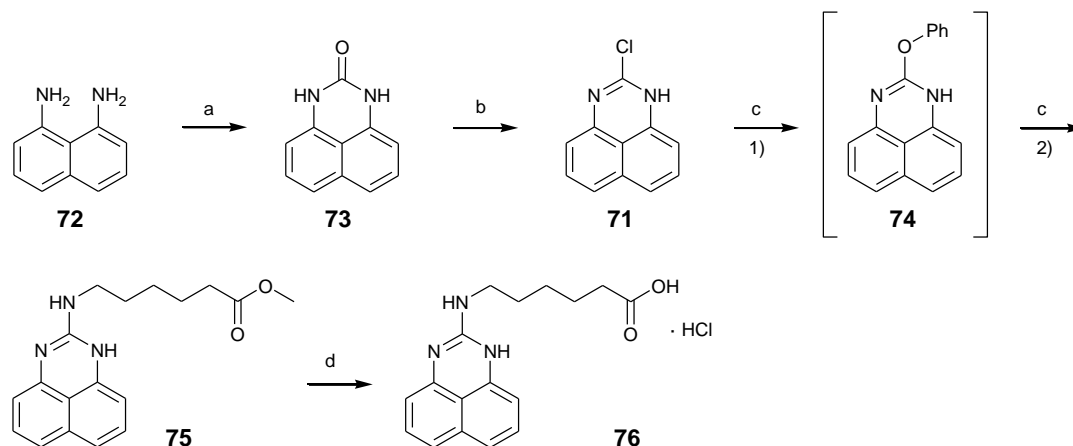
### 3.2.1 Modifikation der 2-Aminogruppe

M. Zeiger hatte im Rahmen seiner Diplomarbeit<sup>[90]</sup> verschiedene, an der 2-Aminogruppe alkylierte 2-Aminoperimidin-Derivate dargestellt, indem er 2-Chlorperimidin **71** mit primären Aminen mit den gewünschten Alkylresten umgesetzt hatte. Diese Route wurde auch in der vorliegenden Synthese eines konjugierbaren, an der 2-Aminogruppe alkylierten 2-Aminoperimidin-Derivats verfolgt. Als Linker für die Konjugation wurde dabei wie schon im Fall des derivatisierten 2-Aminobenzimidazols **63** (siehe 3.1.1) 6-Aminohexansäuremethylester **61** verwendet.

2-Chlorperimidin **71** wurde in zwei Schritten durch Umsetzung von 1,8-Diaminonaphthalin **72** mit CDI zum cyclischen Harnstoff **73**<sup>[90]</sup> und anschließende Weiterreaktion mit  $\text{POCl}_3$ <sup>[91]</sup> erhalten. Der Versuch, **71** analog zu der von M. Zeiger beschriebenen Methode mit 6-Aminohexansäuremethylester **61** in siedendem Ethanol zur Reaktion zu bringen, führte nicht zum gewünschten Produkt. Dies änderte sich auch nicht nach Zugabe eines Äquivalents DIPEA, um die als Hydrochlorid vorliegende Verbindung **61** in das freie Amin umzuwandeln. Die erfolgreiche Umsetzung zu **75** gelang schließlich durch Verwendung einer von J.M. Herbert beschriebenen Variante, bei der 2-Chlorperimidin **71** zunächst für 20 min in Phenol auf 110 °C erhitzt wird, wobei sich 2-Phenoxyperimidin **74** bildet, welches *in situ* mit einem primären Amin versetzt wird und zum gewünschten 2-aminoalkylierten Produkt reagiert.<sup>[91]</sup>



Einzigste Abweichung zur von J.M. Herbert beschriebenen Variante war im zweiten Reaktionsschritt die Zugabe von DIPEA zur Bildung des freien Amins von **61**.



**Abbildung 32:** Synthese eines konjugierbaren, an der 2-Aminogruppe alkylierten 2-Aminoperimidin-Derivats. a: CDI, DCM (abs.), RT, 1 h, 89 %; b: POCl<sub>3</sub>, 107 °C, 4 h, 95 %; c: 1) Phenol, 110 °C, 20 min, 2) **61**, DIPEA, 110 °C, 4 h, 48 %; d: 6 N HCl, 100 °C, 4 h, 91 %.

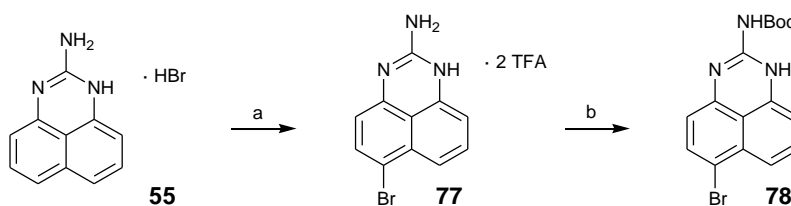
Um die Konjugation an DNA oder PNA zu ermöglichen, wurde **75** durch Hydrolyse in siedender halbkonzentrierter HCl in das Hydrochlorid der freien Carbonsäure (**76**) überführt.

### 3.2.2 Modifikation des Naphthylrings

Da RNA-Spaltexperimente mit an der 2-Aminogruppe alkylierten Aminoperimidin-Derivaten im Vergleich zu unmodifiziertem 2-Aminoperimidin einen Rückgang der Spaltaktivität gezeigt hatten<sup>[8]</sup> (siehe auch Kapitel 5.2.5), wurde neben der Modifikation der 2-Aminogruppe auch eine Modifikation des Naphthylrings angestrebt. Dabei bestand die Hoffnung, die Anbringung von Substituenten an den Naphthylring werde die Spalteigenschaften des Moleküls weniger beeinflussen als eine Alkylierung der Aminogruppe.

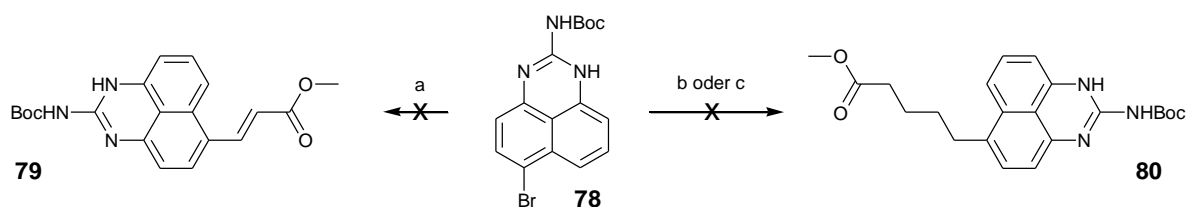
#### 3.2.2.1 2-Amino-6-bromperimidin und der Versuch einer Kreuzkupplung

Eine Möglichkeit, 2-Aminoperimidin **55** direkt am Naphthylring zu modifizieren, besteht in der Bromierung von **55** mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TFA.<sup>[92]</sup> Dabei wird keine externe Bromquelle benötigt, da das Edukt als Hydrobromid vorliegt und dadurch HBr in der Reaktionslösung zur Verfügung steht. Das einfach bromierte Produkt **77** fällt als zweifaches TFA-Salz aus der Lösung aus und kann so problemlos mit hohem Reinheitsgrad isoliert werden.



**Abbildung 33:** Bromierung von 2-Aminoperimidin und anschließende Boc-Schützung. a:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %), TFA, RT, 50 min, 67 %; b: 1) DOWEX ( $\text{Cl}^-$ -Form), 2)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NEt}_3$ , Aceton, RT, 66 h, 76 %.

Es wurde nun angestrebt, den Bromsubstituenten mittels Palladium-katalysierter Kreuzkupplungsreaktion durch einen Alkylrest zu ersetzen. Durch Umsetzung von **77** mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  wurde die an der 2-Aminogruppe Boc-geschützte Verbindung **78** erhalten, die bei den folgenden Kreuzkupplungstestreaktionen als Edukt diente. Zunächst wurde eine Heckreaktion<sup>[93]</sup> versucht. **78** wurde dafür unter in unserer Arbeitsgruppe bereits für die Synthese nicht-natürlicher Aminosäuren verwendeten, ligandenfreien Bedingungen<sup>[94]</sup> mit Acrylsäuremethylester umgesetzt. Dabei diente  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  als Katalysator,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  als Base und  $\text{Bu}_4\text{NOTf}$  als Promotor; als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Wasser und DMF verwendet. Die Reaktionszeit wurde so gewählt, dass die DC-Kontrolle den vollständigen Verbrauch des Edukts anzeigte. In allen Testansätzen wurde eine dunkelgrüne Suspension erhalten, aus der kein Kreuzkupplungsprodukt isoliert werden konnte.



**Abbildung 34:** Versuch der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung von Boc-geschütztem 2-Amino-6-bromperimidin. a: Methylacrylat,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Bu}_4\text{NOTf}$ , DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 55 °C, 5 h, RT, 15 h; b: 5-(9-BBN)pentansäuremethylester (4-Pentensäuremethylester **81**, 9-BBN, THF (abs.), RT, 4 h),  $[\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2]$ , NaOMe, THF/DMF (abs.), 80 °C, 2 h; c: 5-(9-BBN)pentansäuremethylester (4-Pentensäuremethylester **81**, 9-BBN, THF (abs.), RT, 4 h),  $[\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2]$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , THF/DMF (abs.), 80 °C, 4.5 h, RT, 17 h.

Als Alternative wurde – analog zu einer von Esteban *et al.* durchgeführten Kupplung von 4-(9-BBN)butansäuremethylester an verschiedene Arylbromide<sup>[95]</sup> – die Suzuki-Kupplung<sup>[96]</sup> mit dem aus 4-Pentensäuremethylester **81** und 9-BBN erzeugten und nicht isolierten 5-(9-BBN)pentansäuremethylester versucht, wobei  $[\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2]$  als Katalysator und eine Mischung aus THF und DMF als Lösungsmittel verwendet wurden. DMF wurde dabei zur Verbesserung der Löslichkeit des Edukts hinzugegeben. Als Base wurde zunächst NaOMe, in einem weiteren Testansatz  $\text{K}_2\text{CO}_3$  verwendet. In beiden Ansätzen wurde mittels DC-Kontrolle

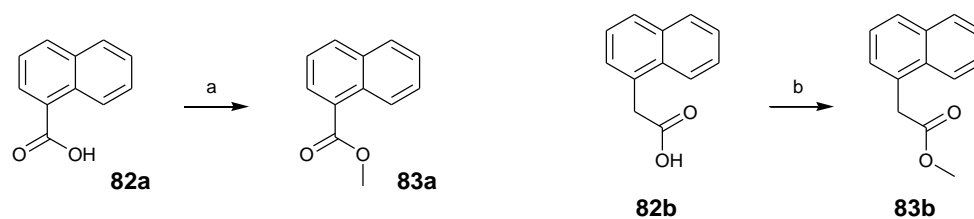
der vollständige Verbrauch des Edukts beobachtet, das gewünschte Kreuzkupplungsprodukt konnte jedoch nicht aus der erneut dunkelgrünen Reaktionslösung isoliert werden.

Die Tatsache, dass Versuche, die freie Base von 2-Amino-6-bromperimidin **77** zu erzeugen, zur Zersetzung der Verbindung führten<sup>[92]</sup>, legt nahe, dass sich das Edukt **78** unter den gewählten Reaktionsbedingungen zersetzt hat, da sowohl die Heck- als auch die Suzuki-Kupplung in Gegenwart einer Base durchgeführt werden. Möglicherweise hätte eine Negishi-Kupplung<sup>[97]</sup> in diesem Fall zum Ziel geführt, kann doch bei dieser Kreuzkupplungsreaktion auf den Einsatz einer Base verzichtet werden. Allerdings sind auch die für diese Kreuzkupplungsreaktion benötigten Oragnozink-Verbindungen basisch. Die Negishi-Kupplung wurde in der vorliegenden Arbeit daher nicht getestet, stattdessen wurde eine komplett andere Route zur Synthese von am Naphthylring substituierten 2-Aminoperimidinderivaten gewählt.

### 3.2.2.2 Synthese von 2-Aminoperimidin-Derivaten ausgehend von substituierten Naphthalinbausteinen

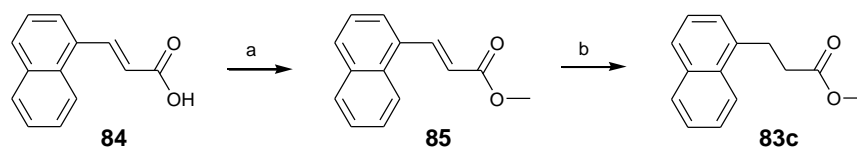
Die beobachteten Schwierigkeiten bei Reaktionen von 2-Aminoperimidin und seinen Derivaten ließen eine neue Strategie in den Fokus rücken: Die Verwendung bereits substituierter Naphthalinverbindungen zum Aufbau des 2-Aminoperimidin-Gerüsts. Ein solcher Weg würde zwar mehr Reaktionsschritte benötigen als die direkte Modifikation von **55** oder **78**, hätte jedoch den Vorteil, dass Reaktionen von Verbindungen mit der empfindlichen 2-Aminoperimidin-Gruppe vermieden würden. Da eine Vielzahl substituierter Naphthalinbausteine kommerziell erhältlich ist, muss die Einführung von Alkylresten am Naphthylring nicht selbst durchgeführt werden.

Um eine Konjugation an DNA oder PNA zu ermöglichen, wurden Naphthalinderivate mit Carbonsäureresten als Edukte gewählt, wobei der Carbonsäurerest sich entweder direkt am Naphthylring befinden sollte (**82a**) oder aber im Fall des Essig- (**82b**) bzw. Propionsäurerests im Abstand von einer bzw. zwei Methyleneinheiten. Die freie Carbonsäure wurde zunächst in den entsprechenden Methylester umgewandelt: **82a** wurde dafür mit Oxalylchlorid ins Säurechlorid<sup>[98]</sup> und dann durch Zugabe von Methanol in Verbindung **83a** überführt.<sup>[99]</sup> **82b** wurde mit  $\text{SOCl}_2$  in MeOH zu **83b** umgesetzt.<sup>[100]</sup>



**Abbildung 35:** Veresterung der Naphthalinderivate **82a** und **82b**. a: 1)  $(\text{COCl})_2$ , DMF, DCM (abs.),  $0^\circ\text{C}$  - RT, 14 h, 2) MeOH,  $0^\circ\text{C}$  - RT, 3 h, 96 %; b:  $\text{SOCl}_2$ , MeOH (abs.),  $0^\circ\text{C}$  - RT, 20 h, 98 %.

Als Edukt für die Synthese eines 2-Aminoperimidinderivats mit einem Propionsäurerest wurde anstelle von 3-(1-Naphthyl)propionsäure die günstigere und besser verfügbare 3-(1-Naphthyl)acrylsäure **84** verwendet. Diese wurde durch Umsetzung mit  $\text{SOCl}_2$  in MeOH zum Methylester **85** verestert und mit  $\text{H}_2$  und Palladium auf Aktivkohle zu **83c** reduziert.<sup>[101]</sup>

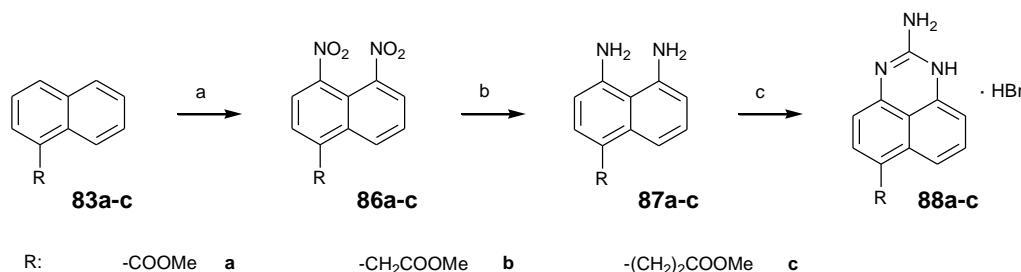


**Abbildung 36:** Synthese von 3-(1-Naphthyl)propionsäuremethylester **83c**. a:  $\text{SOCl}_2$ , MeOH (abs.),  $0^\circ\text{C}$  - RT, 20 h, 97 %; b: 5 bar  $\text{H}_2$ , Pd/C (10 %), EtOAc (abs.), 4 h, 97 %.

Die Nitrierung der Verbindungen **83a-c** wurde wie von C. F. Koelsch und D. O. Hoffman für **83a** beschrieben<sup>[102]</sup> durchgeführt. Anders als in der Literatur dargestellt, konnte jedoch das 4,5-dinitrierte Produkt **86a** auch nach mehrfachem Umkristallisieren aus Toluol bzw. aus Eisessig nicht sauber von allen Nebenprodukten abgetrennt werden, die durch Mono- oder Dinitrierung in verschiedenen Positionen des Naphthylrings entstehen. Auch nach säulenchromatischer Aufreinigung wurde lediglich ein 2:1-Gemisch von **86a** und dem 3,5-dinitrierten Isomer erhalten. Nach Reduktion des Gemisches mit  $\text{Et}_3\text{SiH}$  unter Katalyse von Palladium auf Aktivkohle<sup>[103]</sup> war eine säulenchromatographische Trennung beider Isomere möglich, so dass **87a** sauber isoliert werden konnte.

Die folgende Cyclisierung zum 2-Aminoperimidinderivat **88a** erwies sich als schwierig. Ein in der Literatur häufig für solche Zwecke sowohl im Fall von 2-Aminoperimidin-Derivaten<sup>[104]</sup> als auch im Fall der Synthese von 2-Aminobenzimidazol ausgehend von 1,2-Diaminobenzol<sup>[105]</sup> verwendetes Reagenz ist Cyanamid. Verschiedene Versuche, **87a** als Hydrochlorid oder freies Amin in Anlehnung an diese Vorschriften in **88a** umzuwandeln, schlugen allesamt fehl bzw. ergaben das Produkt in verunreinigter Form und mit sehr niedrigen Ausbeuten. Auch die Verwendung von Cyanbromid anstelle von Cyanamid nach der von Dasgupta *et al.* für die Synthese von 2-Aminoperimidin-Hydrobromid beschriebenen Methode<sup>[106]</sup> gelang

zunächst nicht. Erst ein Wechsel des Lösungsmittels von dem von Dasgupta *et al.* verwendeten Benzol hin zu DCM brachte schließlich Erfolg. Das gewünschte Produkt **88a** fiel als Hydrobromid aus und konnte nach Waschen mit Aceton analysenrein und in guten Ausbeuten isoliert werden.



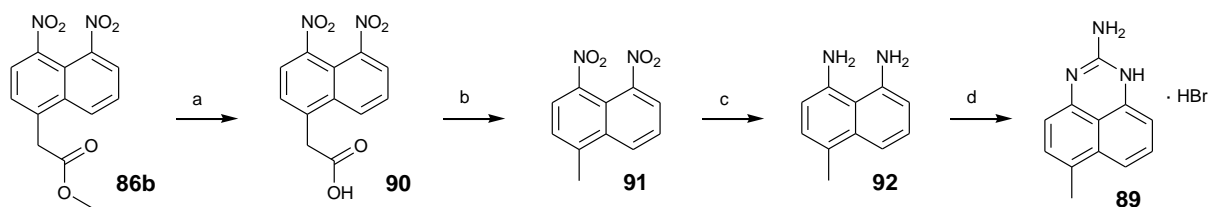
**Abbildung 37:** Synthese verschiedener am Naphthylring substituierter 2-Aminoperimidin-Derivate. a: HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -5 °C, 5 – 10 min, 36 – 42 %; b: für **87a** und **b**: Et<sub>3</sub>SiH, Pd/C (10 %), MeOH (abs.), RT, 20 min (**87a**: 16 % über 2 Schritte, **87b**: 91 %), für **87c**: 4 bar H<sub>2</sub>, Pd/C (abs.), EtOAc (abs.), RT, 23 h, 84 %; c: BrCN, DCM (abs.), 40 °C, 4.5 – 20 h, RT, 0 – 16 h, 40 – 76 %.

Die Synthesen von **88b** und **88c** wurden analog durchgeführt. In beiden Fällen war es allerdings möglich, die nitrierten Verbindungen **86b** und **86c** durch Säulenchromatographie sauber zu isolieren, so dass für die folgende Reduktion kein Gemisch eingesetzt werden musste. Aufgrund der geringen Löslichkeit von **86c** im für die Reduktion mit Et<sub>3</sub>SiH verwendeten Lösungsmittel konnte die Reduktion nicht wie zuvor beschrieben mit Et<sub>3</sub>SiH unter Palladium-Katalyse bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Stattdessen wurde die Suspension von **86c** in EtOAc im Autoklaven bei einem Wasserstoff-Druck von 4 bar in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle umgesetzt und so das Diamin **87c** erhalten, wobei eine deutlich längere Reaktionszeit (23 h) als bei den zuvor mit Et<sub>3</sub>SiH durchgeführten Reduktionen (20 min) nötig war. Die anschließende Cyclisierung zu **88b** und **88c** erfolgte analog zur Synthese von **88a**, wobei der Cyclisierungsschritt für **88c** mit einer nur etwas mehr als halb so hohen Ausbeute gelang wie in den anderen beiden Fällen. Alle drei Verbindungen wurden als Hydrobromid isoliert und konnten in dieser Form auch über einen längeren Zeitraum hinweg stabil gelagert werden.

### 3.2.2.3 Synthese von 2-Amino-6-methylperimidin **89**

Die Synthese von 2-Amino-6-methylperimidin **89** ging nicht von 1-Methylnaphthalin, sondern von **86b** aus. Dafür wurde der dinitrierte Methylester **86b** zunächst durch Reaktion in siedender halbkonzentrierter HCl zur Carbonsäure **90** hydrolysiert. Durch Umsetzung der freien Carbonsäure mit NEt<sub>3</sub> bei Raumtemperatur wurde durch Decarboxylierung mit fast

quantitativer Ausbeute 1-Methyl-4,5-dinitronaphthalin **91** erhalten (siehe auch Kapitel 3.2.3.2). Decarboxylierungen von Nitroarylessigsäure-Derivaten unter milden Bedingungen sind aus der Literatur bekannt, wobei teilweise ein Erwärmen der Reaktionslösung nötig ist.<sup>[107]</sup> Im vorliegenden Fall liegt durch die beiden Nitrosubstituenten ein besonders elektro-nenarmer Aromat vor, so dass die Decarboxylierung besonders leicht abläuft.



**Abbildung 38:** Synthese von 2-Amino-6-methylperimidin **89**. a: 6 N HCl, 100 °C, 2 h 15 min, 89 %; b: NEt<sub>3</sub>, Aceton, RT, 3 h, 97 %; c: Et<sub>3</sub>SiH, Pd/C (10 %), MeOH (abs.), RT, 18 min, 93 %; d: BrCN, DCM (abs.), 40 °C, 4.5 h, 84 %.

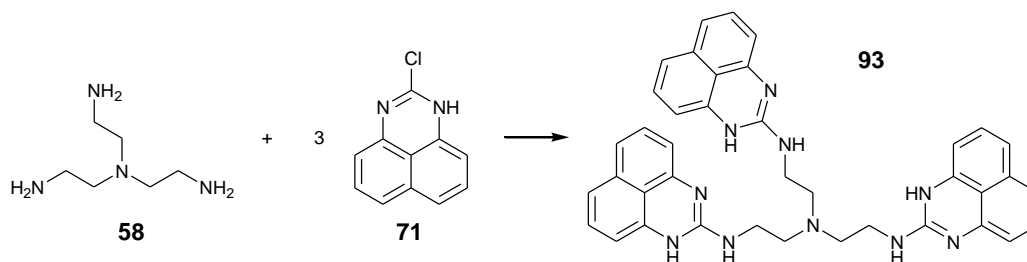
**91** wurde unter den bereits etablierten Reaktionsbedingungen mit Et<sub>3</sub>SiH unter Palladium-Katalyse zum Diamin **92** reduziert und dann mit BrCN zum Hydrobromid des gewünschten 2-Aminoperimidin-Derivats **89** umgesetzt.

### 3.2.3 Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten

Da ein Grund für die hohe Spaltaktivität des Tris(2-aminobenzimidazol)s **57** das Vorhandensein mehrerer spaltaktiver Einheiten ist, wurde die Synthese von Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten angestrebt, um diese mit **57** vergleichen zu können. Analog zu den bisher im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen 2-Aminoperimidin-Derivaten wurden auch hierfür zwei Strategien verfolgt: Die Verknüpfung über die 2-Aminogruppe sowie die Verknüpfung über den Naphthylring.

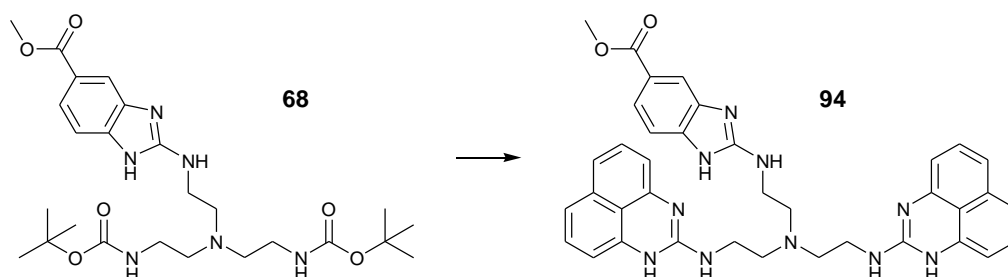
#### 3.2.3.1 Verknüpfung über die 2-Aminogruppe

Erste Zielverbindung war das zum nicht funktionalisierten Tris(2-aminobenzimidazol) **1**<sup>[7]</sup> analoge Tris(2-aminoperimidin) **93**, welches in einem Schritt durch Umsetzung von Tris(2-aminoethyl)amin **58** mit drei Äquivalenten 2-Chlorperimidin **71** in siedendem Ethanol mit einer Ausbeute von 72 % erhalten werden konnte.



**Abbildung 39:** Synthese von Tris(2-aminoperimidin) **93**. EtOH (abs.), 78 °C, 4 h, 72 %.

**93** trägt zwar drei 2-Aminoperimidin-Einheiten, besitzt jedoch keine geeignete funktionelle Gruppe, die eine Konjugation an PNA oder DNA ermöglichen würde. Aus diesem Grund wurde ausgehend von Tris(2-aminobenzimidazol)-Vorläufer **68** eine Verbindung dargestellt, die zwei 2-Aminoperimidin- sowie eine mit einer Carbonsäureestergruppe versehene 2-Aminobenzimidazoleinheit trägt. Dafür war zunächst die Entschützung der beiden Aminogruppen von **68** nötig, bevor durch Umsetzung mit 2-Chlorperimidin **71** in Gegenwart von  $\text{NEt}_3$  in siedendem EtOH die Zielverbindung **94** mit einer Ausbeute von 40 % erhalten werden konnte.

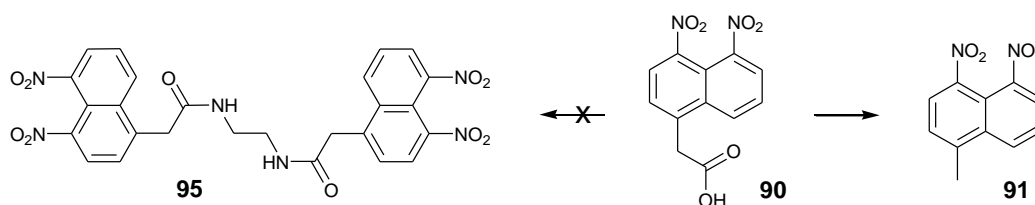


**Abbildung 40:** Synthese von **94**. 1)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH (abs.), RT, 3 h, 2) 2-Chlorperimidin **71**,  $\text{NEt}_3$ , EtOH (abs.), 78 °C, 5 h, 40 %.

### 3.2.3.2 Verknüpfung über den Naphthyling

Aufgrund der bereits beobachteten Empfindlichkeit der 2-Aminoperimidin-Einheit wurde angestrebt, diese Einheit erst im letzten Schritt der Synthese durch Cyclisierung mit  $\text{BrCN}$  zu bilden. Zunächst wurde die Darstellung einer Verbindung mit zwei über den Naphthyling verknüpften 2-Aminoperimidin-Einheiten durchgeführt, um die Machbarkeit dieses Konzepts zu testen. Als Linker zwischen den beiden Einheiten diene dabei Ethylendiamin. Die mit Carbonsäureresten versehenen Naphthyleinheiten sollten über Amidbindungen mit dem Linker verknüpft werden. Als Edukt für die Naphthyleinheiten sollten dinitrierte Zwischenstufen aus den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Synthesen dienen.

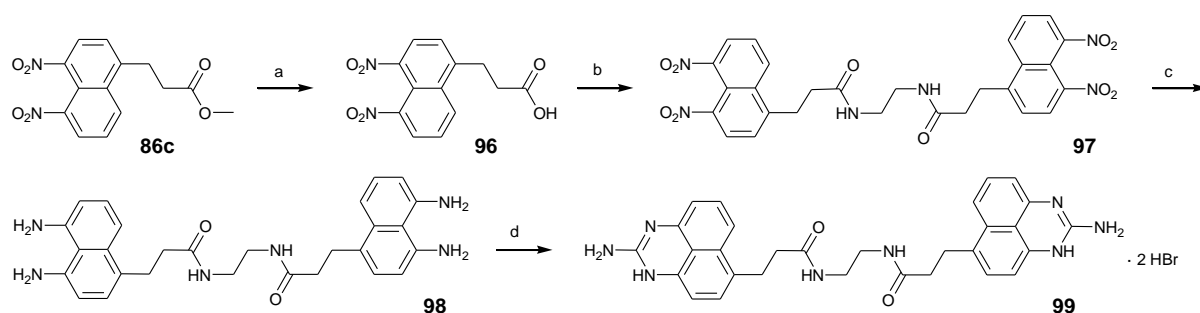
Da der 4,5-dinitrierte 1-Naphthoesäuremethylester **86a** nur im Gemisch mit einem anderen Isomer hatte isoliert werden können, kam er als Edukt nicht in Frage, da es fragwürdig schien, ob eine Trennung der beiden Isomere nach erfolgter Hydrolyse auf der Stufe der freien Carbonsäuren besser möglich wäre. Stattdessen wurde zunächst das mit einem Essigsäuremethylesterrest versehene 4,5-Dinitroderivat **86b** als Ausgangsmaterial gewählt, das durch Umsetzung in siedender halbkonzentrierter HCl in die freie Carbonsäure **90** überführt werden konnte. Alle Versuche, **90** nach Aktivierung des Carbonsäurerests mit DIC und HOBt in Gegenwart von  $\text{NEt}_3$  mit Ethylendiamin umzusetzen, führten jedoch lediglich zur Decarboxylierung der Carbonsäure (vgl. Kapitel 3.2.2.3). Auch die Umwandlung von **90** zum entsprechenden Carbonsäurechlorid und anschließende Reaktion mit Ethylendiamin ohne Zugabe einer externen Base führte nicht zum Ziel. In diesem Fall wurde trotz langer Reaktionszeit lediglich das Edukt sowie in Teilen die decarboxylierte Verbindung **91** erhalten.



**Abbildung 41:** Misslungene Synthese von **95**. Getestete Reaktionsbedingungen: HOBt, DIC,  $\text{NEt}_3$ , Ethylendiamin, DMF (abs.), RT, 18 h oder 1)  $\text{SOCl}_2$ , DCM (abs.), RT, 20 h, 2) Ethylendiamin, RT, 6 Tage.

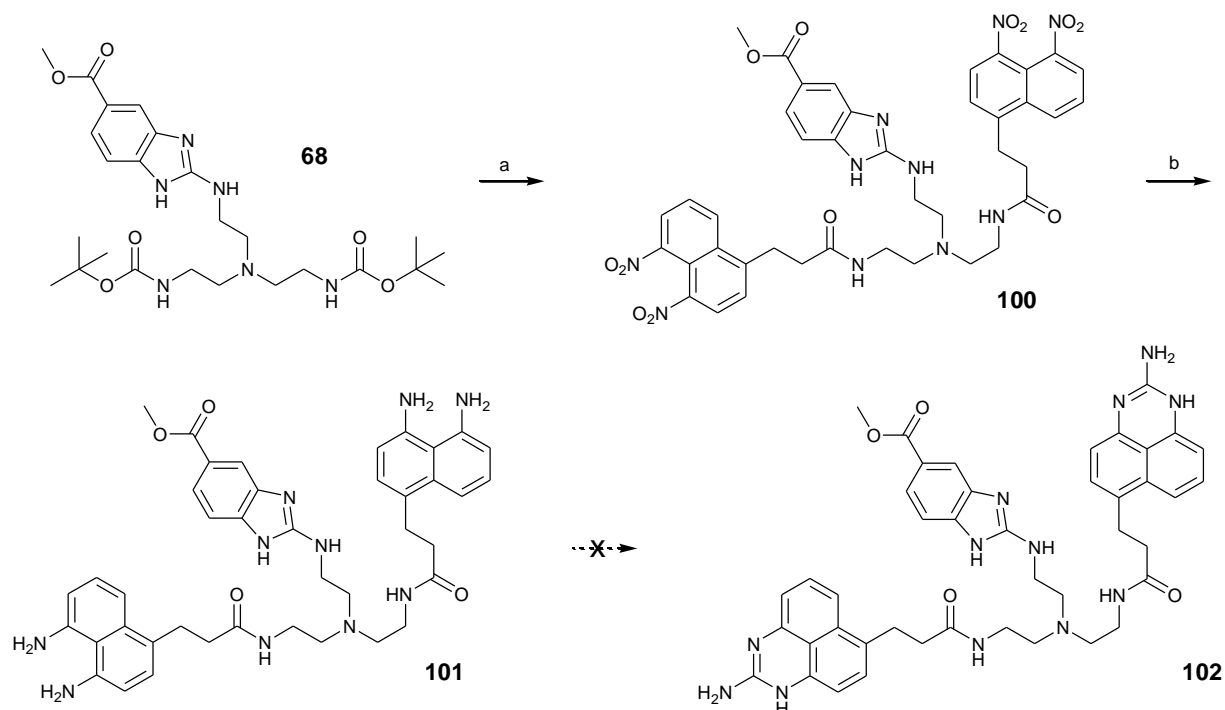
Die Verwendung des mit einem Propionsäuremethylesterrest versehenen 4,5-Dinitronaphthalins **86c** führte schließlich zum Erfolg. Die vollständige Hydrolyse zur Carbonsäure **96** erforderte die Umsetzung in siedender halbkonzentrierter HCl für 16 Stunden. Nach Aktivierung der Carbonsäure mit HOBt und DIC, gefolgt von der Reaktion mit 0.5 Äquivalenten des Linkers Ethylendiamin in Gegenwart von  $\text{NEt}_3$ , wurde Verbindung **97** mit einer Ausbeute von 54 % erhalten. Die Reduktion der Nitrogruppen zu **98** erfolgte mit Wasserstoff (10 bar) unter Palladiumkatalyse, wobei zur vollständigen Reduktion aller Nitrogruppen eine Reaktionszeit von 44 Stunden nötig war. Durch Cyclisierung mit  $\text{BrCN}$  wurde schließlich das Endprodukt **99** mit einer Ausbeute von 72 % erhalten.





**Abbildung 42:** Synthese von **99**. a: 6 N HCl, 100 °C, 16 h, 94 %; b: HOBt, DIC, NEt<sub>3</sub>, Ethylendiamin, DMF (abs.), RT, 72 h, 54 %; c: 10 bar H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH (abs.), RT, 44 h, 74 %; d: BrCN, DCM/DMF (abs.), 40 °C, 3.5 h, RT, über Nacht, 72 %.

Nach der erfolgreichen Synthese von **99** wurde versucht, eine konjugierbare Verbindung mit mehreren über den Naphthylring verknüpften 2-Aminoperimidin-Einheiten zu synthetisieren. Dazu wurde erneut vom Tris(2-aminobenzimidazol)-Vorläufer **68** ausgegangen. Dieser wurde zunächst mit SOCl<sub>2</sub> in MeOH (abs.) entschützt. Die nun freien Aminogruppen wurden mit der Carbonsäure **96** gekuppelt, wobei HATU in Gegenwart von DIPEA als Kupplungsreagenz verwendet wurde. Die Kombination aus HOBt und DIC hatte sich in diesem Fall als nicht reaktiv genug herausgestellt. Die Reaktion gelang mit sehr guter Ausbeute, wobei die Aufreinigung recht aufwendig war und eine mehrfache Säulenchromatographie erforderte.



**Abbildung 43:** Versuchte Synthese von Verbindung **102**. a:1) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C - RT, 3 h; 2) **96**, HATU, DIPEA, DMF (abs.), RT, 4 Tage, 94 %; b: 10 bar H<sub>2</sub>, Pd/C, DMF (abs.), RT, 20 h.

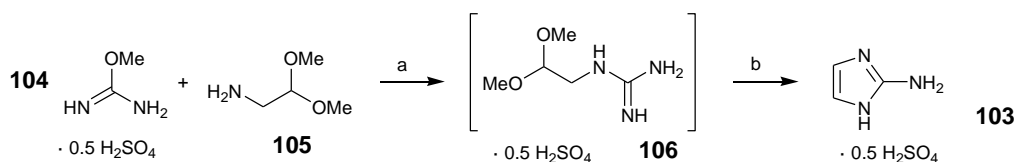
Die so erhaltene Nitroverbindung **100** erwies sich als schwer löslich, weshalb eine Reduktion mit H<sub>2</sub> und Pd/C in dem dafür im Normalfall verwendeten Lösungsmittel MeOH nicht zum Produkt führte. Die Umsetzung gelang schließlich in DMF als Lösungsmittel, in dem sich **100** vollständig löste. Das nach Filtration über Celite und Entfernen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über ESI<sup>+</sup>-Massenspektrometrie als Produkt **101** identifiziert werden, jedoch deuteten die zusätzlichen Signale im Massenspektrum auf leichte Verunreinigungen hin. Aufgrund der Schwerlöslichkeit von **101** war eine säulenchromatographische Aufreinigung nicht möglich. Stattdessen wurde versucht, die leicht verunreinigte Verbindung **101** direkt weiter zum 2-Aminoperimidin-Derivat **102** umzusetzen. Als Reagenz diente hierfür erneut BrCN, als Lösungsmittel wurde anstelle von DCM DMF verwendet. Auch in diesem Lösungsmittel löste sich **101** jedoch nicht vollständig. Vermutlich ist diese Schwerlöslichkeit des Edukts, möglicherweise in Kombination mit noch vorhandenen Verunreinigungen, der Grund dafür, dass das gewünschte Produkt **102** auch nach mehreren Versuchen nicht erhalten werden konnte.

### 3.3 Synthese von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol und seine Derivatisierung

1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** war schon in der Dissertation von K. Dörr<sup>[8]</sup> als Spalter getestet worden und dabei vor allem durch seine geringe Aggregationstendenz aufgefallen. Dies machte die weitere Untersuchung von **56** sowie insbesondere die Synthese eines konjugierbaren Imidazoimidazol-Derivats erstrebenswert.

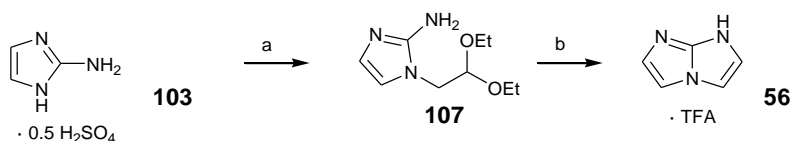
#### 3.3.1 Synthese von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56**

Ausgangsverbindung für die Synthese von **56** war 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **103**. Dieses ist zwar kommerziell erhältlich, lässt sich jedoch auch auf einfachem Wege bequem selbst herstellen. Der Vorschrift von Weinmann *et al.*<sup>[108]</sup> folgend wurden dafür *O*-Methylisoharnstoff-Hemisulfat **104** und 2-Aminoacetaldehyddimethylacetal **105** in H<sub>2</sub>O zur Reaktion gebracht, so dass sich das nicht isolierte Zwischenprodukt **106** bildete, welches durch Umsetzung mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu **103** cyclisiert wurde.



**Abbildung 44:** Synthese von 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **103**. a: H<sub>2</sub>O, 50 °C, 4 h; b: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.), 100 °C, 2 h, 69 %.

Für die im Rahmen der Doktorarbeit von K. Dörr durchgeführten Spaltexperimente war **56** durch M. Suhartono über den bekannten Syntheseweg<sup>[109,110]</sup> hergestellt worden. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit leicht abgewandelt, da die Ausbeute im ersten Syntheseschritt – der Alkylierung von **103** mit Bromacetaldehyddiethylacetal – lediglich 16 % betragen hatte. Eine Verbesserung der Ausbeute auf 26 % gelang durch die Verwendung von NaH<sup>[111,112]</sup> anstelle von NaNH<sub>2</sub> als Base. Ein Grund für die geringe Ausbeute ist die Entstehung des dialkylierten Edukts, das im Massenspektrum des Rohprodukts nachgewiesen wurde. Der zweite Syntheseschritt wurde wie beschrieben<sup>[8]</sup> durchgeführt und führte nach HPLC-Aufreinigung mit einer Ausbeute von 28 % zum TFA-Salz der Zielverbindung **56**.



**Abbildung 45:** Synthese von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56**. a: Bromacetaldehyddiethylacetal, NaH, DMF (abs.), RT, 20 h, 26 %; b: HCl (2 N), 100 °C, 1 h, 28 % nach HPLC.

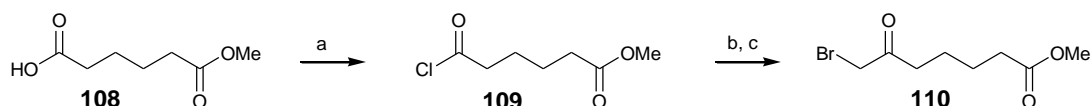
Für den Einsatz in Spaltexperimenten wurde das TFA-Salz von **56** mittels DOWEX-Ionenaustauscher (HCl-Form) in das entsprechende Hydrochlorid umgewandelt.

### 3.3.2 Versuch der Synthese eines konjugierbaren 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol-Derivats

Um ein konjugierbares Derivat von **56** zu erhalten, sollte 2-Aminoimidazol **103** mit einem in  $\alpha$ -Position bromierten Ketocarbonsäureester anstelle von Bromacetaldehyddiethylacetal alkyliert werden. Eine nachfolgende Kondensationsreaktion sollte dann ein in Position 2 mit einem Linker versehenes 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol-Derivat ergeben. Über die Carbonsäuregruppe des Linkers wäre dann eine Konjugation an DNA oder PNA möglich. Um eine mögliche Kondensation des Stickstoffatoms in Position 1 mit der Carbonsäureestergruppe, die zu einem Tricyclus führen würde, zu verhindern, wurde die Anzahl der Methyleneinheiten zwischen Keto- und Carbonsäureestergruppe so gewählt, dass eine solche Reaktion einen Sie-

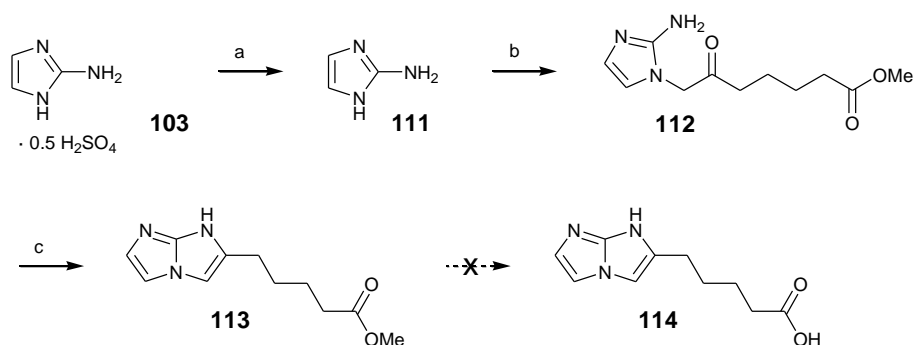
benring ergeben würde. Da solche Ringgrößen thermodynamisch nicht bevorzugt sind, wäre eine solche Kondensationsreaktion unwahrscheinlich.

Die Darstellung des in  $\alpha$ -Position bromierten Ketocarbonsäureesters wurde zunächst auf klassischem Wege durch direkte Umsetzung des Ketocarbonsäureesters mit  $\text{Br}_2$ <sup>[113]</sup> bzw. durch Umsetzung des Lithium-Enolats des Ketocarbonsäureesters mit  $\text{Br}_2$ <sup>[114]</sup> versucht. Ersteres führte nicht zum gewünschten Produkt, letzteres ergab das Produkt in Ausbeuten von unter 30 %. Ein alternativer Weg zur Synthese bromierter Ketocarbonsäureester wurde von Marugán *et al.*<sup>[115]</sup> sowie von Richards *et al.*<sup>[116]</sup> beschrieben. Dafür wird die freie Carbonsäuregruppe einer einfach veresterten Dicarbonsäure zunächst in das Carbonsäurechlorid überführt, mit TMS-Diazomethan oder Diazomethan umgesetzt und dann *in situ* mit HBr versetzt. Aufgrund der leichteren und weniger gefährlichen Handhabung wurde in der vorliegenden Arbeit TMS-Diazomethan verwendet. Das gewünschte Produkt **110** konnte so in einer Ausbeute von 69 % (über drei Schritte) isoliert werden.



**Abbildung 46:** Synthese des bromierten Ketocarbonsäureesters **110**. a:  $(\text{COCl})_2$ , DMF (kat.), DCM (abs.),  $0\text{ }^\circ\text{C}$  - RT, 1 h; b: TMS-Diazomethan,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{DCM}$  (abs.), RT, 2 h; c: konz. HBr, direkte Aufarbeitung, 69 % über drei Schritte.

Die Alkylierung von 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **103** mit **110** erwies sich wie schon bei der Synthese von **56** als schwierig. Versuche, die Alkylierung unter Verwendung von  $\text{NaNH}_2$  als Base<sup>[109,110]</sup> durchzuführen, führten nicht zum gewünschten Produkt. Da bei Alkylierungen von 2-Aminoimidazol in Position 1 in Literaturvorschriften teilweise die freie Base des 2-Aminoimidazols anstelle des Hemisulfats eingesetzt wird<sup>[112,117]</sup>, wurde **103** für folgende Alkylierungsversuche zunächst mit  $\text{NaOtBu}$  in die freie Base **111** umgewandelt.<sup>[118]</sup> Diese wurde direkt weiter umgesetzt, da bei längerer Aufbewahrung eine Zersetzung der Substanz beobachtet werden konnte. Die Alkylierung von **111** zu **112** gelang schon unter Verwendung einer verglichen mit NaH oder  $\text{NaNH}_2$  eher milden Base wie  $\text{NEt}_3$ , allerdings konnten auch durch Variation der Reaktionsbedingungen keine Ausbeuten über 25 % erzielt werden.



**Abbildung 47:** Versuchte Synthese von **114**. a: NaOtBu, MeOH (abs.), -70 °C - RT, 3.5 h; b: **110**, NEt<sub>3</sub>, MeOH (abs.), RT, 48 h, 25 %; c: HCl (konz.), MeOH, 65 °C, 5 h, 11 %.

Die nachfolgende Cyclisierung zu **113** wurde zunächst unter milden Bedingungen durch Erhitzen in Toluol in Gegenwart katalytischer Mengen PPTS versucht, wobei keine Umsetzung beobachtet werden konnte. Fünfstündiges Erhitzen in MeOH in Gegenwart von konzentrierter HCl führte schließlich zum gewünschten Produkt **113**, allerdings lediglich mit einer Ausbeute von 11 %. Um eine Konjugation an Nucleinsäuren oder Nucleinsäureanaloga zu ermöglichen, war nun die Hydrolyse des Esters nötig. Die Reaktion von **113** mit LiOH führte zu einer Zersetzung des Produkts. Auch bei der versuchten Hydrolyse mit HCl entstanden nicht näher identifizierbare Nebenprodukte; das Produkt konnte lediglich in Spuren im Massenspektrum des Rohprodukts nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Ausbeuten sämtlicher Reaktionsschritte und der Tatsache, dass sich das substituierte 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **113** in der versuchten Esterhydrolyse als sehr labil erwiesen hatte, wurden keine weiteren Versuche zur Synthese von **114** unternommen.

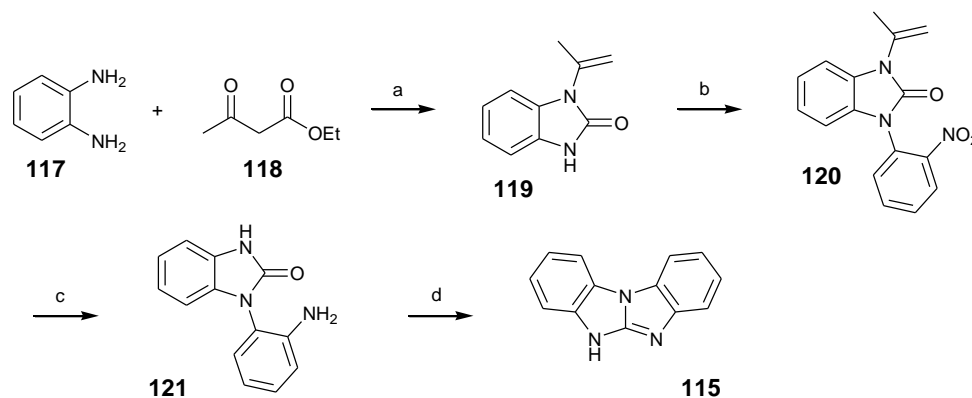
### 3.4 Synthese von 5*H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol-Verbindungen

Nachdem sich die geringe Stabilität von substituiertem 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **113** gegenüber Säuren und Basen herausgestellt hatte, wurde in der Hoffnung auf eine Stabilisierung der 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol-Gruppe durch die zusätzlichen Phenylringe 5*H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115** und das konjugierbare Derivat **116** synthetisiert.

#### 3.4.1 Synthese von 5*H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115**

Die Synthese von **115** wurde erstmals von R. Rachour und R. Zniber beschrieben.<sup>[119]</sup> Da im vorletzten Schritt dieser vierstufigen Synthese eine Reduktion der Nitrogruppe mit gleichzeitiger Entfernung des Alkylrestes in siedender halbkonzentrierter HCl durchgeführt wird (sie-

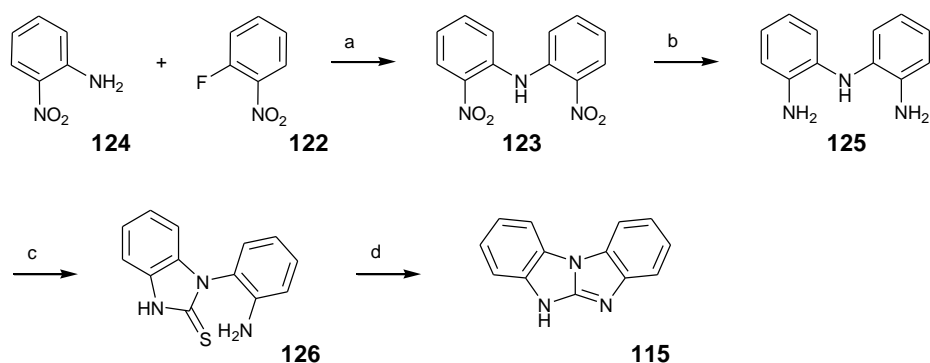
he Abbildung 48), schien diese Route für potentiell konjugierbare Derivate mit einer Estergruppe eher ungeeignet. Es wurde daher für die Synthese von **115** ein neuer, auch für konjugierbare Derivate geeigneter Weg gesucht.



**Abbildung 48:** Synthese von **115** nach R. Rachour und R. Zniher.<sup>[119]</sup> a: Xylol,  $\Delta$ , 6 h, 87 %; b: 1-Fluor-2-nitrobenzol **122**, NaOH, Tetra-*n*-butylammoniumbromid, Benzol/H<sub>2</sub>O, RT, 24 h, 65 %; c: HCl (6 N), SnCl<sub>2</sub>, 100 °C, 1 h, 53 %; d: Xylol, 140 °C, 4 h, 41 %.

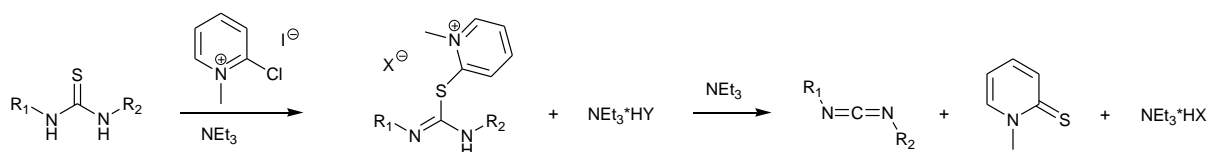
Dafür wurde zunächst, einer Vorschrift von Ren *et al.* folgend, die Dinitroverbindung **123** durch S<sub>N</sub>Ar-Reaktion von 1-Fluor-2-nitrobenzol **122** mit 2-Nitroanilin **124** in Gegenwart von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> als Base hergestellt und das Produkt **123** anschließend mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse zur Diaminoverbindung **125** reduziert.<sup>[120]</sup> Der Versuch, den durch Umsetzung von **125** mit CDI gewonnenen Harnstoff **121** nach der Vorschrift von R. Rachour und R. Zniher zu **115** zu cyclisieren, führte nicht zum Ziel. Daher wurde **125** nun analog zur Synthese der 2-Aminobenzimidazol-Derivate mit TCDI in den cyclischen Thioharnstoff **126** überführt.

Während die ersten drei Syntheseschritte alle mit guten bis sehr guten Ausbeuten gelangen, gestaltete sich der nachfolgende Cyclisierungsschritt schwierig. Als Cyclisierungsreagenz diente wiederum das Mukaiyama-Reagenz. Im Vergleich zur Synthese von Mono-2-aminobenzimidazol **63** und Tris(2-aminobenzimidazol) **57** waren sehr lange Reaktionszeiten von 7 Tagen nötig. Dennoch gelang keine vollständige Umsetzung und das Produkt **115** konnte lediglich mit einer Ausbeute von 15 % isoliert werden. Die Zugabe von NEt<sub>3</sub> als Base brachte keine Veränderung. Nichtsdestotrotz lag die Gesamtausbeute (10 %) aufgrund der gut funktionierenden ersten drei Schritte immer noch im Bereich der Gesamtausbeute der Synthese von R. Rachour und R. Zniher (12 %).



**Abbildung 49:** Synthese von 5H-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115**. a:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMSO, 120 °C, 40 h, 95 %; b: 10 bar  $\text{H}_2$ , Pd/C (10 %), EtOAc (abs.), RT, 24 h, quantitative Umsetzung; c: TCDI, Imidazol, MeCN (abs.), RT, 17.5 h, 69 %; d: Mukaiyama-Reagenz, DMF (abs.), RT, 7 Tage, 15 %.

Die im Vergleich zur Synthese von Mono-2-aminobenzimidazol **63** und Tris(2-aminobenzimidazol) **57** schlechten Ausbeuten des Cyclisierungsschrittes lassen sich mechanistisch begründen. Bei der Umsetzung eines acyclischen Thioharnstoffes mit dem Mukaiyama-Reagenz in Anwesenheit einer Base wie  $\text{NEt}_3$  bildet sich zunächst ein Carbodiimid<sup>[121]</sup>, welches mit einem Amin weiter zu einem Guanidinderivat reagieren kann<sup>[87]</sup> (siehe Abbildung 50). Bei cyclischen Thioharnstoffen ist die Bildung eines Carbodiimids, bei dem drei Atome linear angeordnet sein müssen, aufgrund der Ringspannung unmöglich. Stattdessen muss der Angriff des Amins vor der Abspaltung der Abgangsgruppe erfolgen. Diese Reaktion scheint sehr viel langsamer zu verlaufen als der Angriff eines Amins auf ein stark elektrophiles Carbodiimid. Tatsächlich konnte aus der Reaktionslösung der Reaktion von **125** mit dem Mukaiyama-Reagenz die vor dem Angriff des Amins und der Abspaltung von 1-Methyl-2-thiopyridon vorliegende Zwischenstufe isoliert werden.

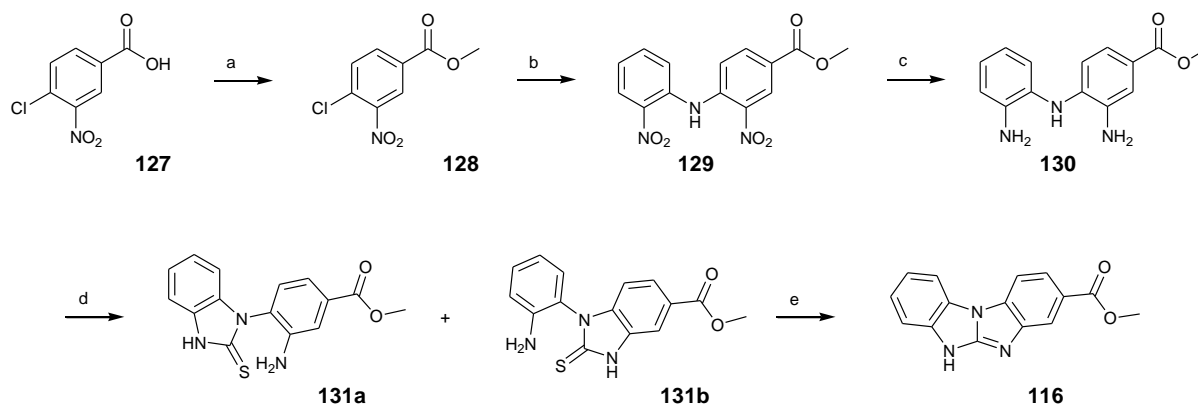


**Abbildung 50:** Mechanismus der Bildung von Carbodiimiden aus Thioharnstoffen mithilfe des Mukaiyama-Reagenzes.<sup>[121]</sup>

### 3.4.2 Synthese von konjugierbarem 5H-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **116**

Für die Synthese des mit einer Estergruppe versehenen Derivats von 5H-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115** wurde zunächst das Edukt 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure **127** mit MeOH in Gegenwart von konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in den Methylester **128** umgewandelt.<sup>[122]</sup> Das 4-Chlor-Derivat wurde gewählt, weil das entsprechende 4-Fluor-Derivat nicht kommerziell erhältlich war. Durch die geringere Elektronegativität des Chlorsubstituenten gegenüber einem Fluor-

substituenten und die damit verbundene geringere Elektrophilie des *ipso*-Kohlenstoffatoms verlief die folgende  $S_NAr$ -Reaktion mit 2-Nitroanilin **124** zur Dinitroverbindung **129** mit einer sehr viel schlechteren Ausbeute als im Fall der Reaktion von 1-Fluor-2-nitrobenzol **122** mit **124**.



**Abbildung 51:** Synthese von **116**. a: MeOH (abs.), konz.  $H_2SO_4$ , 65 °C, 4 h, 81 %; b: 2-Nitroanilin **124**,  $K_2CO_3$ , DMSO, 120 °C, 35 h, 46 %; c: 12 bar  $H_2$ , Pd/C (10 %), EtOAc (abs.), RT, 19 h, 84 %; d: TCDI, Imidazol, MeCN (abs.), RT, 72 h, 87 % des Produktgemischs; e: Mukaiyama-Reagenz, DMF (abs.), RT, 7 Tage, 16 %.

**129** wurde mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse zu Verbindung **130** reduziert und dann mit TCDI in den entsprechenden Thioharnstoff überführt. Da nur eine der beiden Phenylgruppen von **130** eine Estergruppe trägt und das Molekül damit unsymmetrisch ist, bildete sich bei der Umsetzung mit TCDI ein Produktgemisch aus den beiden Thioharnstoffen **131a** und **131b**. Beide reagieren im folgenden Cyclisierungsschritt zum gleichen Produkt weiter, deshalb war eine Auftrennung der beiden Isomere nicht nötig. Die Cyclisierungsreaktion verlief erwartungsgemäß wie im oben beschriebenen Fall mit sehr niedrigen Ausbeuten und erforderte lange Reaktionszeiten. Angesichts der geringen bereits für Spaltexperimente ausreichenden Mengen sind diese niedrigen Ausbeuten jedoch akzeptabel, da eine Synthese des potentiellen Spalters in großem Maßstab nicht nötig ist.

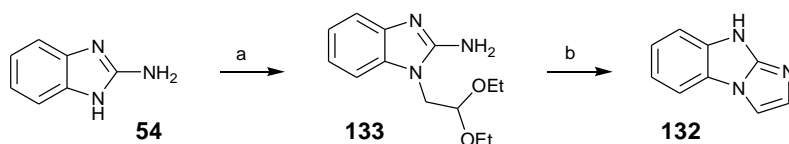
### 3.5 Synthese weiterer cyclischer Guanidine

#### 3.5.1 Synthese von 9H-Imidazo[1,2-a]benzimidazol **132**

Neben dem mit zwei Phenylringen versehenen 1H-Imidazo[1,2-a]imidazol-Derivat **115** wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das nur einen Phenylring besitzende 9H-Imidazo[1,2-a]benzimidazol **132** dargestellt. Den bekannten Vorschriften folgend<sup>[110,123]</sup> wurde dafür zunächst 2-Aminobenzimidazol **54** mit Bromacetaldehyddiethylacetal zu **133** alkyliert, wobei NaOEt als



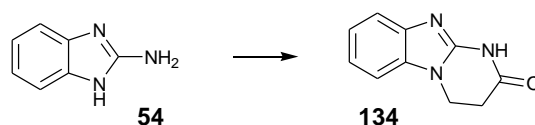
Base diene. Wie schon im Fall der Alkylierung von 2-Aminoimidazol **103** waren die Ausbeuten dabei mit 26 % eher gering. Durch Umsetzung von **133** in siedender 2 N HCl erfolgte der Ringschluss zum Endprodukt **132**. Dieses wurde durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub>-Lösung als freie Base ausgefällt und mit einer Ausbeute von 88 % isoliert.



**Abbildung 52:** Synthese von 9H-Imidazo[1,2-a]benzimidazol **132**. a: Bromoacetaldehyddiethylacetal, NaOEt, MeOH (abs.), 78 °C, 93 h, 26 %; b: HCl (2 N), 100 °C, 30 min, 88 %.

### 3.5.2 Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazol-2-on **134**

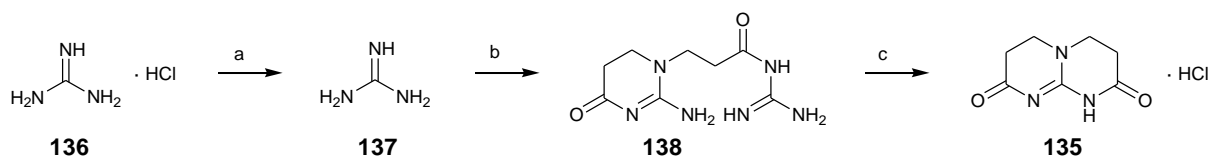
Ebenfalls von 2-Aminobenzimidazol **54** geht die Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazol-2-on **134** aus. Nach der Vorschrift von W. Nawrocka und M. Zimecki<sup>[124]</sup> konnte dieses in einem Schritt durch Umsetzung von **54** mit Acrylsäureethylester in siedendem Diglyme mit einer Ausbeute von 63 % synthetisiert werden.



**Abbildung 53:** Synthese von 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazol-2-on **134**: Acrylsäureethylester, Diglyme, 160 °C, 5 h, 63 %.

### 3.5.3 Synthese von 3,4,6,7,8,9-Hexahydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidin-2,8-dion **135**

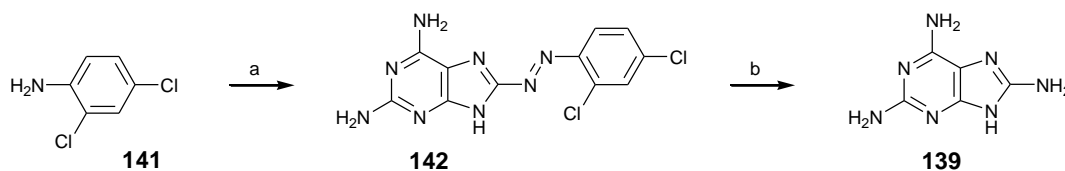
Ergänzend zu den bereits beschriebenen Verbindungen **56** und **115** wurde mit dem Pyrimidopyrimidindion **135** ein weiteres symmetrisches cyclisches Guanidin synthetisiert. Hierfür wurde zunächst Guanidin-Hydrochlorid **136** mit NaOMe in MeOH in das freie Guanidin **137** überführt.<sup>[125]</sup> Nach aus der Literatur bekannten Vorschriften<sup>[126,127]</sup> wurde dieses mit Acrylsäuremethylester in Verbindung **138** umgewandelt, welche anschließend mit 6 N HCl in das gewünschte Produkt **135** überführt werden konnte. Die Gesamtausbeute über alle drei Schritte betrug 43 %.



**Abbildung 54:** Synthese von **135**: a: NaOMe, MeOH (abs.), 0 °C, 30 min; b: Acrylsäuremethylester, DMF (abs.), 25 - 30 °C, 2.5 h, 54 % über zwei Schritte; c: 6 N HCl, RT, 3 h, 76 %.

### 3.5.4 Synthese von 2,6,8-Triaminopurin **139**

Ein weiterer Heterocyclus, der die Guanidinstruktur enthält, ist das 2,6,8-Triaminopurin **139**. Diese modifizierte Nucleobase wurde nach der Vorschrift von L. Cavalieri und A. Bendich synthetisiert.<sup>[128]</sup> Diese wiederum hatten sich an der Synthesevorschrift von J. Spies und T. Harris für die Herstellung von 2-Oxy-6,8-diaminopurin orientiert.<sup>[129]</sup> Zunächst wurde durch Azokupplung von 2,6-Diaminopurin-Sulfat-Hydrat **140** mit dem Diazoniumsalz von 2,4-Dichloranilin **141** die Azoverbindung **142** erhalten. **142** wurde durch Filtration isoliert und ohne weitere Aufreinigung mit einem Überschuss  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  zum gewünschten Produkt 2,6,8-Triaminopurin **139** reduziert. Dieses konnte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bzw. Wasser als Sulfat-Salz analysenrein isoliert werden.



**Abbildung 55:** Synthese von 2,6,8-Triaminopurin **139**: a:1)  $\text{NaNO}_2$ , HCl (konz.),  $\text{H}_2\text{O}$ , 0 °C, 20 min; 2) **140**, NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0 °C, 15 min; b:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 1.5 M NaOH, 60 – 80 °C, 2 h, 16 % über beide Schritte.

Da **139** als Sulfat nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser besitzt und auch in DMSO nicht vollständig löslich ist, wurde versucht, 2,6,8-Triaminopurin per HPLC als freie Base aus dem Rohprodukt zu isolieren, was jedoch auch nach mehrmaligen Versuchen nicht gelang. **139** musste daher in den später durchgeführten Spaltexperimenten als Sulfat eingesetzt werden.

## 4 Konjugation der RNA-Spalter

Die in Kapitel 3 beschriebenen Verbindungen können – so sie denn aktiv sind – RNA lediglich sequenzspezifisch spalten. Um einen sequenzspezifischen Spalter zu erhalten, ist die Konjugation an eine sequenzerkennende Einheit wie ein Oligonucleotid, ein Oligonucleotidanalogen, ein Peptid oder einen sonstigen sequenzspezifischen RNA-Liganden nötig (vgl. Kapitel 2.3).

### 4.1 Konjugation an DNA

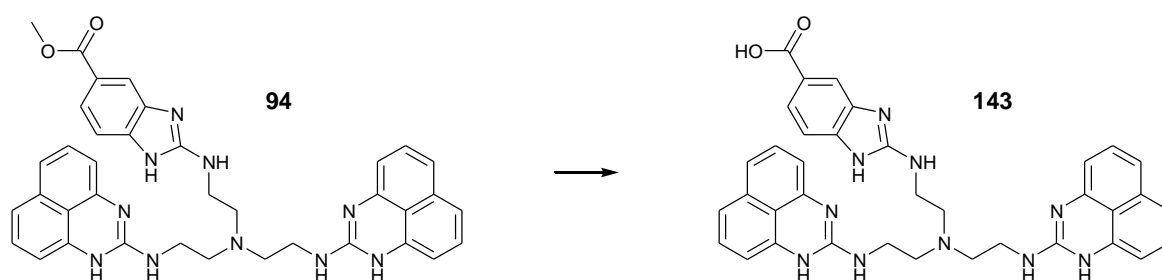
Eine verbreitete Methode zum Aufbau sequenzspezifischer RNA-Spalter ist die Konjugation an kurze DNA-Oligonucleotide<sup>[5]</sup>. Auch in der Arbeitsgruppe Göbel wurden auf diese Weise sequenzspezifische Spalter mit einer Tris(2-aminobenzimidazol)-Einheit dargestellt.<sup>[85]</sup> Die Verwendung von DNA-Oligonucleotiden als sequenzerkennenden Teil des Spalters birgt jedoch einige Nachteile.

Einer dieser Nachteile ist die Labilität von DNA in Zellen und Zellextrakten. Zwar besitzt DNA eine enorme Stabilität gegenüber einer Hydrolyse der glykosidischen wie auch der Phosphordiesterbindungen<sup>[10]</sup>, so dass *in vitro*-Experimente problemlos durchführbar sind, doch ist sie als natürlich vorkommendes Biomolekül anders als künstliche Oligonucleotidanaloga wie LNA<sup>[130]</sup> oder PNA<sup>[27]</sup> nicht stabil gegen biologische Zersetzung. So droht bei *in vivo*-Experimenten bzw. Experimenten in Zellextrakten der Abbau von Desoxyoligonucleotiden durch zelluläre Desoxynucleasen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Spaltexperimente ist dies natürlich unerheblich, sollte aber im Hinblick auf mögliche zukünftige Anwendungen nicht völlig außer Acht gelassen werden.

Weitere Nachteile der Verwendung von DNA-Oligonucleotiden in sequenzspezifischen RNA-Spaltern betreffen jedoch direkt die Konjugation von Spaltern an DNA und bestehen damit unabhängig davon, ob Spaltexperimente *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden. Dazu gehören die bei der Abspaltung der DNA vom Träger und zur Entschützung der Nucleobasen benötigten Bedingungen. Weil die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Spalter zu Aggregation mit Oligonucleotiden neigen, ist eine Konjugation an DNA in Lösung nicht möglich. Versuche dieser Art führten lediglich zur Präzipitation der nichtkonjugierten Nucleinsäure. Auch die Zugabe von Harnstoff zur Verminderung von Präzipitationseffekten brachte keine Änderung. Daher wurde die Konjugation der in unserer Gruppe hergestellten Spalter-Konju-

gate schon in der Vergangenheit mit festphasengebundener DNA durchgeführt.<sup>[85]</sup> Bei nach der Standard-Phosphoramiditmethode hergestellten DNA-Oligonucleotiden erfolgt die Abspaltung der DNA von der Festphase sowie die Entschützung der Nucleobasen im basischen Milieu,<sup>[131]</sup> wobei je nach gewählten Schutzgruppen unterschiedliche Reagenzien zum Einsatz kommen und unterschiedlich lange Reaktionszeiten nötig sind.

Dies ist für viele der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Spalter ungünstig, da einige dieser Verbindungen, wie die 2-Aminoperimidin-Derivate, zum Teil stark basenlabil sind (siehe auch Kapitel 5.1.4). Um zu testen, ob 2-Aminoperimidin-Derivate unter bestimmten Abspaltbedingungen dennoch beständig sind, wurden kleine Proben der potentiell konjugierbaren Verbindung **143** verschiedenen Abspaltbedingungen ausgesetzt, die von kommerziellen Anbietern von Oligonucleotiden abhängig von den verwendeten Nucleobasenschutzgruppen empfohlen werden.



**Abbildung 56:** Esterhydrolyse von **94**: 6 N HCl, 100 °C, 4 h 15 min. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels ohne weitere Aufreinigung für Testexperimente bzw. Konjugationsversuche eingesetzt.

Für die Analyse der Proben wurde das jeweils verwendete Reagenz nach Ablauf der Reaktionszeit im Vakuum entfernt, vom Rückstand ein Massenspektrum aufgenommen und dieses mit dem Massenspektrum von **143** verglichen. Nach keinem der in Tabelle 1 aufgeführten Tests zeigte das Massenspektrum ein Signal für **143**, so dass davon ausgegangen werden musste, dass das 2-Aminoperimidin-Derivat unter den genannten Bedingungen jeweils vollständig zersetzt worden war. Dafür sprach auch die jeweils schon nach kurzer Zeit zu beobachtende Dunkelgrünfärbung der Reaktionslösung, die schon beim Versuch der Synthese von 2-Aminoperimidin-Derivaten häufig aufgetreten war (vgl. Kapitel 3.2). Die Konjugation von basenlabilen RNA-Spaltern an festphasengebundene DNA-Oligonucleotide scheint daher nicht durchführbar zu sein.

**Tabelle 1:** Verwendete Reagenzien und Bedingungen für Stabilitätstest mit **143**. Für die Tests wurden jeweils ca. 0.4 mg **143** mit 1 mL des jeweiligen Reagenzes versetzt und die Reaktion den genannten Bedingungen ausgesetzt.

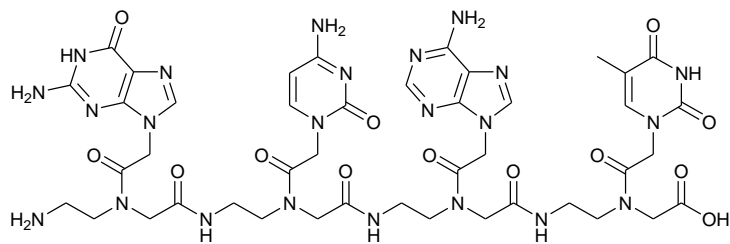
Verwendetes Reagenz	Reaktionszeit (Schütteln bei RT)	Reaktionszeit/Reaktionstemperatur (im Anschluss an das Schütteln bei RT)
NH <sub>3</sub> (aq)/EtOH 3:1 <sup>[132]</sup>	2 h	3 h bei 55 °C
NH <sub>3</sub> (aq)/EtOH 3:1 <sup>[132]</sup> (unter Argon)	2 h	3 h bei 55 °C
H <sub>2</sub> O/ <i>t</i> BuNH <sub>2</sub> 3:1 <sup>[133]</sup>	-	6 h bei 60 °C
(MeNH <sub>2</sub> (aq) (40 %)/NH <sub>3</sub> (aq) 1:1 <sup>[133]</sup>	5 min	10 min bei 55 °C
Toluol/Ethylendiamin 1:1 <sup>[134]</sup>	2 h	-

Ein weiteres Problem bei der Konjugation von Spaltern an DNA trat bedingt durch den Herstellungsprozess der käuflich erworbenen festphasengebundenen DNA-Oligonucleotide auf. Diese waren vom Hersteller mit einem C<sub>6</sub>-Aminolinker versehen worden und wurden mit bereits entschütztem Linker geliefert. Sämtliche Konjugationsversuche dieser DNA mit verschiedenen Spaltern – darunter auch nicht-basenlabile Spalter wie Tris(2-aminobenzimidazol) **144** – führten zu einem Produkt, dessen Masse der des Oligonucleotids mit einem 4-*tert*-Butylphenoxyacetyl-gecappten Linker entspricht. Testabspaltungen des Oligonucleotids ohne vorherigen Konjugationsversuch führten ebenfalls zum gleichen Produkt. Laut Hersteller könnte die Acetylierung der Aminogruppe von einer Verunreinigung des festphasengebundenen Oligonucleotids mit dem Cappingreagenz 4-*tert*-Butylphenoxyessigsäureanhydrid herrühren. Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen<sup>[135]</sup> lassen jedoch auch die Wanderung einer TAC-Schutzgruppe einer Nucleobase auf die Aminogruppe des Linkers möglich erscheinen.

## 4.2 Konjugation an PNA

Um die Nachteile von DNA-Oligonucleotiden als Teil von sequenzspezifischen RNA-Spaltern zu umgehen, bietet es sich an, stattdessen Nucleinsäureanaloga zur Sequenzerkennung zu

verwenden. Zu den vielen solcher künstlicher als Antisense-Oligonucleotide verwendeter Analoga<sup>[136]</sup> zählt auch die Peptid-Nucleinsäure (PNA), die von Nielsen *et al.* entwickelt wurde.<sup>[137]</sup> PNA besitzt anstelle des Phosphat-Zucker-Rückgrates ein pseudopeptidisches Rückgrat, das aus Aminoethylglycin-Einheiten aufgebaut ist, die über Amidbindungen miteinander verknüpft sind.<sup>[27]</sup> Da es sich bei PNA um ein künstliches Polymer handelt, weist sie anders als DNA eine hohe Stabilität gegenüber biologischem Abbau in Serum oder Zellextrakten auf.<sup>[138]</sup> Hinzu kommt, dass PNA-Oligomere eine höhere Affinität zu komplementären RNA-Oligonucleotiden besitzen als analoge DNA-Oligonucleotide.<sup>[139]</sup>



**Abbildung 57:** Beispiel eines PNA-4mers.

Auch die bei der Verwendung von festphasengebundenen DNA-Oligonucleotiden aufgetretenen Probleme existieren im Fall von PNA nicht. Da die PNA-Monomere über Amidbindungen verknüpft werden, lassen sich PNA-Oligomere analog zur Festphasensynthese von Peptiden bequem an Festphase synthetisieren, wobei die Fmoc-Schutzgruppenstrategie verwendet wird. Die Abspaltung des PNA-Oligomers sowie der Schutzgruppen der Nucleobasen erfolgt dabei im sauren Milieu, was die Konjugation basenlabiler RNA-Spalter an festphasengebundene PNA möglich macht. Die Synthese kürzerer PNA-Stücke ist auch manuell ohne Probleme möglich, kann jedoch ebenso auf einem handelsüblichen Peptid-Synthesizer durchgeführt werden. Da das Rückgrat der PNA ungeladen ist, werden am C-Terminus häufig eine oder mehrere Lysin-Einheiten angehängt, die durch ihre positive Ladung die Löslichkeit von PNA-Oligomeren in Wasser erhöhen.<sup>[27,137]</sup>

Für die vorliegende Arbeit wurden PNA-10mere und -15mere mit verschiedenen Sequenzen an Festphase synthetisiert und dann für die Konjugation von Spaltern verwendet. Die Synthese der 10mere erfolgte dabei manuell. Für größere PNA-Oligomere wie die 15mere erwies sich diese Methode als ungeeignet. Bei zunehmender Kettenlänge stiegen die für die Kupplung des nächsten Monomers benötigten Reaktionszeiten immer weiter an, was die Dauer der Synthese unnötig in die Länge zog. Da zudem der Umsatz der einzelnen Kupplungsschritte in der Regel unvollständig war, war der Anteil kürzerer Nebenprodukte am

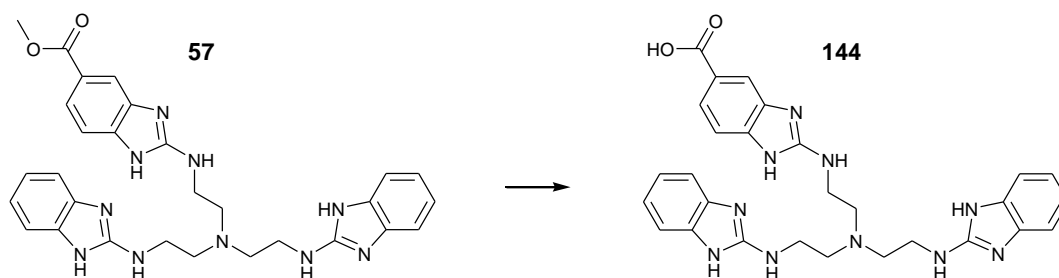
Ende der Synthese zu groß, um einen sinnvollen Einsatz in Konjugationsansätzen möglich zu machen. Die verwendeten PNA-15mere wurden daher in Kooperation mit der Gruppe von R. Strömberg am Karolinska Institut von A. Ghidini bzw. P. Dogandzhiyski an einem Mikrowellen-Peptid-Synthesizer hergestellt. Die 10mere wurden am C-Terminus mit einer, die 15mere mit zwei Lysin-Einheiten versehen.

**Tabelle 2:** Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PNA-Oligomere und Kürzel der damit synthetisierten Konjugate

PNA	Synthetisierte PNA-Oligomere	Konjugate
PNA1	Lys – aac agt cct c	K1, K2, K7, K8, K9
PNA2	Lys – gct gac ggc t	K3
PNA3	LysLys – tat gga aca gtc ctc	K4
PNA4	LysLys – gat cgg ctg acg gct	K5
PNA5	LysLys – att tca cga ata tca	K6

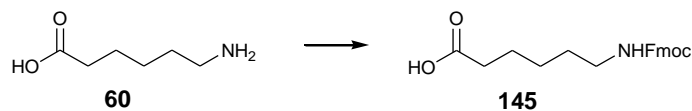
#### 4.2.1 Konjugation von Tris- und Mono(2-aminobenzimidazol) an PNA

Um die synthetisierten PNA-Konjugate mit den bereits früher beschriebenen DNA-Konjugaten<sup>[85]</sup> vergleichen zu können, wurden zunächst Konjugate von Tris(2-aminobenzimidazol) an PNA-Oligomeren dargestellt. Dafür wurde der Carbonsäuremethylester **57**, der nach HPLC-Aufreinigung als TFA-Salz vorlag, zunächst mittels DOWEX-Ionenaustauscher (Cl<sup>-</sup> Form) in das entsprechende Hydrochlorid überführt und dann durch Hydrolyse mit 6 N HCl in die freie Carbonsäure umgewandelt, um eine Reaktion mit dem freien N-Terminus eines PNA-Oligomers zu ermöglichen.



**Abbildung 58:** Esterhydrolyse von **57**: 6 N HCl, 100 °C, 2 h.

Da bei den über eine Amid-Bindung gebildeten DNA-Konjugaten von Tris(2-aminobenzimidazol) ein C<sub>6</sub>-Aminolinker als Verbindung zwischen DNA-Oligonucleotid und Spalter verwendet worden war, wurde auch im Rahmen dieser Arbeit ein C<sub>6</sub>-Aminolinker verwendet. Um in der PNA-Festphasensynthese eingesetzt werden zu können, wurde dafür 6-Aminiohexansäure **60** mit Fmoc-Succinimid in Verbindung **145** umgewandelt.

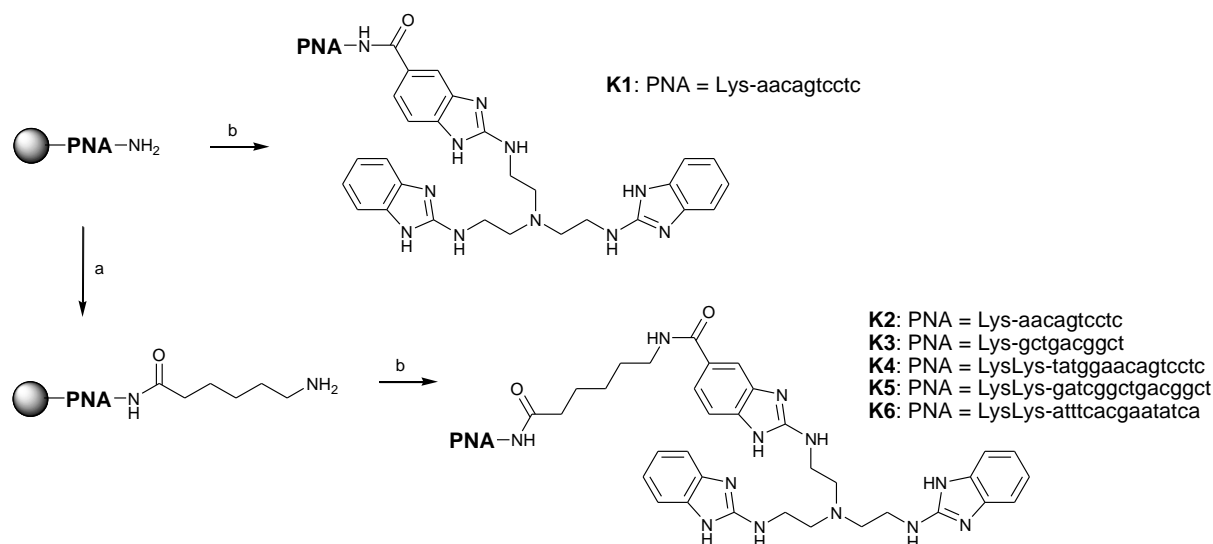


**Abbildung 59:** Fmoc-Schützung von 6-Aminohexansäure **60**. Fmoc-Succinimid, NaHCO<sub>3</sub>, Aceton/H<sub>2</sub>O (1:1), RT, 3 h, 71 %.

Der Linker wurde unter Verwendung von HOBt/DIC als Kupplungsreagenzien mit dem *N*-Terminus eines PNA-Oligomers verknüpft. Nach Entschützung der Aminogruppe des Linkers mit Piperidin folgte die Konjugation des Spalters an die PNA, wobei wiederum HOBt/DIC als Kupplungsreagenzien zum Einsatz kamen. Außerdem wurden vier Äquivalente NEt<sub>3</sub> zur Reaktion hinzugegeben, um die Löslichkeit des als HCl-Salz vorliegenden Spalters **144** zu erhöhen. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels Kaiser-Test überprüft, bevor die Abspaltung des Konjugats sowie die Entschützung der Nucleobasen mit TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (9.5:0.25:0.25) erfolgten. In MALDI-Massenspektren der Rohprodukte war in keinem Fall ein Signal für unkonjugierte PNA zu sehen, was auf eine nahezu vollständige Konjugation hindeutet. Diese nahezu quantitative Umsetzung stellt einen weiteren Vorteil gegenüber der Konjugation an DNA dar: PAGE-Gele der nicht aufgereinigten DNA-Konjugationslösungen zeigten jeweils einen Eduktanteil von etwa 10 – 30 %.<sup>[140]</sup>

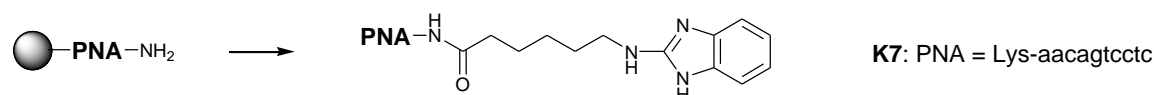
Um überschüssige Reagenzien sowie Abbruchstücke der PNA-Synthese abzutrennen, wurden die Konjugate per HPLC aufgereinigt. Auf diese Art und Weise wurde jedes der fünf PNA-Oligomere **PNA1** – **PNA5** mit Tris(2-aminobenzimidazol) konjugiert und die Konjugate **K2** – **K6** erhalten. Das Konjugat **K6** wurde dabei von P. Dogandzhiyski zur Verfügung gestellt. Zum Vergleich wurde auch ein Konjugat von **PNA1** und Tris(2-aminobenzimidazol) ohne zusätzlichen Linker synthetisiert (**K1**).





**Abbildung 60:** Synthese der Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugate **K1** – **K6**. a: 1) **145**, HOBT, DIC, DMF, RT, 24 h; 2) Piperidin, DMF, RT, 30 min; b: 1) **144**, HOBT, DIC, NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 72 h; 2) TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h.

Um einen Vergleich mit PNA-Konjugaten mit 2-Aminoperimidin-Derivaten mit nur einer 2-Aminoperimidin-Einheit zu ermöglichen, wurde auch ein Konjugat von **PNA1** mit Mono(2-aminobenzimidazol) **59** synthetisiert, wobei die Vorgehensweise der im Fall der Tris(2-aminobenzimidazol)-Konjugate entsprach. Lediglich die Menge an NEt<sub>3</sub> wurde auf 1 eq. reduziert, da **59** im Gegensatz zu **144** nur als Monohydrochlorid vorliegt.



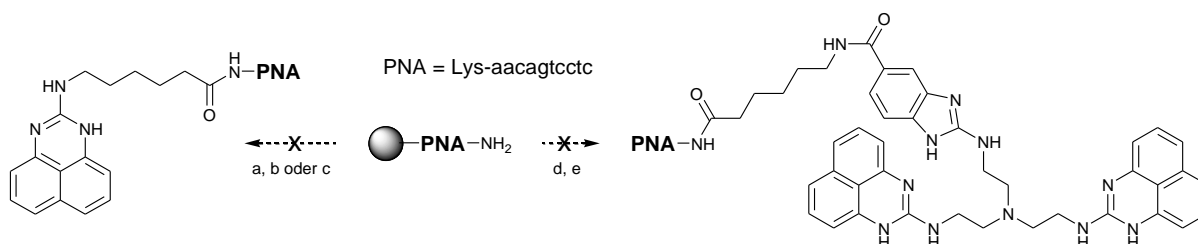
**Abbildung 61:** Konjugation von **59** an **PNA1**: 1) **59**, HOBT, DIC, NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 48 h; 2) TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h.

#### 4.2.2 Konjugation von 2-Aminoperimidin-Derivaten an PNA

Während sich die Konjugation der 2-Aminobenzimidazole an PNA gut reproduzierbar mit hohen Ausbeuten durchführen ließ, gestaltete sich die Konjugation von 2-Aminoperimidin-Derivaten aufgrund der Labilität dieser Verbindungen wie erwartet sehr viel schwieriger. Während lange Reaktionszeiten, die einen hohen Umsatz gewährleisten sollten, in der Regel zu einer Dunkelgrünfärbung der Lösung führten und kein Produkt ergaben, entstand bei kürzeren Reaktionszeiten das Produkt gar nicht oder in äußerst geringen Ausbeuten, so dass eine Isolation des Produkts in den meisten Fällen nicht möglich war.

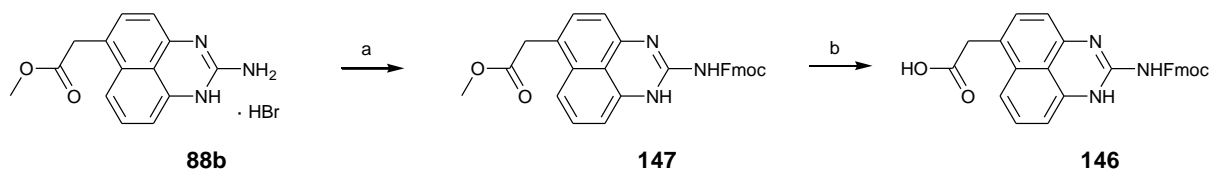
Die Konjugation der an der 2-Aminogruppe mit einem Linker versehenen Verbindung **76** gelang auch bei Verzicht auf NEt<sub>3</sub> als Base bzw. mit dem gegenüber HOBT/DIC reaktiveren

Aktivierungsreagenz HATU (in Kombination mit DIPEA) nicht. Ein Wechsel des Lösungsmittels von DMF zu NMP führte zwar dazu, dass das Massensignal des gewünschten Konjugats im MALDI-Massenspektrum sichtbar war, jedoch war die Intensität dieses Signals gegenüber dem Eduktsignal und Signalen, die von verschiedenen Verunreinigungen herrührten, nur äußerst gering. Eine Isolation des Produkts mittels HPLC war nicht möglich. Auch die Konjugation des mit zwei 2-Aminoperimidin-Einheiten versehenen Derivats **143** gelang nicht.



**Abbildung 62:** Versuch der Synthese von 2-Aminoperimidin-PNA-Konjugaten. a: 1) **76**, HOBT, DIC,  $\text{NEt}_3$ , DMF, RT, 20 h; 2) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h; b: 1) **76**, HOBT, DIC, NMP, RT, 20 h; 2) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h; c: 1) **76**, HATU, DIPEA, NMP, RT, 20 h; 2) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h; d: 1) **145**, HOBT, DIC, DMF, RT, 24 h; 2) Piperidin, DMF, RT, 30 min; e: 1) **143**, HOBT, DIC,  $\text{NEt}_3$ , DMF, RT, 20 h; 2) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h.

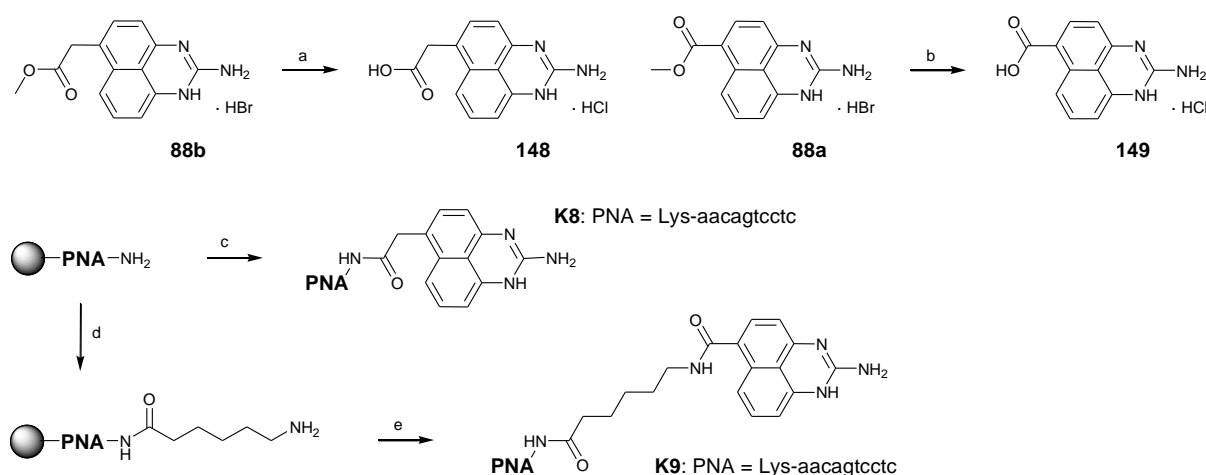
Im Folgenden wurde daher die Konjugation von am Naphthylring modifizierten 2-Aminoperimidin-Derivaten versucht. In der Hoffnung, eine Schützung der 2-Aminogruppe würde die Konjugation erleichtern, wurde zunächst Verbindung **88b** mit Fmoc-Cl geschützt und die Methyl estergruppe mit 6 N HCl hydrolysiert. Die so erhaltene Carbonsäure **146** wurde direkt für Konjugationsversuche an **PNA1** eingesetzt, die jedoch alle nicht zum gewünschten Zielprodukt führten.



**Abbildung 63:** Fmoc-Schützung und Hydrolyse von **88b**. a: Fmoc-Cl, DIPEA, DCM (abs.), RT, 21 h, 45 %; b: 6 N HCl, 100 °C, 12 h.

Eine erfolgreiche Konjugation gelang schließlich mit den beiden ungeschützten Verbindungen **88a** und **88b**. Beide Verbindungen wurden zunächst einer Hydrolyse der Methyl estergruppe in siedendem HCl unterzogen und dann für Konjugationsexperimente eingesetzt. Die freie Carbonsäure von **88b** konnte unter Verwendung von HOBT/DIC als Aktivierungsreagenzien und NMP als Lösungsmittel zum Konjugat **K8** umgesetzt werden, wobei auf die Zugabe von  $\text{NEt}_3$  verzichtet wurde. HPLC-Chromatogramm und MALDI-Massenspektrum

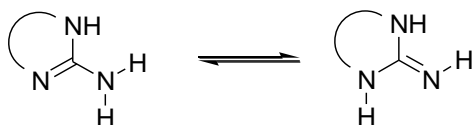
zeigten eine deutlich unvollständigere Umsetzung der PNA als im Fall der 2-Aminobenzimidazol-Konjugate. Die freie Carbonsäure von **88a**, das sich – vermutlich aufgrund der geringeren Elektronendichte im Naphthylring – als einziges der 2-Aminoperimidin-Derivate auch bei basischem pH-Wert als stabil erwiesen hatte (siehe 5.1.4), ließ sich sogar unter den gleichen Bedingungen wie die 2-Aminobenzimidazol-Derivate an **PNA1** konjugieren, so dass der Wechsel des Lösungsmittels hin zu NMP und der Verzicht auf  $\text{NEt}_3$  nicht nötig waren. Auch in diesem Fall war die Umsetzung jedoch unvollständig.



**Abbildung 64:** Synthese der beiden PNA-Konjugate **K8** und **K9**. a: HCl (6 N), 100 °C, 4 h, RT, 20 h; b: HCl (6 N), 100 °C, 7.5 h, RT, 20 h; c: 1) **148**, HOBT, DIC, NMP, RT, 21 h; 2) TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h; d: 1) **145**, HOBT, DIC, DMF, RT, 24 h; 2) Piperidin, DMF, RT, 30 min; e: 1) **149**, HOBT, DIC,  $\text{NEt}_3$ , DMF, RT, 20 h; 2) TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5), RT, 3 h.

## 5 Unspezifische RNA-Spaltung durch Guanidinanaloge

Die Erforschung von Guanidinanaloge als potenzielle RNA-Spalter hat in der Arbeitsgruppe Göbel eine lange Tradition (vgl. auch Kapitel 2.3.3.4). Während die ersten untersuchten Verbindungen lediglich zur Spaltung von Modellphosphaten in der Lage gewesen waren, führte eine Verschiebung des  $pK_a$ -Werts der getesteten Substanzen in den neutralen Bereich zu auch unter physiologischen Bedingungen aktiven RNA-Spaltern. Die Aktivität wurde dabei erhöht, wenn Verbindungen mit mehreren Guanidin-analogen Einheiten eingesetzt wurden.<sup>[7]</sup> In jüngerer Vergangenheit zeigte K. Dörr in ihrer Doktorarbeit, dass lediglich Verbindungen mit einer möglichst kleinen Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer (Abbildung 65) Spaltaktivität aufweisen.<sup>[8]</sup> Zudem scheint auch ein größeres aromatisches System und die damit verbundene Möglichkeit zu stärkeren  $\pi$ -stacking-Wechselwirkungen positive Auswirkungen auf die Spaltaktivität zu haben. Ob diese Eigenschaft aber tatsächlich die Aktivität eines Einzelmoleküls erhöht oder lediglich die Aggregationstendenz und damit verbunden die Spaltung durch Aggregate, ist unklar.



**Abbildung 65:** Gleichgewicht zwischen Amino- und Imino-Tautomer eines Guanidinanalogons.

Zusammengefasst scheinen folgende Faktoren die Spaltaktivität eines Guanidinanalogons zu erhöhen:

- $pK_a$ -Wert im annähernd neutralen Bereich (pH 6 – 8)
- Niedrige Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer
- Große  $\pi$ -stacking-Fläche
- Mehrere Guanidin-analoge Einheiten innerhalb einer Verbindung

Durch Spaltexperimente mit verschiedenen, größtenteils bisher noch nicht getesteten Verbindungen sollte der Einfluss dieser Faktoren weiter untersucht werden.

### 5.1 Eigenschaften verschiedener Guanidinanaloge

Vor der Durchführung der Spaltexperimente war zunächst eine genauere Untersuchung der Eigenschaften der potentiellen RNA-Spalter nötig. Damit sollten zum einen Voraussagen

über die Aktivität einer Verbindung getroffen werden, zum anderen die optimalen Bedingungen für die Spaltexperimente (insbesondere der geeignete pH-Wert) ermittelt werden.

### 5.1.1 $pK_a$ -Werte der untersuchten Guanidinanaloga

Für die katalytische Aktivität einer Verbindung ist der  $pK_a$ -Wert von entscheidender Bedeutung, bestimmt er doch, ob die Verbindung bei der Spaltung einer RNA-Phosphordiesterbindung als Protonendonator oder -akzeptor fungieren kann. Substanzen mit einem  $pK_a$ -Wert im neutralen Bereich können sowohl Donor als auch Akzeptor sein und besitzen damit gleichzeitig säure- und basenkatalytische Aktivität.

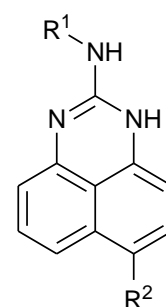
Die Bestimmung der  $pK_a$ -Werte der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen erfolgte – sofern die  $pK_a$ -Werte nicht bereits aus der Literatur bekannt waren – durch Messung der Absorption einer Lösung der jeweiligen Verbindung bei unterschiedlichen pH-Werten der Lösung. Um die für die Absorptionsmessung am besten geeignete Wellenlänge zu ermitteln, wurden zunächst ein UV-Spektrum bei saurem pH-Wert sowie eines bei basischem pH-Wert gemessen. Durch Vergleich der beiden Spektren wurde dann die Wellenlänge bestimmt, bei der die Absorptionswerte die größte Differenz aufwiesen. Anschließend wurde eine saure Lösung der jeweils untersuchten Verbindung schrittweise mit einer Base versetzt (zunächst 1 M TRIS-Lösung, ab pH 7.5 dann 1 M NaOH-Lösung, bei Bedarf später auch stärker konzentrierte Natronlauge). Nach jeder Zugabe von Base wurde mithilfe einer pH-Elektrode der pH-Wert der Lösung ermittelt und dann bei der zuvor identifizierten Wellenlänge die Absorption der Lösung gemessen. Durch Auftragung der Absorptionswerte gegen den pH-Wert wurde eine sigmoidale Kurve erhalten, deren Wendepunkt dem  $pK_a$ -Wert der Verbindung entspricht. Für manche Verbindungen wurden in dem gewählten Messfenster (pH 2.5 – ca. 12) zwei  $pK_a$ -Werte bestimmt. Jede  $pK_a$ -Wert-Bestimmung wurde einmal wiederholt und der Mittelwert der beiden gefundenen Werte berechnet.

Als Lösungsmittel für die  $pK_a$ -Wert-Bestimmungen wurde in der Regel ein 1:1-Gemisch aus Wasser und Methanol verwendet, um eine vollständige Löslichkeit der Verbindungen über den gesamten pH-Bereich zu gewährleisten. Das Ansäuern erfolgte mit Essigsäure bzw. 2M HCl. Ein Test mit 2-Amino-6-bromperimidin **77** zeigte für die Messung des  $pK_a$ -Werts in reinem Wasser bzw. Wasser/Methanol (1:1) einen Unterschied der ermittelten Werte von 0.1. Eine solche Abweichung ist durchaus akzeptabel, wenn – wie in der vorliegenden Arbeit – lediglich abgeschätzt werden soll, ob der Wert ungefähr im neutralen Bereich liegt.

Der  $pK_a$ -Wert von 2-Aminoperimidin **55** war bereits von K. Dörr ermittelt worden und liegt bei 8.1. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die  $pK_a$ -Werte verschiedener am Naphthyl-Ring bzw. an der Aminogruppe substituierter 2-Aminoperimidin-Derivate gemessen. Diese lagen alle im Bereich zwischen 6.7 und 8.1, die jeweiligen Verbindungen sollten also in dieser Hinsicht ebenso gut zur Spaltung von RNA geeignet sein wie die Stammverbindung **55**. Für die Verbindungen **77** und **88a** mit  $pK_a$ -Werten von 7.2 bzw. 6.7 könnte allerdings die optimale Spaltaktivität bei einem pH-Wert von 7 erreicht werden, während der optimale pH-Wert für die anderen untersuchten Verbindungen eher bei etwa 8 liegen sollte, wie es auch schon bei der Stammverbindung der Fall gewesen war.

**Tabelle 3:**  $pK_a$ -Werte verschiedener 2-Aminoperimidin-Derivate.

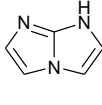
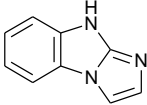
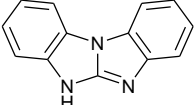
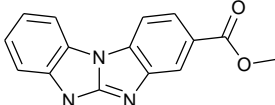
Verbindung	Restgruppen	$pK_a$ -Wert
<b>55</b>	$R^1 = R^2 = H$	8.1 <sup>[8]</sup>
<b>150</b>	$R^1 = CH_3, R^2 = H$	7.7
<b>77</b>	$R^1 = H, R^2 = Br$	7.2
<b>89</b>	$R^1 = H, R^2 = CH_3$	8.1
<b>88a</b>	$R^1 = H, R^2 = COOMe$	6.7
<b>88b</b>	$R^1 = H, R^2 = CH_2COOMe$	7.7
<b>88c</b>	$R^1 = H, R^2 = (CH_2)_2COOMe$	7.9



Auch 1*H*-imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** war von K. Dörr als RNA-Spalter getestet und der pH-Wert bestimmt worden.<sup>[8]</sup> Da sich gezeigt hatte, dass **56** mit einem Substituenten unter basischen Bedingungen nicht stabil ist (vgl. Kapitel 3.3.2), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Derivate synthetisiert, die mit einem (**132**) bzw. zwei Phenylringen anelliert sind (**115** und **116**). **116** trägt zusätzlich an einem der Phenylringe einen Carbonsäuremethylester-Rest. Während der  $pK_a$ -Wert von **56** mit 7.4 perfekt im physiologischen Bereich liegt, führt das Anfügen der Phenylringe zu einer teils erheblichen Absenkung des ersten  $pK_a$ -Werts. Durch den negativen mesomeren Effekt der COOMe-Gruppe bedingt ist der  $pK_a$ -Wert von **116** noch weiter erniedrigt. Solch niedrige Werte lassen zunächst eine nur

sehr geringe Spaltaktivität erwarten, die vermutlich bei einem pH-Wert von 6 deutlich höher sein dürfte als bei pH 7 oder 8.

**Tabelle 4:**  $pK_a$ -Werte von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** und seinen Derivaten.

Verbindung				
	<b>56</b>	<b>132</b>	<b>115</b>	<b>116</b>
$pK_a$ -Wert(e)	7.4 <sup>[8]</sup>	6.5 bzw. 12.4	4.7 bzw. 11.3	3.7 bzw. 10.5

Für 2-Aminobenzimidazol **54**, das ebenfalls schon von K. Dörr als RNA-Spalter getestet worden war, wurde ein  $pK_a$ -Wert von 7.3 ermittelt. Das Anfügen eines weiteren Ringes, in dem die 2-Aminogruppe Teil einer Amidbindung ist (**134**), führt zu einer Absenkung des ersten  $pK_a$ -Wertes auf 3.7. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass **134** keine oder nur eine geringe Spaltaktivität besitzt.

**Tabelle 5:**  $pK_a$ -Werte von 2-Aminobenzimidazol **54** und seinem Derivat.

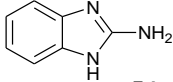
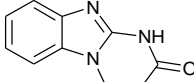
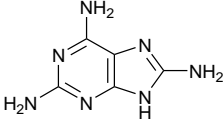
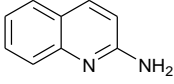
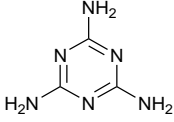
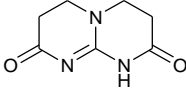
Verbindung		
	<b>54</b>	<b>134</b>
$pK_a$ -Wert(e)	7.3	3.7 bzw. 10.3

Tabelle 6 zeigt die  $pK_a$ -Werte weiterer Guanidinanaloga, die im Rahmen dieser Arbeit als RNA-Spalter getestet wurden. 2,6,8-Triaminopurin **139** und 2-Aminochinolin **151** (streng genommen kein Guanidin-, sondern ein Amidinanalogen) besitzen einen  $pK_a$ -Wert im Bereich von 6 bis 8, stellen also potentielle RNA-Spalter da. Die optimale Spaltaktivität dürfte dabei jeweils bei pH-Werten im Bereich des eigenen  $pK_a$ -Werts liegen. Der  $pK_a$ -Wert von Melamin **152** liegt mit 5.2 außerhalb des optimalen Bereichs. Dennoch ist zumindest bei einem pH-Wert von 6 Spaltaktivität nicht ausgeschlossen. Für die nicht UV-aktive Verbindung **135** konnte der  $pK_a$ -Wert mit der hier verwendeten Methode nicht bestimmt werden. Durch einen Vergleich mit anderen hier untersuchten Strukturen (insbesondere mit

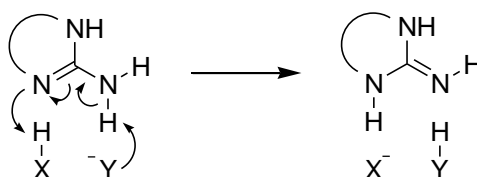
Verbindung **134**) lässt sich jedoch abschätzen, dass der  $pK_a$ -Wert – bedingt durch die beiden elektronenziehenden Carbonylgruppen – deutlich unter 7 liegen sollte.

**Tabelle 6:**  $pK_a$ -Werte weiterer Guanidin- und Amidinanaloga.

Verbindung				
	<b>139</b>	<b>151</b>	<b>152</b>	<b>135</b>
$pK_a$ -Wert(e)	10.8, 6.2 und 2.4 <sup>[141]</sup>	7.0	5.2 <sup>[142]</sup>	Nicht bestimmt

### 5.1.2 Energiebarrieren zwischen Amino- und Imino-Tautomer

In der Doktorarbeit von K. Dörr wurde gezeigt, dass auch zwischen der Spaltaktivität und der Höhe der Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer eine Korrelation besteht. Ist diese Energiedifferenz möglichst klein (ca. 0 – 5 kcal/mol), so kann bei der RNA-Spaltung ein „Protonen Shuttle“ zwischen Spalter und Phosphordiesterbindung stattfinden: Während das Stickstoffatom, das Teil der endocyclischen Doppelbindung ist, als Base fungiert und die 2'-OH-Gruppe deprotoniert, wirkt das Stickstoffatom der Aminogruppe als Säure und protoniert ein Oxoanion des Phosphordiesters. Bei Verbindungen mit einer größeren Energiedifferenz ist dieser doppelte Protonen-Shift energetisch ungünstig und wird daher vermutlich allenfalls in geringem Maße stattfinden. Tatsächlich zeigten Substanzen mit höherer Energiebarriere in der Arbeit von K. Dörr keine bzw. nur eine sehr geringe Spaltaktivität.<sup>[8]</sup>



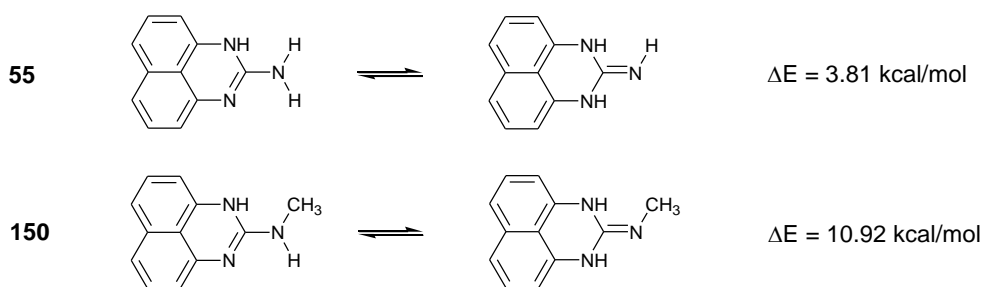
**Abbildung 66:** Umwandlung des Amino-Tautomers in das Imino-Tautomer durch einen doppelten Protonen-Shift.

Die Berechnung der Energiebarrieren erfolgte in der Arbeit von K. Dörr mithilfe der semiempirischen AM1-Methode. Diese Methode ist sehr einfach und damit auch potentiell ungenau, doch die Nachprüfung einzelner Werte durch Prof. R. Berger mittels *ab initio*-Rechnungen mit komplexen Basissätzen hatte ähnliche Tendenzen ergeben.<sup>[8]</sup> Aus diesem Grund wurden die Energiedifferenzen auch in der vorliegenden Arbeit mithilfe der AM1-Methode



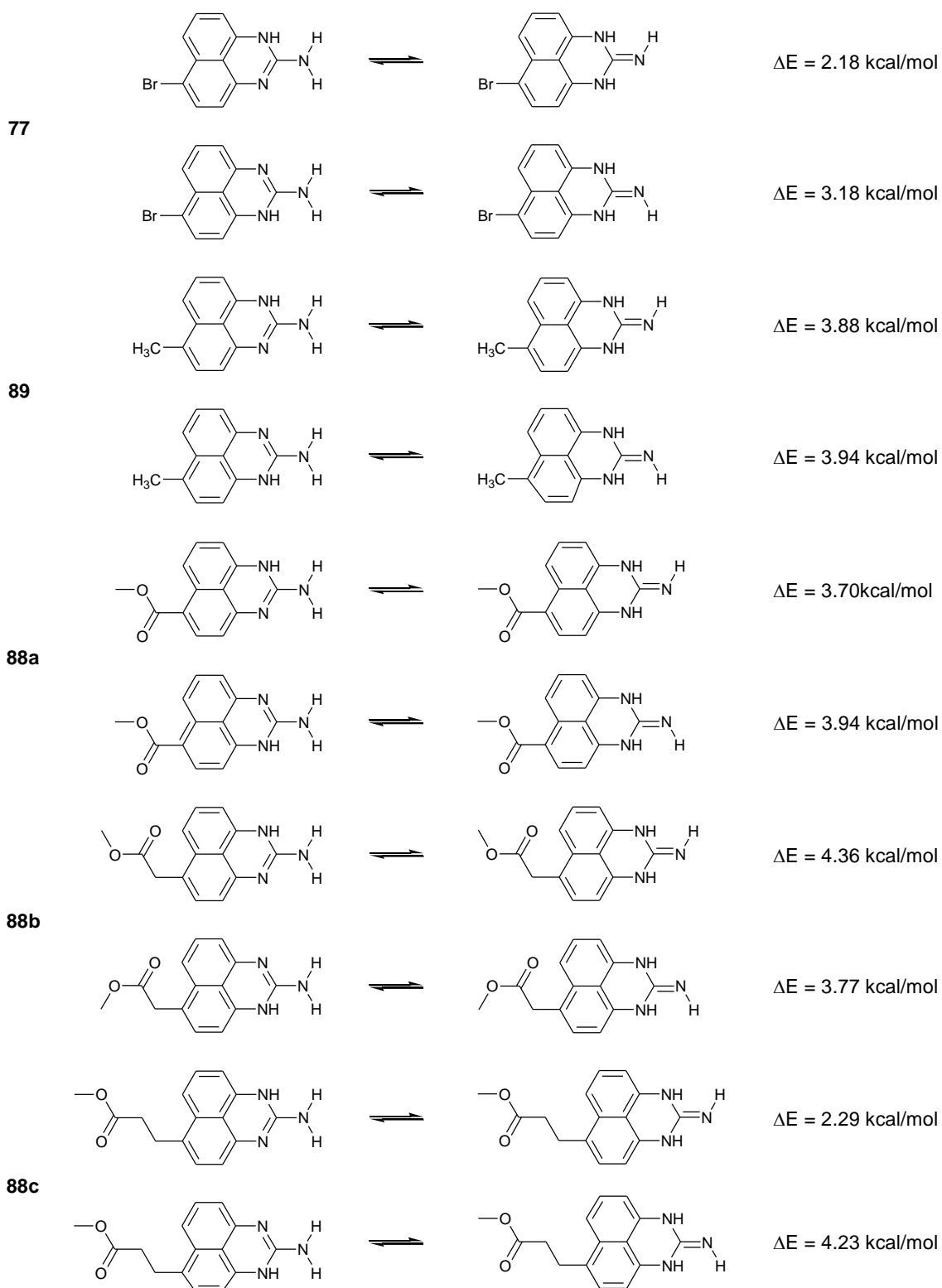
berechnet, allerdings wurde hierfür das Programm *SPARTAN '08 V1.2.0* verwendet, während K. Dörr *ChemDraw Ultra 8.0* genutzt hatte.

Zur Berechnung der Differenzen wurde zunächst das Amino-Tautomer der untersuchten Verbindung mit *SPARTAN* unter Berücksichtigung der Aromatizität gezeichnet und die Geometrie der Struktur dann mithilfe der Funktion „Minimize“ optimiert. Diese Funktion verwendet *MMFF-molecular mechanics* zur Strukturverfeinerung. Anschließend wurde mit der AM1-Methode die Standardbildungsenthalpie berechnet. Der Vorgang wurde für das entsprechende Imino-Tautomer wiederholt und anschließend die Differenz der beiden Standard-Bildungsenthalpien gebildet. Für einige Verbindungen sind zwei verschiedene Protonenshuttle-Vorgänge denkbar, entsprechend wurden in diesen Fällen beide Energiedifferenzen berechnet. Die jeweils berechneten Werte sind auf den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 67:** Energiedifferenzen für 2-Aminoperimidin **55** und 2-(Methylamino)perimidin **150**.

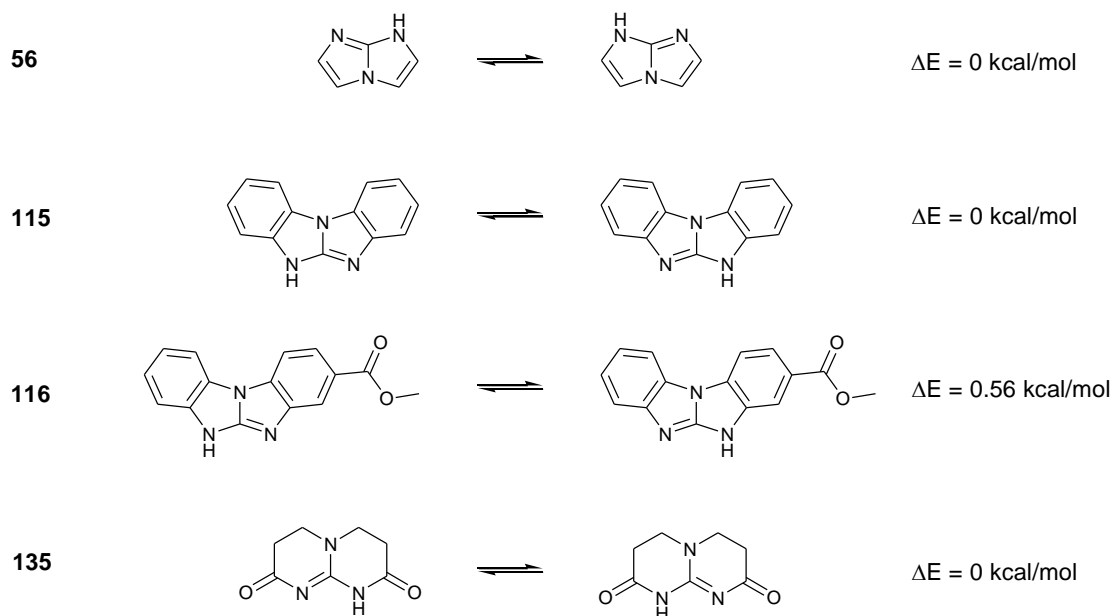
Während die Energiedifferenz für das von K. Dörr als sehr effizienten RNA-Spalter beschriebene 2-Aminoperimidin **55** eher klein ist (3.81 kcal/mol), liegt die Differenz für das *N*-methylierte Derivat **150** mit 10.92 kcal/mol sehr viel höher. Dies deckt sich auch mit der von K. Dörr ermittelten eher niedrigen Spaltaktivität von **150** gegenüber **55**<sup>[8]</sup> (vgl. auch Kapitel 5.2.5). Die am Naphthylring substituierten 2-Aminoperimidin-Derivate hingegen wiesen allesamt Energiedifferenzen zwischen 2.18 und 4.36 kcal/mol auf, sollten also im Hinblick darauf ähnlich aktive RNA-Spalter sein wie die Stammverbindung **55**.



**Abbildung 68:** Energiedifferenzen zwischen Amino- und passendem Imino-Tautomer für verschiedene am Naphthylring substituierte 2-Aminoperimidin-Derivate.

Besonders einfach gestaltet sich die Berechnung der Energiedifferenz für Verbindungen wie 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** (vgl. Abbildung 69). In diesen Fällen sind beide Tautomere aufgrund der Molekülsymmetrie identisch, die Energiedifferenz ist damit Null. Eine Derivati-

sierung durch das Anfügen von Resten wie bei Verbindung **116** zerstört zwar die Symmetrie, lässt jedoch die Energiedifferenz nur unwesentlich steigen. Für solche Verbindungen ist daher zumindest im Hinblick auf die Energiedifferenz ebenfalls eine hohe Spaltaktivität zu erwarten.



**Abbildung 69:** Energiedifferenzen symmetrischer Verbindungen und ihrer Derivate.

Für die weiteren in dieser Arbeit untersuchten Guanidinanaloge variiert die Höhe der Energiedifferenzen stark (Abbildung 70). Während die relativ niedrigen Werte für **54**, **134** und **151** eher hohe Spaltaktivitäten erwarten lassen, deuten die höheren Werte für **132** und **152** auf bestenfalls sehr niedrige Spaltaktivität hin. Für 2,6,8-Triaminopurin **139** lassen sich mehrere Energiedifferenzen berechnen. Schon die beiden Werte für die Bildung eines Imins an Position 8 liegen dabei recht weit auseinander. Noch höhere Werte findet man für die Bildung des Amins an Position 3 (nicht dargestellt). Eine eindeutige Vorhersage über die katalytische Aktivität des Moleküls lässt sich daher nicht treffen.

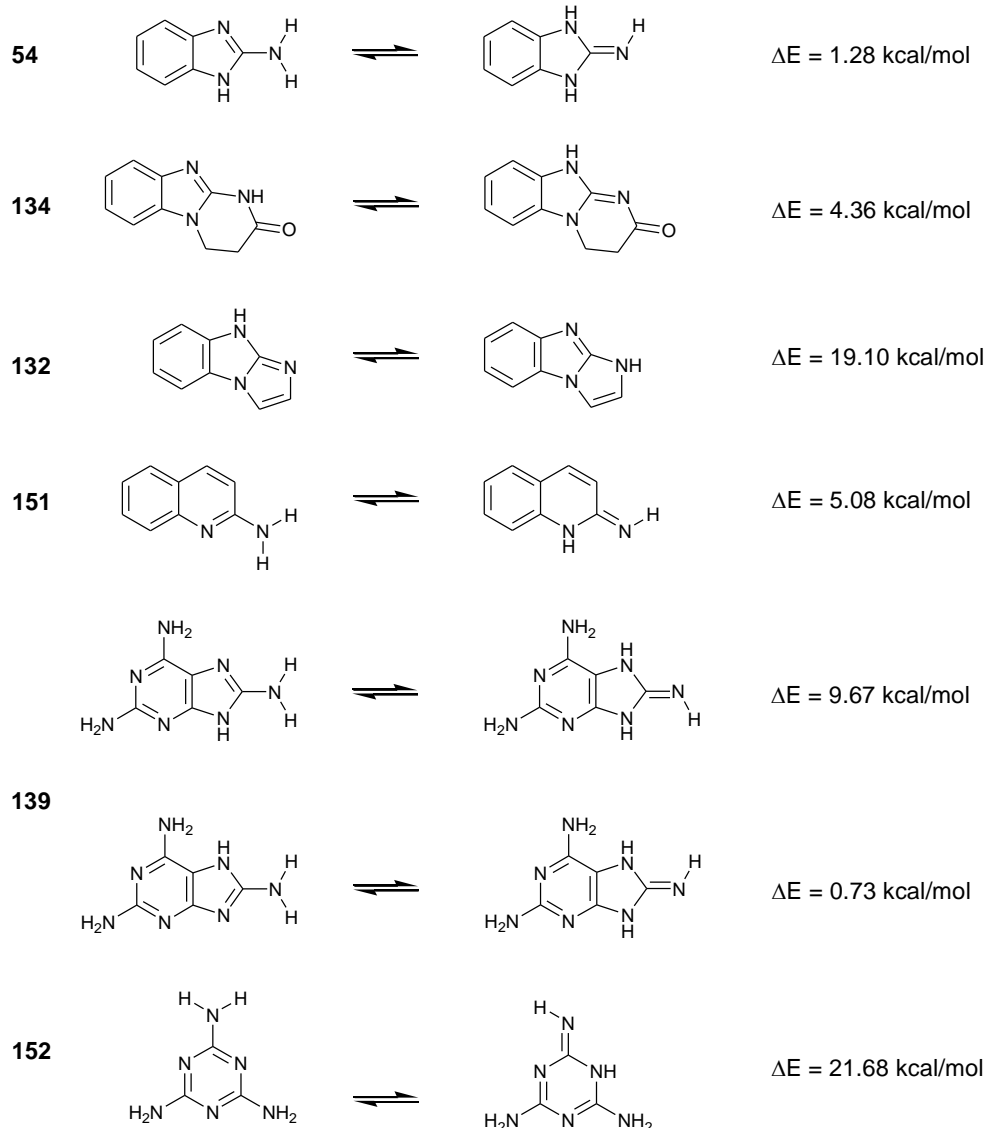


Abbildung 70: Energiedifferenzen weiterer Guanidinanaloga.

### 5.1.3 Aggregationsverhalten der untersuchten Verbindungen

In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass viele der in unserer Arbeitsgruppe als RNA-Spalter untersuchten Verbindungen unter den in den Spaltexperimenten herrschenden Bedingungen zu Aggregation mit dem RNA-Substrat neigen.<sup>[7]</sup> Die Aggregationstendenz ist bedingt einerseits durch Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den häufig positiv geladenen Guanidinanaloga und dem polyanionischen RNA-Rückgrat sowie andererseits durch *stacking*-Wechselwirkungen zwischen den größtenteils aromatischen Spaltern und den RNA-Basen. Im Extremfall kann die Aggregation zu einer Präzipitation der Aggregate von RNA und RNA-Spalter führen, die bereits in der Inkubations-Lösung oder aber später beim Versetzen der Lösung mit dem Ladepuffer und dem Auftragen aufs Gel auftreten kann.<sup>[8]</sup> Selbst wenn dieser Extremfall nicht eintritt, beeinflusst die Aggregation dennoch häufig die Spaltaktivität

einer Verbindung und macht es in jedem Fall schwierig, zu ermitteln, ob die Spaltaktivität schon vom Einzelmolekül oder lediglich von Aggregaten mit mehreren Spalter-Molekülen ausgeht. Für die Interpretation der Ergebnisse von Spaltexperimenten ist es daher entscheidend, das Aggregationsverhalten der als RNA-Spalter getesteten Verbindungen zu kennen.

Eine Methode zur Analyse des Aggregationsverhaltens einer Verbindung ist die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). FCS ermöglicht die Untersuchung der Fluoreszenz-Fluktuation in sehr kleinen Volumina (Subfemtoliter-Bereich), wie sie z.B. durch die Brownsche Molekularbewegung fluoreszenzmarkierter Teilchen hervorgerufen wird. Dafür wird durch das Objektiv eines konfokalen Mikroskops ein Laserstrahl in die Probe fokussiert und so ein sehr kleines Anregungsvolumen erzeugt. Diffundieren nun fluoreszierende Teilchen durch Brownsche Molekularbewegung in dieses Volumen hinein, so werden diese durch die Photonen des Lasers angeregt und emittieren daraufhin Photonen geringerer Energie. Diese werden über einen Detektor registriert und die Daten an einen Computer weitergegeben. Mithilfe der Autokorrelationsfunktion berechnet dieser die Diffusionszeiten der fluoreszierenden Teilchen. Diese Diffusionszeiten sind abhängig von der Größe der Partikel; größere Partikel diffundieren deutlich langsamer als kleine Teilchen. Auch die Ausbildung großer und mittlerer Aggregate fluoreszenzmarkierter Verbindungen mit anderen Molekülen führt entsprechend zu einem erheblichen Anstieg der Diffusionszeiten gegenüber Einzelmolekülen. Bei kleinen Aggregaten hingegen ist der Zuwachs an Masse gegenüber dem Einzelmolekül zu gering, um eine Detektion mittels FCS zu ermöglichen.<sup>[143]</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FCS-Experimente wurden mit dem FCS-Gerät ConfoCor 2 durchgeführt. Anstelle von RNA wurde Cy5-markierte DNA verwendet, um zeitabhängige Effekte durch die Entstehung von Hydrolyseprodukten zu verhindern. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs diente ein He/Ne-Laser (Anregungswellenlänge 633 nm). Um Aussagen über das Aggregationsverhalten der untersuchten Verbindungen unter den Bedingungen der Spaltexperimente treffen zu können, wurden zu den Spaltexperimenten analoge Bedingungen (pH-Wert, Puffer-Konzentration, Nucleinsäure-Konzentration) gewählt. Um die erforderliche Nucleinsäure-Konzentration zu erreichen, ohne zu hohe Zählraten am Detektor hervorzurufen, wurde ein 1:7-Gemisch aus Cy5-markierter **DNA1** und nicht-markierter **DNA2** verwendet (siehe Abbildung 71). Der für Spaltexperimente notwendige Inkubationsschritt wurde in den FCS-Experimenten ausgelassen. Für Verbindungen, bei denen es sich um subs-

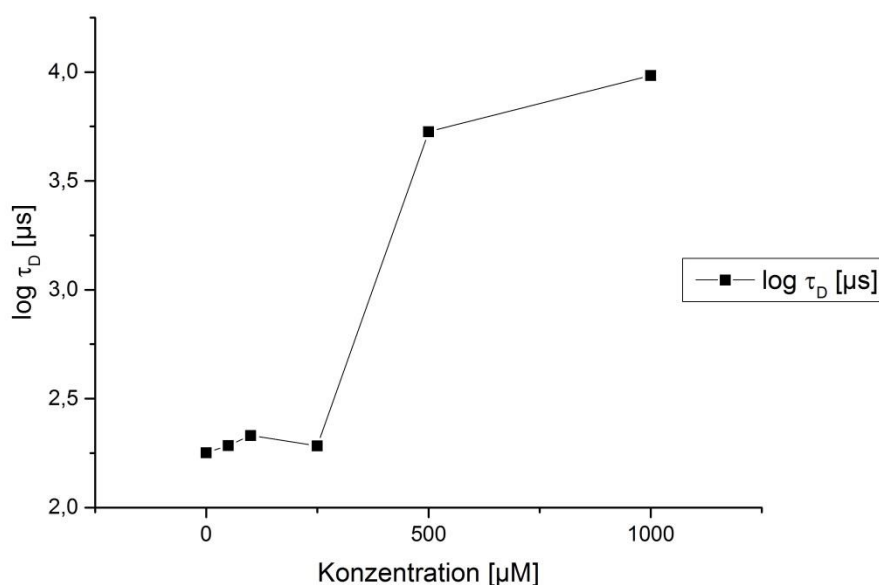
tituierte Derivate einfacherer Verbindungen handelt (2-Aminoperimidin-Derivate, substituiertes 5*H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **116**), wurde lediglich das Aggregationsverhalten der jeweiligen Stammverbindung untersucht. Alle FCS-Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt, für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Diffusionszeiten aus zwei oder drei Messungen verwendet.

**DNA1:** Cy5-5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTU3'

**DNA2:** 5'TGTGGAATTGTGAGCGGATA3'

**Abbildung 71:** Für die FCS-Experimente verwendete DNA-Oligonucleotide.

Die generelle Aggregationstendenz von 2-Aminoperimidin **55** war bereits von K. Dörr gezeigt worden,<sup>[8]</sup> jedoch war dabei der Konzentrationsbereich von 50 bis 500  $\mu\text{M}$ , in dem **55** die höchsten Spaltraten erzielt, nicht genauer untersucht worden. Daher wurden nun FCS-Experimente mit 2-Aminoperimidin-Konzentrationen von 50, 100, 250, 500 und 1000  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

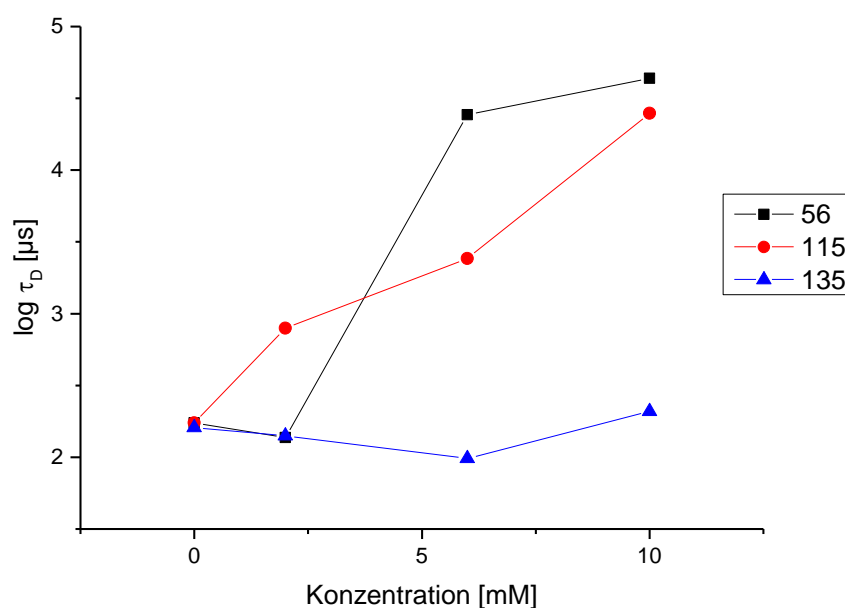


**Abbildung 72:** Diffusionszeit  $\tau_D$  von Cy5-gelabelter **DNA1** in Gegenwart verschieden hoher Konzentration von 2-Aminoperimidin **55**. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden. Bei allen Datenpunkten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zwei FCS-Experimenten.

Wie in Abbildung 72 gezeigt, steigt die mittlere Diffusionszeit der fluoreszenzmarkierten **DNA1** bei 2-Aminoperimidin-Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  und höher deutlich an, was auf starke Aggregation von Nucleinsäure und RNA-Spaltern in diesem Konzentrationsbereich hindeutet. Bei Konzentrationen von 0 bis 250 mM jedoch schwankt die Diffusionszeit nur leicht um den Wert, den **DNA1** ohne Zugabe anderer Substanzen aufweist, so dass hier keine

oder lediglich kleine, mittels FCS nicht detektierbare Aggregate vorzuliegen scheinen. Anders sieht das Ergebnis bei Verbindungen mit mehr als einer 2-Aminoperimidin-Einheit aus: FCS-Experimente mit **94**, das stellvertretend für diese Gruppe von Verbindungen eingesetzt wurde, zeigten deutlich, dass in diesem Fall auch in einem Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  noch Aggregation auftritt.

Die Aggregationsuntersuchungen der weiteren Substanzen wurden – soweit möglich – bei höheren Konzentrationen (2, 6, 10 mM) durchgeführt, da RNA-Spaltexperimente zunächst auch in diesem Bereich erfolgen. Die Diffusionszeit von **DNA1** in Abhängigkeit der jeweiligen Spalter-Konzentration für symmetrische Verbindungen ist in Abbildung 73 dargestellt.

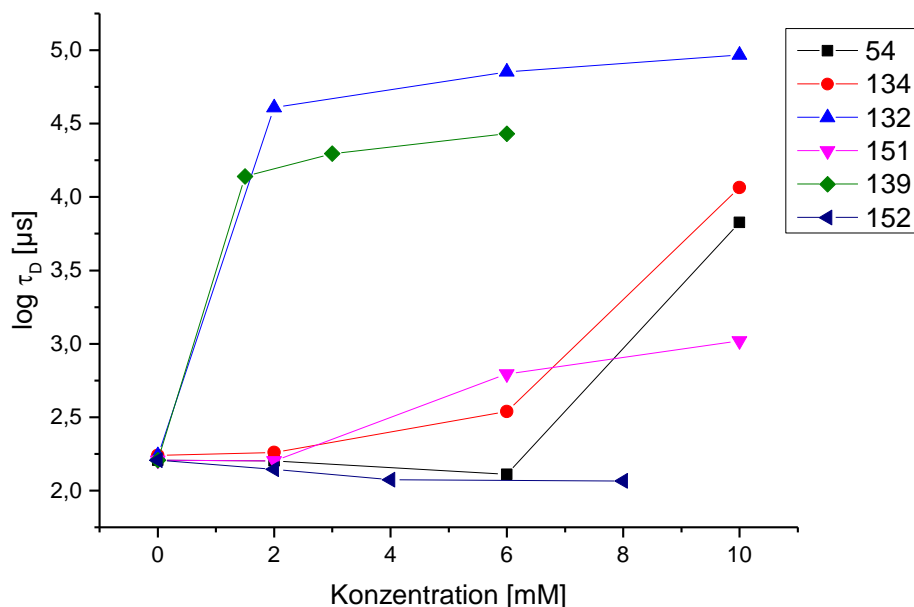


**Abbildung 73:** Diffusionszeit  $\tau_D$  von Cy5-gelabelter **DNA1** in Gegenwart verschieden hoher Konzentration der symmetrischen Verbindungen **56**, **115** und **135**. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden; die Linien stellen keine Interpolation dar.

*5H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115** mit seinem sich über vier Ringe erstreckenden aromatischen System zeigt dabei wenig überraschend die größte Aggregationstendenz: Auch bei der niedrigsten untersuchten Konzentration (2 mM) ist die Diffusionszeit noch deutlich erhöht. Auch *1H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** scheint bei Konzentrationen  $\geq 6$  mM Aggregate mit Nucleinsäuren zu formen, zeigt bei einer Konzentration von 2 mM jedoch keine Aggregation mehr. Das nicht aromatische Pyrimido[1,2-*a*]pyrimidindion-Derivat **135** hingegen führt zu keinem Anstieg der Diffusionszeiten. Auch wenn dieser Befund nahelegt, dass **135** im untersuchten Konzentrationsbereich nicht zur Aggregation mit DNA oder RNA neigt, kann die Bildung von Aggregaten in diesem Fall nicht völlig ausgeschlossen werden, da

die mittels FCS registrierten Partikelzahlen deutlich unter den in Abwesenheit eines RNA-Splatters gemessenen Werten liegen – häufig ebenfalls ein Indiz für das Vorliegen von Aggregaten.

Abbildung 74 zeigt die mittels FCS ermittelten Diffusionszeiten von **DNA1** in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von weiteren im Rahmen dieser Arbeit getesteten Verbindungen.



**Abbildung 74:** Diffusionszeit  $\tau_D$  von Cy5-gelabelter **DNA1** in Gegenwart verschieden hoher Konzentration der Verbindungen **54**, **134**, **132**, **151**, **139** und **152**. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden; die Linien stellen keine Interpolation dar.

Eingeschränkt durch die maximale Konzentration der Stammlösungen, die aufgrund mangelnder Löslichkeit geringer ausfallen kann als die verwendete Standard-Konzentration von 50 mM, konnten die Aggregationsstudien mit Melamin **152** und 2,6,8-Triaminopurin **139** nur bis hin zu Konzentrationen von 8 bzw. 6 mM anstelle der sonst üblichen 10 mM durchgeführt werden. Von den in Abbildung 74 aufgeführten Verbindungen neigen Imidazo[1,2-*a*]benzimidazol **132** und 2,6,8-Triaminopurin **139** schon ab Konzentrationen von 2 bzw. 1.5 mM zu Aggregation mit DNA. Für beide Substanzen sind die ermittelten Diffusionszeiten im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich stark erhöht. Andere Verbindungen scheinen erst bei höheren Konzentrationen mit Nucleinsäuren zu aggregieren: Für das Tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol **134** sowie für 2-Aminochinolin **151** ist ein signifikanter Anstieg der Diffusionszeit erst ab einer Konzentration von 6 mM zu beobachten, für 2-Aminobenzimidazol **54** sogar erst ab einer Konzentration von 10 mM. In Gegenwart von Melamin **152** verändert sich die Diffusionszeit Cy5-markierter **DNA1** auch bei Melamin-



Konzentrationen von 8 mM nicht, es ist daher davon auszugehen, dass **152** im untersuchten Konzentrationsbereich nicht mit DNA oder RNA aggregiert. Für diesen Befund spricht ebenfalls, dass die ermittelte Partikelzahl dabei – anders als bei **135** – stets im Bereich des für **DNA1** in Abwesenheit von RNA-Spaltern erzielten Wertes liegt.

Bei der Interpretation der mit den hier untersuchten Verbindungen durchgeführten Spaltexperimenten ist darauf zu achten, dass eine beobachtete Spaltung von RNA nur dann eindeutig der Spaltaktivität von Einzelmolekülen zuzuordnen ist, wenn die FCS-Experimente im betreffenden Konzentrationsbereich keine Aggregationstendenz für die jeweilige Verbindung zeigen. Andernfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Spaltung lediglich durch Aggregate erfolgt.

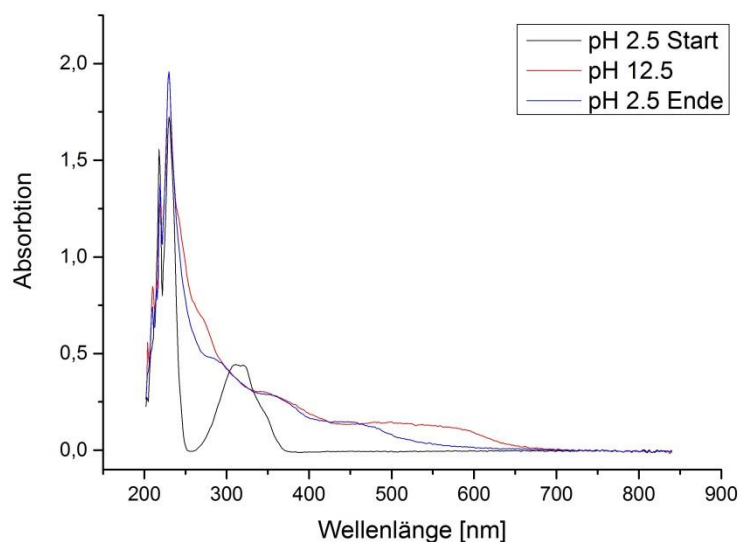
#### 5.1.4 Stabilität der Guanidinanaloga

Die Instabilität von 2-Aminoperimidin und einigen Derivaten als freie Base ist bereits aus der Literatur bekannt<sup>[89,92]</sup> und stellte bereits bei der Synthese von 2-Aminoperimidin-Derivaten eine Schwierigkeit dar (vgl. Kapitel 3.2). Bei der Messung der  $pK_a$ -Werte zeigte sich die mangelnde Stabilität dieser Verbindungen insbesondere im basischen Milieu erneut: Bei der Titration mit NaOH verfärbten sich die Lösungen bei höheren pH-Werten meist irreversibel bräunlich. Um festzustellen, welche Verbindungen auch im basischen pH-Bereich beständig sind und so z.B. für eine Festphasen-Konjugation an DNA und die dafür nötige Festphasen-Abspaltung mit  $NH_3$  in Frage kämen, wurden mittels UV/vis-Spektroskopie Stabilitätstests mit verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen durchgeführt.

Dafür wurde die Verbindung in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und MeOH gelöst, die Lösung mit Essigsäure und HCl auf einen pH-Wert von 2.5 gebracht und ein UV/vis-Spektrum gemessen. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 5 M NaOH auf einen pH-Wert von etwa 12.5 eingestellt und nach einer Inkubationszeit von 5 min erneut ein UV/vis-Spektrum gemessen. Durch Zugabe von 5 M HCl wurde wieder der Ausgangs-pH-Wert erreicht und ein drittes UV/vis-Spektrum gemessen. Bei basenstabilen Verbindungen sollten die beiden bei saurem pH-Wert bestimmten UV/vis-Spektren identisch sein. Dies war sowohl bei 2-Aminobenzimidazol **54** und seinem Derivat **134** als auch bei Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** und den derivatisierten Verbindungen **115**, **116** und **132** der Fall.

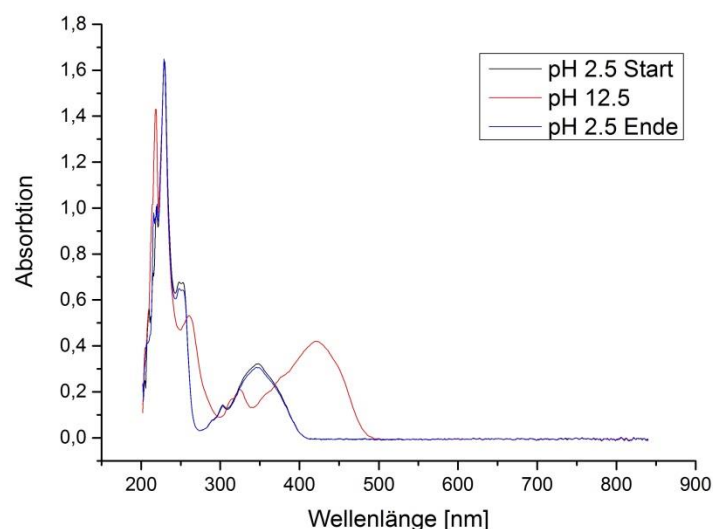
Ein anderes Bild zeigte sich bei der Untersuchung von 2-Aminoperimidin **55**: Sowohl bei der Stammverbindung als auch bei der *N*-methylierten Verbindung **150** sowie den am Naphthyl-

ring substituierten Verbindungen **77**, **88b**, **88c** und **89** konnte nach dem erneuten Ansäuern das ursprüngliche UV/vis-Spektrum nicht wiederhergestellt werden. Beispielhaft sind in Abbildung 75 die UV/vis-Spektren für das mit einem Essigsäuremethylester-Rest substituierte 2-Aminoperimidin-Derivat **88b** dargestellt; in den anderen Fällen zeigte sich ein ähnliches Bild.



**Abbildung 75:** UV/vis-Spektren von 2-Aminoperimidin-Derivat **88b**. In Schwarz ist das Ausgangsspektrum im sauren pH-Bereich dargestellt, in Rot das Spektrum im basischen Milieu. Durch erneutes Ansäuern konnte das ursprüngliche Spektrum nicht wiederhergestellt werden (blau dargestellt).

Einzige Ausnahme unter den 2-Aminoperimidin-Derivaten bildete die am Naphthylring mit einer Carbonsäuremethylester-Gruppe substituierte Verbindung **88a**. In diesem Fall waren die beiden bei saurem pH-Wert aufgenommenen Spektren identisch (Abbildung 76). Auch war hier die Gelbfärbung der Lösung, die im basischen Milieu erfolgte, reversibel. Offenbar ist die Verbindung, vermutlich bedingt durch die vom elektronenziehenden Substituenten hervorgerufene geringere Elektronendichte, sehr viel stabiler als die anderen Derivate.



**Abbildung 76:** UV/vis-Spektren des 2-Aminoperimidin-Derivats **88a**. Das ursprünglich im sauren Milieu aufgenommene Spektrum (schwarz) und das nach erneutem Ansäuern gemessene Spektrum (blau) sind nahezu deckungsgleich. In Rot ist das UV/vis-Spektrum bei basischem pH-Wert dargestellt.

Die für die hier beschriebenen Stabilitätstests verwendeten basischen Bedingungen sind eher harsch, doch die Tatsache, dass bereits 5 min bei pH 12.5 ausreichen, um die Verbindung zu zersetzen, lässt vermuten, dass die basenlabilen 2-Aminoperimidin-Derivate auch bei mildereren basischen pH-Werten zersetzungsanfällig sind. Saure Bedingungen scheinen den Verbindungen jedoch nichts anzuhaben, so dass eine Lagerung als Hydrochloride oder Hydrobromide sinnvoll erscheint.

## 5.2 Spaltexperimente mit Guanidinanaloga

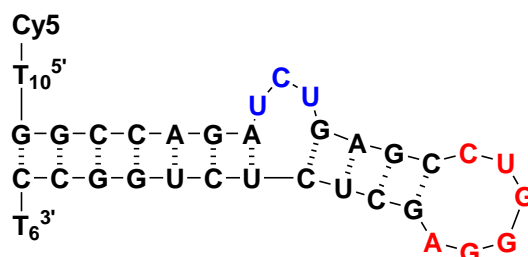
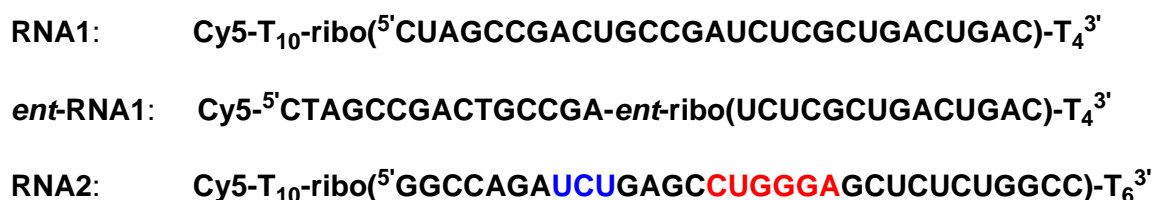
Um beurteilen zu können, wie gut sich die Spaltaktivität einer Verbindung anhand von  $pK_a$ -Wert und Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer vorhersagen lässt und welchen Einfluss weitere Faktoren wie etwa die Aggregationstendenz haben, wurden die zuvor beschriebenen Guanidinanaloga in Spaltexperimenten mit RNA eingesetzt.

### 5.2.1 Durchführung der Spaltexperimente

Für die Untersuchung der Spaltaktivität der verschiedenen Guanidinanaloga wurde das jeweilige RNA-Substrat in Gegenwart von TRIS-HCl-Puffer des gewünschten pH-Werts mit einer Lösung des jeweiligen potentiellen RNA-Spalters versetzt und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Experimente wurden mit pH-Werten von 6, 7 oder 8 durchgeführt, wobei jeweils der pH-Wert gewählt wurde, der dem  $pK_a$ -Wert der untersuchten Verbindung am nächsten lag. So sollte eine gleichzeitige Säure- und Basenkatalyse durch das jeweilige

Guanidinanalogon ermöglicht werden. Trotz der geringen Pufferleistung bei pH 6 wurde für alle pH-Werte TRIS-Puffer verwendet, da die Spaltraten je nach verwendetem Puffer variieren können.<sup>[144]</sup> Um sicher zu gehen, dass der pH-Wert auch nach Zugabe des Spalters den richtigen Wert besitzt, wurden die pH-Werte der Ansatzlösungen überprüft.

Um eine einfache Detektion der Spaltprodukte zu ermöglichen, wurden mit dem Cyanin-Farbstoff Cy5 5'-markierte RNA-Substrate verwendet. Zwischen dem Farbstoff und der eigentlichen RNA-Sequenz sind dabei jeweils zehn unter den Spaltbedingungen stabile DNA-Nucleotide als Spacer eingebaut. Dadurch wird verhindert, dass bei der RNA-Spaltung sehr kurze und damit schwer detektierbare Fragmente entstehen. Auch am 3'-Ende tragen die RNA-Substrate DNA-Nucleotide (jeweils vier oder sechs), was die bessere Unterscheidung der längsten Spaltprodukte vom ungespaltenen Substrat ermöglichen soll.<sup>[7]</sup> Für die Spaltversuche mit unspezifischen RNA-Spaltern wurden die lineare 29mer-RNA **RNA1** sowie die von HIV-1-TAR abgeleitete 31mer-*hairpin*-Struktur **RNA2** verwendet (Abbildung 77), die schon in früheren Arbeiten zum Einsatz gekommen waren. Auf diese Weise sollte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Zusätzlich kam das enantiomere RNA-Substrat **ent-RNA1** zum Einsatz, das dieselbe Sequenz wie **RNA1** besitzt, wobei es sich bei 14 Nucleotiden um enantiomere RNA-Bausteine handelt. Die nicht enantiomeren Nucleotide sind in diesem Fall Desoxynucleotide, um Spaltung in diesem Bereich zu verhindern.



**Abbildung 77:** Sequenzen der drei für Spaltexperimente mit unspezifischen RNA-Spaltern verwendeten RNA-Substrate. Von **RNA2** ist zusätzlich die Sekundärstruktur abgebildet.

Während lineare RNA-Substrate wie **RNA1** nach Inkuabtion mit einem RNA-Spalter eine Spaltung sämtlicher RNA-Phosphodiesterbindungen erwarten lassen, ist bei **RNA2** nur dann

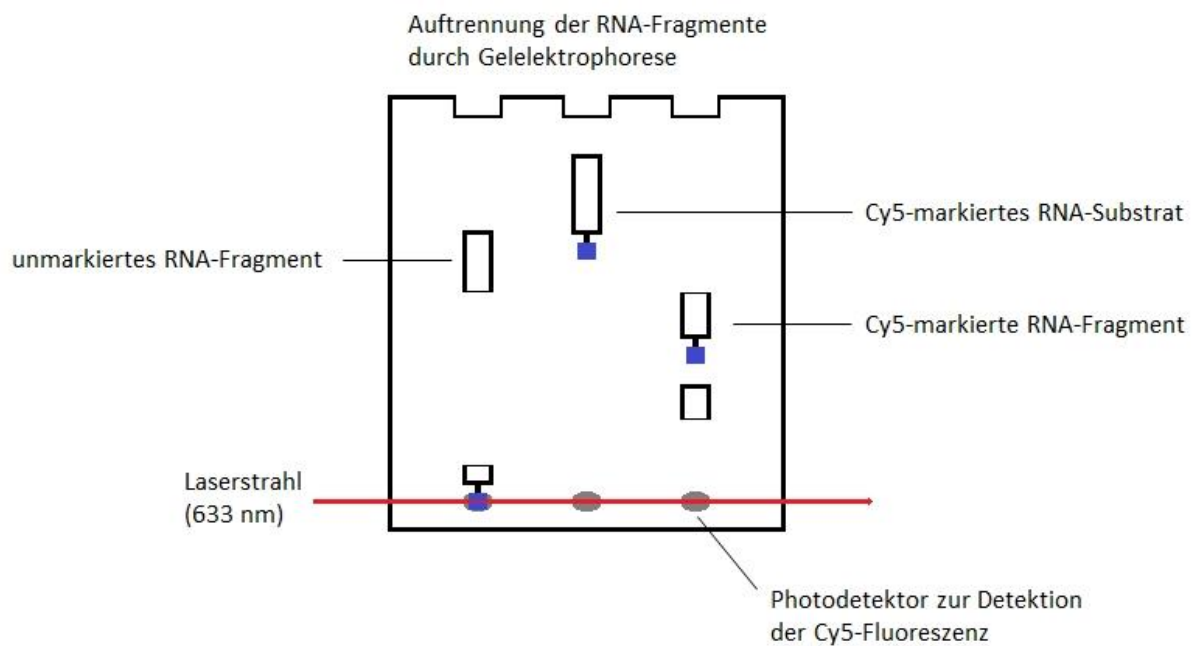
eine Spaltung außerhalb der einzelsträngigen *bulge*- und *loop*-Bereiche möglich, wenn es zu einer durch Aggregation ausgelösten Denaturierung der RNA kommt. Spaltexperimente mit **RNA2** können daher Hinweise auf das Aggregationsverhalten einer Substanz geben.

Nach der Inkubation der RNA mit dem jeweiligen Spalter wurde die Lösung mit Ladebuffer verdünnt und bis zur Analyse mittels Gelelektrophorese eingefroren, um weitere Spaltereignisse zu verhindern. Aufgrund der teils hohen Aggregationstendenz der getesteten Guanidinanaloga, die in der Vergangenheit teilweise zu einer Präzipitation von RNA und Spalter beim Auftragen auf das Gel geführt hatten, wurde nicht der Standard-Formamid-Ladebuffer, sondern ein spezieller, 8 M Harnstoff enthaltender Ladebuffer verwendet. Durch den hohen Harnstoffanteil dieses Ladebuffers war es in früheren Arbeiten gelungen, Präzipitationseffekte weitestgehend zu verhindern.<sup>[8]</sup>

Die Analyse der Spaltexperimente erfolgte mithilfe des DNA-Sequenzierers *ALFexpress*. Die Auftrennung der Spaltfragmente geschieht dabei über eine in einer Gelkassette befindliche Polyacrylamid-Gelmatrix, an die eine Spannung angelegt ist und deren Temperatur über einen Thermostaten während des gesamten Prozesses konstant gehalten wird. Am unteren Ende der Gelkassette regt ein Laserstrahl (633 nm) den Cy5-Farbstoff markierter RNA-Fragmente an, die den Laserstrahl passieren. Die Fluoreszenz, die durch die angeregten Fragmente abgegeben wird, wird durch hinter jeder Laufbahn installierte Photodetektoren registriert und die Daten an einen Computer weitergegeben. Es können bis zu 40 Proben nebeneinander aufgetragen und so gleichzeitig analysiert werden.

Für die Auswertung der Daten wurde die Software *Allele Links 1.0* verwendet. Diese zeigt die am Photodetektor gemessene Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit für jede einzelne Spur an. Dadurch ergibt sich für jedes auftretende RNA-Fragment ein Signal. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der einzelnen Signale. Teilt man den für solch ein Integral erhaltenen Wert durch die Summe aller Integrale einer Spur (einschließlich des Substratsignal-Integrals), so erhält man den Anteil des jeweiligen Fragments an der Gesamtheit aller detektierten RNA-Fragmente in dieser Spur. Werden die Integrale aller Spaltfragment-Signale durch die Summe aller Integrale einer Spur inklusive des Substratsignal-Integrals geteilt, so erhält man entsprechend den Gesamtprozentsatz an gespaltener RNA. Um die einzelnen Signale einem Fragment mit definierter Sequenz zuordnen zu können, wurde auf jedes Gel eine Probe mit basisch hydrolysiertem RNA-Substrat mit aufgetragen. Durch Ab-

zählen der Signale und Vergleich mit dieser Hydrolyseleiter lassen sich die Signale der Spaltexperimente leicht einem bestimmten Fragment zuordnen.



**Abbildung 78:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des DNA-Sequenzierers ALFexpress zur Auftrennung und Detektion Cy5-markierter RNA-Fragmente.

Durch die lange Laufstrecke durch das Polyacrylamidgel (etwa 26 cm) und die konstant gehaltene Temperatur wird eine sehr gute Auftrennung der Spaltfragmente und damit eine sehr hohe Auflösung der einzelnen Signale ermöglicht. Die Detektion der farbstoffmarkierten Fragmente ist dabei so empfindlich, dass die Spaltexperimente mit relativ geringen RNA-Mengen von 150 nM durchgeführt werden können, so dass der Materialaufwand verglichen zu anderen Methoden wie der Analyse von RNA-Spaltung mittels HPLC sehr gering ist. Auch die Vorteile gegenüber der Verwendung isotope-markierter RNA-Substrate für Spaltexperimente mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung liegen auf der Hand: Farbstoffmarkierte RNA hat eine sehr viel größere Stabilität und ist sowohl bei der Handhabung als auch bei der Entsorgung völlig unproblematisch.

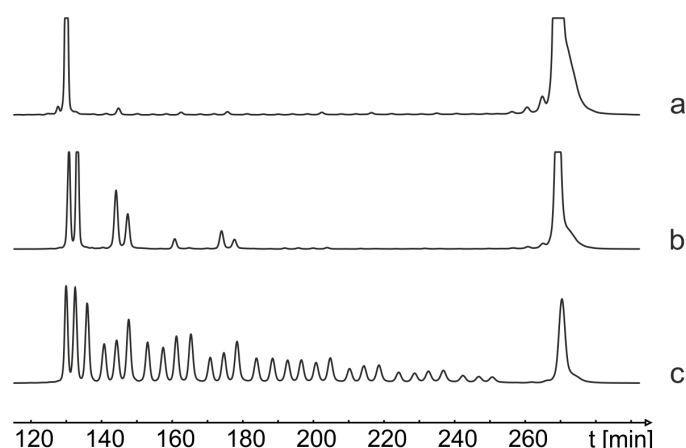
### 5.2.2 Mögliche Fehler und deren Vermeidung

Sämtliche Spaltexperimente wurden mindestens zweimal durchgeführt, um sicherzugehen, dass die ermittelten Spaltraten reproduzierbar sind. Wurden dabei zwei stark voneinander abweichende Ergebnisse für ein und dieselbe Verbindung unter gleichen Bedingungen erhal-

ten, so wurden die Experimente erneut wiederholt, bis ein eindeutiges und durch mehrere Experimente bestätigtes Ergebnis vorlag.

Um Fehler bei der Bestimmung der Spaltaktivität durch das Auftreten von Hintergrundspaltung zu verhindern, wurde parallel zu jedem Spaltexperiment eine RNA-Probe im verwendeten Puffer bei gleichem pH-Wert in Abwesenheit eines RNA-Spalterers ebenfalls für 20 h bei 37 °C inkubiert. In den Fällen, in denen sich die untersuchte Verbindung bei der Herstellung der Stammlösung nicht in Wasser, sondern nur in DMSO lösen ließ, wurde zusätzlich ein Kontrollexperiment mit entsprechender DMSO-Menge angesetzt. Nach Auswertung der zu den einzelnen Spaltexperimenten gehörenden Spuren wurde vom Gesamtspaltanteil jeweils der im passenden Kontrollexperiment ermittelte Gesamtprozentsatz der Hintergrundspaltung abgezogen.

In der Regel beträgt die Hintergrundhydrolyse deutlich unter 5 % und lässt sich zudem leicht ermitteln und aus den Spaltergebnissen herausrechnen. Eine weitaus größere Fehlerquelle stellt die Verunreinigung der Spaltexperimentlösungen durch natürliche Nucleasen dar. Um eine Kontamination mit solchen Nucleasen zu verhindern, wurde bei der Durchführung der Spaltexperimente soweit möglich steril und RNase-frei gearbeitet (vgl. Kapitel 8.9). Dennoch lässt sich eine Kontamination nicht immer vermeiden,<sup>[145]</sup> was insbesondere der Tatsache, dass die Synthese der Spalter nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, geschuldet ist. Da natürliche Nucleasen aber meist sequenzspezifisch spalten (Ribonuclease A z.B. spaltet die Phosphodiesterbindungen in 3'-Position zu Pyrimidinbasen<sup>[19]</sup>), während die im Rahmen dieser Arbeit als freie Moleküle getesteten Verbindungen keinerlei Spezifität aufweisen sollten, lässt sich durch natürliche Nucleasen hervorgerufene Spaltung anhand ungewöhnlicher Spaltmuster leicht identifizieren (vgl. Abbildung 79). Dies war insbesondere dann der Fall, wenn ein Spaltexperiment mehrfach durchgeführt wurde und dabei nur ein Ergebnis eine solche Auffälligkeit zeigte.



**Abbildung 79:** a und b: Zwei Beispiele für durch Nuclease-Kontamination hervorgerufene sequenzspezifische Spaltung von **RNA1**. c: Hydrolysemuster ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) von **RNA1**. Dargestellt ist jeweils das Elektropherogramm.

Bei Verdacht auf Nuclease-Kontamination wurden die Spaltexperimente mehrfach wiederholt, bis ein eindeutiges Ergebnis vorlag. Blieb dabei ein auffälliges Spaltmuster, wie z.B. eine um mehrere Größenordnungen erhöhte Spaltung nach den am 5'-Ende befindlichen Nucleotiden C und U des Substrats **RNA1**, auch nach mehrmaliger Wiederholung erhalten, so wurde das Integral des zugehörigen Signale nicht zur Summe der Integrale der Spaltfragmente addiert, sondern lediglich zur Gesamtsumme aller Integrale inklusive des Substratsignals-Integrals. Eine solche Vorgehensweise war jedoch nur selten nötig.

Um tatsächlich vollkommen ausschließen zu können, dass eine im Experiment beobachtete Spaltung nicht durch eine natürliche Nuclease hervorgerufen wird, wurden die fraglichen Spaltexperimente unter Verwendung enantiomerer RNA mit derselben Sequenz wie das zuvor getestete RNA-Substrat wiederholt. Während enantiomere RNA durch natürliche Nucleasen nicht gespalten wird, sollten achirale Verbindungen *ent*-RNA-Substrate zu gleichen Prozentsätzen spalten wie die entsprechenden nicht enantiomeren RNA-Substrate.<sup>[145]</sup> Die Synthese solcher *enantio*-RNA ist jedoch sehr aufwendig, so dass ein standardmäßiger Einsatz für Spaltexperimente nicht infrage kommt. Aus diesem Grund wurde das *ent*-RNA-Substrat **ent-RNA1** nur in Zweifelsfällen eingesetzt.

### 5.2.3 Ergebnisse der Spaltexperimente mit symmetrischen Guanidinanaloge

1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56**, dessen Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer symmetriebedingt bei Null liegt, wurde schon in der Arbeit von K. Dörr als RNA-Spalter getestet und hatte bei Konzentrationen von 2 bzw. 10 mM eine Spaltaktivität gezeigt.<sup>[8]</sup> Obwohl diese verglichen mit 2-Aminoperimidin recht niedrig war, ist der Befund dennoch



bemerkenswert, neigt doch **56** deutlich weniger bzw. bei Konzentrationen von 2 mM und niedriger gar nicht zur Bildung von Aggregaten (vgl. Kapitel 5.1.3). Bei dem Versuch, ein konjugierbares Derivat von **56** zu synthetisieren, hatte sich dieses leider als extrem instabil erwiesen (siehe Kapitel 3.3.2). Aus diesem Grund wurde mit 5*H*-Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115** eine durch zwei zusätzliche Phenylringe stabilisierte Verbindung mit gleicher Symmetrie synthetisiert und die Spaltaktivität ermittelt. Ebenfalls als RNA-Spalter getestet wurde **116**, ein potentiell konjugierbares Derivat von **115**, sowie **135**, das die gleiche Symmetrie besitzt wie **56** und **115** und damit ebenfalls eine Energiedifferenz von Null hat.

**56** und **135** wurden als wasserlösliche Hydrochloride synthetisiert, so dass die Stammlösungen für die Spaltexperimente in Wasser hergestellt werden konnten. **115** und **116** waren als freie Basen erhalten worden und als solche in höheren Konzentrationen nicht wasserlöslich, so dass für die Stammlösungen DMSO als Lösungsmittel verwendet werden musste. Zwar konnten beide Verbindungen durch Zugabe von HCl auch in Wasser gelöst werden, doch war für die Hydrochloride beider Substanzen lediglich in stark saurer Lösung (pH 1) eine ausreichende Löslichkeit vorhanden. Spaltexperimente in diesem pH-Wert sind wenig sinnvoll, da RNA in diesem pH-Bereich auch ohne die Zugabe von RNA-Spaltern hydrolysiert. Aus diesem Grund wurden die Spaltexperimente mit **115** und **116** in Gegenwart von 20 % DMSO durchgeführt. Um durch das Co-Solvens bedingte Veränderungen in der Hintergrundspaltung zu berücksichtigen, wurden in diesen Fällen auch zu den Kontrollexperimenten 20 % DMSO hinzugegeben und der Wert für die so ermittelte Hintergrundspaltung von den für **115** und **116** ermittelten Spaltraten abgezogen.

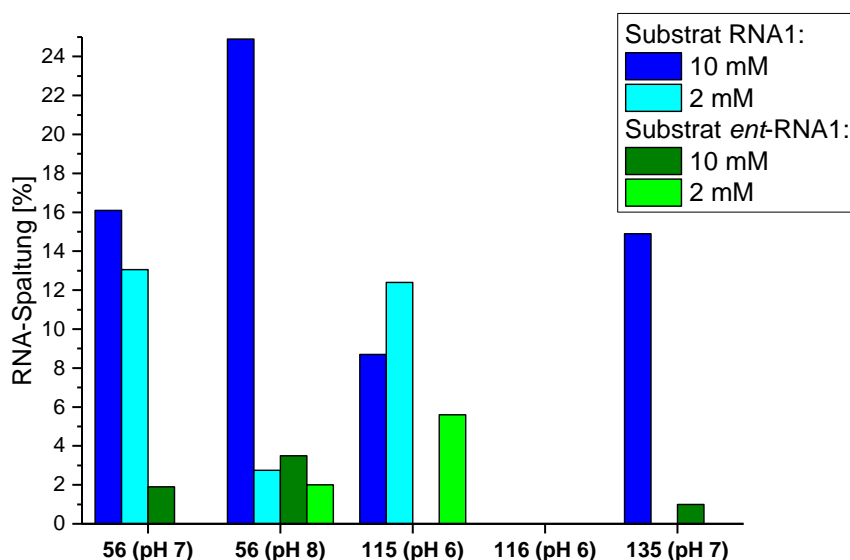
Für die Spaltexperimente wurde zunächst analog zu den Versuchen mit 2-Aminoperimidinderivaten **RNA1** als Substrat eingesetzt. Da das Spaltpattern jedoch teilweise auf eine mögliche Ribonuclease-Kontamination hindeutete, wurden sämtliche Verbindungen, die gegenüber **RNA1** Spaltaktivität zeigten, in einem zweiten Schritt auch mit der enantiomeren **ent-RNA1** getestet. Weil diese lediglich 14 Ribonucleotide enthält und sich ansonsten aus Desoxyribonucleotiden zusammensetzt, sind die absoluten Spaltwerte mit **RNA1** und **ent-RNA1** als Substrat trotz gleicher Sequenz nur bedingt vergleichbar. Die Frage, ob eine Verbindung generell RNA spaltet oder nicht, lässt sich durch Spaltexperimente mit **ent-RNA1** jedoch eindeutig beantworten. Analog zu der Arbeit von K. Dörr wurden alle Verbindungen in einer Konzentration von 2 und 10 mM getestet, um einen Überblick über die jeweilige Spaltaktivität zu erhalten.

*1H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56** wurde sowohl bei pH 7 als auch bei pH 8 getestet, da aufgrund des  $pK_a$ -Wertes von 7.4 eine hohe Spaltaktivität bei beiden pH-Werten möglich sein sollte. **56** spaltete das RNA-Substrat **RNA1** zu bis zu 16 % (10 mM Spalter-Konzentration, pH 7) bzw. 25 % (10 mM Spalter-Konzentration, pH 8) und war jeweils auch noch in einer Konzentration von 2 mM aktiv. Gegenüber **ent-RNA1** war die Aktivität deutlich niedriger, was auf eine Nuclease-Kontamination in den Experimenten mit **RNA1** hindeuten könnte. Bei pH 8 zeigte **56** in beiden verwendeten Konzentrationen Spaltaktivität, bei pH 7 lediglich in einer Konzentration von 10 mM. Der exakt im physiologischen Bereich liegende  $pK_a$ -Wert sowie die Tatsache, dass zwischen Amino- und Iminoisomer keine Energiebarriere besteht, hatten schon im Vorfeld vermuten lassen, dass **56** RNA spalten könnte. Die zumindest gegenüber **ent-RNA1** eher niedrige Spaltaktivität könnte durch die geringere Aggregationstendenz von **56** im Vergleich zu anderen Guanidinanaloga bedingt sein.

Das wesentlich stärker aggregierende Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol **115** ist auch in Konzentrationen von 2 mM sowohl gegenüber **RNA1** als auch **ent-RNA1** aktiv und spaltet die beiden Substrate bei pH 6 zu 12 bzw. 6 %. Auf den ersten Blick erstaunlich ist, dass **115** in höheren Konzentrationen in deutlich geringerem Maße bzw. gar nicht spaltet. Allerdings hatte schon bei den 2-Aminoperimidin-Derivaten die hohe Aggregationstendenz bei höheren Spalter-Konzentrationen zu einem Rückgang der Spaltaktivität geführt. Es erscheint plausibel, dass dies auch bei **115** der Fall ist. Der vergleichsweise niedrige  $pK_a$ -Wert von **115**, der lediglich bei 4.7 liegt, hatte nicht unbedingt eine Spaltaktivität erwarten lassen. Vermutlich führen die Energiedifferenz von Null und das große aromatische System, das *stacking*-Wechselwirkungen und Aggregation mit der RNA begünstigt, dazu, dass der nicht optimale  $pK_a$ -Wert nicht so stark ins Gewicht fällt. Dies gilt zumindest, wenn die Spaltexperimente bei pH 6 durchgeführt werden; bei pH 7 wird keine RNA-Spaltung durch **115** beobachtet. Offenbar ist die Differenz zwischen pH- und  $pK_a$ -Wert in diesem Fall zu groß. Analog dazu zeigt **116**, dessen  $pK_a$ -Wert mit 3.7 noch einmal niedriger liegt und das zudem eine höhere Energiebarriere zwischen Amino- und Imino-Isomer besitzt, weder bei pH 6 noch bei pH 7 Spaltaktivität.

Das Hexahydro-2*H*-pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-2,8-dion **135**, das vermutlich einen ebenfalls im sauren pH-Bereich liegenden  $pK_a$ -Wert besitzt, zeigt zwar in Konzentrationen von 10 mM eine deutliche (Substrat **RNA1**) bzw. geringe (Substrat **ent-RNA1**) Spaltaktivität, diese ist jedoch vermutlich durch die Tatsache bedingt, dass **135** als Hydrochlorid vorliegt und dieses

so sauer ist, dass die Pufferkapazität des TRIS-Puffers (pH 7) nicht ausreicht. Der pH-Wert der Spatlösung liegt dadurch bei ca. 3.5, wodurch das RNA-Substrat auch ohne Spalter teilweise hydrolysiert. Bei einer Konzentration von 2 mM der Verbindung **135** liegt der pH-Wert wie gewünscht bei 7, allerdings besitzt die Substanz in diesem Konzentrationsbereich auch keinerlei Spaltaktivität mehr. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Spaltung bei einer Konzentration von 10 mM allein durch den niedrigen pH-Wert bedingt war.



**Abbildung 80:** Spaltung von RNA1 (blau) und *ent*-RNA1 (grün) durch die Guanidinanaloga **56**, **115**, **116** und **135**. 150 nM Substrat, 2 oder 10 mM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 8 (**56**), pH 7 (**56**, **135**) oder pH 6 (**115**, **116**), 37 °C, 20 h.

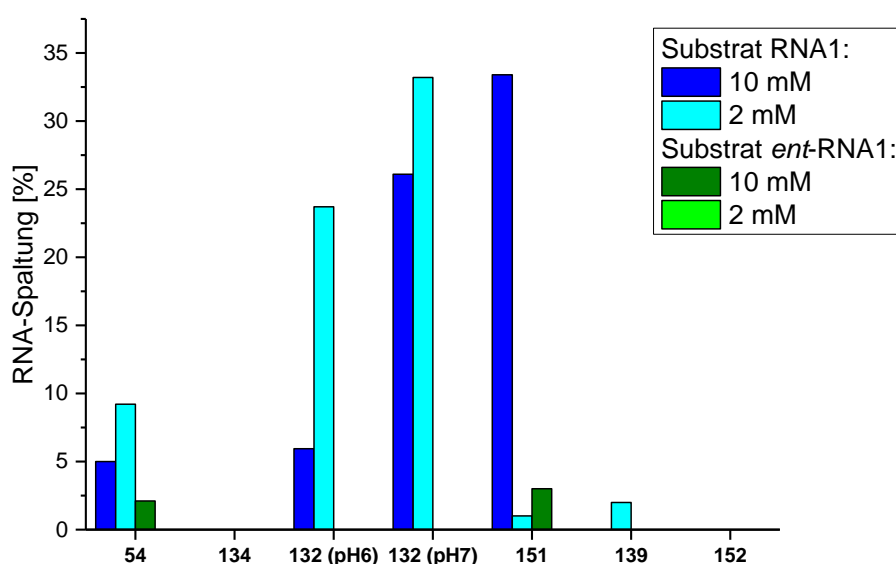
### 5.2.4 Ergebnisse der Spaltexperimente mit weiteren Guanidinanaloga

Neben den Guanidinanaloga mit einer Energiedifferenz von Null zwischen Amino- und Iminotautomer wurden auch einige weitere Guanidinanaloga mit unterschiedlich hohen Energiedifferenzen als RNA-Spalter getestet, um näher zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Spaltaktivität und Energiedifferenz besteht. Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in Wasser wurden 2-Aminobenzimidazol **54**, 2-Aminochinolin **151** und Melamin **152** durch Zugabe von verdünnter HCl in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde dabei so eingestellt, dass die Spatlösungen später den jeweils gewünschten pH-Wert besaßen. Diese pH-Werteinstellung nach HCl-Zugabe war bei Tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-2-on **134** nicht möglich, ohne dass die Substanz präzipitierte. Daher wurde die Stammlösung der Verbindung als freie Base in DMSO angesetzt. Auch die Stammlösung von Imidazo[1,2-*a*]benzimidazol **132**, das zwar als Hydrochlorid synthetisiert worden war, sich aber dennoch als nicht wasserlöslich erwies, wurde in DMSO hergestellt. 2,6,8-Triaminopurin **139**, das als Sulfat

vorlag, war in Wasser komplett unlöslich. Auch in DMSO war die Löslichkeit begrenzt, so dass lediglich Spaltexperimente mit einer Konzentration von 2 mM durchgeführt werden konnten.

Alle Verbindungen wurden – genau wie die in Kapitel 5.2.3 beschriebenen – in Spaltexperimenten mit **RNA1** sowie dem enantiomeren RNA-Substrat **ent-RNA1** eingesetzt. 2-Aminobenzimidazol **54**, das schon von K. Dörr getestet worden war, spaltete wie erwartet beide RNA-Substrate, wenn auch nur zu geringen Prozentsätzen. Der  $pK_a$ -Wert von 7.3 sowie die niedrige Energiedifferenz hatten das Vorhandensein einer Spaltaktivität erwarten lassen. Der relativ hohe Wert für die Spaltung von **RNA1** durch 2 mM **54** ist vermutlich bedingt durch eine Nuclease-Kontamination, ließ er sich doch durch Spaltexperimente mit **ent-RNA1** unter ansonsten gleichen Bedingungen nicht bestätigen.

Eine günstige Energiedifferenz weist auch das 2-Aminobenzimidazol-Derivat **134** auf, dessen  $pK_a$ -Wert mit 3.7 allerdings weit entfernt vom physiologischen pH-Wert liegt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass **134** gegenüber **RNA1** keinerlei Spaltaktivität besitzt, denn die Substanz kann bei dem für die Experimente verwendeten pH-Wert von 6 nur als Basen-, nicht aber als Säure-Katalysator fungieren. Da die Spaltexperimente mit **ent-RNA1** lediglich dem Ausschluss von Spaltung durch Nuclease-Kontamination dienen, konnte im Fall von **134** auf solche verzichtet werden.



**Abbildung 81:** Spaltung von **RNA1** (blau) und **ent-RNA1** (grün) durch die Guanidinanaloga **54**, **134**, **132**, **151**, **139** und **152**. Bedingungen: 150 nM Substrat, 2 oder 10 mM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 6 (**134**, **132**, **139** und **152**), pH 7 (**54**, **132** und **151**), 37 °C, 20 h.

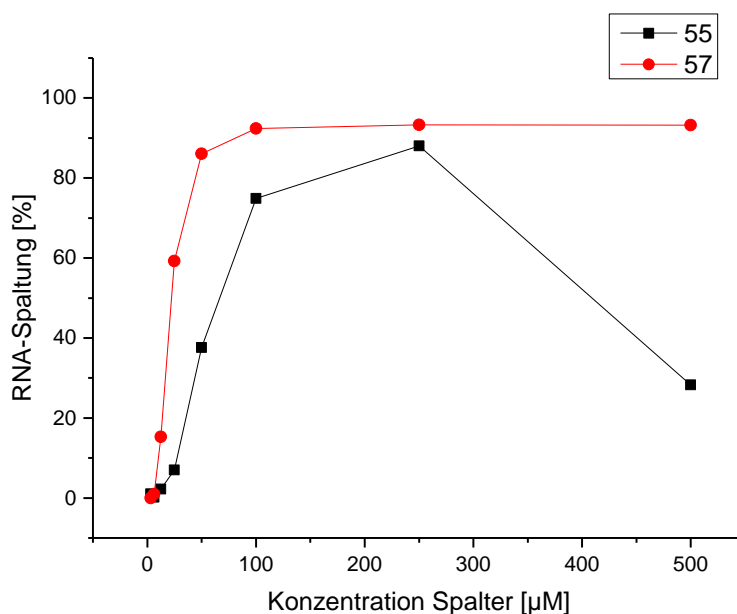
Imidazo[1,2-*a*]benzimidazol **132** hat einen  $pK_a$ -Wert von 6.5 und wurde daher sowohl bei pH 6 als auch bei pH 7 getestet. Dabei zeigten sich gegenüber **RNA1** bei beiden untersuchten pH-Werten erstaunlich hohe Spaltaktivitäten von bis zu 33 % (pH 7, 2 mM). Dies verwundert, liegt doch die Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer bei **132** sehr hoch. Allerdings legten die Spaltpmuster den Verdacht einer Nuclease-Kontamination nahe. Diese wurde durch Spaltexperimente am enantiomeren RNA-Substrat **ent-RNA1** bestätigt: **ent-RNA1** wurde durch **132** nicht gespalten, so dass davon auszugehen ist, dass die Spaltung von **RNA1** komplett auf natürliche Nucleasen zurückzuführen ist.

Ebenfalls eine Nuclease-Kontamination scheint für die hohe Spaltaktivität von 2-Amino-chinolin **151** gegenüber **RNA1** bei einer Konzentration von 10 mM verantwortlich zu sein. Die Spaltaktivität von **151** gegenüber **ent-RNA1** im selben Konzentrationsbereich liegt allerdings – anders als im Fall von **132** – nicht bei Null, sondern noch bei 3 %, so dass **151** grundsätzlich Spaltaktivität zu besitzen scheint. Dies steht im Einklang mit dem günstigen  $pK_a$ -Wert von 7 und der relativ geringen Energiedifferenz. Einen zumindest für Spaltexperimente bei pH 6 noch akzeptablen  $pK_a$ -Wert besitzt zwar auch Melamin **152**, die Energiedifferenz liegt hier jedoch sehr hoch. Es verwundert daher nicht, dass **152 RNA1** nicht spaltet. Spaltexperimente mit **ent-RNA1** wurden auch hier nicht durchgeführt.

2,6,8-Triaminopurin **139** sollte mit einem  $pK_a$ -Wert von 6.2 bei einem pH-Wert von 6 Spaltaktivität besitzen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer zumindest für einen der möglichen Protonenübergänge sehr gering ist. Zwar zeigte **139** bei einer Konzentration von 2 mM tatsächlich eine leichte Spaltaktivität gegenüber **RNA1**, diese konnte in Spaltexperimenten mit **ent-RNA1** jedoch nicht bestätigt werden, so dass davon auszugehen ist, dass **139** in diesem Konzentrationsbereich nicht als Spalter wirkt. Im Fall von **139** muss allerdings beachtet werden, dass die Verbindung als schwerlösliches Sulfat vorliegt und aufgrund dessen zu Präzipitation neigt. So war bei einigen Spaltexperimenten mit **139** eine leichte Trübung der Lösung erkennbar. Berücksichtigt man diese Tatsache, so wird klar, dass **139** nicht notwendigerweise in der zuvor angestrebten Konzentration vorgelegen hat.

### 5.2.5 Ergebnisse der Spaltexperimente mit 2-Aminoperimidin und seinen Derivaten

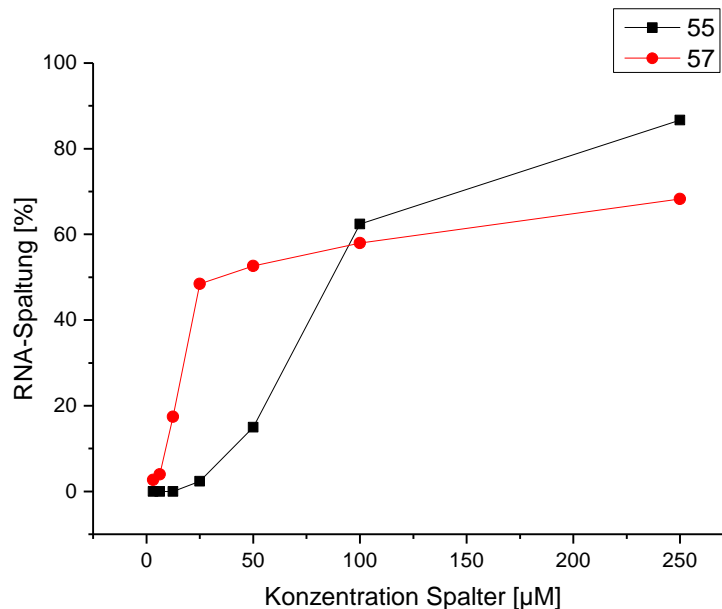
2-Aminoperimidin **55** (als Hydrobromid kommerziell erhältlich) hatte sich bereits in der Dissertation von K. Dörr als besonders aktiver RNA-Spalter sowohl gegenüber natürlicher als auch enantiomerer RNA erwiesen,<sup>[8]</sup> was die Verbindung für weitere Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessant machte. Es zeigte sich, dass die Spaltaktivität gegenüber der linearen **RNA1** bei Spalter-Konzentrationen von 3 bis 250  $\mu\text{M}$  in einem ähnlichen Bereich liegt wie die von Tris(2-aminobenzimidazol) **57** (Abbildung 82). Dies ist bemerkenswert, da **57** anders als **55** gleich drei spaltaktive Einheiten aufweist. Das von der Anzahl der aktiven Einheiten zu 2-Aminoperimidin äquivalente 2-Aminobenzimidazol **54** hingegen besitzt im  $\mu\text{M}$ -Konzentrationsbereich keinerlei Spaltaktivität.



**Abbildung 82:** Spaltung von **RNA1** durch 2-Aminoperimidin **55** und Tris(2-aminobenzimidazol) **57**. Spaltbedingungen: 150 nM Substrat, 3.13 - 500  $\mu\text{M}$  Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden.

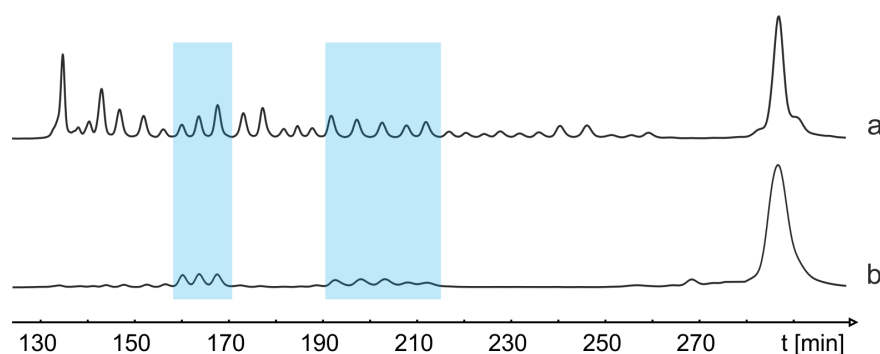
Bei Spalter-Konzentrationen über 250  $\mu\text{M}$  ist im Fall von **55** ein deutlicher Abfall der Spaltaktivität zu beobachten, während der Anteil der durch **57** gespaltenen RNA konstant bleibt. Der Abfall der Spaltaktivität von **55** geht einher mit einem starken Anstieg der Aggregation (vgl. Abbildung 72). Auch wurde beim Ansetzen der Spaltexperimente mit **55** in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  Präzipitation beobachtet. Es ist daher anzunehmen, dass 2-Aminoperimidin **55** bei Konzentrationen über 250  $\mu\text{M}$  so stark mit dem RNA-Substrat aggregiert, dass es zu einer Präzipitation der Aggregate kommt und der Anteil an gespaltenen RNA dadurch abnimmt. Da allerdings bei der Gelelektrophorese der Spaltexperiment-Lösungen

die präzipitierte RNA in der Geltasche verbleibt und daher vom DNA-Sequenzierer gar nicht detektiert wird, muss die Spaltrate auch bei den noch in Lösung befindlichen Aggregaten stark abgeschwächt sein. Womöglich ist in großen Aggregaten die Zugänglichkeit des RNA-Rückgrats bzw. die Ausbildung der zur Spaltung notwendigen Konformation der Phosphordiesterbindung nicht mehr möglich.



**Abbildung 83:** Spaltung von **RNA2** durch 2-Aminoperimidin **55** und Tris(2-aminobenzimidazol) **57**. Spaltbedingungen: 150 nM Substrat, 3.13 - 250 μM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden.

Bei der Spaltung der *hairpin*-RNA **RNA2** ist die Spaltaktivität von **55** im Konzentrationsbereich von 100 bis 250 μM sogar etwas höher als die von **57**, während bei Konzentrationen unter 100 μM **57** eine höhere Spaltaktivität besitzt (Abbildung 83). Vermutlich führt die hohe Aggregationstendenz von 2-Aminoperimidin zu einer Störung der Sekundärstruktur der RNA, so dass eigentlich doppelsträngige und damit nicht spaltbare Bereiche vermehrt als Einzelstränge vorliegen und so gespalten werden können. Dafür spricht, dass die Spaltung nicht nur im Bereich von *loop* und *bulge* beobachtet wird, sondern auch in ursprünglich doppelsträngigen Bereichen (vgl. Abbildung 84). Dies ist zwar auch bei der Verwendung von **57** als Spalter der Fall,<sup>[7]</sup> doch vermutlich sind hier die Aggregationstendenz und damit die Störung der Sekundärstruktur der RNA etwas geringer.

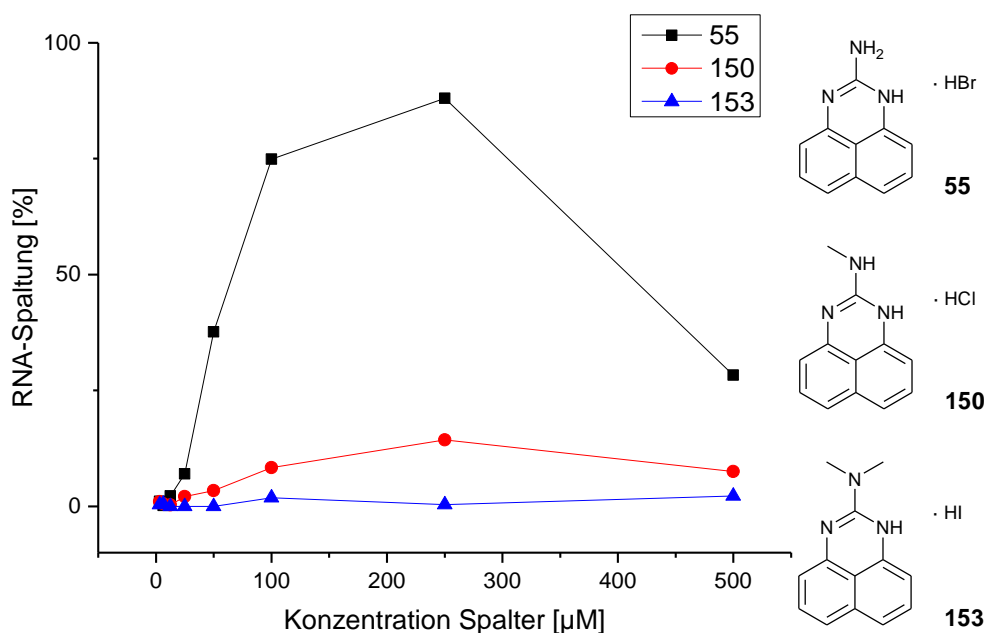


**Abbildung 84:** Elektropherogramm der Spaltung von **RNA2**. a: Spaltung durch 2-Aminoperimidin **55** (150 nM **RNA2**, 100  $\mu$ M **55**, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h). b: Spaltung durch Imidazol (150 nM **RNA2**, 2 M Imidazol, 40 mM NaCl, 500  $\mu$ M EDTA, pH 7, 37 °C, 20 h). Der Imidazol-Puffer wirkt nicht denaturierend, so dass Spaltung nur in den einzelsträngigen *bulge*- und *loop*-Bereichen (blau markiert) erfolgt.

Die hohe Spaltaktivität von 2-Aminoperimidin **55** schon als Einzelmolekül macht die Synthese und Untersuchung von Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten interessant. Eine dafür nötige Verknüpfung mehrerer Einheiten ist dabei prinzipiell entweder über die 2-Aminogruppe (ähnlich dem Tris(2-aminobenzimidazol) **57**) oder aber über den Naphthylring denkbar. Um einschätzen zu können, welche Auswirkung eine solche Modifikation an den beiden Positionen auf die Spaltaktivität hat, wurden einfache Derivate von **55** synthetisiert und deren Spaltaktivität mit der von **55** verglichen.

Zunächst wurde der Einfluss von Substituenten an der 2-Aminogruppe untersucht, indem die Aktivität der an der Aminogruppe einfach bzw. zweifach methylierten Verbindungen **150** und **153** als Spalter getestet wurden. Beide Verbindungen waren von M. Zeiger synthetisiert<sup>[90]</sup> und für die Spaltexperimente zur Verfügung gestellt worden. Es zeigte sich, dass 2-(Methylamino)perimidin **150 RNA1** zu einem weitaus geringeren Prozentsatz spaltet als die Stammverbindung **55** (Abbildung 85). Für 2-(Dimethylamino)perimidin **153** ist praktisch keinerlei Spaltaktivität mehr feststellbar. Da der  $pK_a$ -Wert zumindest durch die Einfach-Methylierung kaum beeinflusst wird (vgl. Kapitel 5.1.1), kann der Abfall der Spaltaktivität nicht  $pK_a$ -Wertbedingt sein. Auffällig ist jedoch die im Fall von **150** sehr viel höhere Energiedifferenz zwischen Amino- und Imino-Tautomer, die möglicherweise der Grund für die sehr viel geringere Spaltaktivität ist. Bei der dimethylierten Verbindung **153** ist ein Protonenshift zwischen Amino- und Imino-Tautomer wie in Abbildung 66 dargestellt gar nicht mehr möglich, was erklären könnte, warum **153** nicht als RNA-Spalter wirkt.

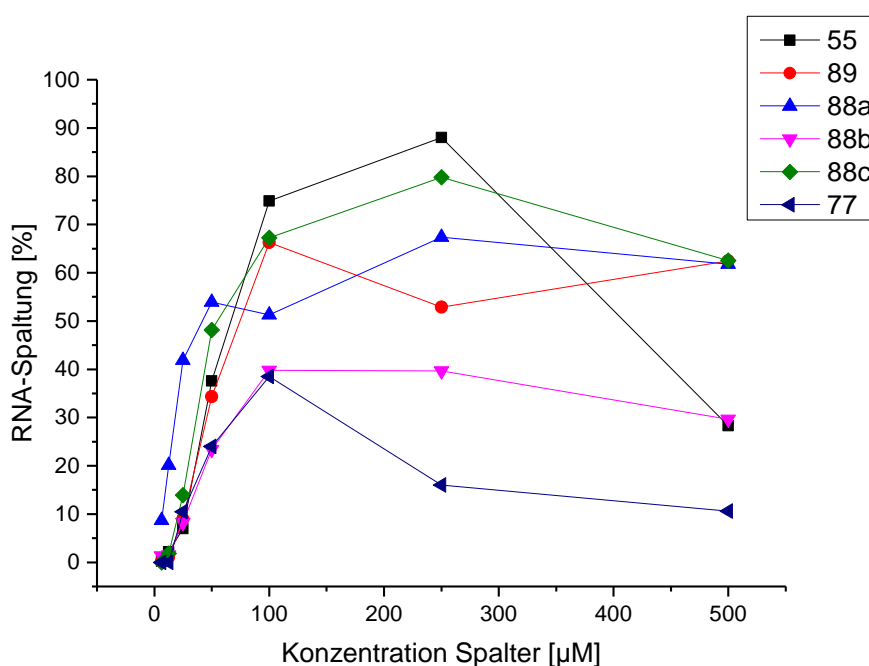
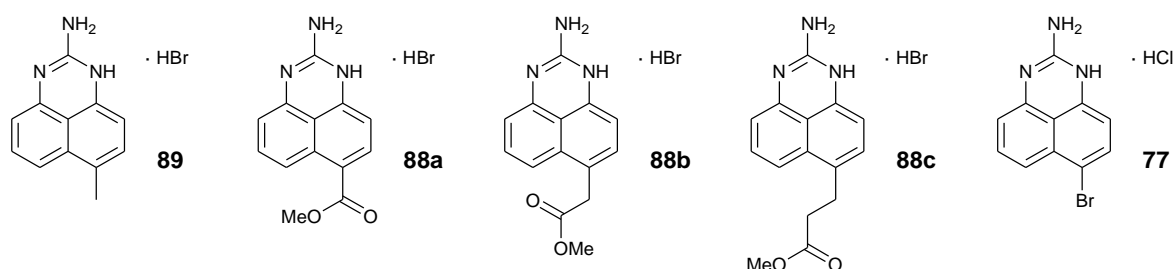




**Abbildung 85:** Spaltung von **RNA1** durch 2-Aminoperimidin **55** und seine an der 2-Aminogruppe methylierten Derivate **150** und **153**. 150 nM Substrat, 3.13 - 500 μM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden.

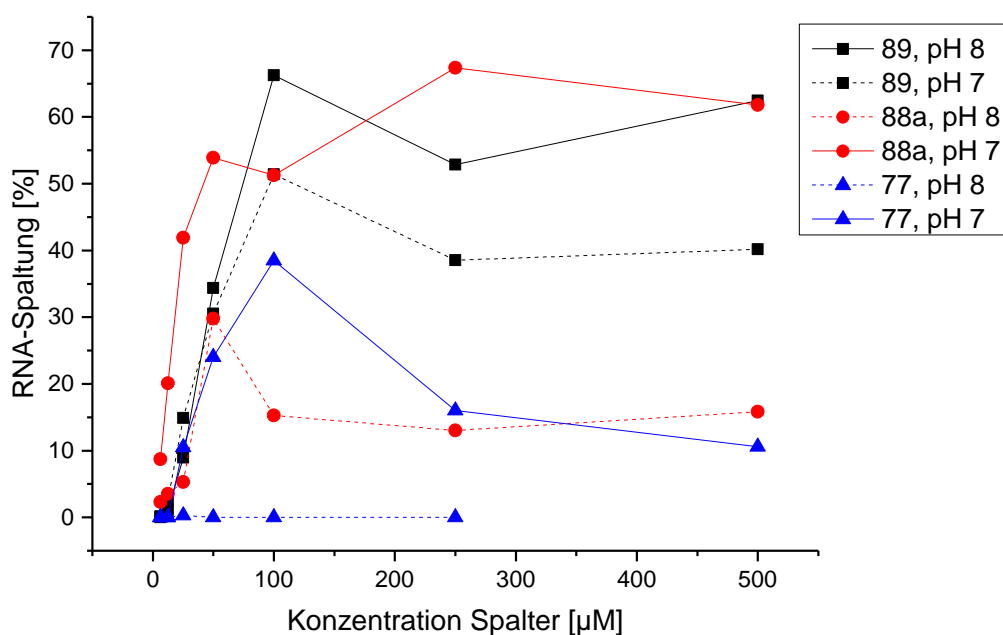
Während die Alkylierung der 2-Aminogruppe zu einer starken Abschwächung der Spaltaktivität führte, hatte die Einführung verschiedener Substituenten am Naphthylring in den meisten Fällen weitaus geringere Auswirkungen. Dennoch war auch hier insgesamt eine Abschwächung der Aktivität gegenüber der Stammverbindung **55** zu beobachten. Bei **88a** (R = COOMe) und **88c** (R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOMe) und **89** (R = Me) war diese eher gering. **88a** und **88c** wiesen im Konzentrationsbereich unter 100 μM sogar eine höhere Spaltaktivität auf als das unsubstituierte 2-Aminoperimidin. Bei **88b** (R = CH<sub>2</sub>COOMe) und bei **77** war die Abschwächung der Spaltaktivität deutlich stärker (Abbildung 86). Die pK<sub>a</sub>-Werte dieser Verbindungen liegen alle zwischen 6.7 und 8.1, die Verbindungen sollten daher alle sowohl als Säure- als auch als Basenkatalysator fungieren können. Auch die Energiedifferenzen zwischen Amino- und Imino-Tautomer liegen alle in einem ähnlichen Bereich und weichen kaum von der der Stammverbindung **55** ab, so dass für alle untersuchten Derivate ähnlich hohe Spaltaktivitäten erwartet werden. Die Tatsache, dass die gemessenen Aktivitäten dennoch deutlich voneinander abweichen, zeigt, dass die Faktoren pK<sub>a</sub>-Wert und Energiedifferenz im vorliegenden Fall zwar auf eine generelle Spaltaktivität hinweisen, die Vorhersage der tatsächlichen Höhe der Spaltaktivität jedoch sehr viel komplexer ist. Vermutlich spielen weitere Faktoren eine Rolle bzw. es können bei der Berechnung der Energiedifferenzen mit der in dieser Arbeit gewählten, sehr einfachen AM1-Methode die Einflüsse unterschiedlicher Substituenten nicht exakt ermittelt werden. Besonders deutlich wird dies im Fall des 2-Amino-6-

bromperimidins **77**, dessen  $pK_a$ -Wert und Energiedifferenz eine gute Spaltaktivität erwarten lassen. Die gemessene Aktivität ist jedoch vor allem im höheren Konzentrationsbereich sehr gering.



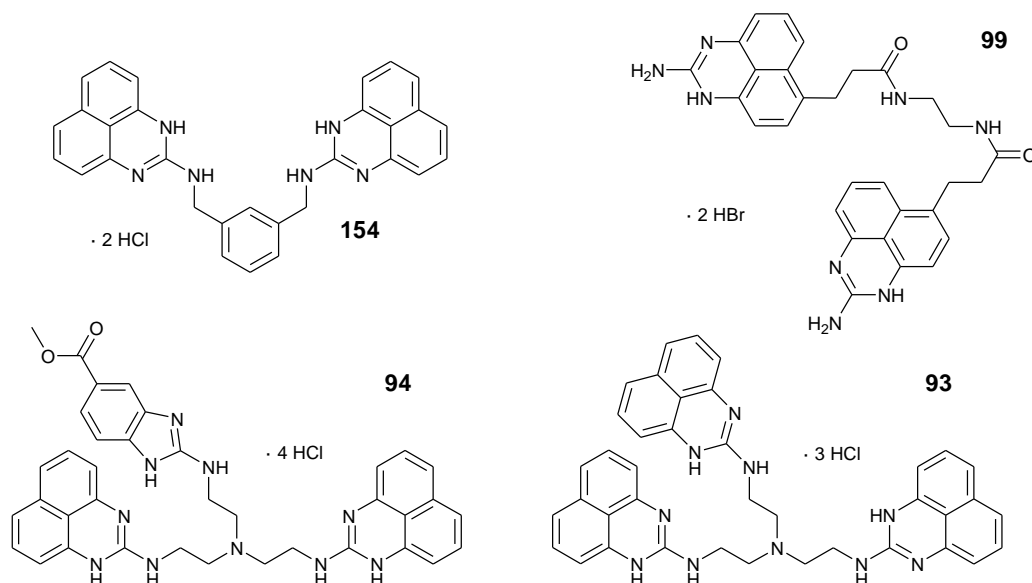
**Abbildung 86:** Spaltung von **RNA1** durch 2-Aminoperimidin **55** und seine am Naphthylring modifizierten Derivate. 150 nM Substrat, 6.25 - 500 µM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 7 (**88a**, **77**) oder 8 (**55**, **89**, **88b**, **88c**), 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden.

Die in Abbildung 86 dargestellten Spaltexperimente wurden entweder bei pH 7 oder bei pH 8 durchgeführt, je nachdem, welcher dieser beiden pH-Werte näher am  $pK_a$ -Wert der zu untersuchenden Verbindung lag. Welche Bedeutung die Wahl des für die jeweilige Verbindung geeigneten pH-Werts hat, zeigt Abbildung 87. Die drei 2-Aminoperimidin-Derivate **89** ( $pK_a = 8.1$ ), **88a** ( $pK_a = 6.7$ ) und **77** ( $pK_a = 7.2$ ) wurden jeweils bei pH 7 und pH 8 als RNA-Spalter getestet. In allen drei Fällen war die Spaltaktivität deutlich höher, wenn der zum  $pK_a$ -Wert besser passende pH-Wert verwendet wurde. 2-Amino-6-bromperimidin **77** wies bei einem bezogen auf den  $pK_a$ -Wert eher ungünstigen pH-Wert von 8 sogar keinerlei Spaltaktivität mehr auf.



**Abbildung 87:** Spaltung von RNA1 durch die 2-Aminoperimidin-Derivate **89**, **88a** und **77** in Abhängigkeit vom pH-Wert. Bedingungen: 150 nM Substrat, 6.25 - 500 μM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 7 oder 8, 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte der Experimente bei dem pH-Wert, der dem  $pK_a$ -Wert der jeweils untersuchten Verbindung näher liegt, sind durch durchgehende Linien verknüpft, die Datenpunkte der Experimente beim jeweils anderen pH-Wert als gestrichelte Linien. Die Linien dienen der besseren Übersicht.

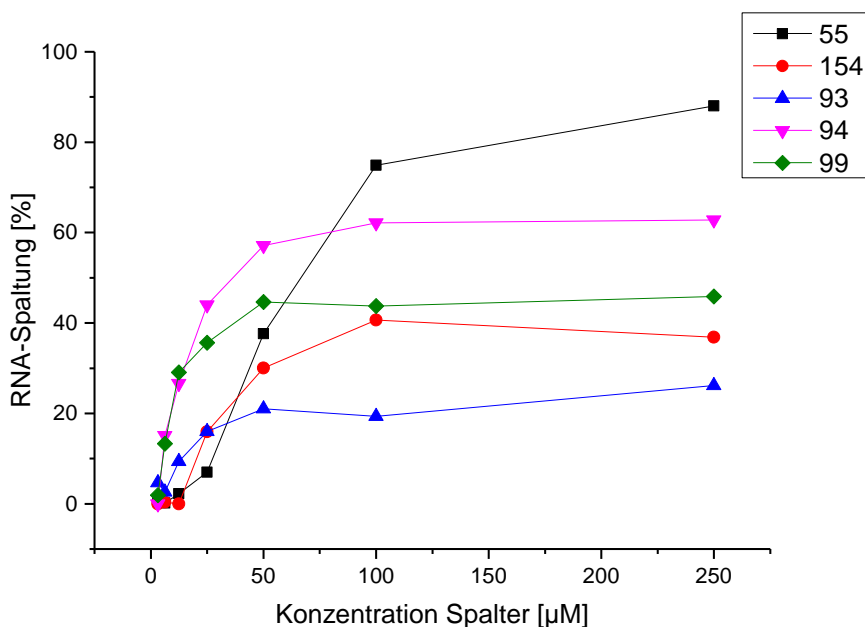
Die hohe Aktivität von 2-Aminoperimidin schon als Einzelverbindung wirft die Frage auf, ob Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten eine noch höhere Spaltaktivität besitzen. Im Fall von 2-Aminobenzimidazol hatte die Erhöhung auf zwei bzw. drei spaltaktive Einheiten zu einer deutlichen Erhöhung der Spaltraten geführt.<sup>[7]</sup> Zwar legen die Ergebnisse der Spaltexperimente mit den unterschiedlichen 2-Aminoperimidin-Derivaten nahe, dass eine Verknüpfung mehrerer Einheiten über den Naphthylrest für den Erhalt der Spaltaktivität günstiger ist, doch ist die Verknüpfung über die 2-Aminogruppe aus synthetischer Sicht deutlich einfacher. So konnten die beiden zwei bzw. drei 2-Aminoperimidin-Einheiten enthaltenden Verbindungen **94** und **93** sehr einfach hergestellt werden (vgl. Kapitel 3.2.3.1). Das Bis(2-aminoperimidin) **154** war von M. Zeiger synthetisiert und bereits von K. Dörr getestet worden. Die Synthese von Verbindungen mit mehreren über den Naphthylring verknüpften 2-Aminoperimidin-Einheiten gestaltete sich deutlich aufwendiger und schwieriger. Zwar konnte das Bis(2-aminoperimidin) **99** durch mehrstufige Synthese erhalten werden, die Herstellung eines zu **94** analogen Moleküls gelang jedoch nicht (vgl. Kapitel 3.2.3.2).



**Abbildung 88:** Als RNA-Spalter getestete Bis- und Tris(2-aminoperimidin)-Derivate.

Wie erwartet zeigte in den Spaltexperimenten die über den Naphthylring verknüpfte Bis(2-aminoperimidin)-Verbindung **99** eine höhere Aktivität als das über die 2-Aminogruppe verknüpfte Bis(2-aminoperimidin)-Derivat **154**. Offenbar führt auch hier die Alkylierung der 2-Aminogruppe zu einer Abschwächung der Spaltaktivität. Interessanterweise lag die Spalt-rate bei der Verwendung von Tris(2-aminoperimidin) **93** als RNA-Spalter noch niedriger als bei **154**. Möglicherweise führt die Erhöhung der Anzahl an 2-Aminoperimidin-Einheiten zu einer stärkeren Aggregationstendenz, was die Zugänglichkeit des RNA-Rückgrats erschweren und unter Umständen zu Präzipitation führen könnte. Die höchste Spaltaktivität der untersuchten Verbindungen zeigte die zwei 2-Aminoperimidin- und eine 2-Aminobenzimidazol-Einheiten enthaltende Verbindung **94**. Auch hier sind die 2-Aminoperimidin-Einheiten über die 2-Aminogruppe verknüpft, doch anscheinend führt das Vorhandensein der zusätzlichen 2-Aminobenzimidazol-Einheit zu einer deutlichen Steigerung der Spaltfähigkeit. Trotz der Tatsache, dass alle Verbindungen mehrere spaltaktive Einheiten besitzen, bleibt die Spaltaktivität zumindest bei Konzentrationen zwischen 100 und 250  $\mu\text{M}$  teilweise deutlich hinter der Aktivität der Stammverbindung **55** mit nur einer aktiven Einheit zurück. In Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  hingegen spalten zumindest **94** und **99** das RNA-Substrat mit höheren Raten. FCS-Experimente mit **94** hatten gezeigt, dass Verbindungen mit mehr als einer 2-Aminoperimidin-Einheit stärker zu Aggregation neigen als **55**. Auch war bis in einen Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  Aggregation zu beobachten. Die besonders starke Aggregationstendenz insbesondere bei höheren Konzentrationen scheint auch in diesem Fall

die Spaltaktivität einzuschränken. Bei niedrigeren Konzentrationen hingegen wird die Spaltaktivität durch die in diesen Bereichen deutlich geringeren Aggregationseffekte positiv beeinflusst. Zudem ermöglicht den in Abbildung 89 aufgeführten Verbindungen die höhere Anzahl katalytisch aktiver Einheiten, auch in sehr geringen Konzentrationen, in denen keine Aggregation mehr beobachtet wird, noch effektiv RNA zu spalten.



**Abbildung 89:** Spaltung von **RNA1** durch Bis- und Tris(2-aminoperimidin)-Derivate im Vergleich zu 2-Aminoperimidin **55**. 150 nM Substrat, 3.13 - 250 μM Spalter, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h. Die Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden.

Insgesamt bestätigen die hier durchgeführten Spaltexperimente die hohe Aktivität von 2-Aminoperimidin **55**, zeigen aber auch, dass eine Derivatisierung in den meisten Konzentrationsbereichen zu einer Abschwächung der Aktivität führt. Eine Spaltaktivität im Bereich von Tris(2-aminobenzimidazol) **57** erreichen auch die Derivate mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten nicht. Die hohe Aggregationstendenz von **55** legt die Vermutung nahe, dass die RNA-Spaltung zumindest bei höheren Spalter-Konzentrationen nicht durch Einzelmoleküle, sondern durch Aggregate katalysiert wird.

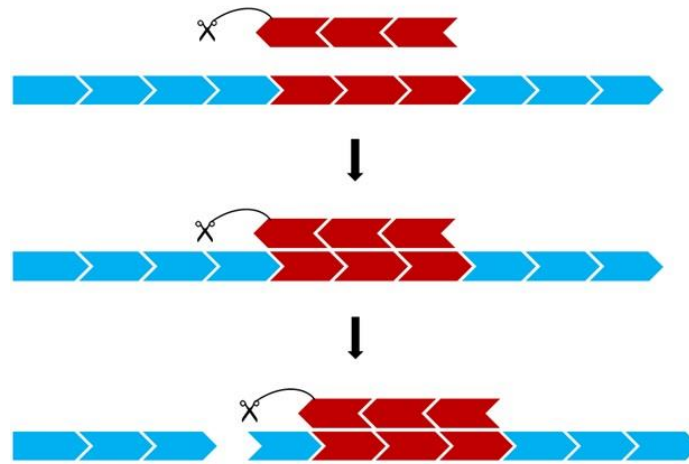
Eine Untersuchung der Spaltaktivität von 2-Aminoperimidin-Konjugaten, die in so geringen Konzentrationen eingesetzt werden können, dass die Aggregationsproblematik nicht mehr besteht, könnte Aufschluss darüber bringen, ob die starke Aggregationstendenz tatsächlich zu einer höheren RNA-Spaltung führt. Die Ergebnisse solcher Experimente sind in Kapitel 6.2 dargestellt.

## 6 Spaltexperimente mit PNA-Konjugaten

Die hohe Aggregationstendenz der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Guanidinanaloga (siehe Kapitel 5.1.3) macht es schwierig, Aussagen darüber zu treffen, ob die Spaltaktivität einer Verbindung auf der katalytischen Aktivität von Einzelmolekülen oder von Molekülaggregaten beruht. Insbesondere zur Beurteilung, welchen Einfluss die Größe der Energiedifferenz zwischen Imino- und Aminotautomer einer Verbindung auf die Spaltaktivität hat, ist es jedoch unerlässlich, die Spalteigenschaften der Einzelmoleküle zu untersuchen. Im Falle der Spaltung durch Molekülaggregate muss nicht notwendigerweise ein und dasselbe Molekül als Protonen-Donor und -Akzeptor fungieren. Man kann daher nicht davon ausgehen, dass bei der Spaltung der RNA-Phosphordiesterbindung durch Aggregate ein Protonenshift innerhalb eines Spalter-Moleküls erfolgt und dieses Molekül dadurch von der Imino- in die Aminoform (oder umgekehrt) wechselt. Nur dann jedoch wäre die Energiebarriere zwischen den beiden Tautomeren wirklich von Bedeutung.

Um die Aggregation von Spalter-Molekülen zu unterbinden oder zumindest zu verringern, ist ein Einsatz des zu untersuchenden Spalters in möglichst niedrigen Konzentrationen (unterer mikromolarer bis nanomolarer Bereich) nötig. Eine bloße Verringerung der eingesetzten Spalter-Konzentrationen ist jedoch keine Lösung, denn der prozentuale Anteil an gespaltener RNA kann dabei so gering werden, dass die Detektion der Spaltprodukte und damit die Analyse von Spaltexperimenten extrem erschwert werden.

Dieses Problem entsteht nicht, wenn die zu untersuchende Verbindung zunächst an eine sequenzerkennende Einheit, wie einen kurzen DNA- oder PNA-Strang, konjugiert wird. Durch die Ausbildung von RNA/DNA- bzw. RNA/PNA-Duplexen wird das Spaltermolekül in die direkte räumliche Nähe der zu spaltenden Phosphordiesterbindungen gebracht. Auf diese Weise kann trotz geringer absoluter Konzentration des Spalters eine hohe lokale Konzentration erzeugt werden, was eine höhere Spaltrate und damit eine bessere Detektion der Produkte ermöglicht. Gleichzeitig wird auf diese Weise eine sequenzspezifische Spaltung von RNA erreicht, was die Spalter auch für biochemische oder medizinische Anwendungen interessant macht.



**Abbildung 90:** Schematische Darstellung der sequenzspezifischen Spaltung von RNA durch ein Konjugat aus Spalter und sequenzerkennender Einheit.

### 6.1 RNA-Spaltung mit Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugaten

Konjugate von Tris(2-aminobenzimidazol) an DNA wurden in der Arbeitsgruppe Göbel bereits erfolgreich als spezifische RNA-Spalter eingesetzt.<sup>[85]</sup> Im Hinblick auf mögliche Spaltexperimente in Zellen oder Zellextrakten erscheint es jedoch sinnvoller, RNA-Spalter an in biologischen Systemen stabile Nucleinsäureanaloge zu konjugieren. Hinzu kommt, dass aus synthetischen Gründen eine Konjugation von basenlabilen Guanidinanaloga wie 2-Aminoperimidin und seinen Derivaten an DNA nicht möglich ist (vgl. Kapitel 4.1). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit PNA-Konjugaten gearbeitet. Um sicherzustellen, dass deren Spaltaktivität mit der von DNA-Konjugaten vergleichbar ist, wurde zunächst Tris(2-aminobenzimidazol) **57** an verschiedene PNA-Oligomere konjugiert. Die so erhaltenen Konjugate wurden auf ihre Spalteigenschaften hin untersucht, um einen direkten Vergleich der Spaltaktivitäten von DNA- und PNA-Konjugaten des Tris(2-aminobenzimidazol) zu ermöglichen. Erst danach sollten Spaltexperimente mit PNA-Konjugaten von bisher nicht konjugierten RNA-Spaltern erfolgen.

- K1:** Lys- **aacagtcctc** - TBI
- K2:** Lys- **aacagtcctc** - Linker - TBI
- K3:** Lys- **gctgacggct** - Linker - TBI
- K4:** LysLys- **tatggaacagtcctc** - Linker - TBI
- K5:** LysLys- **gatcggctgacggct** - Linker - TBI
- K6:** LysLys- **atttcacgaatatca** - Linker - TBI
- RNA1:** Cy5-T<sub>10</sub>-ribo(**5'CUAGCCGACUGCCGAUCUCGCUGACUGAC**)-T<sub>4</sub><sup>3'</sup>
- RNA3:** Cy5-T<sub>10</sub>-ribo(**5'AUACCUUGUCAGGAGAAGAGAGGCCGUUA**)-T<sub>4</sub><sup>3'</sup>
- RNA4:** Cy5-T<sub>10</sub>-ribo(**5'UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG**)-T<sub>4</sub><sup>3'</sup>

**Abbildung 91:** Für die Spaltexperimente verwendete Konjugate und RNA-Substrate. Bei dem verwendeten Linker handelt es sich um 6-Aminohexansäure, TBI steht für Tris(2-aminobenzimidazol). Die zueinander komplementären Sequenzen sind in der jeweils gleichen Farbe dargestellt.

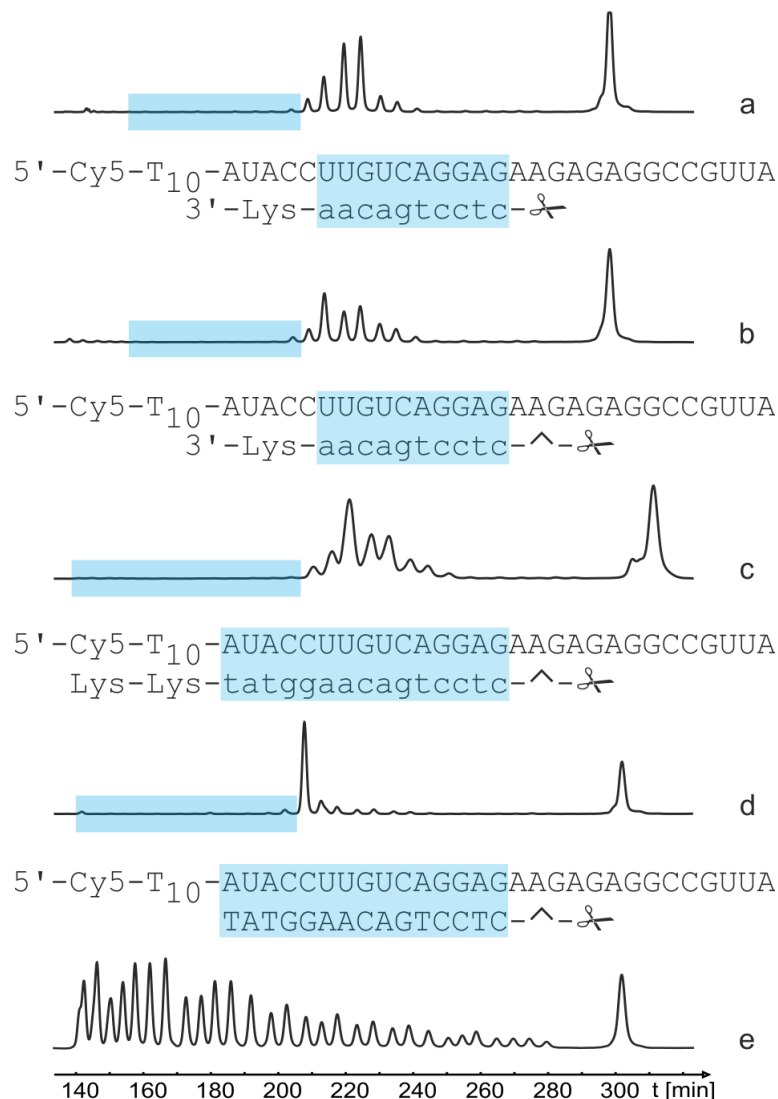
### 6.1.1 Einfluss von Linker und PNA-Länge auf die RNA-Spaltung

Für die ersten Spaltexperimente wurde das zu **RNA3** komplementäre PNA-10mer-Konjugat **K1** eingesetzt. Zwar hatte es sich bei den in der Vergangenheit in unserer Gruppe entwickelten DNA-Spalter-Konjugaten um DNA-15mere gehandelt, doch wurde davon ausgegangen, dass die höhere Affinität von PNA zu RNA auch den Einsatz kürzerer PNA-Oligomere ermöglichen würde. **RNA3** wurde unter den bereits für die Untersuchung von unspezifischen Spaltern verwendeten Bedingungen für 20 h mit **K1** inkubiert. Dafür wurde ein pH-Wert von 8 gewählt, der sich in der Vergangenheit als optimal für die Spaltung mit Tris(2-aminobenzimidazol)-Konjugaten erwiesen hatte.<sup>[85]</sup>

Das aus der Spaltung von **RNA3** durch **K1** resultierende Spaltmuster ist in Abbildung 92a dargestellt. Wie erwartet ist der Grad der Spaltung im Bereich des PNA/RNA-Doppelstranges vernachlässigbar gering, da hier die für die Spaltung nötige colineare Anordnung von 5'- und 2'-OH-Gruppe innerhalb einer Phosphordiesterbindung nicht gegeben ist. Eine Ausnahme bildet das direkt neben der Spalter-Einheit befindliche letzte Basenpaar des Duplexes, das zu einem geringen Prozentsatz gespalten wird. Möglicherweise ist dieses Basenpaar durch den benachbarten Spalter destabilisiert, so dass die beiden Nucleobasen zeitweise ungepaart vorliegen können. Der Hauptspaltbereich liegt zwischen Position 16 und 21 der RNA-Sequenz. Verglichen mit dem zur gleichen RNA komplementären DNA-Konjugat<sup>[85]</sup> ist dieser



Spaltbereich relativ breit. Der Spaltbereich des DNA-Konjugats erstreckt sich zwar ebenfalls über sechs Nucleotide, weist jedoch ein deutliches Spaltmaximum bei Nucleotid 16 auf (vgl. Abbildung 92d). Dies ist beim entsprechenden PNA-Konjugat nicht der Fall.



**Abbildung 92:** Spaltung von **RNA3** durch die PNA-Konjugate **K1** (a), **K2** (b) und **K4** (c) bzw. durch das der Sequenz von **K4** entsprechende DNA-Konjugat<sup>[85]</sup> (d). e: Hydrolysemuster (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) von **RNA3**. Spaltbedingungen: 150 nM Substrat, 750 nM PNA-Konjugat bzw. 1.5 µM DNA-Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h.

Da im DNA-Konjugat der Spalter über einen längeren Linker mit dem Oligonucleotid verbunden ist, während in Konjugat **K1** der Spalter direkt mit dem *N*-Terminus des PNA-Oligomers verknüpft ist, wurde das mit einem C<sub>6</sub>-Linker zwischen Spalter-Einheit und PNA ausgestattete Konjugat **K2** synthetisiert und getestet, das die gleiche PNA-Sequenz besitzt wie **K1**. Wie in Abbildung 92b zu sehen, führt der Linker zwar zu einer leichten Veränderung des Spaltmusters, an dem relativ breiten Spaltbereich ändert sich jedoch nichts. Das Vorhandensein eines Linkers scheint die Breite des Hauptspaltbereichs also nicht zu beeinflussen. Im

Folgenden wurden alle PNA-Konjugate mit einem C<sub>6</sub>-Linker versehen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den entsprechenden DNA-Konjugaten zu gewährleisten.

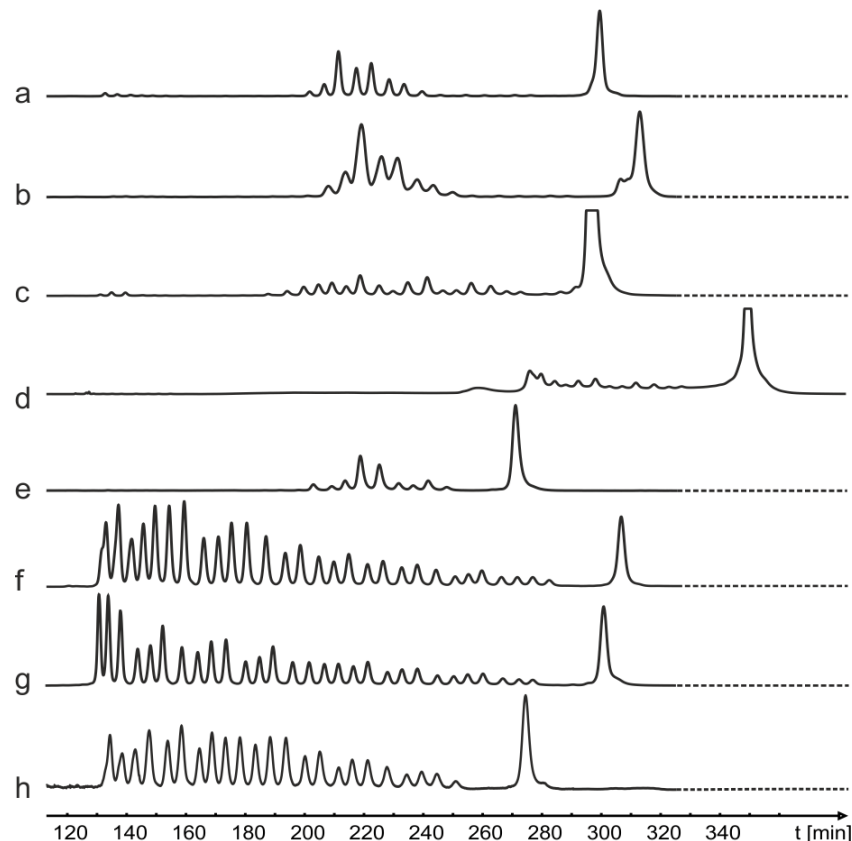
Der Prozentsatz an gespaltener RNA ist für **K1** und **K2** in etwa gleich, liegt jedoch ca. 15 % unter dem durch das entsprechende DNA-Konjugat bei gleicher Konjugat-Konzentration erreichten Prozentsatz. Bei **K1** und **K2** handelt es sich um 10mer-Konjugate, während das DNA-Konjugat ein 15mer-Oligonucleotid enthält. Aus diesem Grunde wurde das zum DNA-Konjugat sequenz-identische und ebenfalls zu **RNA3** komplementäre 15mer-PNA-Konjugat **K4** synthetisiert und in Spaltexperimenten eingesetzt (Abbildung 92c). Diese Verlängerung der PNA-Sequenz führte tatsächlich zu einer Steigerung des Anteils an gespaltener RNA; **K4** spaltete **RNA3** zu einem ähnlich hohen Prozentsatz wie das entsprechende DNA-Konjugat.

### 6.1.2 Spaltung unterschiedlicher RNA-Substrate und Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung

Nachdem gezeigt worden war, dass Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugate komplementäre RNA-Stränge effizient spalten können, wurde die Spaltaktivität von zu verschiedenen RNA-Substraten komplementären PNA-Konjugaten untersucht. Neben den bereits beschriebenen, zu **RNA3** komplementären Konjugaten **K2** und **K4** wurden die beiden zu **RNA1** komplementären Konjugate **K3** (PNA-10mer) und **K5** (PNA-15mer) sowie das zu **RNA4** komplementäre PNA-15mer-Konjugat **K6** eingesetzt. Letzteres wurde von P. Dogandzhiyski im Rahmen ihrer Doktorarbeit synthetisiert und untersucht. Die Spaltung der RNAs durch die passenden Konjugate ist in Abbildung 93 dargestellt.

Das Muster der Spaltung von **RNA4** durch **K6** (Abbildung 93e) gleicht in der Breite des Spaltbereichs den Mustern der Spaltung von **RNA3** durch die Konjugate **K1**, **K2** und **K4**. Der Spaltbereich für die Spaltung von **RNA1** durch das 10mer-PNA-Konjugat **K3** hingegen ist immens verbreitert (Abbildung 93c). Spaltung tritt in diesem Fall an allen Nucleotiden außerhalb des RNA/PNA-Doppelstrangs auf, ohne dass ein Spaltmaximum erkennbar wäre. Eine noch stärkere Abweichung von den gewohnten Spaltmustern ist bei der Spaltung von **RNA1** durch das 15mer-PNA-Konjugat **K5** (Abbildung 93d) zu erkennen: Es kommt zu einer Verschiebung sämtlicher RNA-Fragment-Signale einschließlich des Substrat-Signals hin zu höheren Detektionszeiten. Gleichzeitig überlagern sich einige Fragment-Signale; eine Zuordnung der Signale zu den einzelnen Fragmenten und somit eine genauere Analyse des Spaltbereichs sind nicht möglich. Da der RNA/PNA-Duplex für **K5** sehr viel G/C-reicher ist als in den ande-

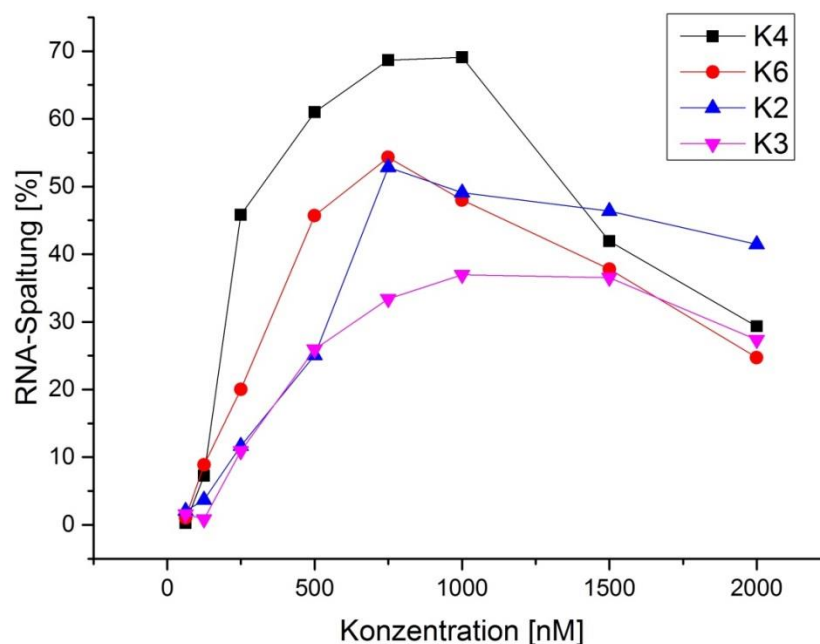
ren Fällen, ist eine mögliche Erklärung für dieses abweichende Spaltmuster, dass das PNA-15mer des Konjugats **K5** so stark an **RNA1** bindet, dass eine Auftrennung des Doppelstranges selbst bei der Gelelektrophorese nicht oder nur in geringem Maße stattfindet. Durch die Hybridisierung mit dem PNA-Konjugat besitzen die RNA-Fragmente sowie das nicht gespaltene RNA-Substrat eine sehr viel höhere Masse und bewegen sich dadurch langsamer durch das Sequenziergel.



**Abbildung 93:** Spaltung verschiedener RNA-Substrate durch die jeweils komplementären PNA-Konjugate (150 nM Substrat, 750 nM Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h). a: **RNA3** mit Konjugat **K2**. b: **RNA3** mit Konjugat **K4**. c: **RNA1** mit Konjugat **K3**. d: **RNA1** mit Konjugat **K5**. e: **RNA4** mit Konjugat **K6**. f - h: Hydrolyse-muster ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) von **RNA3**, **RNA1** und **RNA4**.

Neben den Spaltmustern wurde für die einzelnen Konjugate auch die Abhängigkeit der Spaltaktivität von der eingesetzten Spalter-Konzentration untersucht. Aufgrund der schwierigen Analysierbarkeit der Spaltergebnisse wurde Konjugat **K5** dabei nicht eingesetzt. Der Prozentsatz an gespaltenem RNA-Substrat nach einer Inkubationszeit von 20 h wurde bei Konzentrationen von 62.5 – 2000 nM bestimmt (Abbildung 94). Im Konzentrationsbereich unter 1  $\mu\text{M}$  zeigt das 15mer-Konjugat **K4** die höchste Spaltrate, schon bei einer Konjugat-Konzentration von 250 nM wird knapp die Hälfte des RNA-Substrats gespalten. Eine etwas niedrigere Aktivität weist **K6** auf, ebenfalls ein 15mer-Konjugat. Noch niedrigere Spaltraten zeigen die bei-

den 10mer-Konjugate **K2** und **K3**. Wie erwartet steigt die Spaltaktivität bei einer Erhöhung der Spalter-Konzentration zunächst an. Die volle Aktivität wird im Bereich von 750 – 1000 nM erreicht. Während die RNA-Spaltung im Bereich bis 1000 nM Spalter-Konzentration einer Sättigungskinetik gehorcht, nimmt die Spaltaktivität bei Konzentrationen über 1000 nM unerwartet wieder ab. Dieser Abfall der Spaltraten ist für die PNA-15mer-Konjugate sehr stark, für die 10mer-Konjugate deutlich schwächer ausgeprägt. Ein solches Phänomen war für die in der Vergangenheit untersuchten DNA-Konjugate nicht beobachtet worden.<sup>[85]</sup>



**Abbildung 94:** Konzentrationsabhängigkeit der Spaltaktivität verschiedener Konjugate gegenüber dem jeweils komplementären RNA-Substrat. Spaltbedingungen: 150 nM Substrat, 62.5 – 2000 nM Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h. Die zu ein und demselben Konjugat gehörenden Datenpunkte sind zur besseren Übersicht miteinander verbunden. Bei allen Datenpunkten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zwei Spaltexperimenten.

### 6.1.3 Untersuchung des Aggregationsverhaltens von PNA-Konjugaten und Nucleinsäuren mittels FCS

Während RNA und DNA ein polyanionisches Rückgrat besitzen, ist das PNA-Rückgrat ungeladen und hydrophob. PNA neigt daher in wässriger Lösung zu Aggregation. Es lag daher die Vermutung nahe, dass die höhere Hydrophobie der PNA-Konjugate gegenüber den DNA-Konjugaten und die damit verbundene Aggregationstendenz der Grund für die Abnahme der Spaltaktivität bei höheren Spalter-Konzentrationen sowie für die teilweise stark verbreiterten Spaltbereiche sein könnte. Das Phänomen von geringeren Spaltaktivitäten trotz höherer

Spalter-Konzentrationen aufgrund von Aggregation war schon im Fall der unspezifischen RNA-Spaltung durch 2-Aminoperimidin-Derivate beobachtet worden (Kapitel 5.2.5).

Um zu untersuchen, ob bei den für die Spaltexperimente verwendeten Konzentrationen die PNA-Konjugate tatsächlich mit Oligonucleotiden aggregieren, wurde mittels FCS (siehe auch Kapitel 5.1.3) die Diffusionszeit der Cy5-markierten **DNA1** (im Verhältnis 1:7 verdünnt mit unmarkierter **DNA2**) in Abwesenheit und in Gegenwart der zu beiden DNAs nicht komplementären Konjugate **K2** – **K6** gemessen. Die Konjugate wurden dabei in einer Konzentration von jeweils 750 nM eingesetzt. Bei dieser Konzentration war in den Spaltexperimenten das Erreichen der maximalen Spaltaktivität beobachtet worden, ein Rückgang der Spaltraten erfolgte erst bei höheren Konzentrationen. Die weiteren Bedingungen der FCS-Experimente (pH-Wert, Pufferkonzentration, Gesamtkonzentration an Nucleinsäure) wurden analog zu den Spaltexperimenten gewählt.

Die Messungen ergaben, dass sich die Diffusionszeit der DNA durch Zugabe des Konjugats **K2** bei den gewählten Konzentrationen nicht erhöht, während die Diffusionszeit der DNA in Gegenwart der Konjugate **K3** – **K6** zunimmt. Besonders stark war dieser Anstieg im Falle des zu **RNA1** komplementären Konjugats **K5**. Diese Erhöhung der Diffusionszeiten ist ein deutliches Indiz dafür, dass die PNA-Konjugate **K3** – **K6** mit Oligonucleotiden aggregieren. Das 10mer-Konjugat **K2** hingegen scheint im Konzentrationsbereich bis 750 nM noch keine Tendenz zur Aggregation mit DNA und somit vermutlich auch RNA zu besitzen. Weiterführende FCS-Experimente mit **K2** ergaben auch für eine Konjugats-Konzentration von 1 µM keine Aggregation. Bei einer Konzentration von 1.5 µM wurde jedoch auch für **K2** ein Anstieg der Diffusionszeit und damit Aggregation mit DNA beobachtet.

Die Aggregation der PNA-Konjugate mit Oligonucleotiden bietet eine Erklärung für den Abfall der Spaltaktivität bei höheren Spalter-Konzentrationen: Da in diesem Bereich auch die Aggregation zunimmt, könnte die Spalter-Einheit der Konjugate durch die Ausbildung großer Aggregate an den Wechselwirkungen mit dem RNA-Rückgrat und somit der Katalyse der Phosphordiesterbindungs-Spaltung gehindert werden. Für diese Erklärung spricht auch die Tatsache, dass bei analogen FCS-Experimenten mit **DNA1** und **DNA2** in Gegenwart von DNA-Tris(2-aminobenzimidazol)-Konjugaten, bei denen das Phänomen des Spaltaktivitäten-Rückgangs bei höheren Konzentrationen nicht aufgetreten war, keine Aggregation beobachtet worden war.<sup>[85]</sup> Möglicherweise ist die im Falle des Konjugats **K5** besonders hohe Aggregationstendenz neben den durch die G/C-reiche Sequenz stabileren RNA/PNA-Doppelsträn-

gen ein weiterer Grund für die Verschiebung und Überlagerung der Fragment-Signale im Sequenziergel (vgl. Abbildung 93).

Um zu untersuchen, ob DMSO die Aggregation abschwächen würde, wurden die FCS-Experimente in Gegenwart von 10 % DMSO bei sonst gleichen Bedingungen wiederholt. Unter diesen Bedingungen stiegen die Diffusionszeiten der DNA lediglich in Gegenwart der beiden zu **RNA1** komplementären Konjugate **K3** und **K5**. **K4** und **K6** scheinen in den untersuchten Konzentrationen (je 750 nM PNA-Konjugat) und in Gegenwart von 10 % DMSO hingegen nicht mit Oligonucleotiden zu aggregieren. Spaltversuche mit den Konjugaten **K4** und **K5** (je 750 nM) mit der jeweils komplementären RNA in Gegenwart von 10 % DMSO unter den ansonsten unveränderten Bedingungen zeigten jedoch keine Veränderung des Spaltmusters. Auch der Prozentsatz an gespaltener RNA (nur für **K4** bestimmt) veränderte sich nur unwesentlich. Da der Einfluss von DMSO auf die Spaltergebnisse nur gering zu sein scheint, wurde in weiteren Spaltexperimenten die Durchführung in rein wässrigem Medium bevorzugt – auch, um eine bessere Vergleichbarkeit mit in der Vergangenheit erhaltenen Resultaten zu gewährleisten.

**Tabelle 7:** Veränderung der Diffusionszeit von **DNA1** in Gegenwart der PNA-Konjugate **K2** - **K6**. Bedingungen: 19 nM **DNA1**, 131 nM **DNA2**, 750 nM Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8.

Konjugat	Erhöhung der Diffusionszeit von <b>DNA1</b>	
	0 % DMSO	10 % DMSO
<b>K2</b>	Nein	Nein
<b>K3</b>	Ja	Ja
<b>K4</b>	Ja	Nein
<b>K5</b>	Ja	Ja
<b>K6</b>	Ja	Nein

In einem zusätzlichen FCS-Experiment wurde untersucht, ob PNA-Konjugate nur mit nicht-komplementären oder auch mit komplementären Nucleinsäuren aggregieren. Dafür wurde die Diffusionszeit von Cy5-gelabelter **RNA1** – im Verhältnis 1:7 verdünnt mit der unmarkierten, aber ebenfalls zu **K3** und **K5** komplementären **RNA5** – in Gegenwart von **K3** und **K5**

bestimmt und mit der Diffusionszeit von **RNA1** in Abwesenheit von PNA-Konjugaten verglichen. Auch hier zeigte sich in Gegenwart von **K3** bzw. **K5** eine deutliche Erhöhung der Diffusionszeiten, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die beiden Konjugate im untersuchten Konzentrationsbereich (750 nM) auch mit komplementärer RNA Aggregate bilden.

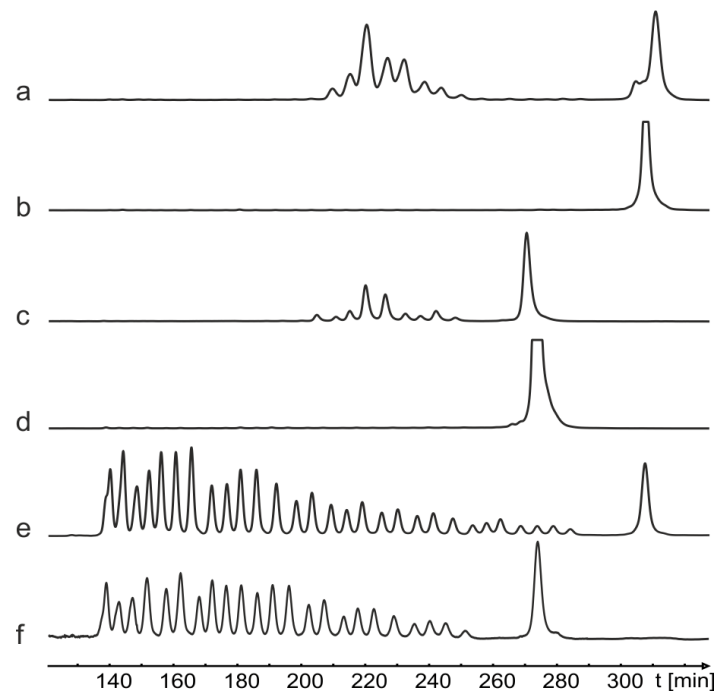
**RNA5:** 5'**GGCGCUAGCCGACUGCCGAUCUCGCUGACUGAC**3'

**Abbildung 95:** Sequenz der unmarkierten **RNA5**. Der zu PNA-Konjugat **K3** bzw. **K5** komplementäre Bereich ist grün eingefärbt.

#### 6.1.4 Substratspezifität der PNA-Spalter-Konjugate

Das Ergebnis der Aggregations-Untersuchungen legte zunächst die Vermutung nahe, dass auch die breiten Spaltbereiche durch Aggregationseffekte erklärt werden könnten: Die Aggregation eines RNA/PNA-Doppelstranges mit weiteren freien PNA-Konjugat-Molekülen könnte dazu führen, dass Spaltung auch in den RNA-Bereichen auftritt, die von der eigentlich an das Substrat gebundenen Spalter-Einheit weiter entfernt sind. Da die PNA-Konjugate allerdings auch mit nicht komplementären Oligonucleotiden aggregieren, wäre in diesem Fall auch die Spaltung von nicht komplementärer RNA durch PNA-Konjugate möglich.

Um die Substratspezifität der PNA-Konjugate zu überprüfen, wurden Spaltexperimente mit allen möglichen Kombinationen von RNA-Substraten und PNA-Konjugaten durchgeführt. In **Abbildung 96** sind beispielhaft die Kreuzspaltexperimente der Konjugate **K4** und **K6** mit den zugehörigen RNA-Substraten **RNA3** und **RNA4** dargestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass **RNA3** lediglich durch das komplementäre Konjugat **K4**, nicht aber durch das nicht komplementäre Konjugat **K6** gespalten wird. Entsprechend wird **RNA4** lediglich durch das komplementäre Konjugat **K6**, nicht aber durch **K4** gespalten. Analog dazu wurden die RNA-Substrate **RNA1**, **RNA3** und **RNA4** mit jeweils jedem der PNA-Konjugate **K2** - **K6** inkubiert. Die Ergebnisse sind im Anhang an diese Arbeit dargestellt und entsprechen denen der in **Abbildung 96** gezeigten: Sämtliche getesteten RNA-Substrate wurden nur durch die jeweils komplementären PNA-Konjugate gespalten. Bei Inkubation mit einem nicht komplementären PNA-Konjugat wurde keinerlei Spaltung beobachtet.



**Abbildung 96:** Kreuz-Spaltexperimente zur Überprüfung der Substratspezifität (150 nM Substrat, 750 nM Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h). a: **RNA3** mit Konjugat **K4**. b: **RNA3** mit Konjugat **K6**. c: **RNA4** mit Konjugat **K6**. d: **RNA4** mit Konjugat **K4**. e und f: Hydrolysemuster ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) von **RNA3** bzw. **RNA4**.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und getesteten PNA-Konjugate spalten somit alle substratspezifisch. Offenbar führt die Aggregation von PNA-Konjugaten mit nicht komplementärer RNA nicht zu einer Spaltung des RNA-Rückgrates. Damit ist fraglich, ob die Aggregation als Erklärung für die breiten Spaltbereiche herangezogen werden kann. Dies wäre lediglich dann der Fall, wenn die Aggregation von RNA/PNA-Doppelsträngen mit freien PNA-Konjugaten auf eine Art und Weise erfolgt, die nach wie vor Spaltung zulässt, während dies bei der Aggregation von einzelsträngiger RNA mit nicht komplementären PNA-Konjugaten nicht der Fall ist. Für eine Klärung dieser Frage wären jedoch mehr Erkenntnisse zur Zusammensetzung und Struktur der betreffenden Aggregate notwendig.

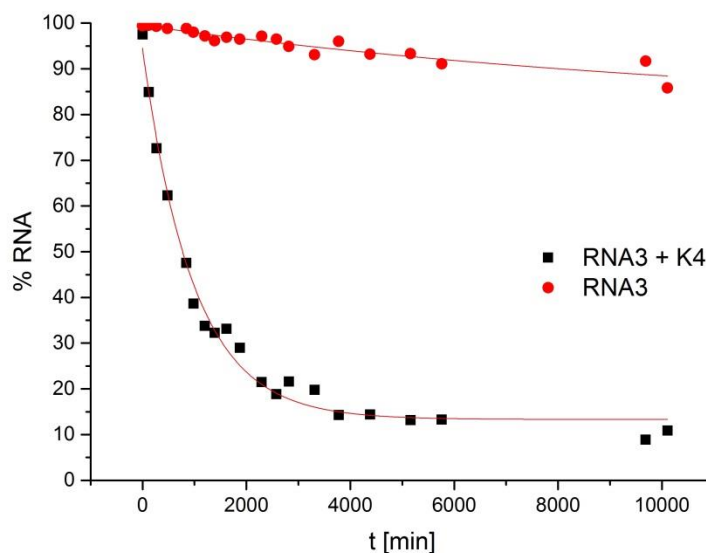
### 6.1.5 Kinetik der RNA-Spaltung durch Konjugat K4

Um die Spalteigenschaften von DNA- und PNA-Konjugat noch besser vergleichen zu können, wurde für die Spaltung von **RNA3** mit Konjugat **K4** die Kinetik bestimmt. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde **RNA3** dafür mit **K4** inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. **K4** wurde in einer Konzentration von 750 nM eingesetzt, um sicherzustellen, dass die maximale Spaltaktivität des Konjugats erreicht wird. Zur Stabilisierung der RNA/PNA-Duplexe wurde das Experiment in Gegenwart von 100 mM NaCl durchgeführt.



Parallel dazu wurde **RNA3** in Abwesenheit eines Spalters den gleichen Bedingungen ausgesetzt, um die Stabilität des Substrats zu überprüfen.

Während das RNA-Substrat in Abwesenheit eines Spalters auch nach sieben Tagen noch zu ca. 90 % ungespalten vorliegt, beträgt die Halbwertszeit für die Spaltung von **RNA3** durch **K4** unter der Annahme einer Kinetik 1. Ordnung 11.2 h, die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$   $0.062 \text{ h}^{-1}$  (jeweils Mittelwert aus zwei Spaltkinetiken). Die Halbwertszeit der Spaltung von **RNA3** durch das zu **K4** äquivalente DNA-Konjugat ist mit 12.4 h nur unwesentlich höher ( $k_1 = 0.056 \text{ h}^{-1}$ ).<sup>[85]</sup> In Bezug auf die Spaltaktivität ist **K4** somit gleichwertig zu seinem DNA-Äquivalent, die leicht niedrigere Halbwertszeit könnte durch die höhere Affinität von PNA zu RNA bedingt sein.



**Abbildung 97:** Kinetik der Spaltung von **RNA3** durch **K4** (Bedingungen: 150 nM Substrat, 0 oder 750 nM Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 37 °C). Die durchgehende Kurve wurde unter der Annahme einer Kinetik 1. Ordnung berechnet.

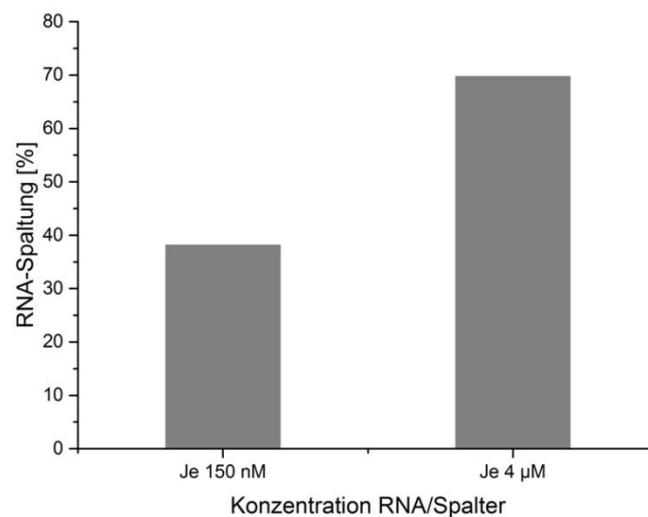
Wie bereits zuvor beobachtet,<sup>[85]</sup> bleibt ein kleiner Prozentsatz des RNA-Substrats auch nach einer Woche vollständig erhalten und wird nicht gespalten. Ein möglicher Grund dafür könnten strukturelle Schäden in einem Teil der RNA-Stränge sein, die eine Hybridisierung mit dem PNA-Konjugat verhindern.

### 6.1.6 Spaltexperimente mit höheren RNA-Konzentrationen

Betrachtet man die Konzentrationsabhängigkeit der Spaltaktivitäten der hier untersuchten PNA-Konjugate von Tris(2-aminobenzimidazol) (Abbildung 94), so fällt auf, dass die volle Aktivität erst erreicht wird, wenn das Konjugat in 5fachem Überschuss in Bezug auf das RNA-

Substrat eingesetzt wird. Hingegen besitzen viele aus der Literatur bekannte sequenzspezifische RNA-Spalter – unter anderem die von Strömberg *et al.* entwickelten PNAszyme<sup>[4,31]</sup> – schon bei einem 1:1-Verhältnis von Spalter und RNA eine sehr hohe Aktivität. Ein Vergleich der für die Spaltexperimente verwendeten Bedingungen zeigt allerdings, dass die von der Gruppe um R. Strömberg eingesetzten Konjugat- und RNA-Konzentrationen mit jeweils 4  $\mu\text{M}$  insgesamt viel höher sind als die in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig verwendeten Konzentrationen (150 nM RNA-Konzentration). Generell sollten höhere Konzentrationen die Bildung der PNA/RNA-Duplexe erleichtern, so dass der Anteil der an das RNA-Substrat gebundenen PNA-Konjugate höher sein sollte als in verdünnter Lösung. Da die Spaltung des RNA-Rückgrates nur nach Hybridisierung von PNA und RNA möglich ist, ist davon auszugehen, dass eine höhere Duplex-Konzentration mit einer höheren Spaltrate einhergeht.

Um dies zu überprüfen, wurden Spaltexperimente durchgeführt, bei denen Konjugat **K4** und **RNA3** in einer Konzentration von jeweils 4  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. Pufferkonzentration, pH-Wert und Inkubationsdauer blieben unverändert, allerdings war vor dem Auftragen auf das Analyse-Gel eine stärkere Verdünnung der Proben mit Ladepuffer notwendig, um zu hohe Zählraten am Detektor zu vermeiden.



**Abbildung 98:** Spaltung von **RNA3** durch Konjugat **K4**. Bedingungen: 150 nM oder 4  $\mu\text{M}$  Substrat, 150 nM oder 4  $\mu\text{M}$  Konjugat, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h.

Die ermittelte Spaltrate für dieses 1:1-Verhältnis von **K4** zu **RNA3** betrug 70 %. Bei einer RNA-Konzentration von 150 nM wurde dieser Wert erst bei 5fachem Überschuss des Konjugats erreicht, ein 1:1-Verhältnis führte hier zu lediglich 38 % Spaltung. Dies zeigt, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PNA-Spalter-Konjugate bereits dann eine hohe Spaltaktivität zeigen können, wenn sie und das RNA-Substrat im Verhältnis 1:1 einge-

setzt werden, wie es auch von der Gruppe um Strömberg für ihre Spalter beschrieben wurde. Außerdem macht dieses Ergebnis deutlich, wie schwierig der Vergleich von Spaltexperimenten ist, die bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden.

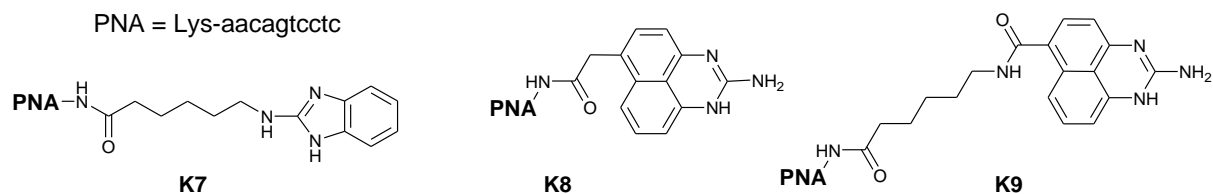
Insgesamt zeigen die mit Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugaten durchgeführten Spaltexperimente, dass es sich bei diesen um aktive und substratspezifische RNA-Spalter handelt. Das PNA-15mer-Konjugat **K4** zeigt eine mit dem äquivalenten DNA-Konjugat vergleichbare Spaltaktivität, die Halbwertszeit für die Spaltung ist im Falle des PNA-Konjugats sogar leicht niedriger. Die getesteten 10mer-PNA-Konjugate scheinen – verglichen mit den 15mer-Konjugaten – trotz der höheren Affinität von PNA zu RNA nicht zur wirklich effizienten Spaltung von RNA auszureichen. Für den Vergleich von PNA-Konjugaten verschiedener Spalter untereinander genügt jedoch bereits die Messung der Spaltaktivität der PNA-10mer-Konjugate vollkommen. Da diese – zumindest im Fall des Konjugats **K2** – anders als die PNA-15mer-Konjugate bei Konzentrationen bis 750 nM nicht zu Aggregation mit Nucleinsäuren neigen, wurden im Folgenden alle neu getesteten RNA-Spalter an die schon für **K2** verwendete **PNA1** konjugiert, um so RNA-Spaltung durch Aggregate auszuschließen.

## 6.2 Spaltexperimente mit Mono-2-aminobenzimidazol- und Mono-2-aminoperimidin-PNA-Konjugaten

Nachdem gezeigt worden war, dass PNA-Konjugate zur effektiven und substratspezifischen RNA-Spaltung genutzt werden können und dass Konjugate mit **PNA1** bei Konzentrationen bis 750 nM für Spaltexperimenten verwendet werden können, ohne dass Aggregationsprobleme auftreten, wurden Konjugate von RNA-Spaltern synthetisiert, die zuvor nur als unkonjugierte Verbindungen getestet worden waren. Durch Spaltexperimente mit diesen Konjugaten sollte ermittelt werden, ob die Verbindungen nur als Aggregate Spaltaktivität besitzen, oder ob sie auch als Einzelmoleküle aktiv sind.

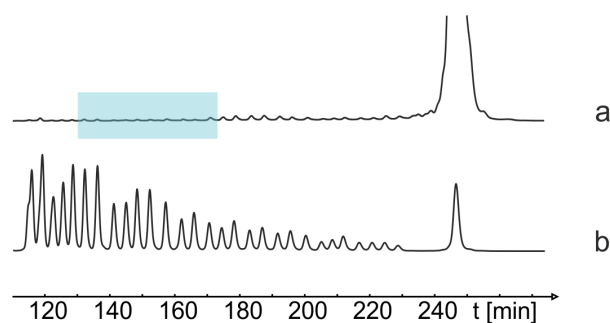
Im Fokus standen dabei Derivate von 2-Aminoperimidin **55**, das als Einzelverbindung eine fast so hohe Spaltaktivität besitzt wie das über drei katalytisch aktive Einheiten verfügende Tris(2-aminobenzimidazol) **57**. Gleichzeitig zeigt **55** aber auch eine besonders starke Tendenz zur Aggregation mit RNA, so dass eine Aussage über die Aktivität von **55** als Einzelmolekül bisher nicht möglich war. Zwei 2-Aminoperimidin-Derivate waren über Restgruppen am Naphthylring erfolgreich an **PNA1** konjugiert worden: Bei **K8** ist der *N*-Terminus der PNA

direkt über eine Amidbindung mit einem Essigsäurerest am Naphthylring verknüpft, bei **K9** ist ein 6-Aminohexansäure-Linker zwischen PNA und Spalter-Einheit eingebaut; der für die Konjugation des Spalters notwendige Carbonsäurerest sitzt hier direkt am Naphthylring. Als Vergleich wurde zusätzlich ein Mono-2-aminobenzimidazol-PNA-Konjugat mit nur einer spaltaktiven Einheit hergestellt (**K7**).



**Abbildung 99:** Verwendete Mono-2-aminobenzimidazol- und Mono-2-aminoperimidin-PNA-Konjugate.

Alle drei Konjugate wurden unter den Standardbedingungen für Spaltexperimente (150 nM **RNA3**, 50 mM TRIS-HCl, 37 °C, 20 h) bei pH 8 in verschiedenen Konzentrationen im Bereich 0.078 – 10 µM getestet. Die im Rahmen dieser Experimente ermittelten Spaltraten gingen nicht über die Hintergrundspaltung hinaus. Die Konjugate besitzen also in den untersuchten Konzentrationen keine bzw. nur eine minimale Spaltaktivität. Die genauere Betrachtung des Hintergrundspaltmusters zeigt eine Unterdrückung der RNA-Spaltung im Bereich des RNA/PNA-Duplexes, so dass davon auszugehen ist, dass die mangelnde Spaltaktivität nicht durch eine ungenügende Bindung der Konjugate an die Substrat-RNA bedingt ist. Ebenfalls für eine ausreichende Bindung der PNA-Konjugate an die komplementäre **RNA3** spricht die Tatsache, dass vergleichbare Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugate im gleichen Konzentrationsbereich eine hohe Spaltaktivität aufwiesen. Im RNA-Bereich direkt hinter dem RNA/PNA-Duplex ist die Spaltung leicht erhöht, was dafür spricht, dass die Konjugate zumindest eine minimale Spaltaktivität besitzen.



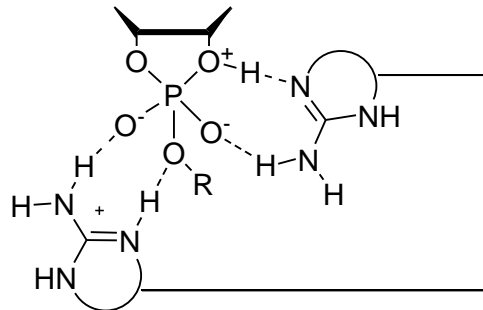
**Abbildung 100:** a: Leichte Spaltung von **RNA3** durch PNA-Konjugat **K9** (Bedingungen: 150 nM Substrat, 625 nM Konjugat **K9**, 50 mM TRIS-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h). b: Hydrolysemuster von **RNA3** ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Da sich bei den Spaltexperimenten mit PNA-Tris(2-aminobenzimidazol)-Konjugaten gezeigt hatte, dass eine höhere Spaltrate beobachtet werden kann, wenn Konjugat und RNA-Substrat beide in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt werden, wurden am Beispiel von Konjugat **K9** weitere Spaltexperimente durchgeführt, bei denen sowohl das Konjugat als auch das Substrat **RNA3** in einer Konzentration von je 4  $\mu\text{M}$  vorlagen. Pufferkonzentration, pH-Wert, Inkubationszeit und Temperatur blieben unverändert. Auch bei diesen Experimenten zeigte das untersuchte Konjugat jedoch keinerlei Spaltaktivität. Ebenso führten Spaltexperimente mit hohen RNA-Konzentrationen bei pH 7 nicht zu einer Spaltaktivität. Dieser pH-Wert war zusätzlich gewählt worden, weil das unkonjugierte 2-Aminoperimidin-Derivat aus **K9** bei pH 7 eine deutlich höhere Aktivität besitzt als bei pH 8. Letztendlich blieben alle Spaltexperimente mit Mono-2-aminobenzimidazol- oder Mono-2-aminoperimidin-Konjugaten erfolglos.

Sowohl 2-Aminobenzimidazol **54** als auch 2-Aminoperimidin **55** hatten als Einzelverbindungen in mM- bzw. im Fall von **55** sogar in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen RNA gespalten, wobei in beiden Fällen in FCS-Experimenten zumindest bei höheren mM- bzw.  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen Aggregation von RNA-Spaltern und RNA beobachtet worden war. Die nun durch den Einsatz der entsprechenden Konjugate in Spaltexperimenten gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl 2-Aminobenzimidazol als auch 2-Aminoperimidin als Einzelmolekül im Konzentrationsbereich von 0.078 – 10  $\mu\text{M}$  die Spaltung von RNA-Phosphordiesterbindungen nicht bzw. nur sehr unzureichend katalysieren. Erst die Ausbildung von Aggregaten mehrerer Spaltermoleküle oder – im Falle des 2-Aminobenzimidazols – die Anwesenheit mehrerer Spalter-Einheiten in einem Molekül wie im Tris(2-aminobenzimidazol) führen zu einer detektierbaren katalytischen Aktivität. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von 2-Aminoperimidin-Derivaten gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, PNA-Konjugate von Verbindungen mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten zu synthetisieren. Daher konnte nicht untersucht werden, ob solche Verbindungen ähnlich dem Tris(2-aminobenzimidazol) auch bei niedrigen Konzentrationen als Konjugat und somit auch als Einzelmolekül Spaltaktivität aufweisen.

Die Tatsache, dass eine Spalter-Einheit im Fall von 2-Aminobenzimidazol und 2-Aminoperimidin offenbar nicht für effiziente RNA-Spaltung ausreicht, lässt verschiedene Deutungen zu: Eine mögliche Erklärung ist, dass bei der Säure-Base-Katalyse der Spaltung ein und dasselbe Molekül bzw. ein und dieselbe Spalter-Einheit nicht gleichzeitig als Protonendonator und -akzeptor fungieren kann. Dies würde bedeuten, dass die Protonenaufnahme und -abgabe

durch verschiedene Moleküle bzw. verschiedene Spalter-Einheiten eines Moleküls erfolgen und die Höhe der Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer somit keinen Einfluss auf die Effizienz eines Spalters besäße. Die Ergebnisse der Spaltexperimente mit den PNA-Konjugaten **K7** – **K9** lassen sich jedoch auch auf eine andere Weise deuten: Möglicherweise ist eine Spalter-Einheit zwar dazu in der Lage, über einen *shuttle*-Mechanismus ein Proton von der 2'-OH-Gruppe auf eines der an das Phosphoratom gebundenen Oxyanionen zu übertragen, doch könnte zusätzlich noch eine weitere Spalter-Einheit zur Protonierung der Abgangsgruppe nötig sein, um den RNA-Strang tatsächlich zu spalten (vgl. Abbildung 101). In diesem Fall wäre die Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer für die Spalteffizienz von Bedeutung.



**Abbildung 101:** Möglicher Mechanismus der Phosphordiesterspaltung durch zwei Guanidin-analoge Einheiten eines RNA-Spalters.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

### 7.1 Zusammenfassung

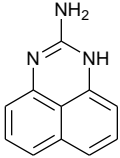
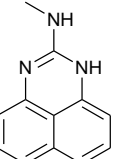
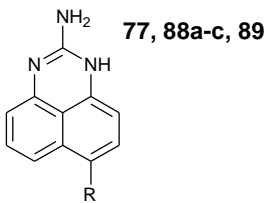
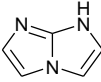
Künstliche Ribonucleasen, die sequenzspezifisch und effizient RNA spalten, könnten potenziell nicht nur als biochemische Werkzeuge dienen, sondern auch als Wirkstoffe gegen eine Vielzahl von Erkrankungen, bei denen mRNA oder miRNA involviert sind, eine wichtige Rolle spielen. Trotz der Tatsache, dass in den letzten beiden Jahrzehnten zahlreiche selektive RNA-Spalter entwickelt wurden, bleibt die Spaltaktivität dieser Verbindungen nach wie vor deutlich hinter der ihrer natürlichen Äquivalente zurück.<sup>[6]</sup> Die Optimierung künstlicher Ribonucleasen bleibt daher weiter von Interesse. Grundlegend für diese Optimierung ist ein Verständnis der Faktoren, die die Spaltaktivität einer Verbindung beeinflussen.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich schon seit geraumer Zeit mit der Synthese metallfreier RNA-Spalter auf Basis von Guanidinen<sup>[7,85]</sup> sowie mit der Untersuchung der Fragestellung, welche Eigenschaften ein effizienter RNA-Spalter besitzen sollte.<sup>[8]</sup> Dieser Frage wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Von Interesse war dabei nicht nur der  $pK_a$ -Wert einer Verbindung, sondern auch die Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer sowie die Aggregationstendenz. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe noch nicht als RNA-Spalter getesteter Verbindungen synthetisiert bzw. in zwei Fällen käuflich erworben. Diese Substanzen wurden – wie auch einige bereits von K. Dörr als RNA-Spalter identifizierte Verbindungen – hinsichtlich der genannten Eigenschaften untersucht und ihre Spaltaktivität gegenüber natürlichen sowie enantiomeren RNA-Substraten getestet. Die so erhaltenen Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in Tabelle 8 dargestellt.

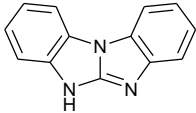
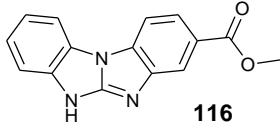
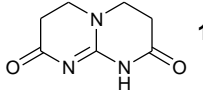
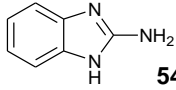
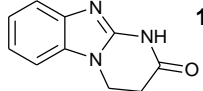
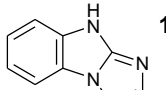
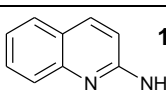
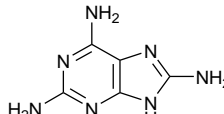
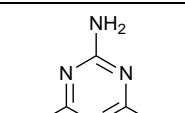
Es zeigte sich, dass alle Verbindungen, die sowohl einen geeigneten  $pK_a$ -Wert (6 – 8) als auch eine niedrige Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer ( $\leq 5$  kcal/mol) besitzen, tatsächlich RNA spalten, wenn auch teilweise nur in geringem Maße. Einzige Ausnahme bildet dabei 2,6,8-Triaminopurin **139**, welches allerdings aufgrund seiner geringen Löslichkeit möglicherweise in weitaus geringerer Konzentration vorlag, als gewünscht – darauf deutet zumindest eine in manchen Spaltexperimenten aufgetretene Trübung der Spallösung hin. Substanzen, bei denen entweder der  $pK_a$ -Wert oder aber die Energiedifferenz weit außerhalb des oben skizzierten Rahmens lagen, wiesen wie erwartet keinerlei Spaltaktivität auf.

Anders sah das Ergebnis für Verbindungen aus, bei denen die Abweichung des  $pK_a$ -Wertes bzw. der Energiedifferenz vom jeweiligen Idealwert weniger groß war: Sowohl **150** (relativ hohe Energiedifferenz) als auch **115** ( $pK_a$ -Wert unter 6) wirkten in den durchgeführten Experimenten als RNA-Spalter. Die Spaltrate war dabei im Fall von **150** deutlich niedriger als bei anderen 2-Aminoperimidin-Derivaten. Offenbar werden die Auswirkungen eines nicht optimalen  $pK_a$ -Wert oder einer etwas zu hohen Energiedifferenz kompensiert, wenn die Abweichungen nicht zu groß sind und der jeweils andere Wert im üblichen Rahmen liegt. Die Strukturen von **115** und **150** legen außerdem die Vermutung nahe, dass die Spaltaktivität in beiden Fällen auch durch das jeweils große aromatische System und die damit möglichen *stacking*-Wechselwirkungen mit der RNA begünstigt wird. Allerdings zeigte sich, dass eine solche Struktur mit erhöhter Aggregationstendenz lediglich in einem gewissen Konzentrationsbereich positive Auswirkungen auf die Spaltaktivität besitzt. Bei höheren Konzentrationen war bei stark aggregierenden Verbindungen ein deutlicher Rückgang der Spaltraten zu beobachten.

**Tabelle 8:** Übersicht über  $pK_a$ -Werte, Energiedifferenzen und Spaltaktivitäten der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Guanidinaloga. Der  $pK_a$ -Wert für **135** wurde nicht ermittelt, liegt aber vermutlich deutlich im sauren pH-Bereich.

Verbindung	$pK_a$ -Wert	Energiedifferenz zw. Amino- und Iminotautomer (kcal/mol)	Spaltaktivität
 <b>55</b>	8.1	3.81	sehr hoch
 <b>150</b>	7.7	10.92	mittel
 <b>77, 88a-c, 89</b>	6.7 – 8.1	2.18 – 4.36	hoch bis sehr hoch
 <b>56</b>	7.4	0	gering

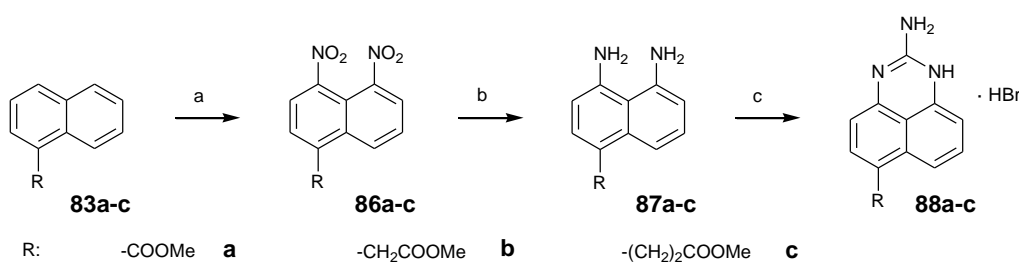


 <b>115</b>	4.7	0	gering
 <b>116</b>	3.7	0.56	keine
 <b>135</b>	?	0	keine
 <b>54</b>	7.3	1.28	gering
 <b>134</b>	3.7	4.36	keine
 <b>132</b>	6.5	19.10	keine
 <b>151</b>	7.0	5.08	gering
 <b>139</b>	6.2	0.73	keine
 <b>152</b>	5.2	21.68	keine

Die Ergebnisse zeigen, dass sich anhand von  $pK_a$ -Wert und Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer sowie unter Berücksichtigung der Aggregationstendenz recht gut vorher-sagen lässt, ob ein Guanidinanalogon RNA spaltet oder nicht. Eine präzise Vorhersage der Spaltaktivität scheint jedoch nicht möglich zu sein, die Höhe der Spaltraten variiert stark. Auch ist fraglich, inwiefern die relativ simplen Berechnungen der Energiedifferenz mit AM1 bei komplexeren Molekülen noch verlässlich sind.

Die größte Spaltaktivität der untersuchten Verbindungen hatte 2-Aminoperimidin **55** gezeigt, das schon in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen RNA spaltet. Es wurden daher verschiedene Derivate mit einer oder mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten synthetisiert. Während die Synthese *N*-substituierter Derivate durch Reaktion von 2-Chlorperimidin mit dem gewünschten Amin recht einfach ist, gestaltet sich die Synthese von Verbindungen mit einem Substituenten am

Naphthylring wesentlich komplizierter. Die hohe Empfindlichkeit von 2-Aminoperimidinen führte dazu, dass eine direkte Derivatisierung am Naphthylring – z.B. durch Kreuzkupplungsreaktionen von 2-Amino-6-bromperimidin – nicht möglich war. Stattdessen wurden Naphthylderivate mit dem jeweils gewünschten Substituenten als Edukte verwendet und diese in drei Schritten durch Nitrierung, anschließende Reduktion der Nitrogruppen und schließlich durch eine Ringschlussreaktion mit Bromcyan in das entsprechende 2-Aminoperimidin-Derivat umgewandelt.



**Abbildung 102:** Synthese verschiedener 2-Aminoperimidin-Derivate. a: HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; b: für **87a** und **b**: Et<sub>3</sub>SiH, Pd/C (10 %), MeOH (abs.), für **87c**: 4 bar H<sub>2</sub>, Pd/C (abs.), EtOAc (abs.); c: BrCN, DCM (abs.).

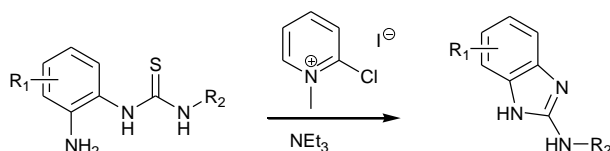
Spaltexperimente mit den verschiedenen Derivaten zeigten, dass eine Alkylierung der 2-Aminogruppe zu einer deutlichen Abschwächung der Spaltaktivität führt. Substituenten am Naphthylring hingegen senken die Spaltaktivität in sehr viel geringerem Maße. Insgesamt wiesen allerdings alle Verbindungen eine geringere Spaltaktivität als die Stammverbindung **55** auf. Während im Fall des 2-Aminobenzimidazols Verbindungen mit mehr als einer 2-Aminobenzimidazol-Einheit sehr viel höhere Spaltraten besitzen als die Einzelverbindung<sup>[7]</sup>, wurde dieser Effekt für 2-Aminoperimidin-Derivate lediglich im Konzentrationsbereich von 50 µM oder niedriger beobachtet. Bei höheren Konzentrationen lagen die Spaltaktivitäten von vier untersuchten Verbindungen mit zwei oder drei 2-Aminoperimidin-Einheiten alleamt unter denen von **55**. Möglicherweise werden auch hier höhere Spaltraten durch die für diese Verbindungen extrem starke Aggregationstendenz verhindert.

Die in FCS-Experimenten festgestellte hohe Aggregationstendenz von 2-Aminoperimidin führt zu einem weiteren Problem. Aufgrund der Aggregationstendenz werden Aussagen darüber, ob die Spaltung der RNA-Phosphordiesterbindung tatsächlich durch Einzelmoleküle oder aber durch Aggregate des Spalters katalysiert wird, schwierig. Um Spaltung durch Aggregate ausschließen zu können, sind Experimente mit sehr geringen Spalter-Konzentrationen nötig. Bei solch niedrigen Konzentrationen (unterer µM- bis nM-Bereich) lässt sich eine detektierbare Spaltung des RNA-Substrates jedoch nur dann erreichen, wenn Konjugate

des Spalters mit einer sequenzerkennenden Einheit verwendet werden, wodurch eine hohe lokale trotz niedriger absoluter Konzentration ermöglicht wird.

Bisher waren in unserer Arbeitsgruppe DNA-Oligonucleotide als sequenzerkennende Einheit verwendet worden.<sup>[85]</sup> Da die Basenlabilität von 2-Aminoperimidinen eine Festphasenkonjugation an DNA aus synthetischen Gründen (Entschützung und Abspaltung von der festen Phase erfolgen unter basischen Bedingungen) unmöglich macht und DNA-Oligonucleotide zudem in biologischem Milieu nicht stabil sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Konjugate mit dem Nucleinsäureanalogon PNA eingesetzt. Diese Konjugate sollten aufgrund ihrer höheren Stabilität in biologischem Milieu auch bei zukünftigen *in vivo*-Experimenten einsetzbar sein.

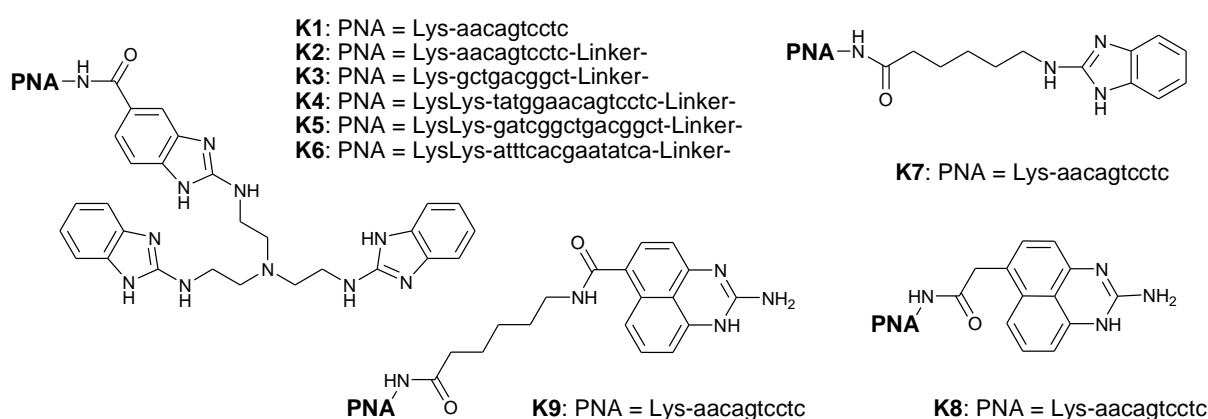
Zunächst wurden PNA-Konjugate von Tris(2-aminobenzimidazol) getestet, um sicherzustellen, dass die Spaltaktivitäten mit denen von DNA-Konjugaten vergleichbar sind. Das für die Konjugation benötigte Tris(2-aminobenzimidazol) **57** wurde über eine neue, quecksilberfreie Variante der ursprünglichen Synthese hergestellt, wobei das Mukaiyama-Reagenz anstelle von HgO zur Cyclisierung der 2-Aminobenzimidazol-Einheiten verwendet wurde. Die Ausbeuten lagen im Bereich der auf dem früheren Wege erhaltenen Ausbeuten; gleichzeitig waren die Reaktionsbedingungen sehr viel milder.



**Abbildung 103:** Ringschluss eines 2-Aminobenzimidazol-Derivats unter Verwendung des Mukaiyama-Reagenzes.

**57** wurde an verschiedene PNA-10- und 15mere konjugiert, was ohne Probleme im einstelligen mg-Bereich gelang. Die Konjugate spalteten die jeweils komplementäre RNA substratspezifisch, wobei die 15mer-Konjugate eine höhere Aktivität aufwiesen. Ein direkter Vergleich zwischen zwei sequenzidentischen PNA- und DNA-Konjugaten zeigte eine vergleichbare Spaltaktivität. Die Halbwertszeit des PNA-Konjugats lag dabei sogar leicht unter der des DNA-Konjugats. Verglichen mit DNA-Konjugaten ist bei PNA-Konjugaten die Spaltstelle sehr viel breiter. Möglicherweise spielt hier die Aggregation von PNA-Konjugaten mit den RNA-Substraten eine Rolle, allerdings bleibt die Substratspezifität von den Aggregationseffekten unbeeinflusst.

Nachdem gezeigt worden war, dass PNA- und DNA-Konjugate eine vergleichbare Spaltaktivität besitzen, wurden zwei 2-Aminoperimidin-Derivate sowie ein Mono-2-aminobenzimidazol-Derivat an ein PNA-10mer konjugiert. Es wurde dabei das PNA-10mer verwendet, das im untersuchten Konzentrationsbereich als Konjugat mit Tris(2-aminobenzimidazol) keinerlei Aggregationseffekte mit Nucleinsäure gezeigt hatte, da Spaltung durch Aggregate in jedem Fall ausgeschlossen werden sollte. Obwohl freies 2-Aminoperimidin ein sehr effizienter RNA-Spalter ist, zeigten die beiden 2-Aminoperimidin-Konjugate wie auch das Mono-2-aminobenzimidazolkonjugat keine Spaltaktivität. Die Tatsache, dass eine spaltaktive Einheit offenbar nicht zur Spaltung von RNA in signifikantem Ausmaß ausreicht, könnte dagegensprechen, dass bei der Spaltung der Phosphodiesterbindung wirklich ein und dasselbe Guanidinanalogon als Protonendonator und -akzeptor dient. Wahrscheinlicher ist, dass diese beiden Funktionen von zwei verschiedenen Molekülen (im Aggregat) oder Einheiten (im Konjugat mit mehreren Spalter-Einheiten) ausgeübt werden. Die Synthese eines Konjugats mit mehr als einer 2-Aminoperimidin-Einheit, mit dem sich diese These weiter überprüfen ließe, gelang im Rahmen dieser Arbeit leider nicht.



**Abbildung 104:** Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte und getestete PNA-Konjugate.

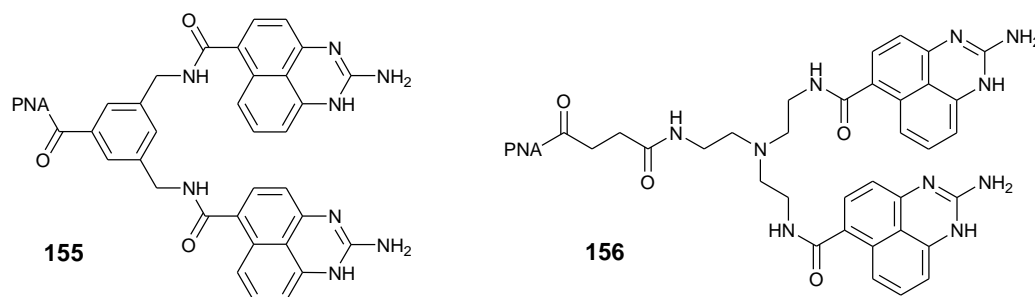
## 7.2 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Guanidinanaloga durchgeführten Spaltexperimente scheinen die Arbeitshypothese, dass der  $pK_a$ -Wert sowie die Höhe der Energiedifferenz zwischen Amino- und Iminotautomer für die Spaltaktivität einer Verbindung von Bedeutung sind, zunächst zu bestätigen. Der Einfluss des  $pK_a$ -Werts wurde durch Spaltexperimente mit 2-Aminoperimidin-Derivaten bei unterschiedlichen pH-Werten zusätzlich untermauert. Hingegen wirft die Tatsache, dass 2-Aminoperimidin in konjugierter Form und

damit als Einzelmolekül in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten keinerlei Spaltaktivität besaß, die Fragen auf, ob die Energiedifferenz überhaupt einen Einfluss auf die Aktivität einer Verbindung haben kann, bzw. ob nicht mindestens zwei Guanidinaloga als Spalter-Einheiten benötigt werden.

Spaltexperimente mit Dinucleosidmonophosphaten wie ApA könnten Aufschluss geben, ob 2-Aminoperimidin und andere der untersuchten Guanidinaloga als Einzelmoleküle tatsächlich keine Spaltaktivität besitzen. Die im Gegensatz zu den polyanionischen RNA-Substraten lediglich zweifach negative Ladung, das durch die flexiblere Struktur deutlich weniger stark ausgeprägte *base stacking* sowie die die viel kleinere Molekülgröße sollten die Tendenz zur Bildung von Aggregaten von Substrat und Spalter stark abschwächen. Falls FCS-Experimente bestätigen, dass sich in diesen Fällen tatsächlich keine Aggregate bilden, so könnten Spaltexperimente Aufschluss über die katalytische Aktivität der einzelnen Guanidinaloga als Einzelmoleküle geben. Zusätzliche *proton inventory studies*<sup>[146]</sup> könnten die Frage klären, ob – wie von uns angenommen – im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Phosphordiestererspaltung tatsächlich zwei Protonen übertragen werden.

Neben der Untersuchung solcher mechanistischen Fragen ist auch die Synthese sequenzspezifischer Ribonucleasen, die sich die hohe Spaltaktivität des 2-Aminoperimidins zu Nutze machen, von Interesse. Da eine 2-Aminoperimidin-Einheit allein offenbar nicht für effiziente Spaltung ausreicht, stehen Konjugate mit Spaltern, die mehrere solcher Einheiten enthalten, im Fokus zukünftiger Forschung. Als stabilstes der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 2-Aminoperimidin-Derivate könnte **88a** als Baustein für solche Verbindungen dienen. Zwei mögliche Zielstrukturen sind in Abbildung 105 dargestellt.



**Abbildung 105:** Mögliche Zielstrukturen für sequenzspezifische RNA-Spalter mit mehreren 2-Aminoperimidin-Einheiten.

Neben diesen beiden eher grundlegenden Projekten macht die neu entwickelte, quecksilberfreie Synthese von Tris(2-aminobenzimidazol) sowie die Konjugation dieses Spalters an

---

biologisch stabile PNA-Oligomere auch stärker anwendungsorientierte Studien *in vivo* möglich. Die nach wie vor recht hohe Halbwertszeit der Konjugate lässt zwar die sehr kurzlebige mRNA als Target ausscheiden, doch mit den in vielen Erkrankungen eine Rolle spielenden miRNAs gibt es auch für Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugate potenzielle Targets, schließlich haben miRNAs im Komplex mit Argonaut-Proteinen eine deutlich längere Lebensdauer. Die Inhibierung von miRNAs ist zum Beispiel durch komplementäre LNA-Oligonucleotide möglich<sup>[147]</sup>, wofür allerdings stöchiometrische Mengen des Inhibitors benötigt werden. Tris(2-aminobenzimidazol)-Konjugate, die bei der RNA-Spaltung *turnover* zeigen, könnten miRNA durch Spaltung der Target-Sequenzen potenziell auch in substöchiometrischen Mengen inhibieren. An der Synthese sowie an der *in vitro*-Untersuchung solcher Konjugate, bei denen der Spalter in der Mitte einer PNA- oder LNA-Sequenz sitzt und die dadurch die Fähigkeit zum *turnover* erhalten,<sup>[144]</sup> arbeitet zurzeit P. Dogandziyski. Experimente mit den Konjugaten in lebenden Zellen erfolgen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Hartmann (Marburg).

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

#### NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Geräte DPX 250 ( $^1\text{H}$ : 250 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 62.9 MHz), Avance 300 ( $^1\text{H}$ : 300 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 75.4 MHz), Avance 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz) und Avance 500 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125.8 MHz) der Firma *Bruker* verwendet. Die chemische Verschiebung  $\delta$  der  $^1\text{H}$ -Signale wurde in ppm angegeben und auf das jeweils verwendete Lösungsmittel bezogen: DMSO- $d_6$  ( $\delta = 2.50$  ppm),  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  ppm) oder  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta = 4.79$  ppm). Die Kopplungskonstanten  $J$  wurden in Hz angegeben. Die Multiplizitäten der Signale wurden mit s für Singulett, br s für breites Singulett, d für Dublett, dd für Dublett von Dublett, t für Triplett, q für Quartett und m für Multipllett bezeichnet.  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden Protonen-entkoppelt aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  der  $^{13}\text{C}$ -Signale wurde ebenfalls in ppm und relativ zum jeweiligen Lösungsmittel angegeben: DMSO- $d_6$  ( $\delta = 39.43$  ppm) oder  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77.0$  ppm). Die für die Zuordnung relevanten Protonen sind kursiv dargestellt. Alle Messungen erfolgten bei 300 K.

#### Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Für die Aufnahme von FT-IR-Spektren wurden die Geräte 1600 Series (Feststoffe: KBr-Presslinge; Flüssigkeiten: NaCl-Fenster) und Spektrum Two (ausgestattet mit einer UATR-Einheit; direkte Messung der Reinstoffe) der Firma *PerkinElmer* verwendet. Die Signale wurden auf ganze Zahlen gerundet und in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Bandenintensitäten wurden mit s für strong, m für medium oder w für weak gekennzeichnet.

#### Massenspektroskopie

Die Aufnahme von ESI-Massenspektren erfolgte mit den Geräten *Fisons Instruments* VG Platform II, *Perseptive Biosystems* Mariner Biospectrometry Workstation und *Shimadzu* LCMS-2020. MALDI-Massenspektren wurden mit dem Gerät *Perseptive Biosystems* Voyager-DE STR gemessen. Für die Aufnahme von HRMS-Spektren wurde das Gerät *Thermo Scientific* MALDI LTQ Orbitrap verwendet.

#### Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden mit dem Gerät *Elementar* Vario MICRO cube erstellt.

### **Schmelzpunkte**

Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heiztischmikroskop nach *Kofler* (unkorrigiert).

### **Dünnschichtchromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554 bzw. Machery-Nagel Nr. 818333; jeweils 0.2 mm Schichtdicke). Alle  $R_f$ -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Laufstrecke betrug 4 bis 5 cm. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe der Firma *Konrad Benda* (Typ NU-6KL) bei Wellenlängen von 254 nm bzw. 366 nm sichtbar gemacht. Als Färbereagenz für nicht UV-aktive Verbindungen diente Kaliumpermanganat-Lösung (3.00 g  $\text{KMnO}_4$ , 20.00 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 300 mL dest. Wasser + 5 ml 5%ige NaOH-Lösung) bzw. Ninhydrinlösung (3.75 g Ninhydrin in 25 mL Aceton und 25 mL *n*-Butanol).

### **Präparative Säulenchromatographie**

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firmen *Merck* oder *Machery-Nagel* verwendet.

### **Analytische und semipräparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie**

Für die analytische HPLC und die Aufreinigung von PNA-Konjugaten wurden folgende Geräte verwendet:

a) PU-980-HPLC-Pumpe mit LG-980-02-Hochdruckgradientenmischer, DG-980-50-Entgaser, UV-975 UV/VIS-Detektor (alle Geräte von *JASCO*) und einem *Varian* 385-LC-ELS-Detektor. b) PU-980-HPLC-Pumpe mit LG-980-02-Hochdruckgradientenmischer, DG-980-50-Entgaser, UV-970 UV/VIS-Detektor und einem MD-2010 Plus-Multiwellenlängendetektor (alle Geräte von *JASCO*). c) PU-2080-HPLC-Pumpe mit LG-2080-02-Hochdruckgradientenmischer, DG-2080-53-Entgaser und einem UV-2075 UV/VIS-Detektor (alle Geräte von *JASCO*).

Für die Analytik und die Aufreinigung von PNA-Konjugaten wurden die verwendeten Säulen mit einem Säulenofen der Firma *JASCO* auf 50 °C temperiert.

Für die semipräparative HPLC wurden folgende Geräte verwendet:

Programmierbare *Waters* 590 Pumpe mit *Waters* Differentialrefraktometer R 401, Einkanal-Potentiometerschreiber BBC Metrawatt *Servogor* 120 und einem *Beckman* 163 Wellenlängendetektor.



---

### **Wasserfreie Lösungsmittel**

THF wurde direkt vor Gebrauch von Natrium/Benzophenon unter Argon abdestilliert. Alle anderen benötigten wasserfreien Lösungsmittel wurden als absolutierte Ware über Molsieb in mit einem Septum versehenen Flaschen der Firmen *Sigma-Aldrich* und *Acros* gekauft und permanent unter Argon gelagert.

### **Druckapparatur**

Reaktionen unter Druck wurden in einem Laborautoklaven Modell 1 der Firma *Roth* (Reaktionsvolumen 100 mL, max. Betriebsdruck 100 bar, max. Betriebstemperatur 150 °C) durchgeführt.

### **Manuelle Festphasensynthese von PNA**

Die manuelle Festphasensynthese von PNA-10meren wurde in Spritzen (2 mL) aus Polyethylen durchgeführt, die mit Scheiben aus porösem Polyethylen (Porenweite 50 µm) ausgestattet waren. Als Festphasenträger wurde Rink-Amid-MBHA-Harz von *Novabiochem* verwendet. Es wurden PNA-Monomere der Firma *Link Technologies* verwendet.

### **Automatische Festphasensynthese von PNA**

Die automatische Festphasensynthese von PNA-15meren wurde mit einem Initiator+ Alstra-Mikrowellen-Peptidsynthesizer der Firma *Biotage* durchgeführt. Als Festphasenträger wurde Rink-Amid ChemMatrix-Harz der Firma *Biotage* verwendet. Es wurden PNA-Monomere der Firma *Link Technologies* verwendet.

### **Konzentrationsbestimmung von PNA-Konjugats-Lösungen**

Die Konzentrationen von PNA-Konjugats-Lösungen wurden mit Hilfe eines NanoDrop 2000c Spektrophotometers der Firma *Thermo Scientific*, ausgestattet mit der NanoDrop 2000/2000c-Software, bestimmt.

### **Messung von pH-Werten**

Für die Messung von pH-Werten von Puffern bzw. bei Titrations zur Bestimmung von  $pK_a$ -Werten wurde ein mit einer Glaselektrode ausgestattetes CG 841 pH-Meter von *Schott* verwendet.

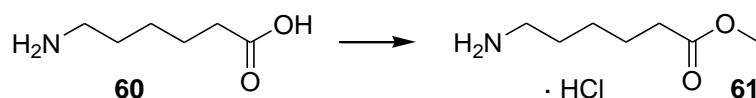
---

**UV/VIS-Spektroskopie**

UV/VIS-Spektren wurden im Rahmen von  $pK_a$ -Wert-Bestimmungen und Stabilitätsuntersuchungen mit einem NanoDrop 2000c Spektrophotometer der Firma *Thermo Scientific*, ausgestattet mit der NanoDrop 2000/2000c-Software, gemessen.

## 8.2 Synthese von 2-Aminobenzimidazolderivaten

### 8.2.1 6-Aminohexansäuremethylester-Hydrochlorid **61**<sup>[88]</sup>



Zu einer Lösung von 8.3 mL (0.11 mol) SOCl<sub>2</sub> in 80 mL MeOH (abs.) wurden unter Eiskühlung portionsweise 5.00 g (38.1 mmol) 6-Aminohexansäure **60** hinzugegeben. Die farblose Reaktionslösung wurde für 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand, ein hellgelber Feststoff, aus Chloroform umkristallisiert. Es wurden 6.92 g eines farblosen Feststoffs erhalten (100 %).

R<sub>f</sub> = 0.13 (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 118 – 122 °C; Lit: 118 – 122 °C.<sup>[148]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.98 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, *H*-C6), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, *H*-C2), 1.72 - 1.57 (m, 4H, *H*-C3 und *H*-C5), 1.43 - 1.31 (m, 2H, *H*-C4).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 177.4, 52.2, 39.4, 33.4, 26.4, 25.1, 23.7.

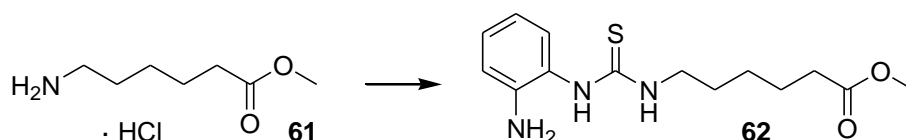
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3445 (w), 3026 (s), 2949 (s), 2664 (w), 2525 (w), 1734 (s), 1577 (m), 1512 (m), 1427 (m), 1364 (m), 1315 (m), 1253 (s), 1197 (s), 1152 (m), 1072 (m), 1045 (m), 1011 (w), 977 (m), 945 (m), 885 (m), 832 (m), 737 (m), 703 (w).

Elementaranalyse für C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> · HCl (181.66):

Berechnet: C, 46.28; H, 8.88; N, 7.71.

Gefunden: C, 46.02; H, 8.97; N, 7.59.

### 8.2.2 6-[3-(2-Aminophenyl)thioureido]hexansäuremethylester **62**



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 599 mg (3.36 mmol) 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol und 50 mg (0.73 mmol) Imidazol in 6 mL Acetonitril (abs.) wurden unter Argon portionsweise 410 mg (2.25 mmol) 6-Aminohexansäuremethylester-Hydrochlorid **61** sowie die Lösung von 0.36 mL DIPEA (2.17 mmol) in 3 mL Acetonitril (abs.) hinzugegeben. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 4 h 30 min bei 50 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt.

Nach Zugabe von 484 mg (4.50 mmol) *o*-Phenylendiamin wurde die Reaktionslösung für 3 h auf 50 °C erwärmt und anschließend erneut über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 2:1). Es wurden 300 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (75 %).

$R_f = 0.19$  (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 100 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.75$  (br s, 1H, NH), 7.23 (br s, 1H, NH), 7.00 - 6.94 (m, 2H, Aryl-H), 6.74 (d, 1H,  $J = 7$  Hz, Aryl-H), 6.56 (dt, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, Aryl-H), 4.79 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.45 - 3.35 (m, 2H, H-C6), 2.30 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-C2), 1.59 - 1.43 (m, 4H, H-C3 und H-C5), 1.31 - 1.22 (m, 2H, H-C4).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 180.7, 173.3, 144.1, 127.9, 127.2, 123.0, 116.4, 115.7, 51.1, 43.8, 33.1, 28.2, 25.7, 24.1$ .

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3410$  (m), 3282 (s), 3142 (s), 2944 (s), 1729 (s), 1618 (m), 1541 (s), 1516 (m), 1496 (s), 1453 (m), 1438 (m), 1303 (m), 1257 (s), 1194 (m), 1150 (m), 754 (m), 644 (w), 611 (m).

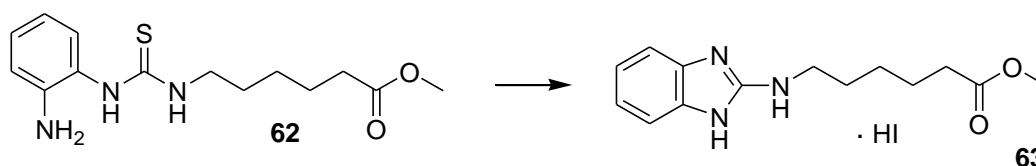
MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  (%) = 294.1 (100) [M-H]<sup>-</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S berechnet 295.14.

Elementaranalyse für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S (295.40):

Berechnet: C, 56.92; H, 7.17; N, 14.22; S, 10.85.

Gefunden: C, 57.00; H, 7.05; N, 14.32; S, 11.01.

### 8.2.3 6-(1*H*-Benzimidazol-2-ylamino)hexansäuremethylester-Hydroiodid **63**



259 mg (0.88 mmol) des Thioharnstoffs **62** wurden unter Argon in 3.3 mL DMF (abs.) gelöst und mit 0.27 mL (1.93 mmol) NEt<sub>3</sub> sowie portionsweise mit 269 mg (1.05 mmol) Mukaiyama-Reagenz versetzt. Die Reaktionslösung, in der sich ein gelber Niederschlag bildete, wurde für 4.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Kugelrohr entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 98:2). Der so erhaltene leicht ölige

Feststoff wurde mehrfach mit Toluol coevaporiert und im Vakuum getrocknet. Es wurden 237 mg eines hellgelben Feststoffs erhalten (69 %).

$R_f = 0.13$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 82 – 84 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.48$  (br s, 2H, NH), 8.87 (br t, 1H,  $J = 5.1$  Hz, NH), 7.38 - 7.35 (m, 2H, Aryl-H), 7.24 - 7.21 (m, 2H, Aryl-H), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.38 - 3.30 (m, 2H, H-C6, überlappt mit H<sub>2</sub>O), 2.33 (t, 2 H,  $J = 7.3$  Hz, H-C2), 1.68 - 1.52 (m, 4H, H-C3 und H-C5), 1.42 - 1.29 (m, 2H, H-C4).

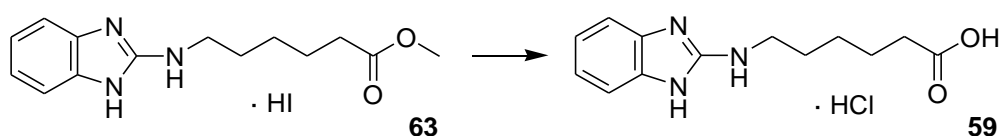
$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 173.1, 153.4, 135.3, 120.3, 111.2, 51.0, 42.1, 33.1, 28.6, 25.6, 24.0$ .

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3398$  (s), 3211 (w), 3116 (w), 3056 (w), 2928 (m), 2876 (w), 2774 (w), 2678 (w), 1736 (s), 1715 (s), 1676 (s), 1644 (s), 1604 (s), 1586 (s), 1512 (w), 1480 (m), 1466 (m), 1427 (w), 1384 (m), 1306 (w), 1260 (m), 1197 (m), 1156 (m), 1097 (w), 1019 (w), 843 (w), 757 (m).

MS (MALDI)  $m/z = 262.1$  (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 284.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> berechnet 261.15.

HRMS (MALDI)  $m/z = 262.15559$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+H<sup>+</sup> berechnet 262.15500.

#### 8.2.4 6-(1H-Benzimidazol-2-ylamino)hexansäure-Hydrochlorid 59



Die Suspension von 35 mg (0.13 mmol) **63** in 5 mL 6 N HCl wurde für 2 h auf 100 °C erhitzt. Der flockige Niederschlag wurde abfiltriert, mit etwas Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 26 mg eines beigen Feststoffs erhalten (70 %).

$R_f = 0.69$  (EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH 15:2:2:1).

Smp: 220 – 222°C.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.64$  (br s, 2H, NH), 12.03 (br s, 1H, COOH), 9.90 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz, NH), 7.40 - 7.34 (m, 2H, Aryl-H), 7.25 - 7.19 (m, 2H, Aryl-H), 3.40 - 3.35 (m, 2H, H-C6, überlappt mit H<sub>2</sub>O), 2.23 (t, 2H,  $J = 9.6$  Hz, H-C2), 1.67 - 1.50 (m, 4H, H-C3 und H-C5), 1.42 - 1.34 (m, 2H, H-C4).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 174.2, 149.9, 129.7, 122.8, 111.1, 42.5, 33.4, 28.1, 25.5, 24.0$ .

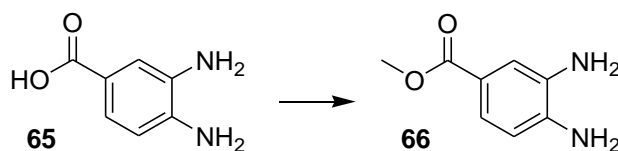
IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3270$  (m), 3089 (w), 3056 (w), 2968 (m), 1709 (s), 1663 (s), 1618 (w), 1478 (m), 1406 (m), 1376 (m), 1302 (w), 1258 (m), 1240 (m), 1189 (m), 1104 (w), 1016 (w), 850 (w), 833 (w), 745 (m), 700 (w), 620 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$  (283.75):

Berechnet: C, 55.03; H, 6.39; N, 14.81.

Gefunden: C, 55.25; H, 6.23; N, 14.78.

### 8.2.5 3,4-Diaminobenzoessäuremethylester **66**<sup>[7]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension von 5.0 g (33 mmol) 3,4-Diaminobenzoessäure **65** in 70 mL MeOH (abs.) wurden unter Argon langsam 2.4 mL (33 mmol)  $\text{SOCl}_2$  hinzugegeben. Die Suspension wurde auf RT erwärmt und für 4 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der violette Rückstand mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt, so dass die überstehende Lösung einen pH-Wert von 9 aufwies. Die Suspension wurde zunächst mit 150 mL und dann dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL 5%iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und dreimal mit je 50 mL dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das rote Rohprodukt wurde in siedendem DCM gelöst und das Reinprodukt durch Zugabe von *n*-Hexan gefällt. Es wurden 4.596 g eines farblosen Feststoffs erhalten (84 %).

$R_f = 0.75$  (EtOAc/MeOH 5:1).

Smp: 106 – 107 °C; Lit: 108 – 109 °C.<sup>[149]</sup>

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7.15$  (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, *H*-C2), 7.08 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, *H*-C6), 6.50 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, *H*-C5), 5.27 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.65 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 166.6, 140.4, 133.7, 120.0, 117.0, 114.7, 112.5, 50.9$ .

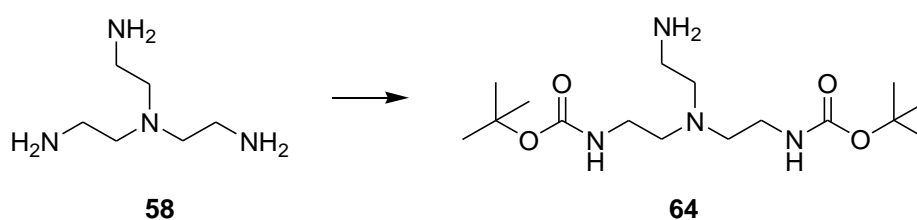
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3438 (m), 3366 (m), 3200 (m), 2950 (w), 1692 (s), 1671 (m), 1628 (m), 1590 (m), 1522 (m), 1452 (m), 1430 (m), 1318 (s), 1298 (s), 1238 (m), 1162 (w), 1104 (w), 992 (w), 894 (w), 767 (m).

Elementaranalyse für  $C_8H_{10}N_2O_2$  (166.18):

Berechnet: C, 57.82; H, 6.07; N, 16.86.

Gefunden: C, 57.57; H, 5.92; N, 16.80.

### 8.2.6 Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin **64**<sup>[7]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.42 mL (9.52 mmol) Tris(2-aminoethyl)amin **58** in 50 mL THF (abs.) wurde unter Argon über einen Zeitraum von 2 h 45 min die Lösung von 4.95 g (20.1 mmol) Boc-ON in 50 mL THF (abs.) hinzuge tropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 46 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand, ein gelbes Öl, in 50 mL EtOAc aufgenommen und zweimal mit je 50 mL 0.5 M NaOH-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 50 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 5:1 + 1 %  $NEt_3$ ). Es wurden 1.491 g eines gelben Öls erhalten (45 %).

$R_f$  = 0.27 (DCM/MeOH 5:1, 1%  $NEt_3$ ).

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 6.75 - 6.71 (m, 2H, NH), 3.19 (br s,  $NH_2$ , überlappt mit  $H_2O$ ), 2.98 - 2.91 (m, 4H,  $CH_2$ ), 2.54 (t, 2H,  $J$  = 5.8 Hz,  $CH_2$ , überlappt mit DMSO), 2.44 - 2.39 (m, 6H,  $CH_2$ ), 1.37 (s, 18H,  $CH_3$ ).

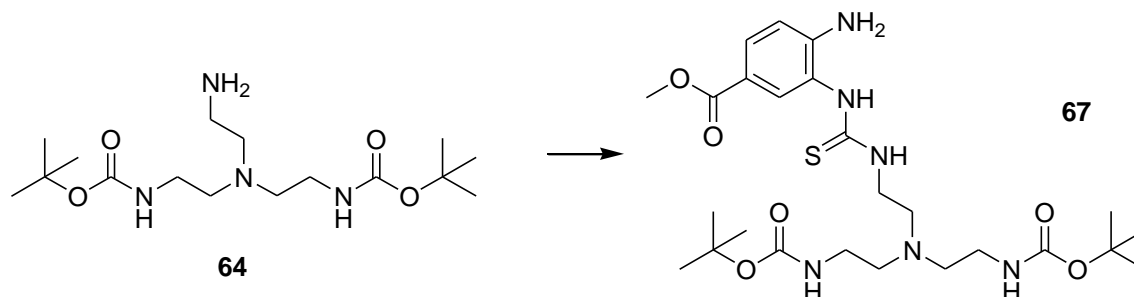
$^{13}C$ -NMR (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 155.6, 77.3, 56.5, 53.9, 38.3, 28.1.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3355 (m), 2977 (m), 2933 (m), 2819 (w), 1700 (s), 1522 (s), 1458 (m), 1391 (m), 1365 (s), 1275 (m), 1251 (s), 1174 (s), 1068 (w), 970 (w), 864 (w), 781 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 347.2 (100)  $[M+H]^+$ ,  $C_{16}H_{34}N_4O_4$  berechnet 346.26.

HRMS (MALDI)  $m/z = 347.26612 [M+H]^+$ ,  $C_{16}H_{34}N_4O_4+H^+$  berechnet 347.26528.

### 8.2.7 4-Amino(3-{2-[bis-(2-{*tert*-butoxycarbonylamino}ethyl)amino]ethyl}-thioureido)benzoesäuremethylester **67**<sup>[7]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.12 g (6.30 mmol) 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol und 94 mg (1.39 mmol) Imidazol in 25 mL MeCN (abs.) wurde die Lösung von 1.46 g (4.20 mmol) Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin **64** in 15 mL MeCN (abs.) unter Argon über einen Zeitraum von 20 min hinzuge tropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung von 1.05 g (6.30 mmol) 3,4-Diaminobenzoensäuremethylester **66** in 10 mL MeCN (abs.) über einen Zeitraum von 25 min hinzuge tropft. Die braune Reaktionslösung wurde für 4 h auf 50 °C erhitzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 1:1 → EtOAc). Es wurden 1.83 g eines gelbbraunen Schaums erhalten (79 %).

$R_f = 0.48$  (EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.85$  (br s, 1H, NH-Aryl), 7.60 - 7.55 (m, 2H, Aryl-H), 7.33 (br s, 1H, NHC=S), 6.75 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz, Aryl-H), 6.69 - 6.61 (m, 2H, NHC=O), 5.68 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.49 - 3.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NC}=\text{S}$ ), 2.97 - 2.90 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{NC}=\text{O}$ ), 2.60 - 2.54 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.48 - 2.44 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ , überlappt mit DMSO), 1.37 (s, 18 H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 181.2, 165.9, 155.6, 149.2, 130.3, 128.9, 122.0, 116.3, 114.4, 77.5, 53.5, 52.3, 51.3, 42.1, 38.2, 28.2$ .

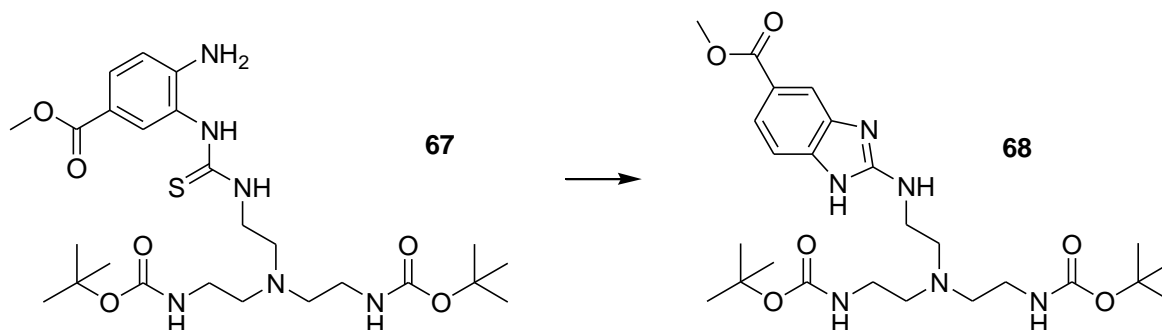
IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3336$  (m), 2946 (m), 2868 (m), 2149 (m), 1700 (s), 1628 (m), 1566 (s), 1516 (s), 1438 (m), 1366 (m), 1333 (m), 1290 (m), 1250 (s), 1165 (s), 1038 (m), 886 (w), 863 (w), 769 (m), 702 (w), 611 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 556.5 (100)  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{42}N_6O_6S$  berechnet 554.29.



HRMS (MALDI)  $m/z = 555.29558 [M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{42}N_6O_6+H^+$  berechnet 555.29593.

### 8.2.8 2-{2-[Bis-(2{*tert*-butoxycarbonylamino}ethyl)amino]ethylamino}-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester **68**



1.67 g (3.01 mmol) des Thioharnstoffs **67** und 0.93 mL (6.62 mmol)  $NEt_3$  wurden in 11 mL DMF (abs.) gelöst und portionsweise mit 922 mg (3.61 mmol) Mukaiyama-Reagenz versetzt. Die Reaktionslösung, in der sich ein gelber Niederschlag bildete, wurde für 20 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit DMF gewaschen und das Filtrat am Kugelrohr bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/MeOH 19:1). Es wurden 1.385 g eines gelbbraunen Schaums erhalten (88 %).

$R_f = 0.62$  (EtOAc/MeOH 5:1).

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 10.92$  (br s, 1H, Ring-NH), 7.72 (d, 1H,  $J = 1.3$  Hz, Aryl-H), 7.58 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Aryl-H), 7.17 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Aryl-H), 6.85 (br s, 1H, NH-Aryl), 6.77 - 6.73 (m, 2H, NHC=O), 3.80 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.37 - 3.30 (m, 2H,  $CH_2N$ -Aryl, überlappt mit  $H_2O$ ), 3.02 - 2.94 (m, 4H,  $CH_2NC=O$ ), 2.67 - 2.62 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.55 (m, 4H,  $CH_2$ , überlappt mit DMSO), 1.35 (s, 18H,  $CH_3$ ).

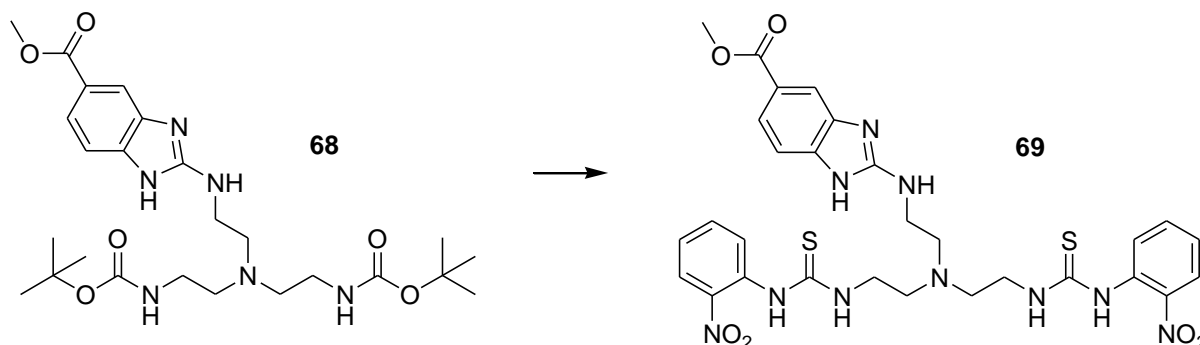
$^{13}C$ -NMR (62.9 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 167.0, 157.3, 155.5, 121.5, 77.4, 53.8, 53.6, 51.4, 38.3, 28.1$ .

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3365$  (m), 2976 (m), 2933 (m), 2867 (w), 1686 (s), 1636 (m), 1601 (m), 1578 (m), 1522 (m), 1511 (m), 1461 (m), 1438 (m), 1389 (w), 1366 (m), 1291 (s), 1250 (m), 1168 (m), 1089 (w), 776 (w).

MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 522.0 (100)  $[M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{40}N_6O_6$  berechnet 520.3.

HRMS (MALDI)  $m/z = 521.30784 [M+H]^+$ ,  $C_{25}H_{40}N_6O_6+H^+$  berechnet 521.30821.

### 8.2.9 2-[2-(Bis-{2-[3-(2-nitrophenyl)thioureido]ethyl}amino)ethylamino]-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 69<sup>[7]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 639 mg (0.99 mmol) **68** in 12 mL MeOH (abs.) wurden tropfenweise 0.71 mL (9.85 mmol) SOCl<sub>2</sub> hinzugegeben. Die gelbe Reaktionslösung, in der sich nach einiger Zeit ein Niederschlag bildete, wurde für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 8 mL EtOH (abs.) und 4 mL NEt<sub>3</sub> gelöst und zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 391 mg (2.17 mmol) 2-Nitrophenylisothiocyanat in 12 mL EtOH (abs.) und 4 mL NEt<sub>3</sub> hinzuge tropft. Die gelbbraune Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc → EtOAc/MeOH 5:1). Es wurden 608 mg eines gelben Schaums erhalten (90 %).

R<sub>f</sub> = 0.49 (DCM/MeOH 5:1 + 1% NEt<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.99 (br s, 1H, Ring-NH), 9.79 (s, 2H, C=S-NH-Ar), 8.44 - 8.40 (m, 2H, NHC=S), 7.97 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Aryl-H), 7.77 - 7.57 (m, 6H, Aryl-H), 7.36 (t, 2H, J = 7.5 Hz, Aryl-H), 7.18 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Aryl-H), 6.99 (br s, 1H, NH-Ar), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.66 - 3.57 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.50 - 3.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.85 - 2.77 (m, 6H, CH<sub>2</sub>).

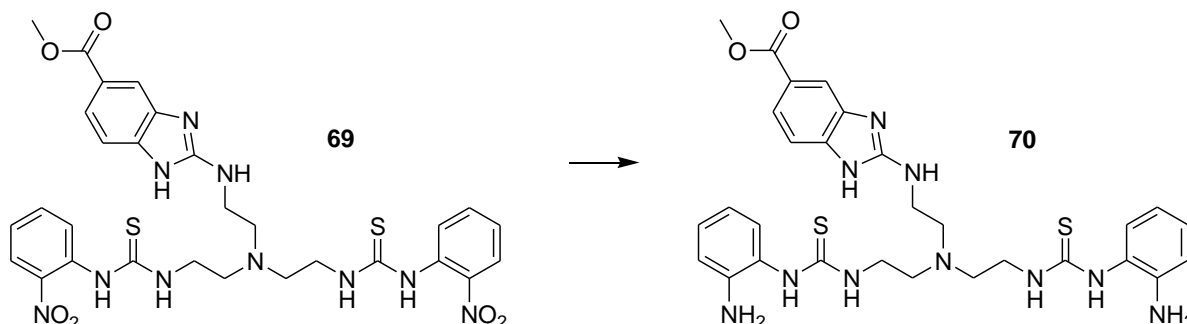
<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 181.3, 166.8, 156.7, 143.2, 133.5, 133.3, 128.8, 125.4, 124.5, 121.8, 79.0, 53.1, 52.0, 51.4, 42.0.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3295 (m), 3034 (w), 2945 (w), 2845 (w), 1702 (w), 1686 (w), 1636 (m), 1606 (m), 1578 (m), 1508 (s), 1506 (s), 1458 (m), 1436 (m), 1340 (m), 1285 (s), 1202 (m), 1158 (w), 1088 (w), 747 (w), 724 (w).

MS (ESI<sup>-</sup>): m/z (%) = 679.7 (91) [M-H]<sup>-</sup>, 715.9 (100) [M+Cl]<sup>-</sup>, 807.9 (77) [M+I]<sup>-</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> berechnet 680.19

HRMS (MALDI)  $m/z = 681.20134 [M+H]^+$ ,  $C_{29}H_{32}N_{10}O_6S_2+H^+$  berechnet 681.20205.

### 8.2.10 2-[2-(Bis-{2-[3-(2-aminophenyl)thioureido]ethyl}amino)ethylamino]-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester **70**<sup>[7]</sup>



Die Lösung von 735 mg (1.08 mmol) der Nitroverbindung **69** in 40 mL mit  $NH_3$  gesättigtem MeOH (abs.) wurde mit 160 mg 10 % Pd/C versetzt und im Autoklaven für 5 h bei 60 °C und 45 bar  $H_2$  und anschließend bei 40 bar  $H_2$  und RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Es wurden 250 mg eines beigen Schaums erhalten (37 %).

$R_f = 0.43$  (EtOAc/MeOH 9:1).

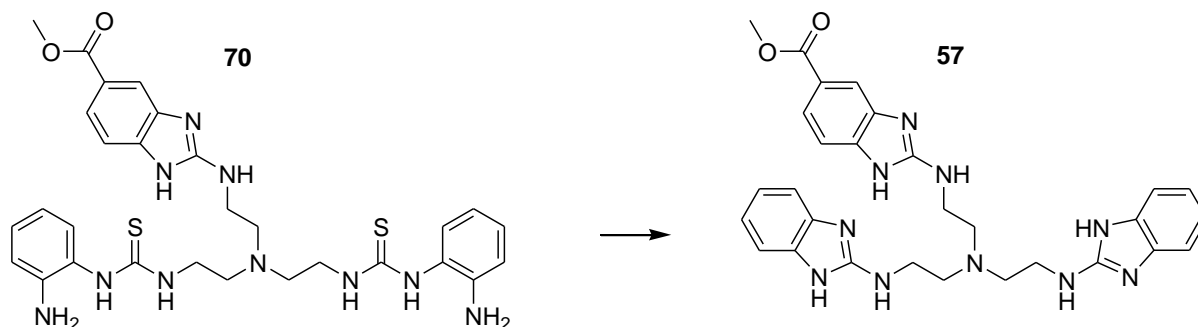
$^1H$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 10.94$  (br s, 1H, NH), 8.94 (s, 2H, NH), 7.72 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, Aryl-H), 7.58 (dd, 1H,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, Aryl-H), 7.26 - 7.13 (m, 3H, Aryl-H und NH), 7.00 - 6.91 (m, 4H, Aryl-H), 6.81 (br s, 1H, NH), 6.77 - 6.73 (m, 2H, Aryl-H), 6.55 (dt, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, Aryl-H), 4.84 (br s, 4H,  $NH_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.54 - 3.46 (m, 4H,  $CH_2$ ), 3.37 - 3.31 (m, 2H,  $CH_2$ , überlappt mit  $H_2O$ ), 2.73 - 2.64 (m, 6H,  $CH_2$ ).

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3210$  (m), 2927 (m), 1695 (m), 1599 (m), 1575 (m), 1532 (s), 1497 (s), 1456 (m), 1435 (m), 1285 (s), 1233 (m), 1156 (m), 1088 (m), 745 (m), 614 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 622.0 (100)  $[M+H]^+$ ,  $C_{29}H_{36}N_{10}O_2S_2$  berechnet 620.25.

HRMS (MALDI)  $m/z = 621.25279 [M+H]^+$ ,  $C_{29}H_{36}N_{10}O_2S_2+H^+$  berechnet 621.25369.

### 8.2.11 2-(2-{Bis-[2-(1H-benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester **57**



240 mg (0.39 mmol) der Verbindung **70** wurden unter Argon in 3.7 mL DMF (abs.) und 0.24 mL (1.70 mmol)  $\text{NEt}_3$  gelöst und portionsweise mit 237 mg (0.93 mmol) Mukaiyama-Reagenz versetzt. Die gelbe Reaktionslösung, in der sich ein Niederschlag bildete, wurde für 22 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit DMF gewaschen und das Filtrat am Kugelrohr bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 9:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$ ). Der so erhaltene hellgelbe Feststoff wurde mittels HPLC weiter aufgereinigt. Es wurden 251 mg eines hellbeigen Feststoffs erhalten (56 %).

$R_f = 0.35$  (DCM/MeOH 5:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ).

Smp: 179 – 181 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 9.22$  (br s, 1H, NH), 9.06 - 8.98 (m, 2H, NH), 7.84 - 7.82 (m, 2H, Aryl-H), 7.42 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Aryl-H), 7.36 - 7.32 (m, 4H, Aryl-H), 7.23 - 7.19 (m, 4H, Aryl-H), 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.65 - 3.52 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 3.09 - 2.97 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ).

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2971$  (m), 2904 (m), 2755 (m), 2656 (m), 1658 (s), 1619 (s), 1476 (m), 1436 (m), 1389 (m), 1289 (m), 1232 (m), 1205 (m), 1139 (m), 1087 (m), 1015 (w), 982 (w), 897 (w), 738 (m), 685 (m), 619 (m).

MS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  (%) = 553.4 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_2$  berechnet 552.3.

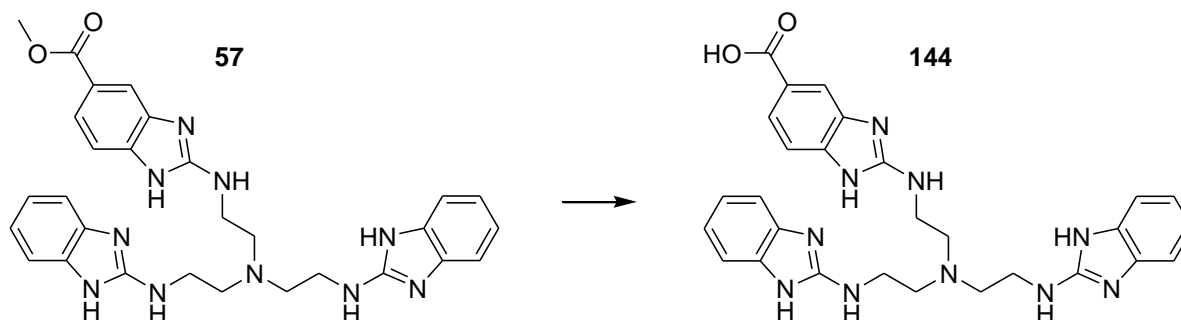
Elementaranalyse für  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_2 \cdot 6 \text{ TFA} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1254.79):

Berechnet: C, 39.24; H, 3.21; N, 11.16.

Gefunden: C, 39.18; H, 3.28; N, 11.34.

HPLC-Bedingungen: semi-präparativ: ReproSil-Pur C18-AQ, 250 x 20, 10  $\mu\text{m}$ , 0.1 % TFA/MeCN (72:28), 9.5 mL/min, 254 nm; analytisch: ReproSil-Pur C18-AQ, 125 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , 0.1 % TFA/MeCN (70:30), 0.8 mL/min, 254 nm,  $t_{\text{R}} = 3.99$  min.

### 8.2.12 2-(2-{Bis-[2-(1H-benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1H-benzimidazol-5-carbonsäure **144**<sup>[7]</sup>

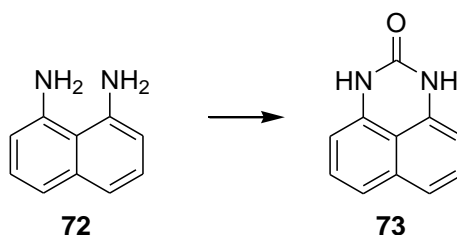


239 mg (0.21 mmol) des TFA-Salzes des Trisbenzimidazolmethylesters **57** wurden über einen DOWEX-Ionentauscher ( $\text{Cl}^-$ -Form) in das entsprechende Hydrochlorid umgewandelt. Dieses wurde in 7.5 mL dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, mit 7.5 mL konz. Salzsäure versetzt und für 2 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der so erhaltene farblose Feststoff wurde ohne weitere Aufreinigung in den Konjugationsexperimenten eingesetzt.

MS ( $\text{ESI}^-$ ):  $m/z$  (%) = 573.3 (100)  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ ,  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_2$  berechnet 538.3.

## 8.3 Synthese von 2-Aminoperimidinderivaten

### 8.3.1 1H-Perimidin-2(3H)-on **73**<sup>[90]</sup>



Zu der Lösung von 1.25 g (7.90 mmol) 1,8-Diaminonaphthalin **72** in 15 mL DCM (abs.) wurde über einen Zeitraum von 30 min die Lösung von 1.41 g (8.59 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 30 mL DCM (abs.) hinzuge tropft, wobei sich ein Niederschlag bildete. Die Suspension wurde für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, so lange mit DCM gewaschen, bis die Waschlösung farblos blieb, und im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.294 g eines hellbraunen Feststoffs erhalten (89 %).

$R_f = 0.59$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 300 – 302 °C; Lit: 302 – 303 °C.<sup>[150]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 10.06$  (s, 2H, NH), 7.21 (dd, 2H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, *H*-C5 und *H*-C8), 7.10 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, *H*-C6 und *H*-C7), 6.51 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, *H*-C4 und *H*-C9).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 150.0, 137.5, 134.0, 127.9, 117.5, 113.5, 103.9$ .

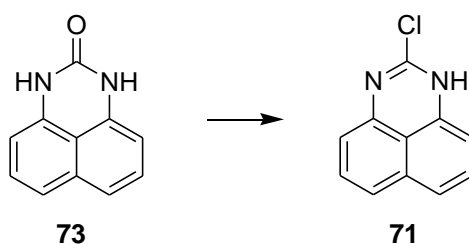
IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3228$  (m), 3095 (m), 2928 (m), 1922 (w), 1844 (w), 1734 (s), 1666 (s), 1647 (s), 1614 (s), 1536 (m), 1471 (m), 1425 (m), 1381 (s), 1325 (m), 1268 (s), 1167 (m), 1095 (m), 1028 (w), 989 (w), 957 (w), 815 (s), 772 (s), 754 (s), 618 (m).

Elementaranalyse für C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O (184.19):

Berechnet: C, 71.73; H, 4.38; N, 15.21.

Gefunden: C, 71.84; H, 4.27; N, 15.39.

### 8.3.2 2-Chlorperimidin **71**<sup>[91]</sup>



1.41 g (7.66 mmol) 2-Perimidinon **73** wurden unter Argon in 9 mL POCl<sub>3</sub> gelöst und für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Das überschüssige POCl<sub>3</sub> wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand vorsichtig mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt. Die Suspension wurde so lange mit 2 N NH<sub>3</sub>-Lösung versetzt, bis ihr pH-Wert bei 8 lag. Der Feststoff wurde abfiltriert, mehrfach mit Wasser gewaschen und aus Aceton umkristallisiert. Es wurden 1.477 g eines hellbraunen Feststoffs erhalten (95 %).

$R_f = 0.56$  (Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 204 – 206 °C; Lit: 202 – 203.5 °C.<sup>[91]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 11.37$  (s, 1H, NH), 7.22 - 7.07 (m, 4H, Aryl-*H*), 6.59 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz, Aryl-*H*), 6.38 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz, Aryl-*H*).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 144.4, 138.3, 134.9, 128.8, 127.9, 120.8, 120.4, 118.8, 113.9, 103.3$ .

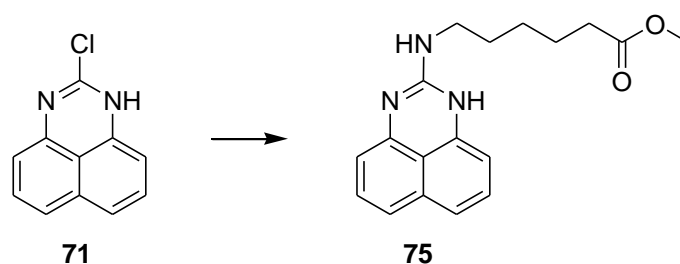
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3095 (w), 3040 (w), 2908 (m), 2800 (m), 1638 (s), 1594 (s), 1480 (m), 1449 (m), 1424 (w), 1407 (s), 1374 (s), 1340 (m), 1286 (m), 1243 (w), 1216 (m), 1208 (m), 1174 (m), 1121 (w), 1078 (w), 1041 (w), 1025 (w), 924 (m), 820 (m), 762 (m), 662 (m).

Elementaranalyse für C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub> (202.64):

Berechnet: C, 65.20; H, 3.48; N, 13.82.

Gefunden: C, 65.05; H, 3.46; N, 13.90.

### 8.3.3 6-(2-Aminoperimidin)hexansäuremethylester **75**



500 mg (2.47 mmol) 2-Chlorperimidin **71** wurden unter Argon mit 5.70 g (60.6 mmol) Phenol versetzt und das Gemisch für 20 min auf 110 °C erhitzt. Nach Zugabe von 457 mg (2.52 mmol) 6-Aminohexansäuremethylester-Hydrochlorid **61** und 0.41 mL (2.50 mmol) DIPEA wurde die Reaktionslösung für weitere 4 h auf 110 °C erhitzt. Das auf RT abgekühlte Gemisch wurde in 20 mL DCM gelöst und so lange mit 2 N NaOH-Lösung versetzt, bis der pH-Wert der Lösung im leicht basischen Bereich lag. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt, ein grüneschwarzes Öl, wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 1:1 → EtOAc). Es wurden 375 mg eines grünen Feststoffs isoliert (48 %).

R<sub>f</sub> = 0.23 (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 154 – 155 °C.

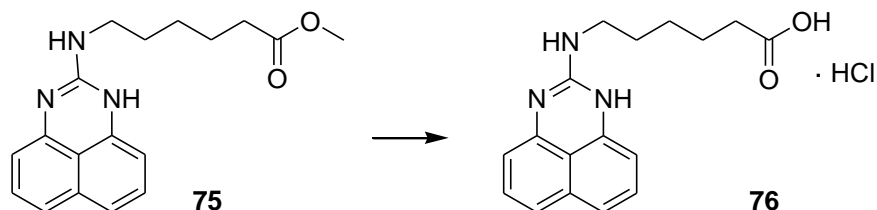
<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 9.39 (br s, 1H, *H*-N1), 7.05 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, Aryl-*H*), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, Aryl-*H*), 6.32 (br s, 2H, Aryl-*H*), 5.85 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, *H*-N2), 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.23 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz, *H*-C6), 2.32 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, *H*-C2), 1.63 - 1.45 (m, 4H, *H*-C3 und *H*-C5), 1.38 - 1.29 (m, 2H, *H*-C4).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 173.2, 150.2, 134.8, 128.0, 118.3, 115.9, 51.0, 39.6, 33.1, 28.7, 25.7, 24.1.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3387 (s), 3324 (m), 3039 (w), 2935 (m), 2865 (m), 1710 (s), 1635 (s), 1608 (s), 1560 (s), 1519 (m), 1478 (m), 1462 (m), 1424 (m), 1405 (m), 1371 (s), 1330 (m), 1262 (s), 1204 (m), 1188 (m), 1178 (m), 1104 (w), 1045 (w), 834 (w), 817 (m), 764 (s), 721 (m), 599 (m).

MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 312.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> berechnet 311.16.

### 8.3.4 6-(2-Aminoperimidin)hexansäure-Hydrochlorid 76



257 mg (0.83 mmol) **75** wurden mit 20 mL 6 N HCl versetzt und das Reaktionsgemisch für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Der graue Niederschlag wurde abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 250 mg eines hellgrauen Feststoffs erhalten (91 %).

R<sub>f</sub> = 0.61 (DCM/MeOH 2:1).

Smp: 228 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 12.02 (br s, 1H, COOH), 11.19 (br s, 2H, NH), 8.36 - 8.32 (m, 1H, NH), 7.37 - 7.33 (m, 4H, Aryl-H), 6.90 (br s, 2H, Aryl-H), 3.43 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz, H-C6), 2.24 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H-C2), 1.65 - 1.52 (m, 4H, H-C3 und H-C5), 1.42 - 1.35 (m, 2H, H-C4).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 174.2, 148.9, 133.6, 132.7, 128.0, 120.2, 114.9, 106.6, 41.0, 33.4, 28.0, 25.4, 23.9.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3268 (m), 3197 (m), 3038 (s), 2940 (s), 1703 (s), 1667 (s), 1594 (m), 1534 (w), 1479 (m), 1466 (m), 1422 (m), 1383 (m), 1337 (m), 1271 (m), 1229 (m), 1175 (m), 1120 (w), 1095 (w), 860 (w), 812 (s), 758 (s), 700 (m), 620 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 298.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> berechnet 297.15.

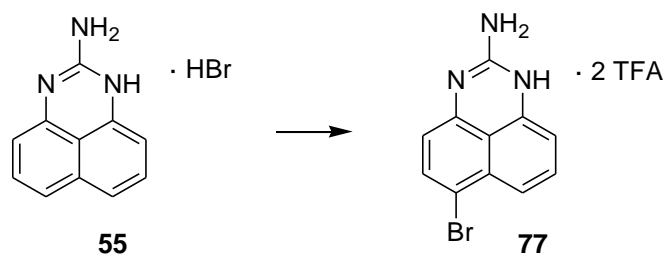
Elementaranalyse für C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HCl (333.81):

Berechnet: C, 61.17; H, 6.04; N, 12.59.

Gefunden: C, 60.97; H, 6.09; N, 12.37.



### 8.3.5 2-Amino-6-bromperimidin **77**<sup>[92]</sup>



Die Lösung von 0.2 mL (2.0 mmol) 30%-iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in 10 mL TFA wurde für 10 min bei RT gerührt und dann mit 437 mg (1.50 mmol) 2-Aminoperimidin-Hydrobromid · 1.5  $\text{H}_2\text{O}$  **55** versetzt. Die gelbe Lösung, in der sich ein farbloser Niederschlag bildete, wurde für 50 min bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 4.5 mL eines 1:1-Gemischs aus TFA und Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 493 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (67 %).

$R_f = 0.22$  (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 213 – 215 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 12.13$  (br s, 2H, NH), 8.44 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.70 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, Aryl-H), 7.57 - 7.43 (m, 2H, Aryl-H), 6.90 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz, Aryl-H), 6.72 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, Aryl-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 159.5, 158.9, 149.9, 133.5, 133.2, 131.7, 129.9, 118.8, 118.1, 118.0, 116.0, 113.4, 112.1, 107.6, 107.2$ .

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3382$  (w), 3258 (m), 3147 (m), 1681 (s), 1604 (m), 1584 (m), 1410 (m), 1367 (m), 1196 (s), 1184 (s), 1145 (m), 1052 (w), 1022 (w), 854 (w), 828 (w), 816 (w), 794 (w), 763 (w), 731 (w), 710 (w), 642 (w).

MS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  (%) = 262.0 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrN}_3$  berechnet 260.99.

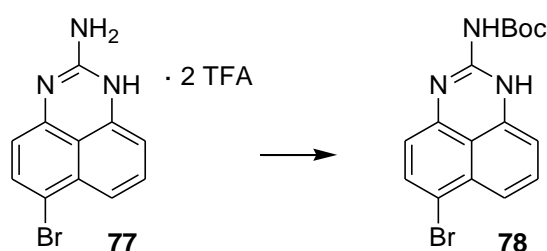
MS ( $\text{ESI}^-$ ):  $m/z$  (%) = 374.0 (100)  $[\text{M}-\text{H}+\text{TFA}]^-$ , 490.0 (2)  $[\text{M}-\text{H}+2\text{TFA}]^-$ ,  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrN}_3$  berechnet 260.99.

Elementaranalyse für  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrN}_3 \cdot 2 \text{TFA}$  (490.15):

Berechnet: C, 36.76; H, 2.06; N, 8.57.

Gefunden: C, 36.60; H, 1.92; N, 8.53.

### 8.3.6 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-6-bromperimidin **78**



466 mg (0.95 mmol) **77** wurden mittels DOWEX-Ionenaustauscher (Cl<sup>-</sup>-Form) vom TFA-Salz in das entsprechende Hydrochlorid umgewandelt. Dieses wurde in 5.5 mL Aceton und 0.4 mL (2.9 mmol) NEt<sub>3</sub> gelöst und mit einer Lösung von 312 mg (1.43 mmol) Boc<sub>2</sub>O in 2 mL Aceton versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 66 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zweimal mit Wasser gewaschen. Es wurden 260 mg eines grünbraunen Feststoffs erhalten (76 %).

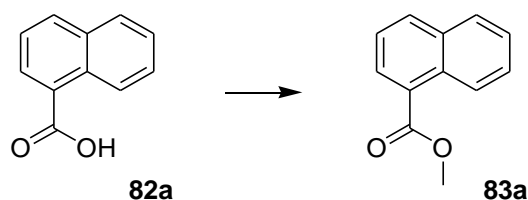
R<sub>f</sub> = 0.81 (DCM/MeOH 95:5).

Smp: > 300 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.70 (br s, 2H, NH), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Aryl-*H*), 7.36 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, Aryl-*H*), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, Aryl-*H*), 6.79 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, Aryl-*H*), 6.60 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, Aryl-*H*), 1.47 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3448 (w), 3278 (w), 2931 (w), 2867 (w), 1718 (m), 1639 (s), 1628 (s), 1594 (m), 1542 (m), 1466 (m), 1357 (m), 1272 (s), 1253 (s), 1153 (s), 1093 (m), 1037 (m), 865 (w), 812 (w), 756 (w), 696 (w), 639 (w).

### 8.3.7 1-Napththoesäuremethylester **83a**<sup>[98,99]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension von 5.0 g (29 mmol) 1-Napththoesäure **82a** in 40 mL DCM (abs.), versetzt mit drei Tropfen DMF, wurden unter Argon 2.7 mL (32 mmol) Oxalylchlorid hinzuge tropft. Die Suspension wurde zunächst für 10 min bei 0 °C, dann für 14 h bei RT gerührt, wobei sich eine klare Lösung bildete. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand unter Eiskühlung zu 20 mL MeOH (abs.)

hinzugetropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 10 min bei 0 °C und für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 20 mL Diethylether aufgenommen, zweimal mit je 10 mL Wasser gewaschen, über MgSO<sub>2</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Es wurden 5.2 g eines gelben Öls erhalten (96 %).

R<sub>f</sub> = 0.54 (*n*-Hexan/EtOAc 9:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.92 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, *H*-C8), 8.19 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.3 Hz, *H*-C2), 8.03 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*-C4), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*-C5), 7.66 - 7.47 (m, 3H, *H*-C3, *H*-C6 und *H*-C7), 4.01 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 168.0, 133.8, 133.3, 131.3, 130.2, 128.5, 127.7, 127.1, 126.2, 125.8, 124.5, 52.1.

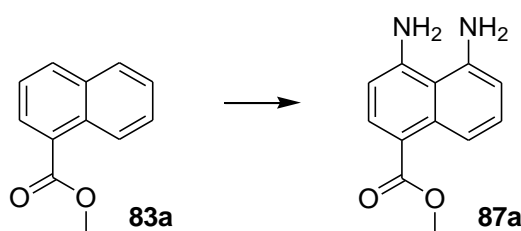
IR (NaCl):  $\tilde{\nu}$  = 3414 (w), 3053 (m), 3003 (m), 2951 (m), 2843 (w), 1959 (w), 1715 (s), 1589 (m), 1510 (m), 1439 (s), 1347 (w), 1280 (s), 1247 (s), 1202 (s), 1137 (s), 1076 (m), 1033 (m), 1019 (m), 951 (w), 849 (w), 813 (m), 783 (s), 655 (m).

Elementaranalyse für C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> (186.21):

Berechnet: C, 77.40; H, 5.41.

Gefunden: C, 77.31; H, 5.43.

### 8.3.8 4,5-Diamino-1-naphthoesäuremethylester **87a**<sup>[102]</sup>



3.70 g (19.9 mmol) 1-Naphthoesäuremethylester **83a** wurden in 8.8 mL auf 0 °C gekühlter konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst und langsam mit dem Gemisch von 2.9 mL konz. HNO<sub>3</sub> und 2.7 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, wobei die Temperatur der Reaktionslösung zwischen -5 und 5 °C gehalten wurde. Die braune Reaktionslösung wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und dann auf Eis gegossen; dabei bildete sich ein beiger Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, fünfmal mit je 10 mL 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und viermal mit je 10 mL eines 1:1-Gemisches aus *n*-Hexan und Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wurde zunächst aus Toluol, dann aus Eisessig umkristallisiert. Es wurden 1.631 g eines beigen Feststoffs erhalten.

Dieser wurde mit 163 mg Pd/C (10 %) versetzt und in 15 mL MeOH (abs.) suspendiert. Bei RT wurden unter Argon 9.5 mL (59 mmol) Et<sub>3</sub>SiH langsam hinzuge tropft, wobei sich das Reaktionsgemisch stark erwärmte. Die Reaktionslösung wurde für 18 min bei RT gerührt und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1). Es wurden 672 mg eines gelben Feststoffs erhalten (16 % über beide Reaktionsschritte).

R<sub>f</sub> = 0.45 (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 79 – 81 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.60 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 0.9 Hz, *H*-C8), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*-C2), 7.32 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 7.4 Hz, *H*-C7), 6.70 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 0.8 Hz, *H*-C6); 6.50 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*-C3), 5.42 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.21 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 168.1, 150.4, 143.9, 135.7, 132.8, 128.0, 118.6, 116.3, 115.8, 113.6, 108.5, 51.5.

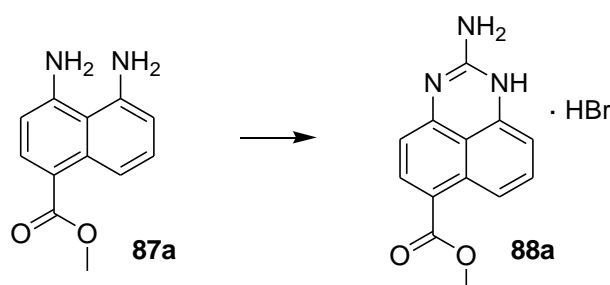
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3407 (m), 3331 (m), 2928 (w), 1679 (m), 1628 (m), 1578 (s), 1522 (m), 1461 (w), 1430 (w), 1344 (w), 1258 (s), 1211 (m), 1183 (m), 1156 (m), 1111 (m), 962 (w), 867 (w), 812 (m), 756 (m), 660 (m), 623 (m), 568 (m).

Elementaranalyse für C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (216.24):

Berechnet: C, 66.65; H, 5.59; N, 12.96.

Gefunden: C, 66.72; H, 5.70; N, 12.78.

### 8.3.9 2-Amino-6-carbonsäuremethylesterperimidin-Hydrobromid **88a**



720 mg (3.33 mmol) des Diamins **87a** wurden in 15 mL DCM (abs.) gelöst und unter Argon mit 1.3 mL (4.0 mmol) einer 3 M Lösung von BrCN in DCM versetzt. Die gelbe Lösung, in der sich ein beiger Niederschlag bildete, wurde für 20 h zum Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag

wurde abfiltriert, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 799 mg eines grauen Feststoffs erhalten (74 %).

$R_f = 0.24$  (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 247 – 249 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.76$  (br s, 2H, NH), 8.41 (dd, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, H-C7), 8.13 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-C5), 8.07 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.56 (dd, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 7.6$  Hz, H-C8), 6.97 (dd, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, H-C9), 6.89 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-C4), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 166.0, 149.4, 137.8, 133.8, 133.1, 132.0, 130.1, 118.6, 117.9, 115.3, 107.5, 105.8, 51.7$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3114$  (m), 1683 (s), 1641 (m), 1616 (m), 1579 (m), 1503 (m), 1463 (m), 1432 (m), 1367 (m), 1311 (w), 1245 (s), 1208 (m), 1187 (m), 1117 (m), 1065 (m), 1024 (m), 892 (w), 813 (m), 758 (s), 703 (m), 631 (w), 522 (w).

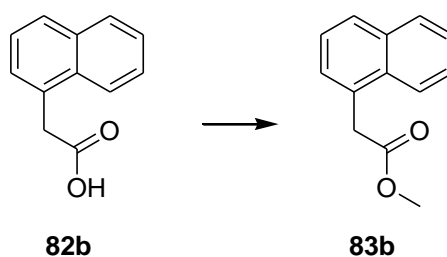
MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 242.6 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> berechnet 241.09.

Elementaranalyse für C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HBr (322.16):

Berechnet: C, 48.47; H, 3.75; N, 13.04.

Gefunden: C, 48.58; H, 3.83; N, 13.05.

### 8.3.10 1-Naphthylessigsäuremethylester **83b**<sup>[100]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 5.00 g (26.9 mmol) 1-Naphthylessigsäure **82b** in 25 mL MeOH (abs.) wurden unter Argon 2.5 mL (35 mmol) SOCl<sub>2</sub> zugetropft. Die hellgelbe Lösung wurde für 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 50 mL EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde je dreimal mit je 50 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Es wurden 5.301 g eines farblosen Öls erhalten (98 %).

$R_f = 0.40$  (*n*-Hexan/EtOAc 9:1).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.02 - 7.98$  (m, 1H, *H*-C8), 7.89 - 7.85 (m, 1H, *H*-C5), 7.81 (dd, 1H,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, *H*-C4), 7.58 - 7.40 (m, 4H, *H*-C2, *H*-C3, *H*-C6, *H*-C7), 4.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 172.0, 133.9, 132.1, 130.5, 128.7, 128.1, 128.0, 126.4, 125.8, 125.5, 123.8, 52.1, 39.0$ .

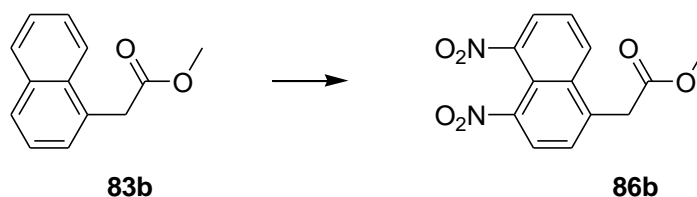
IR (NaCl):  $\tilde{\nu} = 3457$  (w), 3048 (s), 2951 (s), 2843 (w), 1938 (w), 1737 (s), 1597 (m), 1512 (m), 1435 (m), 1397 (m), 1333 (m), 1266 (m), 1195 (m), 1167 (m), 1043 (w), 1011 (m), 785 (m), 478 (s), 447 (s), 433 (s), 417 (s).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2$  (200.23):

Berechnet: C, 77.98; H, 6.04.

Gefunden: C, 77.70; H, 6.07.

### 8.3.11 2-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)essigsäuremethylester **86b**



3.0 g (15 mmol) 1-Naphthylessigsäuremethylester **83b** wurden in 6.6 mL auf 0 °C gekühlter konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und tropfenweise mit dem Gemisch aus 2.2 mL konz.  $\text{HNO}_3$  und 2 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt, wobei die Temperatur der Reaktionslösung unter 0 °C gehalten wurde. Die dunkle, zähflüssige Lösung wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und dann auf Eis gegossen, wobei sich ein beiger Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, viermal mit je 10 mL 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung sowie mit insgesamt 15 mL eines 1:1-Gemisches aus *n*-Hexan und Diethylether gewaschen und in DCM und Wasser gelöst. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Toluol umkristallisiert und dann säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1  $\rightarrow$  *n*-Hexan/EtOAc 1:1). Es wurden 1.824 g eines farblosen Feststoffs erhalten (42 %).

$R_f = 0.33$  (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 141 – 142 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8.55$  (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.0$  Hz,  $H\text{-C6}$ ), 8.51 - 8.44 (m, 2H,  $H\text{-C8}$ ,  $H\text{-C3}$ ), 7.95 (dd, 1H,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 7.7$  Hz,  $H\text{-C7}$ ), 7.88 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $H\text{-C2}$ ), 4.47 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 170.4$ , 145.1, 144.0, 139.0, 133.4, 131.2, 129.1, 127.1, 127.0, 126.8, 115.5, 52.1, 38.0.

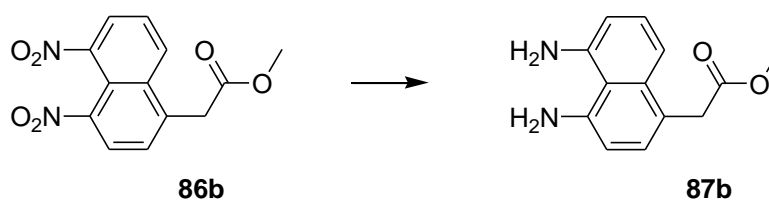
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3113$  (w), 3080 (w), 2957 (w), 1734 (s), 1631 (w), 1603 (w), 1576 (w), 1520 (s), 1431 (m), 1348 (s), 1325 (s), 1239 (m), 1192 (s), 1171 (s), 999 (w), 984 (m), 940 (w), 902 (w), 889 (w), 853 (w), 829 (m), 819 (m), 788 (w), 763 (m), 738 (m), 718 (m), 674 (w), 625 (w), 588 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$  (290.23):

Berechnet: C, 53.80; H, 3.47; N, 9.65.

Gefunden: C, 53.80; H, 3.44; N, 9.59.

### 8.3.12 2-(4,5-Diaminonaphth-1-yl)essigsäuremethylester **87b**



352 mg (1.21 mmol) der Nitroverbindung **86b** wurden mit 40 mg Pd/C (10 %) versetzt und in 5 mL MeOH (abs.) suspendiert. Bei RT wurden unter Argon 2.0 mL (12 mmol)  $\text{Et}_3\text{SiH}$  langsam hinzugegeben, wobei sich das Reaktionsgemisch stark erwärmte. Die Reaktionslösung wurde für 15 min bei RT gerührt und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt ( $n$ -Hexan/EtOAc 3:1). Es wurden 255 mg eines pinken Feststoffs erhalten (91 %).

$R_f = 0.33$  ( $n$ -Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 107 – 109 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7.11$  (dd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $H\text{-C7}$ ), 7.00 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz,  $H\text{-C2}$ ), 6.94 (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz,  $H\text{-C8}$ ), 6.61 (dd, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz,  $H\text{-C6}$ ), 6.53 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $H\text{-C3}$ ), 5.56 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.43 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.80 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.56 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 172.2, 146.8, 145.7, 134.9, 128.4, 126.4, 119.0, 115.8, 112.6, 109.9, 109.4, 51.3, 38.4$ .

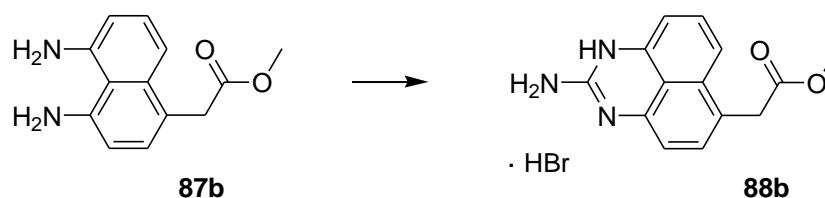
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3423$  (w), 3389 (w), 3338 (w), 1726 (s), 1586 (s), 1434 (m), 1412 (m), 1355 (m), 1332 (m), 1240 (w), 1203 (m), 1161 (m), 996 (m), 889 (w), 867 (w), 826 (m), 810 (m), 747(s), 721 (m), 645 (m), 592 (m), 494 (w), 473 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  (230.26):

Berechnet: C, 67.81; H, 6.13; N, 12.17.

Gefunden: C, 67.64; H, 5.98; N, 12.05.

### 8.3.13 2-Amino-6-(essigsäuremethylester)perimidin-Hydrobromid **88b**



240 mg (1.04 mmol) des Diamins **87b** wurden in 7 mL DCM (abs.) gelöst und unter Argon mit 0.42 mL (1.25 mmol) einer 3 M Lösung von BrCN in DCM versetzt. Die Reaktionslösung, in der sich ein grauer Niederschlag bildete, wurde für 6.5 h zum Sieden erhitzt und dann weitere 16 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 265 mg eines grauen Feststoffs erhalten (76%).

$R_f = 0.26$  (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 215 – 217 °C.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.36$  (br s, 2H, NH), 7.86 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.40 (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, H-C8), 7.32 - 7.28 (m, 2H, H-C5, H-C7), 6.86 (dd, 1H,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, H-C9), 6.79 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, H-C4), 3.93 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 171.3, 149.6, 133.1, 132.4, 132.0, 129.8, 128.4, 123.8, 117.1, 115.2, 106.8, 106.2, 51.6, 37.2$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3280$  (w), 3169 (w), 2905 (m), 2842 (m), 1733 (m), 1675 (s), 1645 (s), 1575 (m), 1507 (w), 1486 (w), 1451 (m), 1434 (m), 1377 (m), 1320 (m), 1266 (m), 1237 (m), 1206 (m), 1162 (s), 1142 (m), 1065 (w), 1002 (m), 837 (w), 816 (m), 763 (s), 702 (m).

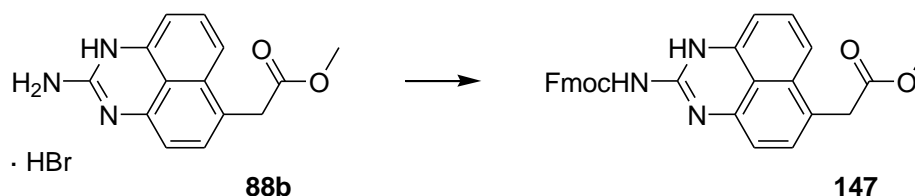


Elementaranalyse für  $C_{14}H_{13}N_3O_2 \cdot HBr$  (336.18):

Berechnet: C, 50.02; H, 4.20; N, 12.50.

Gefunden: C, 49.96; H, 4.12; N, 12.37.

### 8.3.14 2-[[*(9H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-6-(essigsäuremethylester)-perimidin **147**



100 mg (0.30 mmol) 2-Amino-6-(essigsäuremethylester)perimidin-Hydrobromid **88b** wurden in 5 mL DCM (abs.) und 0.05 mL (0.30 mmol) DIPEA gelöst und unter Argon mit 77 mg (0.30 mmol) Fmoc-Chlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 21 h bei RT gerührt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 65 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (45 %).

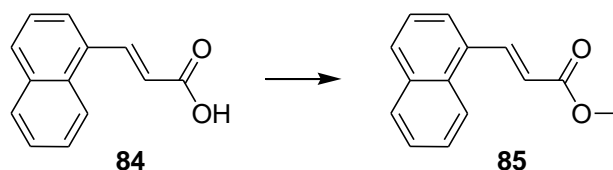
Smp: 193 – 194 °C.

$^1H$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.06 (br s, 2H, NH), 7.91 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz, Aryl-H), 7.71 (d, 2H,  $J$  = 7.0 Hz, Aryl-H), 7.46 - 7.27 (m, 5H, Aryl-H), 7.21 - 7.12 (m, 2H, Aryl-H), 6.77 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, Aryl-H), 6.70 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, Aryl-H), 7.40 (d, 2H,  $J$  = 6.3 Hz,  $CH_2$ (Fmoc)), 4.30 (t, 1H,  $J$  = 6.5 Hz, CH(Fmoc)), 3.85 (s, 2H,  $CH_2$ (Acetyl)), 3.58 (s, 3H,  $OCH_3$ ).

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3165 (w), 3056 (w), 2954 (w), 1737 (m), 1652 (m), 1622 (s), 1585 (m), 1435 (m), 1379 (m), 1348 (m), 1318 (w), 1262 (s), 1234 (m), 1200 (m), 1167(m), 1097 (m), 1073 (s), 1038 (m), 1012 (w), 798 (m), 753 (m), 741 (m), 727 (m).

MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 478.3 (100)  $[M+H]^+$ ,  $C_{29}H_{23}N_3O_4$  berechnet 477.2.

### 8.3.15 3-(1-Naphthyl)acrylsäuremethylester **85**



Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension von 1.00 g (5.04 mmol) 3-(1-Naphthyl)acrylsäure **84** in 10 mL MeOH (abs.) wurden unter Argon 0.48 mL (6.55 mmol)  $SOCl_2$  langsam hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum

entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL EtOAc aufgenommen und je dreimal mit je 10 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.043 g eines orangefarbenen Öls erhalten (97 %).

R<sub>f</sub> = 0.23 (*n*-Hexan/EtOAc 19:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.46 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, =CH-Aryl), 8.22 (m, 1H, Aryl-H), 8.05 - 7.97 (m, 3H, Aryl-H), 7.68 - 7.54 (m, 3H, Aryl-H), 6.71 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, =CH-COOMe), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 166.3, 140.6, 133.2, 130.6, 130.5, 128.6, 127.1, 126.2, 125.5, 125.3, 122.8, 120.3, 51.4.

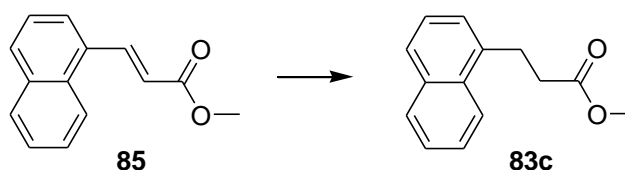
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 2949 (w), 1710 (s), 1630 (m), 1511 (w), 1433 (m), 1347 (m), 1306 (m), 1266 (m), 1252 (m), 1239 (m), 1210 (w), 1191 (m), 1164 (s), 1087 (w), 1038 (w), 975 (m), 855 (w), 799 (m), 774 (s), 721 (m), 697 (w), 598 (m).

Elementaranalyse für C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> · 0.1 H<sub>2</sub>O (214.05):

Berechnet: C, 78.56; H, 5.74.

Gefunden: C, 78.62; H, 5.70.

### 8.3.16 3-(1-Naphthyl)propionsäuremethylester 83c



Die Lösung von 1.02 g (4.82 mmol) **85** in 10 mL EtOAc (abs.) wurde mit 112 mg Pd/C (10 %) versetzt und im Autoklaven für 4 h bei RT und 5 bar H<sub>2</sub>-Druck gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.002 g eines farblosen Öls erhalten (97 %).

R<sub>f</sub> = 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc 19:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.08 - 8.04 (m, 1H, *H*-C8), 7.95 - 7.91 (m, 1H, *H*-C5), 7.80 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, *H*-C4), 7.60 - 7.49 (m, 2H, *H*-C6, *H*-C7), 7.46 - 7.36 (m, 2H, *H*-C2, *H*-C3), 3.60

(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.33 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>-Aryl, überlappt mit H<sub>2</sub>O-Restsignal), 2.73 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>-COOMe).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 172.5, 136.3, 133.3, 131.0, 128.5, 126.7, 126.0, 125.6, 125.5, 125.4, 123.2, 51.2, 34.2, 27.2.

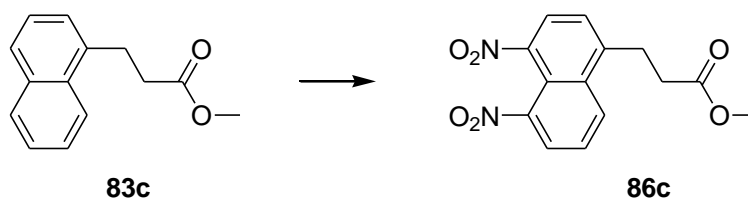
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 2950 (w), 1733 (s), 1598 (w), 1511 (w), 1435 (m), 1397 (w), 1366 (w), 1350 (w), 1296 (m), 1254 (m), 1195 (m), 1165 (m), 1056 (w), 1020 (w), 982 (w), 862 (w), 798 (m), 775 (s), 733 (w), 581 (w).

Elementaranalyse für C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> (214.26):

Berechnet: C, 78.48; H, 6.59.

Gefunden: C, 78.44; H, 6.51.

### 8.3.17 3-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)propionsäuremethylester 86c



2.70 g (12.6 mmol) **83c** wurden in 5.3 mL auf -5 °C gekühlter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.) gelöst. Zu der gelben Lösung wurde das Gemisch aus 1.9 mL (27 mmol) HNO<sub>3</sub> (konz.) und 1.6 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.) langsam hinzuge tropft, sodass die Temperatur der Reaktionslösung unter 0 °C blieb. Die schwarze, zähflüssige Reaktionslösung wurde für 5 min bei -5 °C gerührt und dann auf Eis gegossen, wobei sich ein hellbrauner Niederschlag bildete. Die Suspension wurde mit 60 mL 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt, sodass der pH-Wert im leicht basischen Bereich lag. Nach Zugabe von 100 mL EtOAc wurde der unlösliche Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit dem abfiltrierten Feststoff vereint, aus Eisessig umkristallisiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1 → *n*-Hexan/EtOAc 1:1). Es wurden 1.385 g eines hellgelben Feststoffs erhalten (36 %).

R<sub>f</sub> = 0.34 (*n*-Hexan/EtOAc 1:1).

Smp: 187 – 189 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8.71$  (dd, 1H,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 1.1$  Hz,  $H\text{-C6}$ ), 8.49 (dd, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.1$  Hz,  $H\text{-C8}$ ), 8.42 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz,  $H\text{-C3}$ ), 7.95 (dd, 1H,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 7.6$  Hz,  $H\text{-C7}$ ), 7.79 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz,  $H\text{-C2}$ ), 3.60 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.51 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Aryl}$ ), 2.82 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-COOMe}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 172.0$ , 145.3, 144.9, 143.4, 132.7, 130.6, 127.1, 126.9, 126.8, 126.8, 115.6, 51.3, 33.7, 27.7.

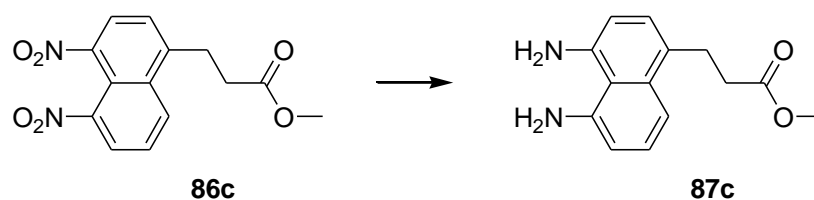
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2923$  (m), 2852 (w), 1736 (s), 1531 (s), 1435 (m), 1420 (w), 1346 (s), 1290 (m), 1189 (s), 1168 (s), 1086 (m), 975 (m), 905 (m), 881 (m), 850 (m), 822 (m), 789 (m), 780 (m), 770 (m), 757 (m), 734 (s), 714 (m), 654 (w), 630 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$  (304.25):

Berechnet: C, 55.27; H, 3.98; N, 9.21.

Gefunden: C, 55.27; H, 4.04; N, 9.27.

### 8.3.18 3-(4,5-Diaminonaphth-1-yl)propionsäuremethylester **87c**



100 mg (0.33 mmol) **86c** 3-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)propionsäuremethylester sowie 23 mg Pd/C (10 %) wurden in 15 mL EtOAc (abs.) suspendiert und im Autoklaven für 23 h bei 4 bar  $\text{H}_2$ -Druck und RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1). Es wurden 68 mg eines rotbraunen, zähflüssigen Öls erhalten (84 %).

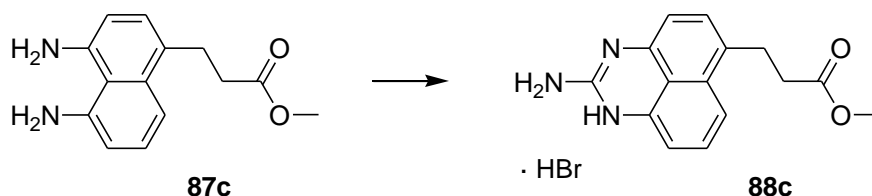
$R_f = 0.10$  (*n*-Hexan/EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7.16 - 7.04$  (m, 2H,  $H\text{-C7}$ ,  $H\text{-C8}$ ), 6.93 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $H\text{-C2}$ ), 6.59 (dd, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 1.6$  Hz,  $H\text{-C6}$ ), 6.51 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $H\text{-C3}$ ), 5.58 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.30 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.58 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.04 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Aryl}$ ), 2.62 - 2.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOMe}$ , überlappt mit DMSO).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 172.9$ , 147.0, 144.9, 134.2, 126.3, 126.2, 124.6, 116.0, 112.1, 109.8, 109.7, 51.2, 34.3, 27.9.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3423 (w), 3337 (m), 2950 (m), 2871 (w), 1720 (s), 1588 (s), 1436 (m), 1418 (m), 1356 (m), 1301 (m), 1286 (m), 1265 (m), 1198 (m), 1163 (s), 1023 (w), 992 (w), 816 (m), 745 (s), 623 (m), 500 (w).

### 8.3.19 2-Amino-6-(propionsäuremethylester)perimidin-Hydrobromid **88c**



Die Lösung von 50 mg (0.2 mmol) des Diamins **87c** in 3 mL DCM (abs.) wurde mit 0.08 mL (0.25 mmol) 3.0 M BrCN-Lösung in DCM versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 4.5 h zum Sieden erhitzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von 3 mL DCM (abs.) bildete sich ein farbloser Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 28 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (40 %).

$R_f$  = 0.30 (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 195 – 197 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.33 (br s, 2H, NH), 7.83 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.43 - 7.41 (m, 2H, H-C7, H-C8), 7.22 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-C5), 6.85 (dd, 1H,  $J$  = 5.3 Hz,  $J$  = 3.0 Hz, H-C9), 6.76 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, H-C4), 3.58 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.09 (t, 2 H,  $J$  = 7.3 Hz,  $\text{CH}_2$ -Aryl), 2.63 (t, 2 H,  $J$  = 7.3 Hz,  $\text{CH}_2$ -COOMe).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.5, 149.5, 133.2, 131.8, 131.3, 129.3, 128.3, 127.5, 116.7, 115.3, 106.7, 106.3, 51.2, 33.4, 26.7.

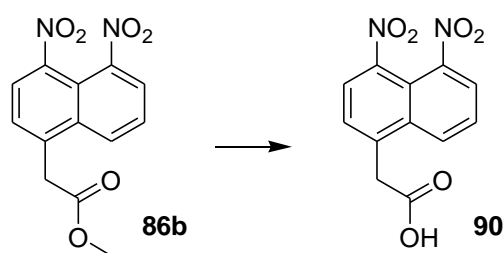
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3190 (m), 3050 (m), 1732 (m), 1668 (s), 1645 (s), 1589 (m), 1506 (m), 1469 (w), 1435 (m), 1372 (m), 1285 (m), 1225 (w), 1186 (m), 1161 (m), 1066 (w), 987 (w), 815 (m), 756 (m), 710 (w), 589 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HBr}$  (350.21):

Berechnet: C, 51.44; H, 4.60; N, 12.00.

Gefunden: C, 51.23; H, 4.67; N, 11.84.

### 8.3.20 2-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)essigsäure **90**



295 mg (1.02 mmol) 2-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)essigsäuremethylester **86b** wurden in 10 mL 6 N HCl suspendiert und für 2 h 15 min auf 100 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit heißem DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 250 mg eines beigen Feststoffs erhalten (89 %).

$R_f = 0.64$  (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 178 – 180 °C.

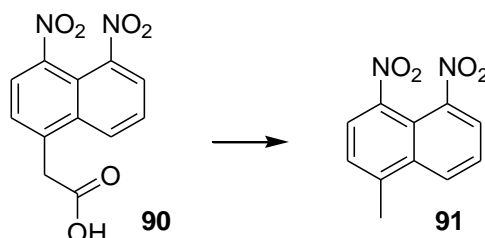
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.81$  (br s, 1H, COOH), 8.55 (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, H-C6), 8.50 - 8.43 (m, 2 H, H-C8, H-C3), 7.95 (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, H-C7), 7.87 (d, 1 H,  $J = 7.9$  Hz, H-C2), 4.36 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 171.6, 145.1, 143.9, 140.0, 133.5, 131.3, 129.0, 127.1, 127.0, 126.9, 115.6, 38.6$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = (2861$  (w)), 1716 (m), 1525 (s), 1435 (w), 1417 (w), 1352 (s), 1254 (m), 1220 (m), 936 (w), 896 (m), 855 (m), 830 (m), 817 (s), 790 (m), 758 (m), 734 (s), 711 (m), 670 (m), 623 (m), 574 (w), 476 (w).

MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  (%) = 230.8 (100) [M-NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> berechnet 276.04.

### 8.3.21 1-Methyl-4,5-dinitronaphthalin **91**



200 mg (0.72 mmol) **90** wurden in 7 mL Aceton gelöst und mit 0.10 mL (0.72 mmol) NEt<sub>3</sub> versetzt. Die violette Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch

aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1). Es wurden 162 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (97 %).

$R_f = 0.19$  (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 143 – 144 °C; Lit: 143 °C.<sup>[151]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.63$  (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, *H*-C6), 8.48 (dd, 1H,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, *H*-C8), 8.39 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, *H*-C3), 7.94 (dd, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 7.7$  Hz, *H*-C7), 7.77 (dd, 1H,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, *H*-C2), 2.85 (d, 3H,  $J = 0.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 145.1, 143.1, 142.9, 133.4, 131.1, 127.3, 126.9, 126.8, 126.8, 115.4, 19.8$ .

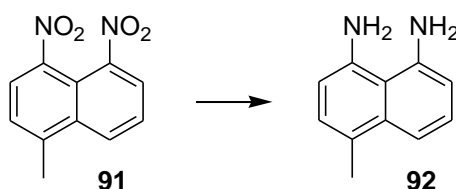
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2970$  (w), 1521 (s), 1389 (w), 1341 (s), 1241 (w), 1201 (w), 887 (w), 841 (m), 821 (m), 769 (m), 760 (m), 737 (m), 651 (w), 636 (w), 622 (w), 586 (w), 560 (w), 534 (w), 484 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$  (232.19):

Berechnet: C, 56.90; H, 3.47; N, 12.06.

Gefunden: C, 56.95; H, 3.42; N, 11.76.

### 8.3.22 4,5-Diamino-1-methylnaphthalin 92



Zu der Suspension von 277 mg (1.19 mmol) **91** und 28 mg Pd/C (10 %) in 10 mL MeOH (abs.) wurden unter Argon langsam 1.54 mL (9.54 mmol)  $\text{Et}_3\text{SiH}$  hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 18 min bei RT gerührt und anschließend über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulen chromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1). Es wurden 290 mg eines rosafarbenen Feststoffs erhalten (93 %).

$R_f = 0.28$  (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 51 – 53 °C; Lit: 64 °C.<sup>[151]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7.12$  (m, 1H, *H-C7*), 7.02 (dd, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, *H-C8*), 6.93 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, *H-C2*), 6.59 (dd, 1H,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, *H-C6*), 6.51 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, *H-C3*), 5.60 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.19 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 146.7$ , 144.2, 135.1, 126.6, 126.0, 122.1, 116.0, 112.8, 110.1, 109.7, 19.3.

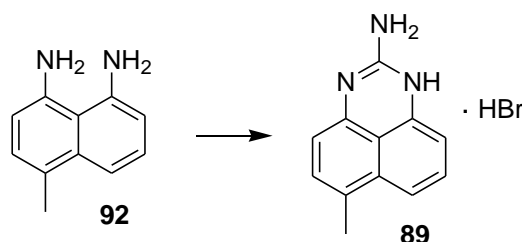
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3351$  (w), 3300 (w), 2899 (w), 1584 (s), 1520 (w), 1459 (w), 1411 (m), 1351 (m), 1341 (w), 1292 (m), 1160 (m), 1029 (m), 870 (m), 815 (m), 777 (m), 747 (s), 638 (m), 620 (m).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2$  (172.23):

Berechnet: C, 76.71; H, 7.02; N, 16.27.

Gefunden: C, 76.93; H, 7.06; N, 16.50.

### 8.3.23 2-Amino-6-methylperimidin-Hydrobromid **89**



150 mg (0.87 mmol) **92** wurden in 5 mL DCM (abs.) gelöst und unter Argon mit 0.35 mL (1.05 mmol) einer 3 M Lösung von  $\text{BrCN}$  in DCM versetzt. Die Reaktionslösung, in der sich rasch ein farbloser Niederschlag bildete, wurde für 4.5 h zum Sieden erhitzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 203 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (84 %).

$R_f = 0.25$  (DCM/MeOH 9:1 + 1 % AcOH).

Smp: 259 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 11.29$  (br s, 2H, *NH*), 7.81 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.45 - 7.34 (m, 2H, *H-C5*, *H-C8*), 7.22 (dd, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, *H-C7*), 6.85 (dd, 1H,  $J = 6.7$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, *H-C9*), 6.24 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, *H-C4*), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 149.6$ , 133.0, 132.5, 130.7, 128.0, 128.0, 126.7, 117.3, 115.0, 106.7, 106.2, 18.1.



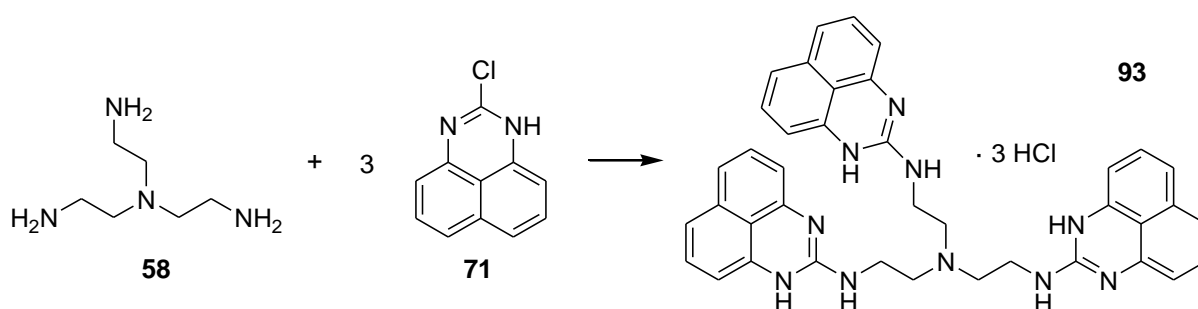
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3275 (w), 3163 (w), 2937 (m), 1668 (s), 1645 (s), 1576 (m), 1504 (m), 1484 (w), 1469 (m), 1439 (m), 1414 (w), 1385 (m), 1372 (m), 1318 (w), 1276 (m), 1160 (m), 1063 (m), 1022 (w), 820 (s), 806 (w), 756 (s), 714 (m), 686 (m), 587 (w), 564 (m).

Elementaranalyse für  $C_{12}H_{11}N_3 \cdot HBr$  (278.15):

Berechnet: C, 51.82; H, 4.35; N, 15.11.

Gefunden: C, 51.76; H, 4.47; N, 15.21.

### 8.3.24 Tris-[2-(perimidin-2-ylamino)ethyl]amin-Hydrochlorid **93**



Die Lösung von 107 mg (0.53 mmol) 2-Chlorperimidin **71** in 3.5 mL EtOH (abs.) wurde unter Argon mit 0.2 mL (0.13 mmol) Tris(2-aminoethyl)amin **58** versetzt und für 4 h zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde eingengt, der dabei ausfallende Feststoff abfiltriert, mit wenig EtOH (abs.) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 43 mg eines beigen Feststoffs erhalten (42 %), der für analytische Zwecke aus EtOH umkristallisiert wurde.

Smp: Zersetzung ab ca. 240 °C.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3422 (m), 3186 (m), 3051 (m), 2944 (m), 1670 (s), 1594 (m), 1523 (w), 1477 (m), 1466 (m), 1421 (w), 1382 (m), 1272 (m), 1173 (w), 1072 (w), 815 (m), 765 (m), 700 (w).

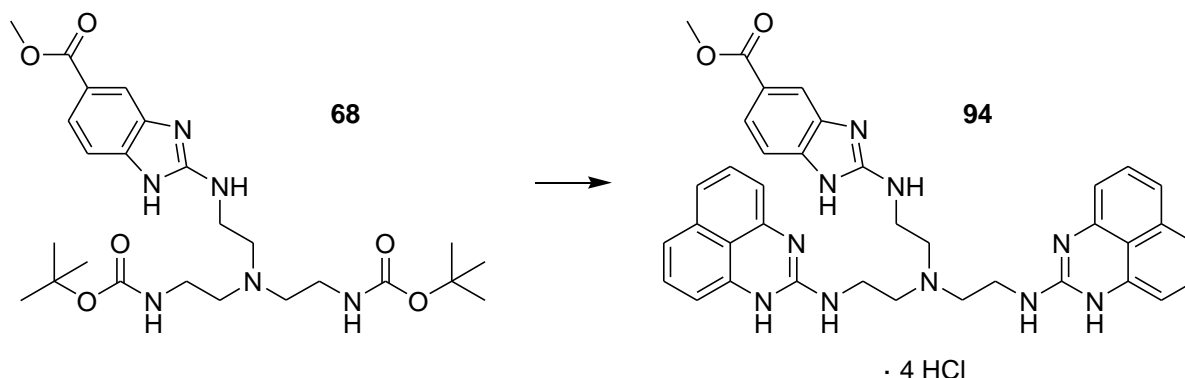
MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 323.5 (44) [M+2H]<sup>2+</sup>, 646.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>,  $C_{39}H_{36}N_{10}$  berechnet 644.3.

Elementaranalyse für  $C_{39}H_{36}N_{10} \cdot 3 HCl \cdot 2.5 H_2O$  (799.19):

Berechnet: C, 58.61; H, 5.55; N, 17.53.

Gefunden: C, 58.54; H, 5.51; N, 17.80.

### 8.3.25 2-(2-{Bis-[2-(perimidin-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester-Hydrochlorid **94**



89 mg (0.14 mmol) des Edukts **68** wurden in 1.6 mL MeOH (abs.) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 0.1 mL (1.4 mmol) SOCl<sub>2</sub> versetzt. Die Reaktionslösung, in der sich ein farbloser Niederschlag bildete, wurde für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 3.5 mL EtOH (abs.) und 0.04 mL (0.28 mmol) NEt<sub>3</sub> gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit 85 mg (0.42 mmol) 2-Chlorperimidin versetzt und für 4 h 50 min zum Rückfluss erhitzt. Es bildete sich ein hellbrauner Niederschlag, der abfiltriert, mit insgesamt 5 mL EtOH gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Das Rohprodukt wurde aus EtOH (abs.) umkristallisiert. Es wurden 45 mg eines beigen Feststoffs erhalten (40 %).

Smp: 235 – 237 °C.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3171 (m), 3044 (m), 2915 (m), 1672 (s), 1595 (m), 1467 (m), 1433 (w), 1380 (w), 1281 (m), 1166 (w), 1087 (w), 986 (w), 814 (m), 763 (m), 700 (w).

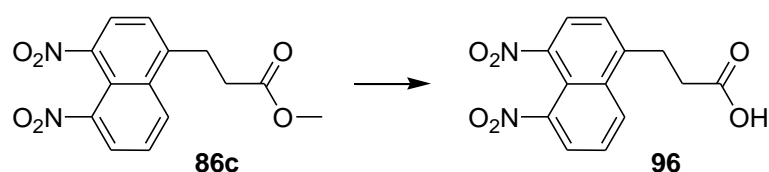
MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 327.4 (81) [M+2H]<sup>+</sup>, 653.6 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>37</sub>H<sub>36</sub>N<sub>10</sub>O<sub>2</sub> berechnet 652.3.

Elementaranalyse für C<sub>37</sub>H<sub>36</sub>N<sub>10</sub>O<sub>2</sub> · 4 HCl (798.59):

Berechnet: C, 55.65; H, 5.05; N, 17.54.

Gefunden: C, 55.54; H, 5.02; N, 17.54.

### 8.3.26 3-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)propionsäure **96**



650 mg (2.14 mmol) **86c** wurden in 26 mL 6 N HCl suspendiert und für 16 h auf 100 °C erhitzt. Der beige Niederschlag wurde abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 583 mg eines beigen Feststoffs erhalten (94 %).

R<sub>f</sub> = 0.38 (DCM/MeOH 9:1).

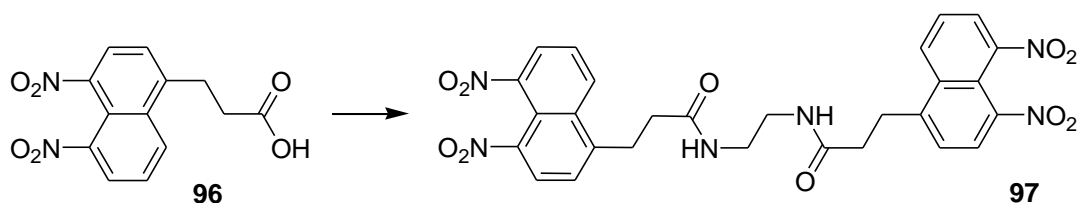
Smp: 200 – 203 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 12.34 (br s, 1H, COOH), 8.71 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 1.1 Hz, *H*-C6), 8.49 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, *H*-C8), 8.42 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*-C3), 7.94 (dd, 1H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-C7), 7.79 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, *H*-C2), 3.48 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>-Aryl), 2.72 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>COOH).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 173.1, 145.3, 145.3, 143.3, 132.8, 130.6, 127.0, 126.8, 126.8, 115.6, 34.0, 27.8.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 2923 (m), 2854 (w), 1714 (s), 1521 (s), 1432 (m), 1418 (m), 1347 (s), 1294 (m), 1212 (m), 1196 (m), 980 (w), 885 (m), 857 (m), 824 (s), 789 (m), 773 (m), 753 (m), 734 (s), 697 (w), 649 (m), 567 (w).

### 8.3.27 3-(4,5-Dinitro-1-naphthyl)-1-{2-[3-(4,5-dinitro-1-naphthyl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon **97**



521 mg (1.80 mmol) der Carbonsäure **96** wurden unter Argon in 5 mL DMF (abs.) gelöst und mit 275 mg (1.80 mmol) HOBt, 0.28 mL (1.80 mmol) DIC, 0.25 mL (1.80 mmol) NEt<sub>3</sub> sowie 0.06 mL (0.09 mmol) Ethylendiamin versetzt. Die rotbraune Lösung, in der sich ein farbloser Niederschlag bildete, wurde für 72 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das so erhaltene Rohprodukt wurde in 5 mL H<sub>2</sub>O suspendiert und die Suspension für 8 h zum Sieden erhitzt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O und MeOH

gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 292 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (54 %).

$R_f = 0.51$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 249 – 251 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.68$  (dd, 2H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, H-C6), 8.46 (dd, 2H,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, H-C8), 8.39 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, H-C3), 7.96 - 7.89 (m, 4H, H-C7, NH), 7.72 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, H-C2), 3.45 (t, 4H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Aryl}$ ), 3.06 - 3.04 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 2.52 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CONHR}$ , überlappt mit DMSO).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 170.6, 145.8, 145.3, 143.2, 132.8, 130.6, 126.9, 126.8, 126.8, 126.7, 115.6, 38.2, 35.8, 28.4$ .

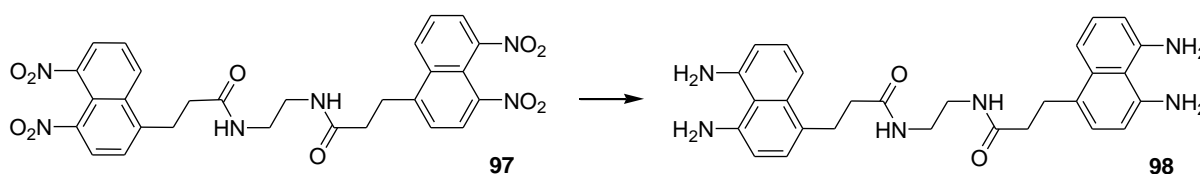
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3293$  (w), 3077 (w), 2940 (w), 1647 (m), 1628 (m), 1558 (m), 1533 (s), 1521 (s), 1452 (m), 1419 (w), 1358 (s), 1269 (m), 1252 (m), 1236 (m), 1218 (w), 1191 (m), 839 (w), 818 (m), 754 (m), 736 (m), 696 (w), 635 (m), 596 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{10}$  (604.52):

Berechnet: C, 55.63; H, 4.00; N, 13.90.

Gefunden: C, 55.80; H, 4.08; N, 13.93.

### 8.3.28 3-(4,5-Diamino-1-naphthyl)-1-{2-[3-(4,5-diamino-1-naphthyl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon **98**



180 mg (0.30 mmol) der Nitroverbindung **97** sowie 22 mg Pd/C (10 %) wurden in 11 mL MeOH (abs.) suspendiert und im Autoklaven für 44 h bei 10 bar  $\text{H}_2$ -Druck und RT gerührt. Die Suspension wurde mit 10 mL Aceton versetzt und bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und der Feststoff noch zweimal mit je 5 mL Aceton und MeOH versetzt und wiederum je 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Es wurden 107 mg eines hellrosafarbenen Feststoffs erhalten (74 %).

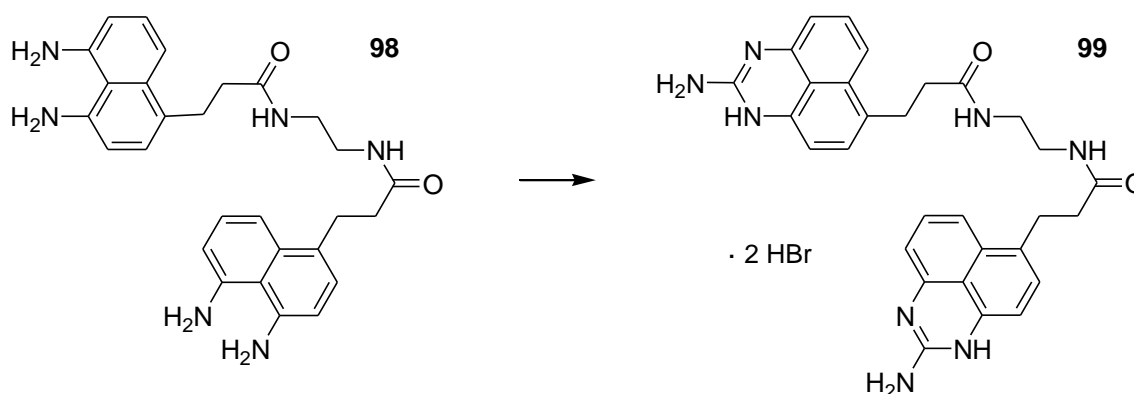
$R_f = 0.38$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 136 – 138 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7.89 - 7.85$  (m, 2H, NHCO), 7.12 - 7.10 (m, 4H, H-C7, H-C8), 6.93 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz, H-C2), 6.58 (dd, 2H,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, H-C6), 6.50 (d, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-C3), 5.57 (br s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 5.26 (br s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 3.09 - 3.07 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 3.02 - 2.96 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-Aryl}$ ), 2.38 - 2.31 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CONHR}$ ).

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3429$  (w), 3297 (m), 2938 (w), 1627 (s), 1588 (s), 1548 (s), 1459 (m), 1418 (m), 1373 (m), 1321 (w), 1300 (m), 1262 (w), 1224 (m), 1174 (w), 1030 (w), 959 (w), 816 (m), 746 (s), 596 (m), 510 (w), 484 (w).

### 8.3.29 3-(2-Amino-1H-perimidin-6-yl)-1-{2-[3-(2-amino-1H-perimidin-6-yl)propionylamino]ethylamino}-1-propanon **99**



Die Suspension von 70 mg (0.14 mmol) des Amins **98** in 5 mL DCM (abs.) und 2 mL DMF (abs.) wurde mit 0.13 mL (0.36 mmol) BrCN-Lösung (3.0 M in DCM) versetzt und für 3.5 h auf 40 °C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde mit 10 mL Aceton versetzt und der Niederschlag abfiltriert, mit 30 mL Aceton in mehreren Portionen gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 69 mg eines braunen Feststoffs erhalten (72 %), der für analytische Zwecke aus EtOH (abs.) umkristallisiert wurde.

Smp: > 330 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.30$  (br s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 7.96 - 7.91 (m, 2H, NHCO), 7.83 (br s, 4H, NH), 7.47 - 7.36 (m, 4H, H-C7, H-C8), 7.20 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz, H-C5), 6.83 (dd, 2H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H-C9), 6.75 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz, H-C4), 3.07 - 3.00 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Aryl}$ ), 2.40 - 2.34 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CONHR}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 171.3, 149.6, 133.2, 131.9, 131.0, 130.3, 128.2, 127.4, 116.9, 115.3, 106.7, 106.3, 38.3, 35.5, 27.6.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3276 (m), 2921 (m), 1682 (s), 1644 (s), 1601 (m), 1550 (m), 1508 (m), 1426 (m), 1373 (m), 1280 (m), 1165 (m), 1066 (w), 1023 (w), 815 (m), 756 (m), 710 (w), 573 (w).

MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 269.4 (100)  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , 308.2 (8)  $[\text{M}+2\text{K}]^{2+}$ , 536.3 (6)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_2$  berechnet 534.25.

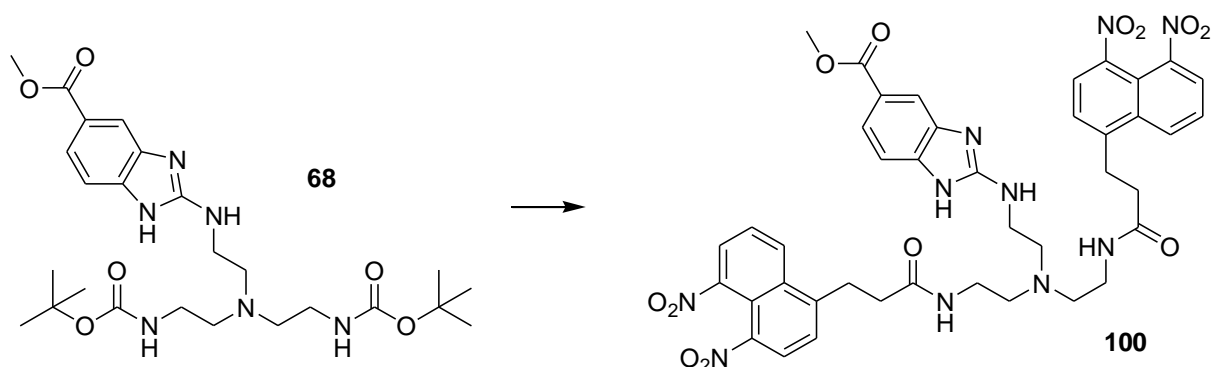
HRMS (MALDI)  $m/z$  = 573.21214  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_2+\text{K}^+$  berechnet 573.21233.

Elementaranalyse für  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_2 \cdot 2 \text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOH}$  (760.53):

Berechnet: C, 35.92; H, 4.28; N, 25.13.

Gefunden: C, 35.55; H, 4.37; N, 25.30.

### 8.3.30 2-(2-{Bis-[2-(3-{4,5-Dinitro-1-naphthyl}-1-propanamid)ethyl]amino}ethylamino)-1H-benzimidazol-5-carbonsäuremethylester 100



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 370 mg (0.57 mmol) **68** in 9 mL MeOH (abs.) wurden langsam 0.41 mL (5.65 mmol)  $\text{SOCl}_2$  hinzugegeben. Die Lösung wurde für 3 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 7.5 mL DMF (abs.) und 0.61 mL (3.71 mmol) DIPEA gelöst, mit 414 mg (1.43 mmol) **96** und 544 mg (1.43 mmol) HATU versetzt und für 4 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Es wurden 464 mg eines braunen Feststoffs erhalten.

$R_f$  = 0.44 (DCM/MeOH 9:1).

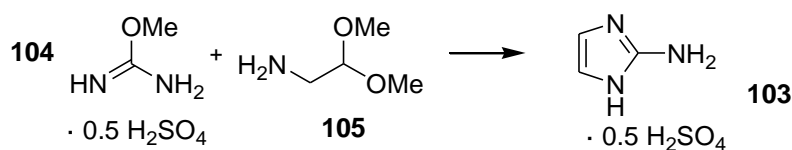
Smp: 116 – 118 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 8.61 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, Naphthyl- $H$ ), 8.41 (d, 2H,  $J$  = 7.3 Hz, Naphthyl- $H$ ), 8.33 (d, 2H,  $J$  = 7.9 Hz, Naphthyl- $H$ ), 8.04 - 7.99 (m, 2H,  $NH$ ), 7.85 (dd, 2H,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 8.2 Hz, Naphthyl- $H$ ), 7.67 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz, Benzimidazol- $H$ ), 7.64 (d, 2H,  $J$  = 8.1 Hz, Naphthyl- $H$ ), 7.51 (dd, 1H,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 1.2 Hz, Benzimidazol- $H$ ), 7.14 - 7.05 (m, 2H, Benzimidazol- $H$ ,  $NH$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.43 - 3.30 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ , überlappt mit  $\text{H}_2\text{O}$ ), 3.18 - 3.09 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.75 - 2.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.59 - 2.50 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ , überlappt mit  $\text{DMSO}$ -Restsignal), 1.28 - 1.22 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 2924 (w), 1634 (m), 1601 (m), 1573 (m), 1525 (s), 1435 (m), 1350 (s), 1286 (m), 1232 (m), 1121 (w), 1087 (w), 981 (w), 889 (w), 846 (w), 820 (m), 764 (m), 736 (m), 628 (w), 581 (w), 557 (w).

## 8.4 Synthese von 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol-Derivaten

### 8.4.1 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **103**<sup>[108]</sup>



Die klare Lösung von 2.5 g (20 mmol) *O*-Methylisoharnstoff-Hemisulfat **104** in 4.2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  wurde unter Argon mit 2.2 mL (20 mmol) 2-Aminoacetaldehyddimethylacetal **105** versetzt und für 4 h bei 50 °C gerührt. Zu der auf RT abgekühlten Reaktionslösung wurden 0.2 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugegeben und die Lösung für 2 h bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die gelbe Reaktionslösung zu 80 mL eisgekühltem EtOH hinzutropft, wobei sich ein beiger Niederschlag bildete. Nachdem die Suspension eine Stunde unter Eiskühlung gerührt worden war, wurde der Niederschlag abfiltriert und mehrfach mit eiskaltem EtOH gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 1.86 g eines beige Feststoffs erhalten (69 %).

Smp: Zersetzung ab ca. 230 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 6.77 (s, 2H,  $H$ -C4 und  $H$ -C5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 146.6, 112.9.

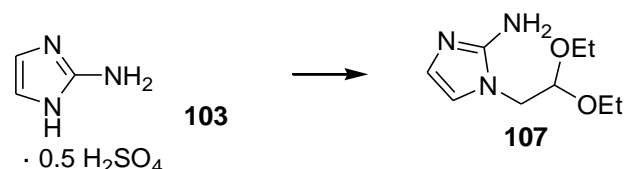
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3295 (m), 3154 (s), 3000 (m), 2764 (m), 1673 (s), 1307 (w), 1107 (s), 1042 (m), 992 (m), 970 (m), 911 (m), 866 (w), 826 (w), 791 (w), 707 (m), 617(m).

Elementaranalyse für  $C_3H_5N_3 \cdot 0.5 H_2SO_4 \cdot 0.5 H_2O$  (133.93):

Berechnet: C, 26.90; H, 4.67; N, 31.37; S, 11.97.

Gefunden: C, 26.87; H, 4.40; N, 31.21; S, 12.25.

#### 8.4.2 1-(2,2-Diethoxyethyl)-2-aminoimidazol **107**



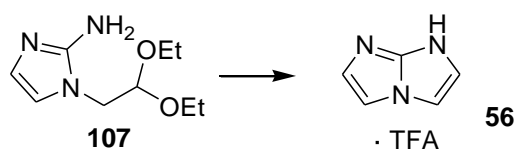
Zu der Suspension von 306 mg (2.32 mmol) 2-Aminoimidazol-Hemisulfat **103** in 3.5 mL DMF (abs.) wurden 0.44 mL (2.78 mmol) Bromacetaldehyddiethylacetal und anschließend portionsweise 281 mg (7.03 mmol) NaH (60% in Mineralöl) hinzugegeben. Die braune Reaktionslösung wurde für 20 h bei RT gerührt und dann mit je 7 mL  $H_2O$  und DCM versetzt und 20-mal mit je 5 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mehrfach mit wenig *n*-Hexan gewaschen. Es wurden 120 mg eines braunen Öls erhalten (26 %).

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6.61 (d, 1H,  $J$  = 1.4 Hz, *H*-C5), 6.51 (d, 1H,  $J$  = 1.4 Hz, *H*-C4), 4.59 (t, 1H,  $J$  = 5.3 Hz, Acetal-*H*), 4.30 (br s, 2H,  $NH_2$ ), 3.84 (d, 2H,  $J$  = 5.3 Hz,  $H_2C$ -N1), 3.80 - 3.68 (m, 2H,  $H_2C$ -O), 3.56 - 3.44 (m, 2H,  $H_2C$ -O), 1.20 (t, 6H,  $J$  = 7.0 Hz,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (62.9 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 149.0, 124.3, 116.0, 102.6, 64.0, 48.5, 15.3.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3399 (s), 3146 (m), 2977 (m), 1655 (m), 1560 (s), 1497 (m), 1381 (m), 1129 (m), 1064 (s), 702 (w).

#### 8.4.3 1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol **56**<sup>[8]</sup>



220 mg (1.10 mmol) **107** wurden in 3.5 mL 2 N HCl gelöst und für 1 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zuerst mit MeOH, dann mit  $CHCl_3$  coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt. Es wurden 70 mg eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten (28 %).



$R_f = 0.22$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp.: Zersetzung bei 280 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 13.25$  (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.64 (d, 2H,  $J = 2.0$  Hz,  $H\text{-C}5$ ,  $H\text{-C}8$ ), 7.51 (d, 2H,  $J = 2.0$  Hz,  $H\text{-C}4$  und  $H\text{-C}6$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 120.4$ , 108.6.

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3140$  (m), 3008 (m), 2958 (m), 2894 (m), 2741 (m), 1660 (s), 1413 (m), 1309 (w), 1205 (s), 1134 (s), 1088 (w), 963 (w), 916 (w), 864 (w), 833 (m), 815 (m), 760 (w), 722 (m), 688 (s), 590 (m).

MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 107.5 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 214.7 (5)  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3$  berechnet 107.05.

HRMS (MALDI)  $m/z = 108.05549$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3+\text{H}^+$  berechnet 108.05562.

HPLC-Bedingungen: semi-präparativ: ReproSil-Pur C18-AQ, 250 x 20, 10  $\mu\text{m}$ , 0.1 % TFA/MeCN (995:5), 8.0 mL/min, 220 nm; analytisch: ReproSil-Pur C18-AQ, 125 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , 0.1 % TFA (100 %), 0.8 mL/min, 220 nm,  $t_R = 7.00$  min.

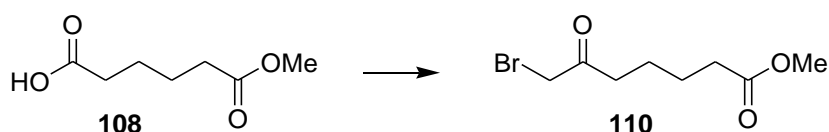
Das TFA-Salz wurde mittels DOWEX-Ionenaustauscher ( $\text{Cl}^-$ -Form) in das Hydrochlorid überführt.

Elementaranalyse für  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3 \cdot 1.5 \text{HCl} \cdot 0.3 \text{H}_2\text{O}$  (167.21):

Berechnet: C, 35.92; H, 4.28; N, 25.13.

Gefunden: C, 35.55; H, 4.37; N, 25.30.

#### 8.4.4 7-Brom-6-oxoheptansäuremethylester **110**



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.2 mL (8.2 mmol) Adipinsäuremonomethylester **108** in 40 mL DCM (abs.) wurden unter Argon zunächst einige Tropfen DMF (abs.) hinzugegeben und dann 2.1 mL Oxalylchlorid (25 mmol) hinzutropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Reagenz wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 18 mL DCM (abs.) gelöst. Nach Zutropfen von 8.2 mL (16 mmol) TMS-Diazomethanlösung (2 M in  $\text{Et}_2\text{O}$ ) wurde die gelbe Lösung für 2 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt, tropfenweise mit 1.9 mL (16 mmol) konz. HBr versetzt, mit 15 mL



eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5 → DCM/MeOH 9:1). Es wurden 244 mg eines braunen Öls erhalten (25 %).

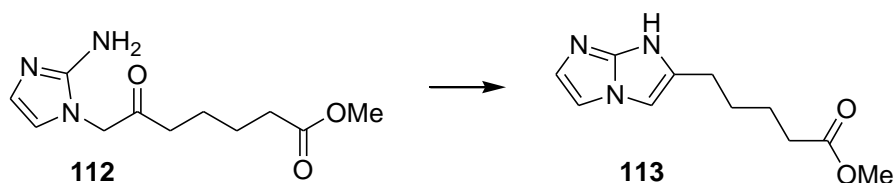
$R_f = 0.09$  (DCM/MeOH 9:1).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.69$  (d, 1H,  $J = 1.5$  Hz, Aryl- $H$ ), 6.45 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, Aryl- $H$ ), 4.90 (s, 2H,  $H\text{-C7}$ ), 3.67 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.64 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $H\text{-C5}$ ), 2.35 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz,  $H\text{-C2}$ ), 1.69 - 1.64 (m, 4H,  $H\text{-C3}$  und  $H\text{-C4}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 203.9, 173.7, 148.3, 123.6, 116.3, 54.0, 51.6, 39.4, 33.5, 24.0, 22.7$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3106$  (m), 2949 (m), 1726 (s), 1662 (s), 1436 (m), 1366 (m), 1249 (m), 1197 (m), 1171 (s), 1098 (m), 1006 (w), 750 (w), 693 (m), 580 (w).

#### 8.4.6 5-(1*H*-Imidazo[1,2-*a*]imidazol-6-yl)-pentansäuremethylester **113**



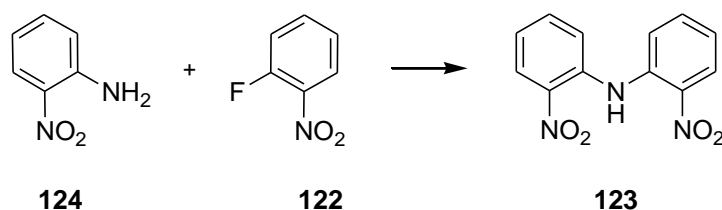
240 mg (1.00 mmol) **112** wurden in 20 mL MeOH gelöst und mit 0.15 mL konz. HCl versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 5 h zum Sieden erhitzt und anschließend durch Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  auf einen leicht basischen pH-Wert gebracht. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit je 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Es wurden 24 mg eines braunen Öls erhalten (11 %).

$R_f = 0.46$  (DCM/MeOH 9:1).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 222.0 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$  berechnet 221.12.

## 8.5 Synthese von 5H-Benzimidazo[1,2-a]benzimidazol-Verbindungen

### 8.5.1 Bis-(2-nitrophenyl)amin **123**<sup>[120]</sup>



1.96 g (14.2 mmol) 2-Nitroanilin **124** wurden in 40 mL DMSO gelöst und mit 2.35 g (17.0 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sowie 1.5 mL (14 mmol) 1-Fluor-2-nitrobenzol **122** versetzt. Die Suspension, die sich im Verlauf der Reaktion schwarz färbte, wurde für 40 h bei 120 °C gerührt. Zu dem auf RT abgekühlten Reaktionsgemisch wurden 20 mL H<sub>2</sub>O hinzugegeben und kräftig gerührt. Die so erhaltene orangefarbene Lösung wurde dreimal mit je 60 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit je 40 mL 15%-iger NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der feste Rückstand wurde aus Cyclohexan umkristallisiert. Es wurden 3.355 g eines orangefarbenen Feststoffs erhalten (95 %).

R<sub>f</sub> = 0.34 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 171 – 173 °C; Lit: 170 – 171 °C.<sup>[152]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.00 (br s, 1H, NH), 8.21 (ddd, 2H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.4 Hz, *J* = 0.4 Hz, *H*-C3), 7.61 - 7.49 (m, 2H, *H*-C5, *H*-C6), 7.09 (ddd, 1H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 6.7 Hz, *J* = 1.7 Hz, *H*-C4).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 137.3, 134.8, 126.8, 121.9, 119.8, 111.4.

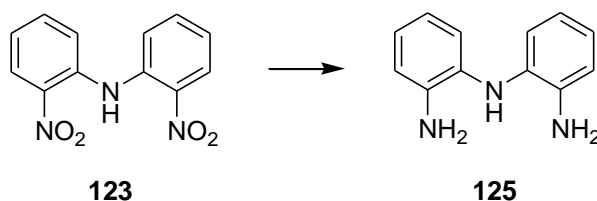
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 1603 (m), 1579 (m), 1539 (w), 1496 (m), 1440 (m), 1333 (s), 1314 (m), 1292 (m), 1256 (s), 1216 (m), 1163 (m), 1147 (s), 1074 (m), 858 (m), 834 (m), 787 (w), 775 (m), 730 (s), 687 (m), 672 (m), 588 (w), 513 (m).

Elementaranalyse für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (259.22):

Berechnet: C, 55.60; H, 3.50; N, 16.21.

Gefunden: C, 55.45; H, 3.54; N, 16.14.

### 8.5.2 Bis-(2-aminophenyl)amin **125**<sup>[120]</sup>



2.993 g (11.55 mmol) Bis-(2-nitrophenyl)amin **123** wurden in 40 mL EtOAc (abs.) weitestgehend gelöst, mit 228 mg Pd/C (10 %) versetzt und für 24 h bei 10 bar H<sub>2</sub>-Druck bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das so erhaltene braune Öl wurde in wenig DCM aufgenommen, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 2.308 g eines rötlichbraunen, langsam kristallisierenden Feststoffs erhalten (100 %).

R<sub>f</sub> = 0.06 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 97 °C; Lit: 100 – 191 °C.<sup>[153]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.94 - 6.88 (m, 2H, Aryl-H), 6.81 - 6.74 (m, 6H, Aryl-H), 5.00 (br s, 1H, NH), 3.63 (m, 4H, NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 138.2, 131.2, 123.3, 120.2, 119.9, 116.5.

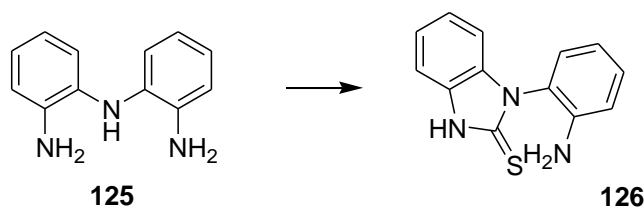
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3474 (w), 3415 (m), 3376 (m), 3339 (m), 3227 (w), 1621 (m), 1606 (m), 1497 (s), 1458 (m), 1430 (m), 1409 (m), 1299 (m), 1278 (m), 1243 (m), 1132 (m), 1037 (w), 914 (w), 837 (w), 745 (s), 643 (m), 538 (m), 480 (w).

Elementaranalyse für C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub> (199.25):

Berechnet: C, 72.33; H, 6.58; N, 21.09.

Gefunden: C, 72.11; H, 6.58; N, 20.97.

### 8.5.3 1-(2-Aminophenyl)-2-mercaptobenzimidazol **126**



Zu der auf 0 °C abgekühlten Lösung aus 300 mg (1.51 mmol) des Amins **125** und 34 mg (0.5 mmol) Imidazol in 10 mL MeCN (abs.) wurde die Lösung von 282 mg (1.51 mmol) TCDI in

10 mL MeCN (abs.) langsam hinzugegeben. Die Reaktionslösung, in der sich rasch ein farblos Niederschlag bildete, wurde für 17.5 h bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig MeCN gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, der Rückstand aus EtOH (abs.) umkristallisiert und der so erhaltene Feststoff mit dem Niederschlag aus der Reaktionslösung vereinigt. Es wurden 252 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (69 %).

$R_f = 0.61$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 261 – 262 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.90$  (br s, 1H, NH), 7.24 - 7.02 (m, 5H, Aryl-H), 6.90 (dd, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, Aryl-H), 6.72 - 6.64 (m, 2H, Aryl-H), 4.95 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 168.8, 145.0, 133.4, 131.5, 129.7, 129.2, 122.9, 122.1, 119.6, 116.3, 116.2, 109.5, 109.5$ .

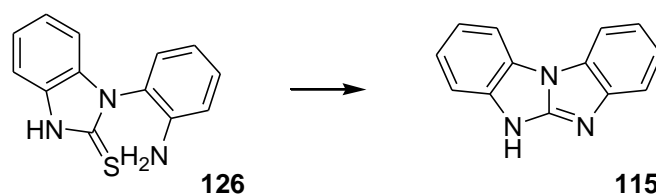
IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3361$  (w), 3304 (m), 3207 (m), 1634 (m), 1584 (w), 1506 (m), 1474 (m), 1462 (m), 1422 (s), 1378 (m), 1358 (m), 1344 (m), 1309 (s), 1268 (m), 1204 (m), 1179 (m), 1159 (m), 1139 (m), 749 (m), 734 (s), 629 (m), 620 (m), 586 (m), 570 (m), 524 (w).

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$  (241.31):

Berechnet: C, 64.70; H, 4.59; N, 17.41; S, 13.29.

Gefunden: C, 64.88; H, 4.59; N, 17.58; S, 13.48.

#### 8.5.4 5H-Benzimidazo[1,2-a]benzimidazol 115



Zu der Lösung von 100 mg (0.41 mmol) des Thioharnstoffs **126** in 1.7 mL DMF (abs.) wurden unter Argon portionsweise 127 mg (0.50 mmol) Mukaiyama-Reagenz hinzugegeben und die gelbe Lösung für eine Woche bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit MeOH gewaschen und das Filtrat am Kugelrohr bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 98:2). Es wurde ein farblos Feststoff erhalten, der aus Aceton umkristallisiert wurde. Es wurden 13 mg farblose Nadeln erhalten (15 %).

$R_f = 0.56$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: Zersetzung ab 302 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.04$  (br s, 1H, NH), 8.11 - 8.08 (m, 2H, Aryl-H), 7.52 - 7.48 (m, 2H, Aryl-H), 7.33 - 7.20 (m, 4H, Aryl-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 153.2, 141.0, 126.0, 122.7, 119.7, 114.4, 110.6$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2981$  (m), 2887 (w), 2630 (w), 1644 (m), 1588 (w), 1569 (m), 1495 (m), 1455 (m), 1429 (w), 1395 (m), 1285 (w), 1248 (w), 1221 (m), 1163 (m), 1147 (m), 1070 (m), 1006 (w), 961 (w), 868 (m), 841 (w), 736 (s), 620 (w), 605 (w), 534 (w).

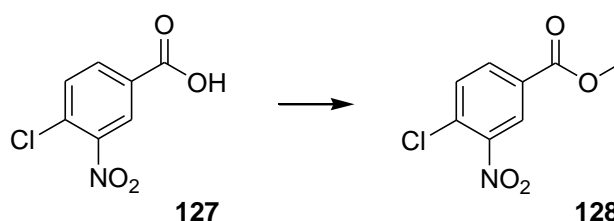
MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 208.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3$  berechnet 207.08.

Elementaranalyse für  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3$  (207.23):

Berechnet: C, 75.35; H, 4.38; N, 20.28.

Gefunden: C, 75.15; H, 4.32; N, 20.05.

### 8.5.5 4-Chlor-3-nitrobenzoesäuremethylester **128**<sup>[122]</sup>



Zu der Lösung von 5.00 g (24.8 mmol) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure **127** in 50 mL MeOH (abs.) wurden 2 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der farblose Rückstand aus einem 1:1-Gemisch aus EtOAc und *n*-Hexan umkristallisiert. Es wurden 4.34 g eines farblosen Feststoffs erhalten (81 %).

$R_f = 0.52$  (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 78 – 80 °C; Lit: 78 – 79 °C.<sup>[154]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8.53$  (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, H-C2), 8.19 (dd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, H-C6), 7.94 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, H-C5), 3.91 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 163.8, 147.5, 133.8, 132.4, 129.8, 129.7, 126.0, 52.8$ .

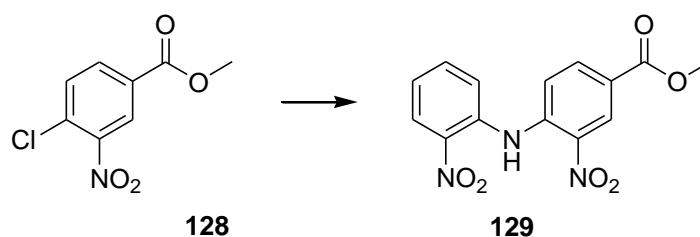
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3102 (w), 2963 (w), 1714 (m), 1604 (m), 1537 (m), 1443 (m), 1354 (m), 1287 (m), 1243 (m), 1200 (m), 1153 (m), 1140 (m), 1113 (m), 1049 (m), 974 (m), 912 (m), 886 (m), 844 (m), 822 (m), 766 (m), 743 (s), 696 (m), 659 (m), 599 (w), 527 (m), 474 (m).

Elementaranalyse für  $C_8H_6ClNO_4$  (215.59):

Berechnet: C, 44.57; H, 2.81; N, 6.50.

Gefunden: C, 44.42; H, 2.92; N, 6.21.

### 8.5.6 4-(2-Nitrophenylamino)-3-nitrobenzoesäuremethylester **129**



Die Lösung von 1.28 g (9.26 mmol) 2-Nitroanilin **124** in 30 mL DMSO wurde mit 1.54 g (11.2 mmol)  $K_2CO_3$  und 2.00 g (9.28 mmol) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäuremethylester **128** versetzt und anschließend für 35 h auf 120 °C erhitzt. Die dunkle Reaktionslösung wurde dreimal mit je 60 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit je 40 mL einer 15%igen NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der braune Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 9:1). Es wurden 1.35 g eines gelben Feststoffs erhalten, der für analytische Zwecke aus Cyclohexan umkristallisiert wurde (46 %).

$R_f$  = 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1).

Smp: 145 – 147 °C.

$^1H$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.77 (br s, 1H, NH), 8.68 (d, 1H,  $J$  = 2.2 Hz, *H*-C2), 8.21 (dd, 1H,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 1.5 Hz, *H*-C3'), 8.07 (dd, 1H,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, *H*-C6), 7.83 - 7.72 (m, 2H, *H*-C5', *H*-C6'), 7.49 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, *H*-C5), 7.45 - 7.39 (m, 1H, *H*-C4'), 3.87 (s, 3H,  $OCH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 164.3, 142.2, 141.1, 135.3, 135.2, 135.0, 134.0, 127.7, 126.1, 125.1, 124.2, 120.8, 118.4, 52.3.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3278 (w), 2924 (w), 2848 (w), 1719 (s), 1625 (m), 1605 (m), 1586 (m), 1506 (s), 1435 (m), 1341 (s), 1299 (s), 1263 (s), 1216 (s), 1148 (m), 1123 (m), 1071 (m), 975 (m), 919 (m), 882 (m), 837 (m), 782 (m), 755 (m), 738 (s), 674 (m), 516 (m).

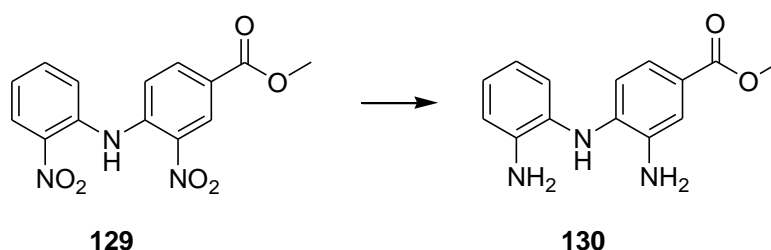


Elementaranalyse für  $C_{14}H_{11}N_3O_6$  (317.25):

Berechnet: C, 53.00; H, 3.49; N, 13.24.

Gefunden: C, 52.87; H, 3.59; N, 13.51.

### 8.5.7 4-(2-Aminophenylamino)-3-aminobenzoensäuremethylester **130**



335 mg (1.06 mmol) der Dinitroverbindung **129** und 33 mg Pd/C (10 %) wurden unter Argon in 10 mL EtOAc (abs.) suspendiert und für 19 h bei RT und 12 bar H<sub>2</sub>-Druck im Autoklaven gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 3:1 → *n*-Hexan/EtOAc 1:1). Es wurden 230 mg eines braunen Feststoffs erhalten (84 %).

R<sub>f</sub> = 0.27 (DCM/MeOH 98:2).

Smp: 144 – 146 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.30 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, *H*-C2), 7.10 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.0 Hz, *H*-C6), 6.94 - 6.88 (m, 2 H, Aryl-*H*), 6.76 (dd, 1H, *J* = 8.6 Hz, *J* = 1.7 Hz, Aryl-*H*), 6.64 (br s, 1H, NH), 6.60 - 6.54 (m, 1H, Aryl-*H*), 6.31 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *H*-C5), 4.95 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.73 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 166.6, 143.0, 137.4, 135.7, 126.1, 125.2, 125.1, 119.5, 119.0, 116.6, 115.2, 115.1, 112.0, 51.1.

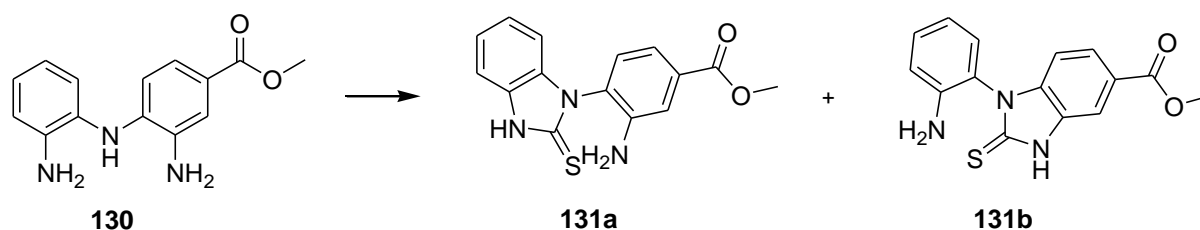
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3371 (m), 2949 (w), 1684 (s), 1630 (m), 1591 (m), 1500 (m), 1448 (m), 1354 (w), 1292 (s), 1262 (s), 1223 (s), 1158 (m), 1082 (m), 987 (m), 917 (w), 890 (w), 849 (w), 809 (w), 763 (m), 740 (m), 714 (m), 489 (w), 459 (w).

Elementaranalyse für  $C_{14}H_{15}N_3O_2$  (257.29):

Berechnet: C, 65.35; H, 5.88; N, 16.33.

Gefunden: C, 65.47; H, 6.15; N, 16.13.

### 8.5.8 Mischung aus 3-Amino-4-(1,2-dihydro-2-thioxobenzo[*d*]imidazol-3-yl)benzoesäuremethylester und 1-(2-Aminophenyl)-2,3-dihydro-2-thioxo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxymethylester **131a** und **131b**



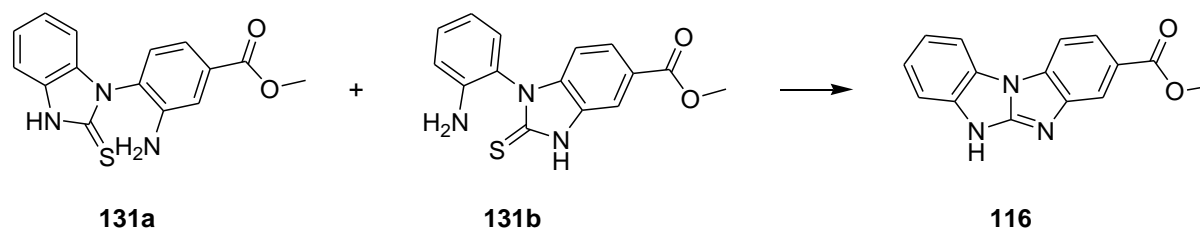
Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 321 mg (1.25 mmol) des Diamins **130** und 28 mg (0.4 mmol) Imidazol in 13 mL MeCN (abs.) wurde unter Argon die Lösung von 234 mg (1.25 mmol) Thiocarbonyldiimidazol in 13 mL MeCN (abs.) hinzuge tropft. Die braune Reaktionslösung wurde für 72 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1). Es wurden 325 mg eines hellbraunen Feststoffs erhalten (Gemisch der beiden Konstitutionsisomere, zusammen 87 %). Das Produktgemisch wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

$R_f = 0.11$  (DCM/MeOH 98:2).

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 3327$  (w), 3205 (w), 2949 (w), 1705 (s), 1623 (m), 1585 (m), 1505 (m), 1472 (m), 1429 (s), 1380 (m), 1359 (w), 1308 (s), 1244 (s), 1208 (s), 1151 (m), 1108 (m), 1089 (m), 991 (m), 886 (w), 762 (m), 739 (s), 644 (m), 624 (m).

MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  (%) = 297.9 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 148.6 (15) [M-2H]<sup>2-</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S berechnet 299.07.

### 8.5.9 Benzimidazo[1,2-*a*]benzimidazol-3-carbonsäuremethylester **116**



310 mg (1.09 mmol) des Produktgemischs **131a/131b** wurden unter Argon in 5.3 mL DMF (abs.) gelöst und portionsweise mit 335 mg (1.31 mmol) des Mukaiyama-Reagenzes versetzt. Die Reaktionslösung wurde 7 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Kugelrohr entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1 →

DCM/MeOH 98:2). Die leicht verunreinigten Produktfraktionen wurden bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mehrfach mit DCM gewaschen. Es wurden 45 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (16 %).

$R_f = 0.59$  (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 295 – 296 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.26$  (br s, 1H, NH), 8.24 (dd, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 0.5$  Hz, Aryl-H), 8.19 - 8.15 (m, 1H, Aryl-H), 8.09 (d, 1H,  $J = 1.2$  Hz, Aryl-H), 7.87 (dd, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, Aryl-H), 7.52 - 7.49 (m, 1H, Aryl-H), 7.39 - 7.25 (m, 2H, Aryl-H), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 166.6, 154.2, 143.8, 138.4, 129.8, 125.2, 123.8, 123.7, 120.9, 120.5, 116.7, 113.3, 111.2, 110.5, 52.0$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2954$  (w), 2675 (w), 1710 (s), 1657 (m), 1604 (m), 1576 (m), 1467 (m), 1449 (m), 1418 (m), 1284 (s), 1255 (m), 1237 (m), 1212 (m), 1166 (m), 1129 (m), 1103 (m), 1085 (m), 1070 (m), 983 (m), 892 (w), 881 (w), 869 (w), 761 (s), 741 (s), 729 (s), 616 (w), 543 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 265.9 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 531.5 (6) [2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> berechnet 265.09.

HRMS (MALDI)  $m/z = 266.09323$  [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+H<sup>+</sup> berechnet 266.09240.

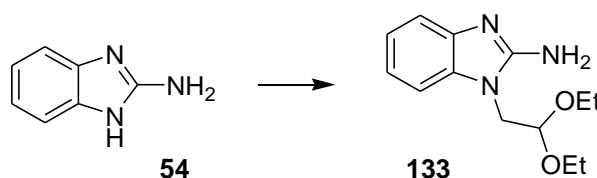
Elementaranalyse für C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 0.5 H<sub>2</sub>O (274.28):

Berechnet: C, 65.69; H, 4.41; N, 15.32.

Gefunden: C, 65.65; H, 4.38; N, 15.46.

## 8.6 Synthese weiterer cyclischer Guanidine

### 8.6.1 2-Amino-1-(2,2-diethoxyethyl)benzimidazol **133**<sup>[110]</sup>



3,4 mL (9.0 mmol) einer 2.7 M Lösung von NaOEt in EtOH wurden in 5 mL MeOH (abs.) gelöst und mit 1.00 g (7.51 mmol) 2-Aminobenzimidazol **54** sowie 1.2 mL (9.0 mmol) Bromacetaldehyddiethylacetal versetzt. Die sich langsam rötlich färbende Reaktionslösung wurde für 93 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, das Filtrat bis zur Trockne eingengt und der Rückstand

mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl<sub>3</sub> gelöst und verbliebenes Edukt durch Zugabe von Cylohexan ausgefällt. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand aus Et<sub>2</sub>O umkristallisiert. Es wurden 487 mg eines hellorangefarbenen Feststoffs erhalten (26 %).

R<sub>f</sub> = 0.60 (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 140 – 142 °C; Lit: 140 – 141 °C.<sup>[110]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.16 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, *H*-C7), 7.11 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, *H*-C4), 6.93 (dt, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.3 Hz, *H*-C5), 6.87 (dt, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, *H*-C6), 6.25 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.73 (t, 1H, *J* = 5.3 Hz, CH), 4.05 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.66 - 3.57 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.44 - 3.36 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.01 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 155.1, 142.5, 134.7, 120.2, 117.9, 114.6, 108.1, 100.2, 62.9, 45.0, 15.1.

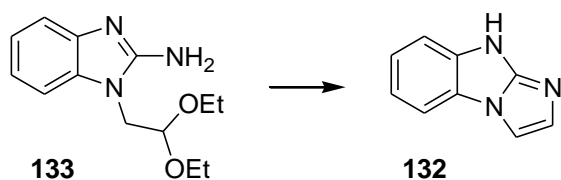
IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3380 (w), 3049 (w), 2976 (w), 1663 (m), 1556 (s), 1472 (w), 1458 (m), 1442 (m), 1375 (w), 1289 (m), 1252 (m), 1187 (w), 1160 (w), 1111 (m), 1055 (s), 1010(m), 943 (w), 913 (w), 894 (w), 760 (m), 743 (s), 682 (m), 590 (w), 527 (w).

Elementaranalyse für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (249.31):

Berechnet: C, 62.63; H, 7.68; N, 16.85.

Gefunden: C, 62.64; H, 7.67; N, 16.97.

### 8.6.2 9*H*-Imidazo[1,2-*a*]benzimidazol **132**<sup>[110]</sup>



300 mg (1.20 mmol) **133** wurden in 3 mL 2 N HCl gelöst und für 30 min auf 100 °C erhitzt, wobei sich die zunächst rote Lösung entfärbte. Nach dem Abkühlen auf RT wurde so lange 10%-ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hinzugegeben, bis die Reaktionslösung einen pH-Wert von 8 erreicht hatte. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 167 mg eines beigen Feststoffs erhalten (88 %).

$R_f = 0.15$  (*n*-Hexan/EtOAc 1:3).

Smp: 186 – 188 °C; Lit: 190 °C.<sup>[123]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 11.50$  (br s, 1H, NH), 7.74 - 7.71 (m, 1H, *H*-C5), 7.65 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz, *H*-C3), 7.40 - 7.36 (m, 1H, *H*-C8), 7.22 (ddd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, *H*-C7), 7.13 - 7.06 (m, 2H, *H*-C6 und *H*-C2).

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 150.1, 139.1, 126.6, 125.1, 122.7, 118.7, 113.2, 110.8, 105.9$ .

IR (pur):  $\tilde{\nu} = 2980$  (w), 2640 (w), 1626 (m), 1609 (m), 1477 (m), 1433 (m), 1293 (m), 1267 (m), 1229 (w), 1179 (m), 1127 (w), 1105 (m), 1075 (m), 859 (w), 849 (w), 813 (m), 742 (s), 720 (s), 698 (m), 675 (s), 605 (m), 559 (m), 477 (w).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 158.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 199.0 (30) [M+H+MeCN]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> berechnet 157.06.

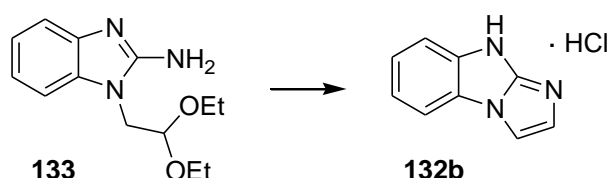
HRMS (MALDI)  $m/z = 158.07133$  [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>+H<sup>+</sup> berechnet 158.07127.

Elementaranalyse für C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> (157.17):

Berechnet: C, 68.78; H, 4.49; N, 26.74.

Gefunden: C, 68.59; H, 4.46; N, 26.99.

### 8.6.3 Imidazo[1,2-*a*]benzimidazol Hydrochlorid **132b**<sup>[110]</sup>



160 mg (0.64 mmol) **133** wurden in 2.5 mL 2 N HCl gelöst und für 30 min zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit MeOH coevaporiert. Es wurden 99 mg eines beigen Feststoffs erhalten (80 %).

$R_f = 0.37$  (*n*-Hexan/EtOAc 1:3).

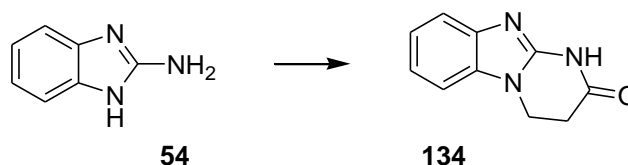
Smp: 195 – 198 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 13.92$  (br s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz, *H*-C3), 8.07 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, *H*-C5), 7.68 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, *H*-C8), 7.61 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz, *H*-C2), 7.52 (ddd, 1H,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, *H*-C7), 7.44 (ddd, 1H,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, *H*-C6).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 142.1, 134.4, 125.5, 123.8, 122.3, 119.9, 113.5, 112.7, 109.0.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3037 (m), 2915 (m), 2842 (m), 2717 (m), 2668 (m), 2617 (m), 1666 (s), 1619 (m), 1488 (m), 1472 (m), 1313 (m), 1293 (m), 1230 (m), 1185 (s), 1152 (m), 1081 (m), 1073 (m), 1017 (m), 1001 (w), 928 (m), 743 (s), 684 (m), 604 (m), 581 (m), 549 (m).

#### 8.6.4 1,2,3,4-Tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol-2-on **134**<sup>[124]</sup>



Die Lösung von 1.00 g (7.51 mmol) 2-Aminobenzimidazol **54** und 0.82 mL (7.53 mmol) Acrylsäureethylester in 3.5 mL Diglyme wurde für 5 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen und aus *n*-Butanol umkristallisiert. Es wurden 880 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (63 %).

$R_f$  = 0.82 (*n*-Hexan/EtOAc 1:3).

Smp: 267 – 268 °C; Lit: 268 – 270.<sup>[124]</sup>

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11.45 (br s, 1H, NH), 7.43 - 7.37 (m, 2H, Aryl-*H*), 7.13 - 7.09 (m, 2H, Aryl-*H*), 4.24 (t, 2H,  $J$  = 7.0 Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.88 (t, 2H,  $J$  = 7.0 Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

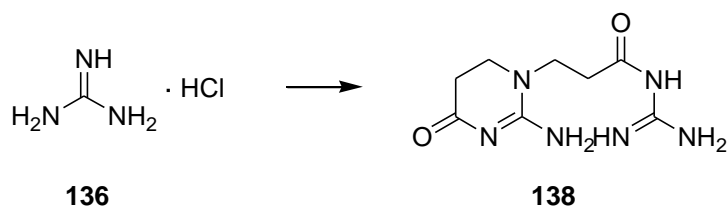
$^{13}\text{C}$ -NMR (62.9 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 168.1, 148.0, 141.7, 132.8, 121.2, 120.5, 117.1, 108.8, 36.8, 29.9.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 2712 (w), 1683 (m), 1634 (m), 1599 (m), 1575 (m), 1518 (m), 1455 (s), 1410 (m), 1378 (m), 1322 (m), 1301 (m), 1284 (m), 1233 (m), 1170 (m), 1014 (m), 898 (m), 874 (m), 798 (m), 773 (m), 758 (s), 744 (s), 711 (m), 635 (m), 588 (m), 559 (m), 486 (m).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 188.7 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 210.5 (17)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 374.8 (41)  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 396.7 (10)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$  berechnet 187.07.

HRMS (MALDI)  $m/z$  = 188.08188  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}+\text{H}^+$  berechnet 188.08184.

### 8.6.5 3-Amino-3-(3-propionsäureguanidin)-6-oxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin **138**<sup>[126]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.62 g (17.0 mmol) Guanidin-Hydrochlorid **136** in 4 mL MeOH (abs.) wurde unter Argon die Lösung von 918 mg (17.0 mmol) NaOMe in 8 mL MeOH (abs.) hinzuge tropft und die Lösung, in der sich ein farbloser Niederschlag bildete, für 30 min unter Eiskühlung gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 8.5 mL DMF (abs.) gelöst und tropfenweise mit 1.5 mL (17 mmol) Acrylsäuremethylester versetzt, wobei die Temperatur bei 25 – 30 °C gehalten wurde. Es bildete sich sofort ein farbloser Niederschlag. Die Suspension wurde für 2.5 h bei 25 – 30 °C gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit MeOH und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.03 g eines farblosen Feststoffs erhalten (54 %).

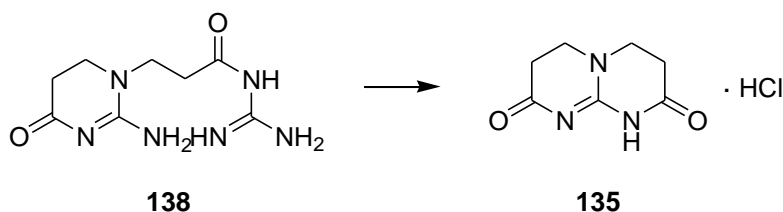
$R_f = 0.44$  (*n*-Butanol/AcOH/H<sub>2</sub>O/EtOAc 1:1:1:1).

Smp: 268 – 270 °C. Lit: 251 °C.<sup>[126]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 3.65$  (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.55 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, CH<sub>2</sub>N), 2.54 (t, 4H,  $J = 7.0$  Hz, 2 x CH<sub>2</sub>CO).

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3347$  (s), 2952 (m), 1651 (s), 1532 (s), 1428 (s), 1409 (s), 1328 (s), 1288 (m), 1234 (m), 1210 (m), 1196 (m), 1063 (w), 1001 (w), 932 (w), 860 (w), 786 (w), 734 (w), 687 (m), 661 (m), 630 (m), 584 (m), 548 (m), 522 (w), 443 (w).

### 8.6.6 3,4,6,7,8,9-Hexahydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidin-2,8-dion Hydrochlorid **135**<sup>[126]</sup>



517 mg (2.28 mmol) der Verbindung **138** wurden mit 0.8 mL 6 N HCl versetzt und bei RT 3 h stehen gelassen, wobei sich sofort farblose Nadeln bildeten. Die Fällung wurde durch Zugabe von MeOH vervollständigt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit viel MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 353 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (76 %).

$R_f = 0.49$  (*n*-Butanol/AcOH/H<sub>2</sub>O/EtOAc 1:1:1:1).

Smp: 249 – 252.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 3.83$  (t, 4H,  $J = 7.3$  Hz, CH<sub>2</sub>N), 2.84 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, CH<sub>2</sub>CO).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 166.6, 152.1, 44.8, 28.9$ .

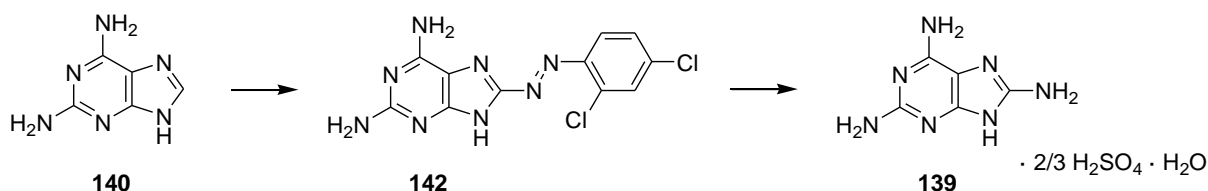
IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3159$  (m), 3075 (m), 2916 (m), 2845 (m), 1765 (s), 1687 (s), 1586 (s), 1409 (m), 1380 (w), 1352 (m), 1339 (m), 1263 (m), 1245 (m), 1192 (s), 1059 (w), 978 (m), 932 (w), 821 (m), 785 (w), 743 (w), 697 (m), 560 (m), 423 (m).

Elementaranalyse für C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HCl (203.63):

Berechnet: C, 41.29; H, 4.95; N, 20.64.

Gefunden: C, 41.02; H, 5.01; N, 20.90.

### 8.6.7 2,6,8-Triaminopurin **139**<sup>[128,129]</sup>



Zu der auf 0 °C gekühlten Suspension von 1.22 g (7.53 mmol) 2,4-Dichloranilin **141** in 5.8 mL HCl (konz.) wurde langsam die Lösung von 540 mg (7.82 mmol) NaNO<sub>2</sub> in 0.75 mL H<sub>2</sub>O hinzuge tropft. Nach 20 min Rühren bei 0 °C wurde zu der Suspension so lange Eis hinzugegeben, bis sich der Feststoff vollständig gelöst hatte. Die so erhaltene Diazoniumsalz-



Lösung wurde nun vorsichtig zu der auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.00 g (5.02 mmol) 2,6-Diaminopurin-Sulfat-Hydrat **140** in 40 mL 1.2 N Natronlauge hinzuge tropft. Die orangefarbene Reaktionslösung wurde mit 1.85 mL 19 N Natronlauge versetzt, nachdem die Hälfte der Diazoniumsalz-Lösung hinzuge tropft worden war. Nach dem vollständigen Zutropfen wurde die Reaktionslösung für 15 min bei RT gerührt und anschließend mit konz. HCl neutralisiert, wobei sich ein voluminöser roter Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, mehrfach mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Das so erhaltene Rohprodukt von **142** wurde ohne weitere Aufreinigung in 60 – 80 °C warmer 1.5 M Natronlauge suspendiert und portionsweise mit 6.00 g (34.5 mmol) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> versetzt, bis die Farbe der Suspension von dunkelrot auf gelbbraun umschlug. Der ockerbraune Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit Eisessig neutralisiert, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde zweimal aus 5%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dann zweimal aus H<sub>2</sub>O umkristallisiert. Es wurden 200 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

Smp: Zersetzung ab ca. 240 °C.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3334 (m), 3126 (m), 1633 (s), 1584 (s), 1468 (w), 1415 (m), 1340 (m), 1087 (s), 1051 (s), 990 (m), 962 (m), 839 (w), 757 (w), 609 (m), 565 (m).

MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 166.7 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> berechnet 165.08.

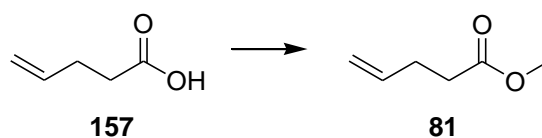
Elementaranalyse für C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> · 2/3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (248.56):

Berechnet: C, 24.16; H, 4.19; N, 39.45; S, 8.60.

Gefunden: C, 24.26; H, 4.27; N, 39.59; S, 8.54.

## 8.7 Sonstige Synthesen

### 8.7.1 4-Pentensäuremethylester **81**<sup>[155]</sup>



5.2 mL (51 mol) 4-Pentensäure **157** wurden bei 0 °C unter Argon tropfenweise mit 4.8 mL (56 mmol) Oxalylchlorid versetzt und zunächst 1 h bei 0 °C, dann 15 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde erneut auf 0 °C abgekühlt, tropfenweise mit 8.2 mL (0.20 mol) MeOH (abs.) versetzt und dann 1.5 h bei 0 °C und 23 h bei RT gerührt. Überschüssiges MeOH wurde abdestilliert, der Rückstand in 30 mL Et<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 10 mL 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie 10 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 4.00 g einer farblosen Flüssigkeit erhalten (69 %).

R<sub>f</sub> = 0.69 (*n*-Hexan/EtOAc 1:8).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.90 - 5.75 (m, 1H, *H*-C4), 5.10 - 4.98 (m, 2H, *H*-C5), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.46 - 2.34 (m, 4H, *H*-C(3), *H*-C2).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.5, 136.6, 115.5, 51.5, 33.4, 28.8.

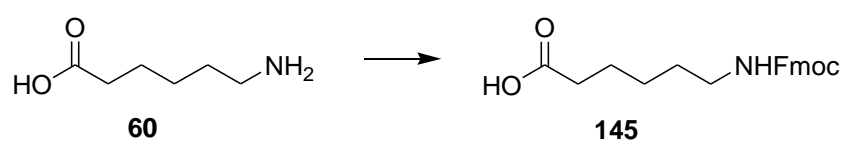
IR (NaCl):  $\tilde{\nu}$  = 3478 (w), 3289 (w), 3080 (m), 2985 (m), 2953 (m), 2851 (w), 1741 (s), 1643 (m), 1440 (m), 1359 (m), 1255 (m), 1172 (s), 1110 (m), 994 (m), 917 (m), 877 (w), 837 (w).

Elementaranalyse für C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> · 0.1 H<sub>2</sub>O (115.95):

Berechnet: C, 62.15; H, 8.87.

Gefunden: C, 62.26; H, 8.67.

### 8.7.2 6-[[*(9H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]hexansäure **145**



Zu der Lösung von 389 mg (2.96 mmol) 6-Aminohexansäure **60** in 20 mL eines 1:1-Gemisches aus Aceton und Wasser wurden 1.00 g (2.96 mmol) Fmoc-Succinimid und 250 mg (2.96 mmol) NaHCO<sub>3</sub> hinzugegeben. Die milchige Suspension wurde für 3 h bei RT gerührt.

Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 20 mL DCM versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase je einmal mit 10 mL 0.1 M HCl und Wasser gewaschen. Die Lösung wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 747 mg eines farblosen Feststoffs erhalten (71 %).

R<sub>f</sub> = 0.61 (DCM/MeOH 9:1).

Smp: 116 – 117 °C; Lit: 114 °C.<sup>[156]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.77 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, Aryl-*H*), 7.59 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Aryl-*H*), 7.43 - 7.37 (m, 2H, Aryl-*H*), 7.31 (dt, 2H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.4 Hz, Aryl-*H*), 4.82 - 4.72 (m, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 4.22 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, CH(Fmoc)), 3.24 - 3.16 (m, 2H, H-C6), 2.36 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, H-C2), 1.72 - 1.32 (m, 6H, H-C3, H-C4, H-C5).

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 178.8, 156.4, 144.0, 141.3, 127.6, 127.0, 125.0, 119.9, 66.5, 47.3, 40.8, 33.7, 29.6, 26.1, 24.2.

IR (pur):  $\tilde{\nu}$  = 3339 (m), 2952 (w), 1688 (s), 1530 (s), 1478 (w), 1462 (m), 1450 (m), 1415 (w), 1330 (m), 1292 (m), 1270 (m), 1253 (m), 1238 (m), 1197 (m), 1172 (w), 1131 (m), 1102 (m), 996 (m), 937 (m), 759 (m), 736 (s), 577 (m), 528 (m).

MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 354.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> berechnet 353.2.

## 8.8 Synthese der PNA-Konjugate

### 8.8.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von PNA-10meren an Festphase

Die PNA-10mere **PNA1** und **PNA2** wurden mittels manueller Festphasensynthese an Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladungsdichte 0.66 mmol/g) hergestellt. Nach dem Aufquellen des Harzes (100 mg, 0.066 mmol) in DCM für 1.5 h wurde die Festphase mehrfach mit NMP gewaschen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Freisetzung der Aminogruppe wurde die Festphase dreimal (15 min, 10 min, 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) behandelt. Anschließend wurde fünfmal mit NMP gewaschen. Zur Kupplung der Lysin-Bausteine bzw. der PNA-Monomere wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure bzw. das Fmoc-geschützte PNA-Monomer (je 3 eq.) zusammen mit HOBt (3 eq.) und DIC (3 eq.) in 1 mL NMP gelöst. Die Lösung wurde für fünf Minuten geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde so lange bei RT geschüttelt, bis der Kaiser-Test eine komplette Umsetzung anzeigte. Bei unvollständiger Umsetzung auch nach mehrstündigem Schütteln wurden zwei weitere eq. des zu kuppelnden Bausteins sowie der Kupplungsreagenzien hinzugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Festphase mehrfach mit NMP gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe wie beschrieben abgespalten. Nach fünfmaligem Waschen mit NMP wurde der nächste Baustein gekuppelt. Nach vollständiger Kupplung aller Bausteine wurde die noch Fmoc-geschützte Festphase zehnmal mit DCM gewaschen und bis zur Verwendung für die Konjugation von RNA-Spaltern bei -20 °C gelagert.

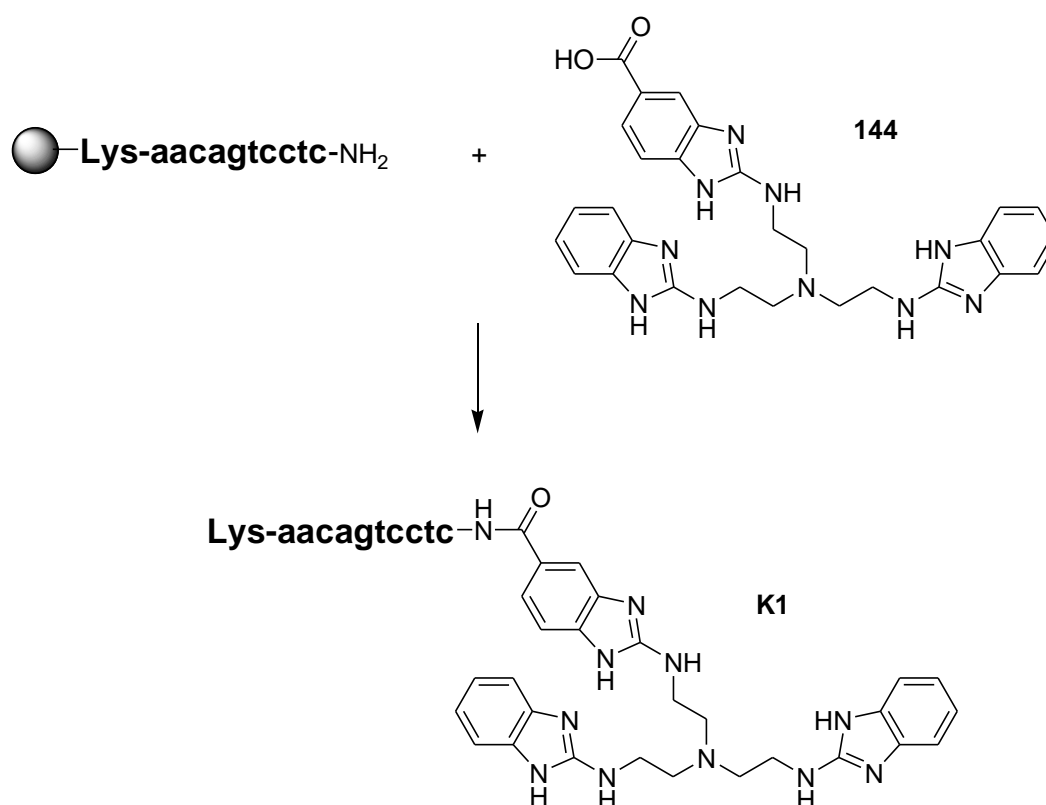
Um den vollständigen Aufbau der gewünschten PNA zu überprüfen, wurde eine kleine Probe der Festphase zweimal (3 h, 30 min) mit Abspalllösung (TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 9.5:0.5:0.5) behandelt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde dreimal in kaltem Et<sub>2</sub>O suspendiert, der Feststoff abzentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet, in H<sub>2</sub>O gelöst und erneut im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Zur Überprüfung des vollständigen Aufbaus des 10mers wurde ein MALDI-Massenspektrum aufgenommen.

### 8.8.2 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von PNA-15meren an Festphase

Die PNA15mere **PNA3**, **PNA4** und **PNA5** wurden mittels automatischer Festphasen-Synthese mit einem Mikrowellen-Peptid-Synthesizer in Kooperation mit der Gruppe von R. Strömberg am Karolinska Institut von A. Ghidini bzw. P. Dogandzhyski nach der Fmoc-Strategie synthetisiert. Es wurden 40 mg (0.022 mmol) des Rink-Amid-Harzes (Beladungsdichte

0.54 mmol/g) eingesetzt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte bei RT mit Piperidin (20 % in NMP). Für die Kupplung der Lysin-Bausteine bzw. der PNA-Monomere (je 3.5 eq.) wurden Oxyma und DIC (je 3.5 eq.) als Kupplungsreagenzien verwendet und die Suspension aus Festphase und Kupplungslösung für 6 min durch Mikrowellenbestrahlung auf 75 °C erhitzt. Nach jedem Kupplungsschritt wurde die Festphase mit einer Capping-Lösung (Essigsäureanhydrid/Lutidin/NMP 5:6:89) behandelt. Die Überprüfung des vollständigen Aufbaus der 15mere erfolgte wie unter 8.8.1 beschrieben.

### 8.8.3 Synthese des PNA-Konjugats K1



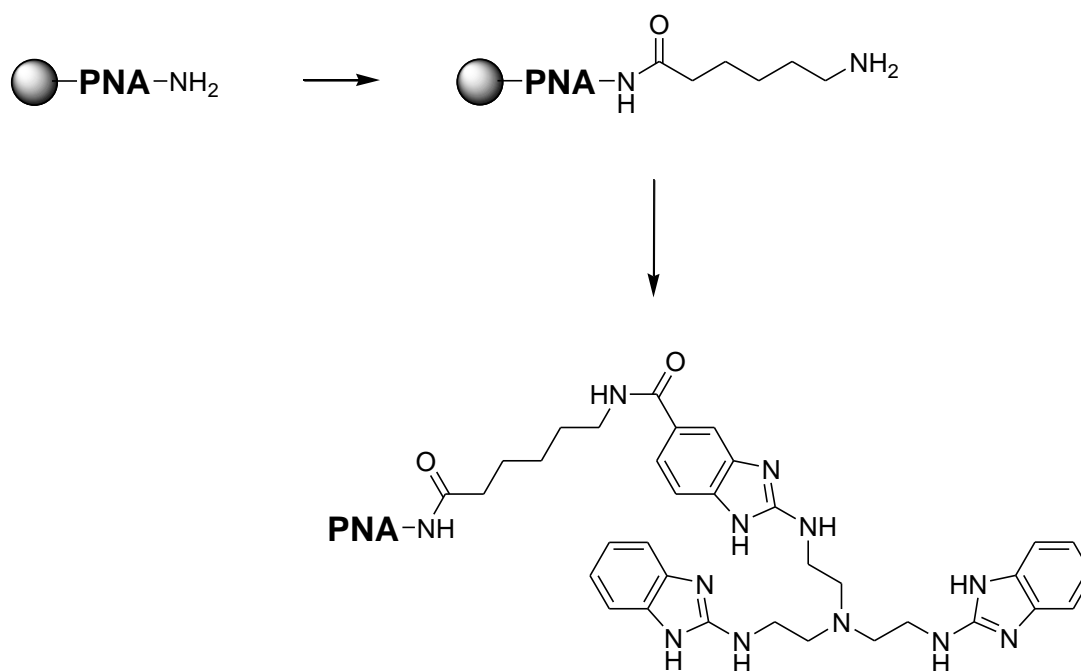
20 mg der festphasengebundenen und vollständig geschützten **PNA1** wurden für 30 min in DCM aufgequollen und mehrfach mit DMF gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit DMF gewaschen. Für die Kupplung des Spalters wurden 50 mg (72 µmol) der freien Carbonsäure **144** in 360 µL DMF gelöst und mit 11 mg HOBt (72 µmol), 40 µL NEt<sub>3</sub> (0.29 mmol) sowie 11 µL DIC (72 µmol) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 72 h bei RT geschüttelt, bis der Kaiser-Test eine nahezu vollständige Umsetzung anzeigte. Die Festphase wurde jeweils fünfmal mit DMF, DCM und MeOH

gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung und Entschützung des Konjugats wurde die Festphase zweimal (3 h bzw. 30 min) mit einer Lösung aus TFA, H<sub>2</sub>O und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dreimal in kaltem Et<sub>2</sub>O suspendiert, abzentrifugiert (6000 rpm) und das Lösungsmittel dann abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet, in H<sub>2</sub>O gelöst und erneut im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohkonjugat wurde per HPLC aufgereinigt.

MS (MALDI)  $m/z = 3320.3 [M+H]^+$ , C<sub>140</sub>H<sub>175</sub>N<sub>69</sub>O<sub>31</sub> berechnet: 3318.4.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Jupiter C12 Proteo 90 Å, 250 x 15, 4 µm, linearer Gradient von 0 – 35 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 6.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, linearer Gradient von 0 – 35 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 1.0 mL/min, 254 nm,  $t_R = 14.41$  min.

#### 8.8.4 Synthese der PNA-Konjugate K2 – K6



**K2:** PNA = Lys-aacagtcctc  
**K3:** PNA = Lys-gctgacggct  
**K4:** PNA = LysLys-tatggaacagtcctc  
**K5:** PNA = LysLys-gatcggctgacggct  
**K6:** PNA = LysLys-atttcacgaatatca

20 mg der festphasengebundenen und vollständig geschützten jeweiligen PNA wurden für 30 min in DCM aufgequollen und mehrfach mit DMF gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit DMF gewaschen.

Für die Kupplung des Linkers wurden 25 mg (72  $\mu\text{mol}$ ) der Carbonsäure **145** in 360  $\mu\text{L}$  DMF gelöst und mit 11 mg HOBT (72  $\mu\text{mol}$ ) sowie 11  $\mu\text{L}$  DIC (72  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 24 h bei RT geschüttelt, bis der Kaiser-Test eine vollständige Umsetzung anzeigte. Die Festphase wurde fünfmal mit DMF gewaschen. Die Kupplung des Spalters sowie die Abspaltung von der Festphase erfolgten wie unter 8.8.3 beschrieben.

#### 8.8.4.1 PNA-Konjugat K2

MS (MALDI)  $m/z = 3433.5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{146}\text{H}_{186}\text{N}_{70}\text{O}_{32}$  berechnet: 3431.5.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Jupiter C12 Proteo 90 Å, 250 x 15, 4  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 27 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 6.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 1 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_R = 14.73$  min.

#### 8.8.4.2 PNA-Konjugat K3

MS (MALDI)  $m/z = 3504.6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{147}\text{H}_{186}\text{N}_{72}\text{O}_{34}$  berechnet: 3503.5.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 1 – 35 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 0.8 mL/min, 254 nm,  $t_R = 17.99$  min.

#### 8.8.4.3 PNA-Konjugat K4

MS (MALDI)  $m/z = 4948.3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{207}\text{H}_{265}\text{N}_{101}\text{O}_{49}$  berechnet: 4949.1.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 55 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 1 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_R = 14.99$  min.

#### 8.8.4.4 PNA-Konjugat K5

MS (MALDI)  $m/z = 5006.1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{209}\text{H}_{266}\text{N}_{102}\text{O}_{50}$  berechnet: 5004.1.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 55 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex

Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 1 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_{\text{R}} = 14.89$  min.

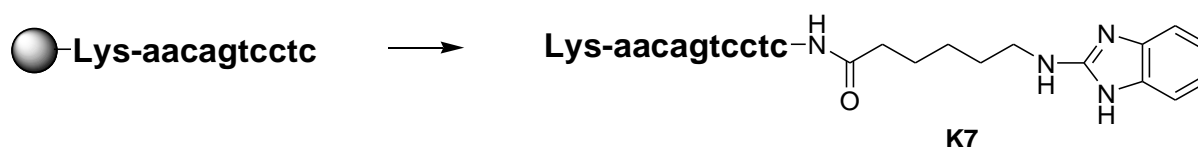
#### 8.8.4.5 PNA-Konjugat K6

Das PNA-Konjugat **K6** wurde von P. Dogandzhiyski synthetisiert und für Spaltexperimente zur Verfügung gestellt.

MS (MALDI)  $m/z = 4933.2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{208}\text{H}_{266}\text{N}_{100}\text{O}_{48}$  berechnet: 4932.1.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 60 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_{\text{R}} = 22.12$  min.

#### 8.8.5 Synthese des PNA-Konjugats K7



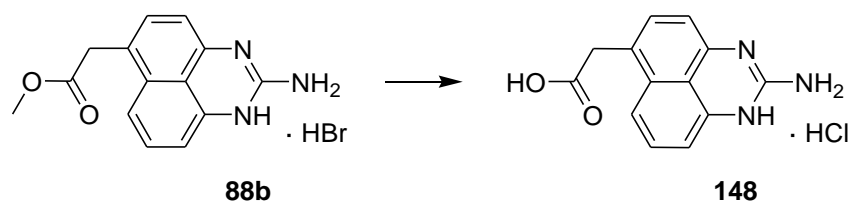
29 mg der festphasengebundenen und vollständig geschützten **PNA1** wurden für 30 min in DCM aufgequollen und mehrfach mit DMF gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit DMF gewaschen. Für die Kupplung des Spalters wurden 28 mg (99  $\mu\text{mol}$ ) der freien Carbonsäure **59** in 500  $\mu\text{L}$  DMF gelöst und mit 13 mg HOBt (99  $\mu\text{mol}$ ), 14  $\mu\text{L}$   $\text{NEt}_3$  (99  $\mu\text{mol}$ ) sowie 16  $\mu\text{L}$  DIC (99  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 48 h bei RT geschüttelt, bis der Kaiser-Test eine nahezu vollständige Umsetzung anzeigte. Die Festphase wurde jeweils fünfmal mit DMF, DCM und MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung und Entschützung des Konjugats wurde die Festphase zweimal (3 h bzw. 30 min) mit einer Lösung aus TFA,  $\text{H}_2\text{O}$  und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dreimal in kaltem  $\text{Et}_2\text{O}$  suspendiert, abzentrifugiert (6000 rpm) und das Lösungsmittel dann abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet, in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und erneut im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohkonjugat wurde per HPLC aufgereinigt.

MS (MALDI)  $m/z = 3028.0$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{125}\text{H}_{162}\text{N}_{62}\text{O}_{31}$  berechnet: 3027.3.

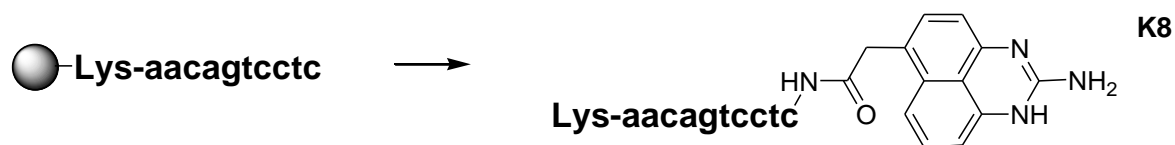


HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Jupiter C12 Proteo 90 Å, 250 x 15, 4 µm, linearer Gradient von 0 – 27 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 6.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, linearer Gradient von 1 – 30 % MeCN in 0.1 % TFA für 20 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_R = 13.24$  min.

### 8.8.6 Synthese des PNA-Konjugats K8



105 mg (0.41 mmol) **88b** wurden in 4 mL 6 N HCl suspendiert, für 5 h auf 100 °C erhitzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit kleinen Mengen Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 76 mg eines grauen Feststoffs erhalten (76 %), der direkt für die Konjugation an PNA verwendet wurde. Die Vollständigkeit der Esterhydrolyse wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$  überprüft.



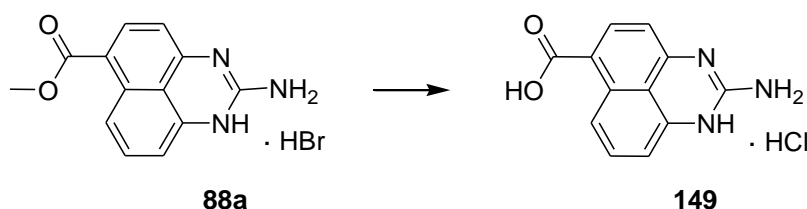
10 mg der festphasengebundenen und vollständig geschützten **PNA1** wurden für 30 min in DCM aufgequollen und mehrfach mit NMP gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit NMP gewaschen. Für die Kupplung des Spalters wurden 11 mg (18 µmol) der freien Carbonsäure **148** in 300 µL NMP gelöst und mit 11 mg HOBt (72 µmol) sowie 11 µL DIC (72 µmol) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 21 h bei RT geschüttelt. Die Festphase wurde jeweils fünfmal mit NMP, DCM und MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung und Entschützung des Konjugats wurde die Festphase zweimal (3 h bzw. 30 min) mit einer Lösung aus TFA, H<sub>2</sub>O und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dreimal in kaltem Et<sub>2</sub>O suspendiert, abzentrifugiert (6000 rpm) und das Lösungsmittel dann abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet, in

H<sub>2</sub>O gelöst und erneut im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohkonjugat wurde per HPLC aufgereinigt.

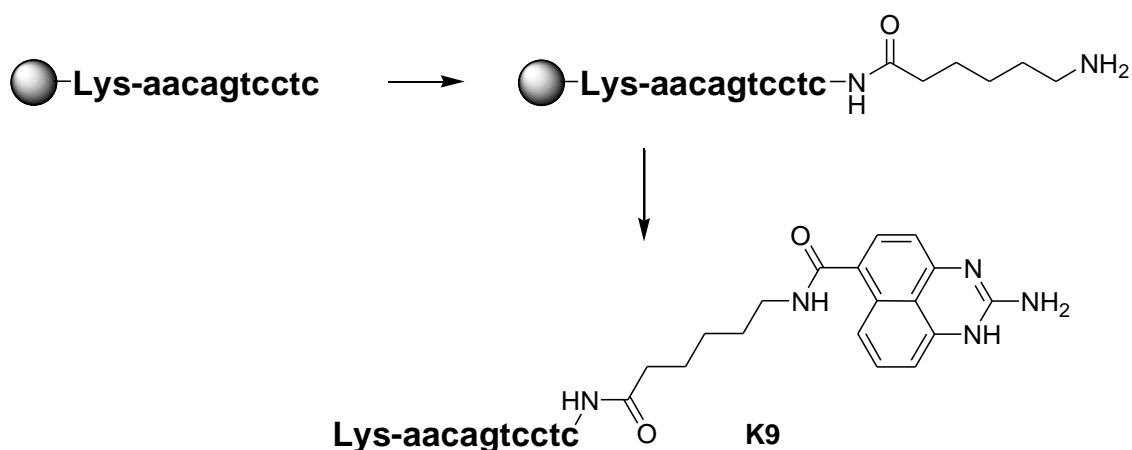
MS (MALDI)  $m/z = 3022.4 [M+H]^+$ , C<sub>125</sub>H<sub>156</sub>N<sub>62</sub>O<sub>31</sub> berechnet: 3021.3.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 10 – 20 % MeCN in 0.1 % TFA für 8 min, dann linearer Gradient von 20 – 45 % MeCN in 0.1 % TFA für 17 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, linearer Gradient von 10 – 20 % MeCN in 0.1 % TFA für 5 min, dann linearer Gradient von 20 – 45 % MeCN in 0.1 % TFA für 10 min, 0.8 mL/min, 254 nm,  $t_R = 10.23$  min.

### 8.8.7 Synthese des PNA-Konjugats K9



264 mg (0.82 mmol) **149** wurden in 5 mL 6 N HCl suspendiert, für 7.5 h auf 100 °C erhitzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 187 mg eines grauen Feststoffs erhalten (87 %), der direkt für die Konjugation an PNA verwendet wurde. Die Vollständigkeit der Esterhydrolyse wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR überprüft.



10 mg der festphasengebundenen und vollständig geschützten jeweiligen PNA wurden für 30 min in DCM aufgequollen und mehrfach mit DMF gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit DMF gewaschen.

Für die Kupplung des Linkers wurden 13 mg (36  $\mu\text{mol}$ ) der Carbonsäure **145** in 180  $\mu\text{L}$  DMF gelöst und mit 6 mg HOBt (36  $\mu\text{mol}$ ) sowie 6  $\mu\text{L}$  DIC (36  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 24 h bei RT geschüttelt, bis der Kaiser-Test eine vollständige Umsetzung anzeigte. Die Festphase wurde fünfmal mit DMF gewaschen. Durch dreimaliges Schütteln (15, 10 und 5 min) mit Piperidin (20 % in DMF) wurde erneut die endständige Aminogruppe freigesetzt. Anschließend wurde die Festphase fünfmal mit DMF gewaschen. Für die Kupplung des Spalters wurden 10 mg (36  $\mu\text{mol}$ ) der freien Carbonsäure **149** in 250  $\mu\text{L}$  DMF gelöst und mit 6 mg HOBt (36  $\mu\text{mol}$ ), 5  $\mu\text{L}$   $\text{NEt}_3$  (0.36 mmol) sowie 6  $\mu\text{L}$  DIC (36  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und dann zur Festphase hinzugegeben. Die so erhaltene Suspension wurde für 20 h bei RT geschüttelt. Die Festphase wurde jeweils fünfmal mit DMF, DCM und MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung und Entschützung des Konjugats wurde die Festphase zweimal (3 h bzw. 30 min) mit einer Lösung aus TFA,  $\text{H}_2\text{O}$  und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen wurden bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dreimal in kaltem  $\text{Et}_2\text{O}$  suspendiert, abzentrifugiert (6000 rpm) und das Lösungsmittel dann abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet, in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und erneut im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohkonjugat wurde per HPLC aufgereinigt.

MS (MALDI)  $m/z = 3121.5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{130}\text{H}_{165}\text{N}_{63}\text{O}_{32}$  berechnet: 3120.3.

HPLC-Bedingungen: präparativ: Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 - 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 55 min, 4.0 mL/min, 254 nm; analytisch: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 0 – 50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 1 mL/min, 254 nm,  $t_R = 14.82$  min.

## 8.9 Experimentelle Bedingungen für Spaltexperimente und Aggregationsstudien

### Kommerziell erhältliche Guanidin- und Amidin-Analoga

Folgende im Rahmen dieser Arbeit als RNA-Spalter getestete Verbindungen wurden kommerziell erworben: 2-Aminoperimidin-Hydrobromid (*Fluka*), 2-Aminobenzimidazol (*Alfa Aesar*), 2-Aminochinolin (*Maybridge*), Melamin (*Fluka*).

### Kontaminationsfreies Arbeiten

Zur Vermeidung von Kontamination durch RNasen wurden Einweghandschuhe (Latex) getragen und sterilisierte Glasgeräte (mindestens 6 Stunden bei 180 °C) verwendet. Zudem kamen zertifiziert RNase-freie Einwegpipettenspitzen (*Eppendorf* bzw. *Nerbe plus*) und Mikroreaktionsgefäße (*Eppendorf*) zum Einsatz. Die RNA-Spaltexperimente wurden in mit DEPC behandeltem Wasser durchgeführt. Um dieses zu erhalten, wurde Millipore-Wasser (stark deionisiertes Wasser, 18.2  $\mu\Omega$ ) mit 0.1 Vol.-% DEPC versetzt, über Nacht stehen gelassen und autoklaviert (20 min bei 121 °C und 2.1 bar).

### Cy5-markierte Oligonucleotide

Für die Spalt- und FCS-Experimente wurden Cy5-markierte RNA- und DNA-Oligonucleotide der Firma *Biospring* verwendet. Bei der enantiomeren RNA **ent-RNA1** handelt es sich um eine Spende der *NOXXON-Pharma AG*.

### Konzentrationsbestimmungen von Nucleinsäurelösungen

Die Konzentrationen von Nucleinsäurelösungen wurden mit Hilfe eines NanoDrop 2000c Spektrophotometers der Firma *Thermo Scientific*, ausgestattet mit der NanoDrop 2000/2000c-Software, bestimmt.

### Spaltexperimente mit RNA

In einem Endvolumen von jeweils 10  $\mu\text{L}$  wurde das jeweilige RNA-Substrat (150 nM bzw. 4  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM TRIS-HCl-Puffer bei pH 6, 7 oder 8 mit dem zu testenden RNA-Spalter in der angegebenen Konzentration versetzt. Alle Proben wurden für 20 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 15  $\mu\text{L}$  Ladepuffer (bei einer Substrat-Konzentration von 150 nM) bzw. 355  $\mu\text{L}$  Ladepuffer und 300  $\mu\text{L}$  DEPC-Wasser (bei einer Substratkonzentration von 4  $\mu\text{M}$ ) versetzt und bis zur Analyse bei -25 °C eingefroren. Bei den Spaltexperimenten mit PNA-Konjugaten wurde Formamid-Ladepuffer (5 mg Dextranblau in 1 mL Formamid), ansonsten

ein mit Harnstoff angereicherter Ladepuffer (8 M Harnstoff, 20 mM EDTA und 0.2 % Crocein Orange in DEPC-Wasser) verwendet.

### **Spaltkinetiken**

Für die Bestimmung von Spaltkinetiken wurden größere Ansatzvolumina gewählt und im Verlauf von 8 Tagen zu verschiedenen Zeitpunkten Proben von je 10 µL entnommen, mit Formamid-Ladepuffer versetzt und bis zur Analyse bei -25 °C eingefroren. Die Spallösungen enthielten je 150 nM RNA-Substrat, 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 8), 100 mM NaCl und 750 nM des getesteten PNA-Konjugats.

### **Hydrolyseleiter**

Um eine Hydrolyseleiter zur Zuordnung der Spaltfragmente zu erhalten, wurden 20 µL einer 750 nM Lösung des jeweiligen RNA-Substrats mit dem gleichen Volumen einer 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Die so erhaltene Lösung wurde für 12 min auf 90 °C erhitzt und die Hydrolyse-Reaktion dann durch Zugabe von 10 µL 1 M HOAc gestoppt. Anschließend wurde mit 75 µL des jeweils verwendeten Ladepuffers verdünnt.

### **Auswertung der Spaltexperimente mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Spaltfragmente wurden durch denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (16 % Monomer, 8 M Harnstoff) mit dem DNA-Sequenzierer *ALFexpress* der Firma *Amersham Biosciences* aufgetrennt. Je 10 µL der zuvor mit Ladepuffer versetzten Proben wurden auf das Gel geladen. Es wurden folgende Laufbedingungen gewählt: 1500 V, 60 mA, 25 W (konstant), 60 °C, 2 s Probenintervall und 400 min Laufzeit. Zur Analyse der Elektropherogramme wurde das AlleleLinks 1.01 Software-Paket (*Amersham Biosciences*) verwendet. Die Signalflächen wurden summiert und der Prozentsatz an gespaltener RNA berechnet. Alle Experimente wurden mindestens zweifach durchgeführt.

### **FCS-Experimente**

Aggregations-Experimente wurden mit einem ConfoCor 2 (*Carl Zeiss*) durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit einem Axiovert 200 M-Mikroskop mit einem für Laser geeigneten C-Apochromat 40x/1.2W Corr-Wasser-Immersionsobjektiv (*Carl Zeiss*). Die Bestimmung der Diffusionszeiten (bei 24 °C) und der durchschnittlichen Anzahl fluoreszierender Teilchen erfolgte mit der Software Fluorescence Correlation Microscope ConfoCor 2 in der Version 3.2 SP1. Für die Kalibrierung des Gerätes (Anregungsquelle: He/Ne-Laser bei 633 nm) wurde freier Cy5-Farbstoff verwendet. Als Probenträger dienten Deckgläschen von *Roth*. Es wurde

---

unter zu den Spaltexperimenten analogen Bedingungen gearbeitet: Die Cy5-markierte **DNA1** (19 nM) und die ungelabelte **DNA2** (131 nM) wurden in 50 mM TRIS-Puffer bei pH 6, 7 oder 8 mit der angegebenen Konzentration des Spalters versetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 30  $\mu$ L erhalten wurde. Der Inkubationsschritt zur Erfassung der Aktivität des Spalters wurde ausgelassen. Jede Probe (Tropfen mit einem Volumen von 30  $\mu$ L) wurde fünfmal für jeweils 30 s gemessen.

---

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AM1	Austin Model 1
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc-ON	2-( <i>tert</i> -Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DETA	Diethylentriamin
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
Diglyme	Diethylenglykoldimethylether
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELS	<i>evaporative light scattering</i>
<i>ent</i>	<i>enantio</i>
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl

---

FCS	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPNP	2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat
IR	Infrarot
konz.	konzentriert
Lit.	Literatur
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Me	Methyl
MMFF	Merck Molecular Force Field
ncRNA	nicht codierende RNA
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclearmagnetische Resonanz
NpN	Nucleosidmonophosphat
NpNp	Nucleosiddiphosphat
ODN	Oligodesoxynucleotid
ORN	Oligoribonucleotid
Oxyma	Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PNA	Peptidnucleinsäure

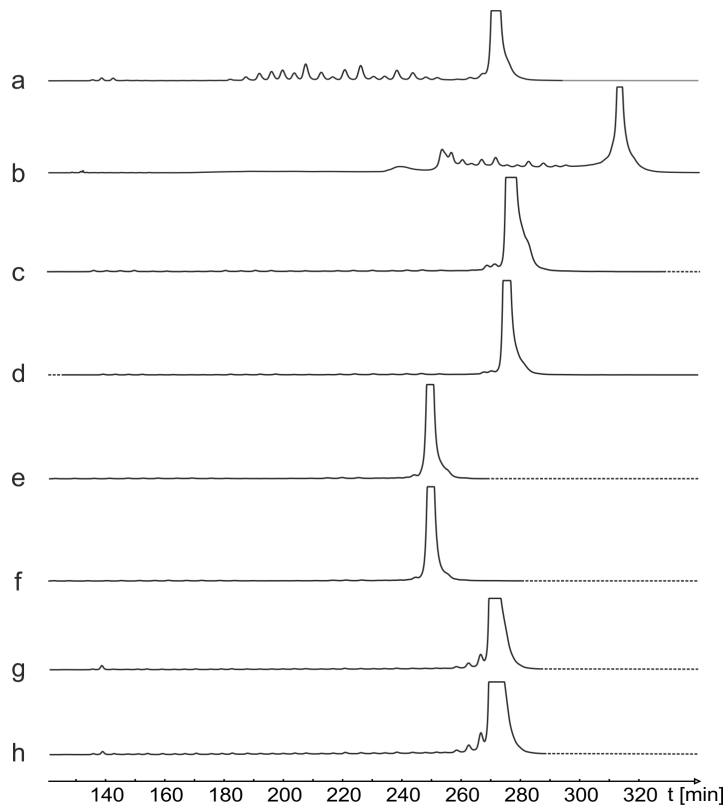


---

PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
TAC	4- <i>tert</i> -Butylphenoxyacetyl
TAR	<i>Trans-activation response element</i>
TBI	Tris(2-aminobenzimidazol)
TCDI	1,1'-Thiocarbonyldiimidazol
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TPBA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(2-pyridylmethyl)-3,5-bis(aminomethyl)benzol
$t_R$	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UATR	Universale Abgeschwächte Totalreflexion
UPNP	Uridin-3'- <i>p</i> -nitrophenylphosphat
UpU	Uridyl(3'-5')uridin
UV	Ultraviolett

## 9.2 Zusätzliche Kreuz-Spaltexperimente

Weitere Kreuz-Spaltexperimente zur Überprüfung der Substratspezifität verschiedener Tris(2-aminobenzimidazol)-PNA-Konjugate (150 nM Substrat, 750 nM Konjugat, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 37 °C, 20 h). a: **RNA1** mit Konjugat **K3**. b: **RNA1** mit Konjugat **K5**. c: **RNA3** mit Konjugat **K3**. d: **RNA3** mit Konjugat **K5**. e: **RNA4** mit Konjugat **K3**. f: **RNA4** mit Konjugat **K5**. g: **RNA1** mit Konjugat **K4**. h: **RNA1** mit Konjugat **K6**.



### 9.3 Literaturverzeichnis

- [1] H. Großhans, W. Filipowicz, *Nature* **2008**, *451*, 414–416.
- [2] a) T. Hermann, E. Westhof, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 66–73; b) J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378–1398;
- [3] H. Ling, M. Fabbri, G. A. Calin, *Nature reviews. Drug discovery* **2013**, *12*, 847–865.
- [4] M. Murtola, M. Wenska, R. Strömberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8984–8990.
- [5] T. Niittymäki, H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 15–25.
- [6] H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1687–1703.
- [7] U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2211–2217.
- [8] K. Dörr, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2010**.
- [9] U. Kaukinen, S. Lyytikäinen, S. Mikkola, H. Lönnberg, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 468–474.
- [10] K. S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747–1760.
- [11] D. M. Brown, A. R. Todd, *Annu. Rev. Biochem.* **1955**, *24*, 311–338.
- [12] F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 70–78.
- [13] U. Kaukinen, T. Venäläinen, H. Lönnberg, M. Peräkylä, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2439–2447.
- [14] P. Järvinen, M. Oivanen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5396–5401.
- [15] G. R. Marshall, J. A. Feng, D. J. Kuster, *Biopolymers* **2008**, *90*, 259–277.
- [16] a) M. Kunitz, *Science* **1939**, *90*, 112–113; b) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* **1940**, *24*, 15–32;
- [17] a) Hirs, C. H. W., S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 633–647; b) D. G. Smyth, W. H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 227–234;
- [18] G. Kartha, J. Bello, D. Harker, *Nature* **1967**, *213*, 862–865.
- [19] R. T. Raines, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045–1065.
- [20] D. Findlay, D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin, C. A. Ross, *Nature* **1961**, *190*, 781–784.
- [21] J. A. Gerlt, P. G. Gassman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11943–11952.
- [22] J. F. Davies, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, D. A. Matthews, *Science* **1991**, *252*, 88–95.
- [23] F. A. Cotton, E. E. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1979**, *76*, 2551–2555.

- 
- [24] D. Desbouis, I. P. Troitsky, M. J. Belousoff, L. Spiccia, B. Graham, *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 897–937.
- [25] B. N. Trawick, A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 939–960.
- [26] J. R. Morrow, O. Iranzo, *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 192–200.
- [27] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Curr. Issues Mol. Biol.* **1999**, *1*, 89–104.
- [28] S. Bradford, Y. Kawarasaki, J. A. Cowan, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, *103*, 871–875.
- [29] M. Gaglione, G. Milano, A. Chambery, L. Moggio, A. Romanelli, A. Messere, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 2490.
- [30] a) S. G. Chaulk, J. P. Pezacki, A. M. MacMillan, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10448–10453;  
b) L. Guan, M. D. Disney, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1462–1465;
- [31] M. Murtola, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3837–3842.
- [32] K. Dimroth, L. Jaenicke, D. Heinzl, *Liebigs Ann. Chem.* **1950**, *566*, 206–210.
- [33] J. J. Butzow, G. L. Eichhorn, *Biopolymers* **1965**, *3*, 95–107.
- [34] G. L. Eichhorn, J. J. Butzow, *Biopolymers* **1965**, *3*, 79–94.
- [35] K. Matsumura, M. Endo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019–2020.
- [36] J. Hall, D. Hüsken, U. Pielers, H. E. Moser, R. Häner, *Chemistry & Biology* **1994**, *1*, 185–190.
- [37] D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2293–2294.
- [38] D. Magda, M. Wright, S. Crofts, A. Lin, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6947–6948.
- [39] J. Hall, D. Hüsken, R. Häner, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3522–3526.
- [40] K. Nwe, C. M. Andolina, J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14861–14871.
- [41] A. M. Ramadan, Calatayud Sala, José Miguel, T. N. Parac-Vogt, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1230–1232.
- [42] A. Kuzuya, R. Mizoguchi, T. Sasayama, J.-M. Zhou, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1430–1436.
- [43] Y. Shi, A. Kuzuya, K. Machida, M. Komiyama, *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 3703–3706.

- 
- [44] A. Kuzuya, Y. Shi, K. Tanaka, K. Machida, M. Komiyama, *Chemistry Letters* **2009**, *38*, 432–433.
- [45] A. Kuzuya, Y. Shi, T. Sasayama, M. Komiyama, *J Biol Inorg Chem* **2005**, *10*, 270–274.
- [46] J. K. Bashkin, E. I. Frolova, U. Sampath, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5981–5982.
- [47] A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Commun.* **1998**, 1077–1078.
- [48] B. N. Trawick, T. A. Osiek, J. K. Bashkin, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 900–905.
- [49] H. Inoue, T. Furukawa, M. Shimizu, T. Tamura, M. Matsui, E. Ohtsuka, *Chem. Commun.* **1999**, 45–46.
- [50] H. Inoue, T. Furukawa, T. Tamura, A. Kamada, E. Ohtsuka, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 833–835.
- [51] S. Sakamoto, T. Tamura, T. Furukawa, Y. Komatsu, E. Ohtsuka, M. Kitamura, H. Inoue, *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 1416–1425.
- [52] W. C. Putnam, J. K. Bashkin, *Chem. Commun.* **2000**, 767–768.
- [53] W. C. Putnam, A. T. Daniher, B. N. Trawick, J. K. Bashkin, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*.
- [54] M. J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577–10578.
- [55] T. Gajda, A. Jancsó, S. Mikkola, H. Lönnberg, H. Sirges, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 1757–1763.
- [56] S. Liu, A. D. Hamilton, *Chem. Commun.* **1999**, 587–588.
- [57] R. Cacciapaglia, A. Casnati, L. Mandolini, A. Peracchi, D. N. Reinhoudt, R. Salvio, A. Sartori, R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12512–12520.
- [58] J. Hovinen, A. Guzaev, E. Azhayeva, A. Azhayev, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2205–2209.
- [59] H. Åström, Nicholas H. Williams, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1461–1465.
- [60] H. Åström, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1901–1907.
- [61] A. Whitney, G. Gavory, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2003**, 36–37.
- [62] T. Niittymäki, U. Kaukinen, P. Virta, S. Mikkola, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 174–184.
- [63] T. Niittymäki, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1275–1280.
- [64] S. Matsuda, A. Ishikubo, A. Kuzuya, M. Yashiro, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3284–3286.

- 
- [65] T. Niittymäki, P. Virta, K. Ketomäki, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1583–1592.
- [66] Q. Wang, H. Lönnberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10716–10728.
- [67] M. Laine, K. Ketomäki, P. Pöijärvi-Virta, H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2780–2787.
- [68] M. Komiyama, T. Inokawa, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 77–78.
- [69] M. Komiyama, T. Inokawa, *J. Biochem.* **1994**, *116*, 719–720.
- [70] M. Endo, Y. Azuma, Y. Saga, A. Kuzuya, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 846–852.
- [71] J. C. Verheijen, Deiman, Birgit A. L. M., E. Yeheskiely, van der Marel, Gijs A., J. H. van Boom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 369–371.
- [72] M. A. Reynolds, T. A. Beck, P. B. Say, D. A. Schwartz, B. P. Dwyer, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, M. D. Metzler, R. E. Klem, Arnold, Lyle J. Jr, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 760–765.
- [73] B. Verbeure, C. J. Lacey, M. Froeyen, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 333–350.
- [74] N. G. Beloglazova, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *FEBS Letters* **2000**, *481*, 277–280.
- [75] N. G. Beloglazova, M. M. Fabani, M. A. Zenkova, E. V. Bichenkova, N. N. Polushin, V. N. Silnikov, K. T. Douglas, V. V. Vlassov, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3887–3897.
- [76] N. G. Beloglazova, A. Y. Epanchintsev, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *Mol. Biol.* **2002**, *36*, 581–588.
- [77] N. G. Beloglazova, M. M. Fabani, N. N. Polushin, V. V. Sil'nikov, V. V. Vlassov, E. V. Bichenkova, M. A. Zenkova, *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 1–17.
- [78] K. Ushijima, H. Gouzu, K. Hosono, M. Shirakawa, K. Kagosima, K. Takai, H. Takaku, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1998**, *1379*, 217–223.
- [79] N. L. Mironova, D. V. Pyshnyi, E. M. Ivanova, V. F. Zarytova, M. A. Zenkova, H. J. Gross, V. V. Vlassov, *Russ. Chem. Bull.* **2002**, *51*, 1177–1186.
- [80] E. Riguet, S. Tripathi, B. Chaubey, J. Désiré, V. N. Pandey, J.-L. Décout, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4806–4809.
- [81] B. Chaubey, S. Tripathi, J. Désiré, I. Baussanne, J.-L. Décout, V. N. Pandey, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 302–313.

- 
- [82] R. Salvio, L. Mandolini, C. Savelli, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7259–7263.
- [83] R. Salvio, R. Cacciapaglia, L. Mandolini, F. Sansone, A. Casnati, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 34412.
- [84] R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 49–58.
- [85] C. Gnaccarini, S. Peter, U. Scheffer, S. Vonhoff, S. Klussmann, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8063–8067.
- [86] a) A. R. Katritzky, B. V. Rogovoy, *ARKIVOC* **2005**, 49–87; b) J. C. Manimala, E. V. Anslyn, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3909–3922;
- [87] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, M. A. Lipton, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1540–1542.
- [88] S. Osada, S. Sano, M. Ueyama, Y. Chuman, H. Kodama, K. Sakaguchi, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 605–611.
- [89] K.-C. Liu, H.-S. Huang, S.-M. Lin, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1990**, *323*, 61–62.
- [90] M. Zeiger, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt, **2007**.
- [91] J. M. Herbert, P. D. Woodgate, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2081–2086.
- [92] J. M. Herbert, P. D. Woodgate, W. A. Denny, *Heterocycles* **1987**, *26*, 1043–1050.
- [93] I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3009–3066.
- [94] M. Suhartono, M. Weidlich, T. Stein, M. Karas, G. Dürner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1608–1614.
- [95] G. Esteban, M. A. López-Sánchez, E. Martínez, J. Plumet, *Tetrahedron* **54**, *1998*, 197–212.
- [96] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- [97] E.-i. Negishi, A. O. King, N. Okukado, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1821–1823.
- [98] J. E. Moore, US4785019 A1, **1988**.
- [99] M. J. Leach, M. S. Nobbs, EP0459830 A1, **1991**.
- [100] F. Shi, J. K. Shen, D. Chen, K. Fog, K. Thirstrup, M. Hentzer, J.-J. Karlsson, V. Menon, K. A. Jones, K. E. Smith et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 303–306.
- [101] P. Manitto, D. Monti, S. Zanzola, G. Speranza, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6658–6665.
- [102] C. F. Koelsch, D. O. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 889–990.
- [103] P. K. Mandal, J. S. McMurray, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599–6601.
- [104] a) M. F. Braña, M. Garrido, Lopez Rodriguez M. L., M. J. Morcillo, Y. Alvarez, Y. Valladares, G. Klebe, *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, *25*, 209–215; b) H. King, E. V. Wright, *J. Chem. Soc.* **1939**, 253;

- 
- [105] S. Weiss, H. Michaud, H. Prietzel, H. Krommer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1973**, *12*, 841.
- [106] P. K. Dasgupta, G. L. Lundquist, K. D. Reiszner, P. W. West, *Anal. Chim. Acta* **1977**, *94*, 205–207.
- [107] a) D. J. Bull, M. J. Fray, M. C. Mackenny, K. A. Malloy, *Synlett* **1996**, *1996*, 647–648; b) M. Achmatowicz, O. R. Thiel, G. Gorins, C. Goldstein, C. Affouard, R. Jensen, R. D. Larsen, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6793–6799;
- [108] H. Weinmann, M. Harre, K. Koenig, E. Merten, U. Tilstam, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 593–595.
- [109] F. Compernelle, S. Toppet, *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 541–544.
- [110] T. Mas, R. M. Claramunt, Santa María, M. Dolores, D. Sanz, S. H. Alarcón, M. Pérez-Torralba, J. Elguero, *ARKIVOC* **2002**, 48–61.
- [111] S. J. Coats, A. B. Dyatkin, W. He, J. Lisko, T. Miskowski, J. L. Ralbovsky, M. Schulz, *WO* 2009/058653 A1, **2009**.
- [112] T. P. Wunz, R. T. Dorr, D. S. Alberts, C. L. Tunget, J. Einspahr, S. Milton, W. A. Remers, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1313–1321.
- [113] J. Nakayama, R. Hasemi, K. Yoshimura, Y. Sugihara, S. Yamaoka, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4912–4924.
- [114] U. Brocksom, A. P. Toloj, T. J. Brocksom, *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 237–242.
- [115] J. J. Marugán, C. Manthey, B. Anaclerio, L. Lafrance, T. Lu, T. Markotan, K. A. Leonard, C. Crysler, S. Eisennagel, M. Dasgupta et al., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926–934.
- [116] J. J. Richards, T. E. Ballard, C. Melander, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1356–1363.
- [117] B. Ye, D. O. Arnaiz, Y.-L. Chou, B. D. Griedel, R. Karanjawala, W. Lee, M. M. Morrissey, K. L. Sacchi, S. T. Sakata, K. J. Shaw et al., *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2967–2980.
- [118] E. D. Jones, Coates, Jonathan Alan Victor, D. I. Rhodes, J. J. Deadman, N. A. Van-Degraff, L. J. Winfield, N. Thienthong, W. Issa, Choi, Neil et al., *WO/2008/077188 A1*, **2008**.
- [119] R. Achour, R. Zniber, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1987**, *96*, 787–792.
- [120] P. Ren, O. Vechorkin, K. v. Allmen, R. Scopelliti, X. Hu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7084–7095.
- [121] T. Shibanuma, M. Shiono, T. Mukaiyama, *Chemistry Letters* **1977**, 575–576.
- [122] S. P. Andrews, M. Ladlow, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5525–5533.



- 
- [123] H. Ogura, H. Takayanagi, Y. Yamazaki, S. Yonezawa, H. Takagi, S. Kobayashi, T. Kamioka, K. Kamoshita, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 923–926.
- [124] W. Nawrocka, M. Zimecki, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, *331*, 249–253.
- [125] B. Burns, R. Hosmane, EP1227103 A2, **2002**.
- [126] K. Sugino, T. Tanaka, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3354–3355.
- [127] W. Wendelin, R. Riedl, *Monatsh. Chem. Chem. Mon.* **1984**, *115*, 445–453.
- [128] L. F. Cavalieri, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*.
- [129] J. R. Spies, Harris Jr., Thomas H., *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 351–352.
- [130] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [131] M. H. Caruthers, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 575–580.
- [132] S. A. Kates, F. Albericio (Eds.) *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, **2000**.
- [133] Glen Research, "The Glen Report. Deprotection - Volumes 1-5", aufgerufen unter <http://www.glenresearch.com/Technical/Deprotection.pdf>, **2013**.
- [134] S. Atiken, D. Hannah, U. Ixkes, C. McKeen, D. Picken, "Plant derived cholesterol modifications: Comparative use in oligonucleotide synthesis", aufgerufen unter <http://www.linktech.co.uk/documents/608/608.pdf>, **2010**.
- [135] M. Alvira, *Improved linkers for peptide and m3G-Cap conjugates of oligonucleotides*, Padua, **2011**.
- [136] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628–1644.
- [137] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [138] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310–1313.
- [139] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [140] S. Peter, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2006**.
- [141] A. Albert, D. J. Brown, *J. Chem. Soc.* **1954**, 2060–2071.
- [142] A. Albert, R. Goldacre, J. Phillips, *J. Chem. Soc.* **1948**, 2240–2249.
- [143] J. D. Muller, Y. Chen, E. Gratton, *Methods Enzymol.* **2003**, *361*, 69–92.
- [144] C. Gnaccarini, *Dissertation*, Universität Frankfurt, **2007**.

- 
- [145] S. Pitsch, U. Scheffer, M. Hey, A. Strick, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3740–3752.
- [146] E. V. Anslyn, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8931–8932.
- [147] a) J. Elmén, M. Lindow, S. Schütz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjärn, H. F. Hansen, U. Berger et al., *Nature* **2008**, *452*, 896–899; b) M. Thomas, K. Lange-Grünweller, E. Dayyoub, U. Bakowsky, U. Weirauch, A. Aigner, R. K. Hartmann, A. Grünweller, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1088–1098;
- [148] C. M. Jakobsen, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs, A. Gady, C. E. Olsen, S. B. Christensen, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4696–4703.
- [149] P. R. Thomas, G. J. Tyler, *J. Chem. Soc.* **1957**, 2197–2201.
- [150] B. Gabriele, G. Salerno, R. Mancuso, M. Costa, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4741–4750.
- [151] H. W. Thompson, *J. Chem. Soc.* **1932**, 2310.
- [152] Bacon, R. G. R., S. G. Pande, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 1967–1973.
- [153] N. L. Allinger, G. A. Youngdale, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1020–1026.
- [154] D. Jönsson, B. H. Warrington, M. Ladlow, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 584–595.
- [155] B. G. Jackson, S. W. Pedersen, J. W. Fisher, J. W. Misner, Gardner John P., M. A. Staszak, C. Doecke, J. Rizzo, J. Aikins, E. Farkas et al., *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5667–5677.
- [156] N. Fischer-Durand, M. Salmain, B. Rudolf, L. Jugé, V. Guérineau, O. Laprèvote, A. Vessières, G. Jaouen, *Macromolecules* **2007**, *40*, 8568–8575.

---

## 9.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtstag und -ort: 10.04.1985  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

### Studium und Schulbildung

03/2010 – 12/2014 Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Titel: *Synthese und Evaluierung RNA-spaltender Guanidin-analoga und ihrer PNA-Konjugate*

12/2009 Diplom

06/2009 – 12/2009 Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Titel: *Lanthanid-Chelate zur Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden*

10/2006 Vordiplom

10/2004 – 12/2009 Studium der Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main

06/2004 Abitur

1995 – 2004 Adolf-Reichwein-Schule Neu-Anspach

1991 – 1995 Adolf-Reichwein-Grundschule Neu-Anspach

### Zusatzqualifikationen

03/2010 – 02/2015 Betreuung von Studenten in Grund- und Forschungspraktika

---

10/2013 – 02/2015	Betreuung der Übungen zu den Vorlesungen „Reaktionsmechanismen der organischen Chemie“ und „Naturstoffsynthese“
-------------------	---

**Ehrenamtliches Engagement**

seit 2001	Gruppenleiterin in der Baptistischen Pfadfinderschaft; Mitarbeit auf Orts-, Regions- und Bundesebene
-----------	--

## 9.5 Publikationsliste

Friederike Danneberg, Alice Ghidini, Plamena Dogandzhiyski, Elisabeth Kalden, Roger Strömberg, Michael W. Göbel, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 493–498.

*“Sequence-specific RNA cleavage by PNA conjugates of the metal-free artificial ribonuclease tris(2-aminobenzimidazole)”*

## 9.6 Wissenschaftliche Vorträge

1. 2<sup>nd</sup> PhosChemRec Network meeting, 16. – 20. Februar **2011**, Padua.  
*“Comparison of RNA cleaving guanidine analogues”*
2. 3<sup>rd</sup> PhosChemRec Network meeting, 02. – 04. Juli **2011**, Stockholm.  
*“Evaluation of RNA cleavers based on aminoperimidine”*
3. 6<sup>th</sup> PhosChemRec Network meeting, 30. August – 01. September **2013**, Cambridge.  
*“RNA cleavage by conjugates of PNA and guanidine analogues”*
4. 7<sup>th</sup> PhosChemRec Network meeting, 14. – 17. Februar **2014**, Castleton.  
*“Comparison of RNA cleaving guanidine analogues”*
5. II. DNG-Doktorandenseminar, 29. – 30. Oktober **2014**, Bad Herrenalb.  
*„Conjugates of PNA and guanidine analogues as artificial ribonucleases”*

## 9.7 Posterbeiträge

Friederike Danneberg, Plamena Dogandzhiyski, Elisabeth Kalden, Ute Scheffer, Michael Göbel,

VI. Nucleinsäurechemie-Treffen, 19. – 20. September **2013**, Greifswald.

*„Site-specific RNA cleavage by heterocyclic guanidine analogues conjugated to PNA oligomers”*

---

### **9.8 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel *„Synthese und Evaluierung RNA-spaltender Guanidinanaloga und ihrer PNA-Konjugate“* selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Frankfurt am Main, 26.02.2015

Friederike Danneberg