

Künstliche Ribonucleasen auf Basis von 2-Aminobenzimidazolen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie

und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Sascha Peter

aus Lich

Frankfurt am Main, 2006

(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Michael Göbel, Prof. Dr. Joachim Engels

Datum der Disputation: 04.05.2007

Kurzfassung

"Künstliche Ribonucleasen auf Basis von 2-Aminobenzimidazolen"

Sascha Peter

Die Entwicklung künstlicher Ribonucleasen bietet das Potential, Werkzeuge für die Biotechnologie und langfristig neuartige Pharmaka bereitzustellen. 2-Aminobenzimidazole haben sich als metallfreie Katalysatoren zur unspezifischen Spaltung von Ribonucleinsäuren bewährt. In der vorliegenden Arbeit sollte das Konzept von künstlichen Ribonucleasen auf Basis dieser Molekülklasse auf seine Tragfähigkeit geprüft werden. Außerdem sollten weitere mechanistische Erkenntnisse über die Katalyse der RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole gewonnen werden.

Hierzu wurden kupplungsfähige 2-Aminobenzimidazol-Derivate hergestellt und anschließend an RNA-Liganden gekuppelt. Diese Konjugate wurden auf ihre Spaltaktivität gegenüber RNA bei physiologischen Bedingungen sowie auf ihre Substrat- und Ortsspezifität getestet.

Zunächst wurden Tripeptidkonjugate synthetisiert und untersucht. Hierbei konnte eine gegenüber den unkonjugierten Spezies erhöhte Affinität der Konjugate zum Substrat festgestellt werden. Auch wurde gezeigt, dass 2-Aminobenzimidazole, die in wässriger Lösung zur Aggregation neigen, auch als Einzelmoleküle in der Lage sind, die RNA-Hydrolyse zu katalysieren. Die Substrat- und Ortsspezifität der Tripeptidkonjugate ließ jedoch zu wünschen übrig.

Durch die Konjugation von 2-Aminobenzimidazol-Derivaten an Antisense-DNA gelang schließlich die sequenz- und ortsspezifische Affinitätsspaltung von RNA mit beachtlicher Aktivität. Damit war die Tragfähigkeit des Konzepts bewiesen.

Ferner konnten durch die weitere Untersuchung der Konjugate starke Indizien gewonnen werden, die das Modell, auf dem die Auswahl der 2-Aminobenzimidazole als katalytische Einheit beruht, stützen.

Abstract

"Artificial Ribonucleases based on 2-Aminobenzimidazoles"

Sascha Peter

The development of artificial Ribonucleases has the potential to provide valuable tools for Biotechnology and, on the long term, a new class of drugs. 2-aminobenzimidazoles have proven to be powerful metal-free catalysts for the unspecific hydrolysis of RNA. The aim of this thesis was to test the concept of artificial ribonucleases based on this class of molecules. Besides, deeper insights in the mechanism of RNA-hydrolysis through 2-Aminobenzimidazoles should be obtained.

In order to achieve this, functionalized 2-aminobenzimidazole derivatives were synthesized and coupled to RNA-ligands. These conjugates were tested on their cleavage activity towards RNA at physiological conditions as well as on substrate and site specificity.

At first, tripeptide-conjugates were synthesized and examined. They showed an increased affinity towards the Substrates in comparison to the unconjugated species. Furthermore, it could be shown that 2-Aminobenzimidazole derivatives, that tend to aggregate under aqueous conditions, are capable of catalyzing RNA hydrolysis as single molecules. Substrate- and site-specificity of the Tripeptide-conjugates was very poor, though.

By conjugating 2-aminobenzimidazole moieties to antisense-DNA, sequence- and site-selective affinity cleavage with a remarkable activity could be observed eventually. Thus, the proof of principle for the concept had been achieved.

Further examination of the conjugates provided strong evidence for the accuracy of the model by which 2-aminobenzimidazol derivatives have been designed as catalysts for RNA-hydrolysis.

Meiner Frau und meiner Tochter

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2002 bis November 2006 unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Göbel möchte ich für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, die Betreuung und die Anregungen und Diskussionen danken.

Der Europäischen Union danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Netzwerks zur Entwicklung künstlicher Nucleasen ENDEVAN.

Herrn Dr. J. G. Zimmermann und seinem Team gilt mein Dank für die Aufnahme von NMR-Spektren sowie die Unterstützung bei selbständigen Messungen, Frau M. Christoph für die Durchführung der Elementaranalysen, Frau I. Prieß und Frau H. Prill für die Messung der Massenspektren.

Herrn Dr. G. Dürner und Frau G. Stracke sowie Frau E. Müller und M. Funke bin ich für Analysen und Reinigungen per HPLC und auch für die Bereitstellung destillierter Lösungsmittel sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Scheffer für die Durchführung des überwiegenden Anteils der Bioanalytik sowie der Spaltexperimente. Auch für die Diskussionen zur Interpretation der Daten und Planung neuer Experimente, die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit und schließlich die regelmäßige Bereitstellung von Süßwaren möchte ich ihr herzlich danken. Frau E. Kalden und N. Brüssler, die Frau Dr. Scheffer unterstützten, gebührt ebenfalls Dank.

Frau T. Ruppenthal danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe auf ihre herzliche Art bei anfallenden administrativen Aufgaben.

Für die Bereitstellung von *enantio*-RNA Substraten danke ich Prof. Dr. S. Pitsch vom EPFL Lausanne sowie der NOXXON-Pharma AG in Berlin. Frau Dr. V. Ludwig sowie Herrn Dipl. Chem. M. Suahrtono möchte ich für die Versorgung mit nicht-natürlichen Aminosäuren danken.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Laboratmosphäre bedanken. Namentlich genannt seien hier noch Frau Dipl. Chem. K. Beier, Herr Dr. O. Boden, Herr Dipl. Chem. C. Gnaccarini, Herr Dr. M. Hey, Herr Dipl. Chem. G. Seifert, Herr Dipl. Chem. C. Timm, und Herr Dipl. Chem. M. Weimar. Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dipl. Chem. D. Akalay für den Austausch über Automobiltechnologie und -Pflege und die Durchsicht der vorliegenden Arbeit. Herrn Dr. Z. Nazir und Herrn Dipl. Chem. S. Ullrich danke ich besonders für die vielen Diskussionen, die auch über das Fachliche hinausgingen und den meist fairen Wettstreit um die musikalische Untermalung.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zum ungestörten Zusammenschreiben der vorliegenden Arbeit in ihrem Büro danke ich Frau D. Schön, Frau J. Kurras und Frau A. Cruse ganz herzlich.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Quinkert, mit dem die Diskussionen über Naturwissenschaft und Philosophie immer besonderen Spaß bereitet haben.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern und insbesondere meiner Frau, deren Rückhalt und Liebe die Anfertigung dieser Arbeit maßgeblich unterstützt haben. Auch meine Tochter hat hier einen Anteil, indem sie mich während des Schreibens stets wach und munter hielt.

1	EINLEITUNG	1
2	KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN	2
2.1	MECHANISMUS UND KATALYSE DER RNA-HYDROLYSE	3
2.2	BEISPIELE FÜR DIE ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON RNA.....	6
2.3	KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN AUF BASIS VON METALLKOMPLEXEN	9
2.3.1	Künstliche Nucleasen auf Basis von Lanthanid(III)-Komplexen.....	9
2.3.2	Künstliche Nucleasen auf Basis von Cu(II)-Komplexen	13
2.3.3	Künstliche Nucleasen auf Basis von Zn(II)-Komplexen	15
2.4	METALLFREIE KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN	18
2.5	WEITERE STRATEGIEN ZUR SEQUENZ- UND ORTSSPEZIFISCHEN RNA-SPALTUNG	20
3	2-AMINOBENZIMIDAZOLE ALS RNA-SPALTENDE MOLEKÜLE	22
4	EIGENE SYNTHETISCHE ARBEITEN	25
4.1	DARSTELLUNG KUPPLUNGSFÄHIGER 2-AMINOBENZIMIDAZOL-DERIVATE	25
4.1.1	Synthese des Bisbenzimidazols	25
4.1.2	Synthese des Trisbenzimidazols	28
4.1.3	Synthese des Bisbenzimidazol-Trens	36
4.2	SYNTHESE DER 2-AMINOBENZIMIDAZOL-KONJUGATE	38
4.2.1	Synthese der Oligopeptidkonjugate.....	40
4.2.1.1	Synthese von Trisarginin und Trisarginin GABA	40
4.2.1.2	Synthese eines tripeptidischen RNA-Liganden und seines GABA-Analogons.....	41
4.2.1.3	Kupplung von Bisbenzimidazol an Trisarginin.....	43
4.2.1.4	Kupplung von Trisbenzimidazol an Trisarginin-GABA	45
4.2.1.5	Kupplung von Tetramethylrhodamin an Trisarginin-GABA.....	46
4.2.1.6	Acylierung von Trisarginin-GABA.....	46
4.2.1.7	Kupplung von Bisbenzimidazol und Trisbenzimidazol an einen tripeptidischen RNA- Liganden	48
4.2.1.8	Peptidkonjugate durch Kupplung zweier Amine zum Harnstoff.....	49
4.2.2	Synthese der Nucleinsäurekonjugate.....	51
4.3	WEITERE SYNTHETISCHE ARBEITEN.....	53
4.3.1	Zur Synthese trismethylierten Trisbenzimidazols.....	53

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Synthese von Palmitoylverbindungen	56
5	2-AMINOENZIMIDAZOL-KONJUGATE ALS KÜNSTLICHE RIBONUCLEASEN	57
5.1	ASSAY ZUR MESSUNG DER RNA-HYDROLYSE.....	57
5.2	UNSPECIFISCHE RNA-HYDROLYSE DURCH 2-AMINOENZIMIDAZOLE	60
5.2.1	Aggregationsstudien mit kupplungsfähigem Trisbenzimidazol	64
5.3	AFFINITÄTSSPALTUNG VON RNA DURCH 2-AMINOENZIMIDAZOL-PEPTIDKONJUGATE	68
5.3.1	Experimente mit Trisargininkonjugaten	68
5.3.2	Experimente mit Bcr-Abl-Ligand-Konjugaten	77
5.3.3	Bis- vs. Trisbenzimidazol: Katalytische Einheiten und Konstitution des Molekülgerüsts ..	84
5.4	WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUM AGGREGATIONSVERHALTEN VON 2-AMINOENZIMIDAZOLEN	86
5.5	SEQUENZ- UND ORTSSPEZIFISCHE RNA-SPALTUNG DURCH 2-AMINOENZIMIDAZOL- NUCLEINSÄUREKONJUGATE.....	90
5.6	DER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PK_A UND AKTIVITÄT VON RNA-SPALTENDEN MOLEKÜLEN	98
6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	AUSBLICK	106
8	EXPERIMENTELLER TEIL.....	108
8.1	ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN.....	108
8.2	ARBEITSMETHODEN MIT OLIGOPEPTIDEN	110
8.3	ARBEITSMETHODEN MIT NUCLEINSÄUREN	111
8.4	SYNTHESE DES BISBENZIMIDAZOLS	115
8.4.1	Synthese von 3,5-Bis-brommethyl-benzoessäuremethylester 37	115
8.4.2	Synthese von 3,5-Bis-diformaminomethyl-benzoessäuremethylester 38	116
8.4.3	Synthese von 3,5-Bis-diaminomethyl-benzoessäure-bis-hydrochlorid 39	118
8.4.4	Synthese von 3,5-Bis- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminomethyl-benzoessäure 35	119
8.4.5	Synthese von 4-Aminobuttersäuremethylester Hydrochlorid 41	120
8.4.6	Synthese von 4-[3,5-Bis-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino-methyl)-benzoyl-amino]- buttersäuremethylester 42	121
8.4.7	Synthese von 4-{3,5-Bis-[3-(2-amino-phenyl)-thioureidomethyl]-benzoylamino}- buttersäuremethylester 44	123

Inhaltsverzeichnis

8.4.8	Synthese von 4-{3,5-Bis-[(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäuremethylester 45	125
8.4.9	Synthese von 4-{3,5-Bis-[(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäure 34	126
8.5	SYNTHESE DES TRISBENZIMIDAZOLS.....	128
8.5.1	Synthese von 2-Nitrophenylisothiocyanat 66	128
8.5.2	Synthese von 3,4-Diaminobenzoessäuremethylester 60	129
8.5.3	Synthese von Bis[2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin 47	130
8.5.4	Synthese von 4-Amino(3-{2-[bis-(2-{ <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl}amino]ethyl}thioureido)benzoessäure-methylester 51	131
8.5.5	Synthese von 2-{2-[Bis-(2-{ <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl}amino)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäure-methylester 61	133
8.5.6	Synthese von 2-[2-{Bis-[2-[3-(2-Nitrophenyl)thioureido]ethyl]amino) ethylamino]-3 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäure-methylester 62	134
8.5.7	Synthese von 2-[2-{Bis-[2-[3-(2-Aminophenyl)thioureido]ethyl]amino) ethylamino]-3 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäure-methylester 63	136
8.5.8	Synthese von 2-(2-{Bis-[2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino} ethylamino)-3 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonsäure-methylester 64	138
8.5.9	Synthese von 4-{[2-(2-{Bis-[2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino)-ethylamino]-3 <i>H</i> -benzimidazol-5-carbonyl]-amino}-buttersäure-methylester 110	140
8.6	SYNTHESE DES BISBENZIMIDAOL-TRENS.....	142
8.6.1	Synthese von 2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl-bis-(2-aminoethyl)-amin 57	142
8.6.2	Synthese von Bis-[2-[3-(2-nitrophenyl)-thioureido]-ethyl]-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl-amin 68	143
8.6.3	Synthese von Bis-[2-[3-(2-aminophenyl)-thioureido]-ethyl]-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl-amin 69	145
8.6.4	Synthese von Bis-[2-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl-amin 70	147
8.7	SYNTHESE DER PALMITOYLVERBINDUNGEN.....	149
8.7.1	Synthese von Palmitoyl{2-bis-(2- <i>tert</i> -butoxycarbonylaminoethyl)-amino}ethylamid 111	149

Inhaltsverzeichnis

8.7.2	Synthese von Palmitoyl-(2-{bis-[2-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethyl)-amid 97	150
8.8	ZUR SYNTHESE DES TRISMETHYLIERTEN TRISBENZIMIDAZOLS.....	152
8.8.1	Synthese von Tris-[2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)ethyl]amin 58	152
8.8.2	Synthese von Tris-[2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-methyl-amino)ethyl]-amin 93	153
8.8.3	Synthese von Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-nitrophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin 94	155
8.8.4	Synthese von Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-aminophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin 95	157
8.9	SYNTHESE DER PEPTIDKONJUGATE	159
8.9.1	Synthese der freien Säure des Trisbenzimidazols 46	159
8.9.2	Synthese von Trisarginin 71 und Trisarginin-GABA 72	160
8.9.3	Synthese des Tripeptids 75 und des GABA-Tripeptids 76	161
8.9.4	Synthese des Bisbenzimidazol-Trisarginin-Konjugats 77	163
8.9.5	Synthese des Trisbenzimidazol-Trisarginin-Konjugats 78	165
8.9.6	Synthese des Tren-Trisarginin-Konjugats 87	166
8.9.7	Synthese des Bisbenzimidazol-Tren-Trisarginin-Konjugats 86	168
8.9.8	Synthese des Bisbenzimidazol-Tripeptidkonjugats 82	170
8.9.9	Synthese des Trisbenzimidazol-Tripeptidkonjugats 83	171
8.9.10	Synthese von acyliertem Trisarginin-GABA 81	172
8.9.11	Synthese von TAMRA-gelabeltem Trisarginin-GABA 80	174
8.10	SYNTHESE DER NUCLEINSÄUREKONJUGATE.....	176
8.10.1	Synthese des Bisbenzimidazol- Antisense-15mer-Konjugats 89	176
8.10.2	Synthese des Trisbenzimidazol-Antisense-15mer-Konjugats 90	177
9	ANHANG	179
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	179
9.2	LITERATURVERZEICHNIS.....	181
9.3	LEBENS LAUF	186
9.4	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	187

1 Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten haben Ribonucleinsäuren als Forschungsobjekt zunehmend an Bedeutung gewonnen. Hatte man sie früher nur als stumme Vermittler genetischer Informationen angesehen, wurde in diesem Zeitraum deutlich, dass ihre strukturelle Vielfalt in einer Fülle biochemischer Funktionen zum Tragen kommt. Durch die Entdeckung der Reversen Transkriptase 1970 war gezeigt worden, dass genetische Information nicht nur von DNA über RNA übertragen wird, sondern auch umgekehrt fließen kann. Meilensteine in der RNA-Forschung stellen sicherlich auch die Entdeckung katalytisch aktiver RNA-Moleküle Anfang der achtziger Jahre sowie der RNA-Interferenz in jüngster Vergangenheit dar. Aufgrund der Fähigkeit, genetische Information zu speichern und zu übertragen, katalytisch in Form von Ribozymen zu wirken und schließlich durch Wechselwirkung mit Proteinen und kleinen Molekülen wichtige regulatorische Funktionen auszuüben, sind Ribonucleinsäuren heute Gegenstand intensiver Forschung.

Die Entwicklung künstlicher Ribonucleasen stellt ein Feld in diesem Forschungsgebiet dar. Während die langfristige Motivation in der Entwicklung neuartiger Pharmaka durch Inhibierung RNA-gesteuerter Prozesse besteht, werden artifizielle Nucleasen zunächst eher als biotechnologisches Werkzeug Anwendung finden. Ein Beispiel hierfür ist die Identifikation der Bindungsstellen von Liganden durch Affinitätsspaltung, die gerade für den Sonderforschungsbereich 579 "RNA-Liganden-Wechselwirkungen", dem mehrere Arbeitsgruppen unseres Hauses angehören, von großem Interesse ist.

2-Aminobenzimidazole sind potente metallfreie Katalysatoren für die hydrolytische Spaltung von RNA. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese kupplungsfähiger 2-Aminobenzimidazolderivate und deren Konjugation an RNA-Liganden, um das Konzept der Affinitätsspaltung durch künstliche Nucleasen auf Basis dieser Stoffklasse überprüfen zu können. Weiterhin sollten die 2-Aminobenzimidazole durch ihre Konjugate besser charakterisiert und neue mechanistische Erkenntnisse gewonnen werden.

2 Künstliche Ribonucleasen

Künstliche Nucleasen sind Enzymmimetika, die rational entworfen werden, um die aktiven Zentren ihrer natürlichen Gegenstücke zu imitieren. Hierbei sollen möglichst einfache Strukturen geschaffen werden, die mit einem minimalen Satz von für die Katalyse nötigen funktionellen Gruppen ausgestattet sind¹.

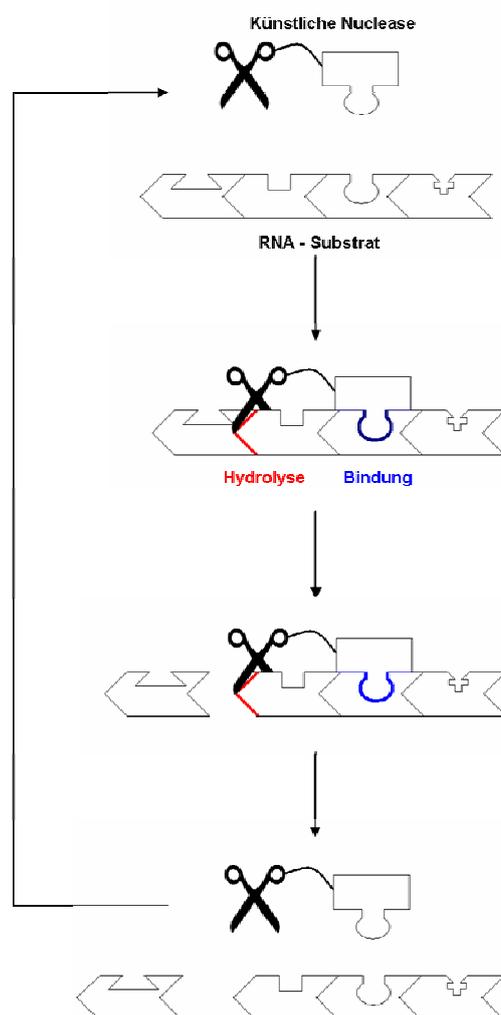


Abbildung 1: Idealisiertes Schema einer substratspezifischen künstlichen Ribonuclease

Diese sehr allgemeine Definition bezieht sich auf unspezifische Nucleasen. Sie wird oft um die Substratspezifität erweitert. In diesem Fall sind eine katalytisch aktive Einheit zur Spaltung und eine solche für die Erkennung und Bindung eines Nucleinsäuresubstrats oder einer Substratklasse in einem Molekül vereint. Im Folgenden geht es schließlich um die

Untergruppe der Ribonucleasen. Diese katalysieren ausschließlich die Spaltung von Ribonucleinsäuren (RNA), Deoxyribonucleinsäuren (DNA) stellen kein Substrat dar und bleiben unangetastet. Abbildung 1 zeigt das Ideal einer künstlichen, hydrolytisch spaltenden Ribonuclease. Der Ligand erkennt und komplexiert das RNA-Substrat. Die katalytische Einheit hydrolysiert daraufhin die RNA an einer bestimmten Stelle. Idealerweise wird dadurch der Komplex mit dem Substrat derart destabilisiert, dass die Ribonuclease für einen erneuten Zyklus zur Verfügung steht (katalytischer Turnover).

2.1 Mechanismus und Katalyse der RNA-Hydrolyse

Oligo- und Polynucleotide sind sehr stabile Biopolymere. Dies liegt unter anderem an der hohen kinetischen Stabilität des Phosphodiester-Rückgrats gegenüber nucleophilen Angriffen². Die hydrolytische Spaltung von DNA und RNA muss somit unter Normalbedingungen in physiologischer Lösung katalysiert werden, um überhaupt in nennenswertem Maße stattzufinden.

Der Mechanismus der RNA-Hydrolyse verläuft über einen pentakoordinierten Übergangszustand in Form eines dianionischen Phosphorans durch einen nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe am Phosphor. Dabei fungiert der 5'-Sauerstoff als anionische Abgangsgruppe, die wiederum zum Alkohol protoniert wird. Durch diese Umesterung entsteht zunächst ein 2'-3'-Cyclophosphat, das letzten Endes in ein 3' – oder 2'-Phosphat hydrolysiert wird. (Abbildung 2).

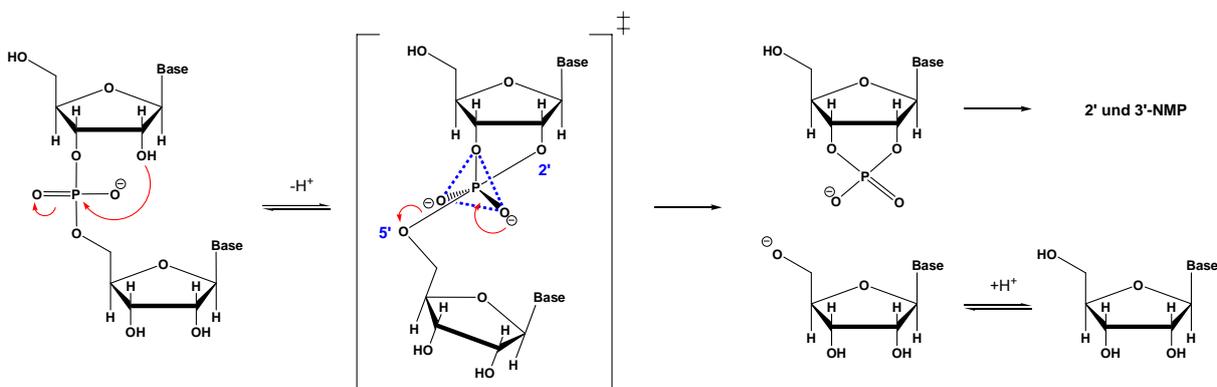


Abbildung 2: Mechanismus der RNA-Hydrolyse

Während das Phosphoran im sauren Medium durch Protonierung stabilisiert wird und somit ein Intermediat darstellt, ist es bei physiologischem pH nicht klar, ob es als kurzlebiges Intermediat oder als Übergangszustand durchlaufen wird. In jedem Falle ist das Phosphoran so kurzlebig, dass es bei neutralem pH keine kinetische Relevanz als Zwischenprodukt aufweist. Das trigonal bipyramidale Phosphoran besitzt drei äquatoriale (in der Abbildung mit einer blauen gestrichelten Linie verbunden) und zwei apicale Liganden. Nucleophil und Abgangsgruppe müssen in diesem S_N^2 -artigen Mechanismus aus stereoelektronischen Gründen die apicalen Positionen einnehmen³.

Während in einzelsträngiger RNA ein Winkel von ca. 180° von 2'- und 5'-Sauerstoff (also Nucleophil und Abgangsgruppe) ohne weiteres eingenommen werden kann, ist dieser in doppelsträngiger RNA auf etwa 90° festgelegt. Durch diese konformationelle Bedingung kann RNA nur in einzelsträngigen Regionen ohne Hilfe eines externen Nucleophils hydrolytisch gespalten werden⁴. Die signifikante Lebensdauer monoanionischer Phosphorane in saurer Lösung erlaubt zwar die Pseudorotation (vide infra); bedingt durch Stacking wird aber der 5'-Sauerstoff in der äquatorialen Position fixiert. Selbst im Einzelstrang können Stacking-Wechselwirkungen die Hydrolyse beeinträchtigen, insbesondere in purinreichen Sequenzen⁵.

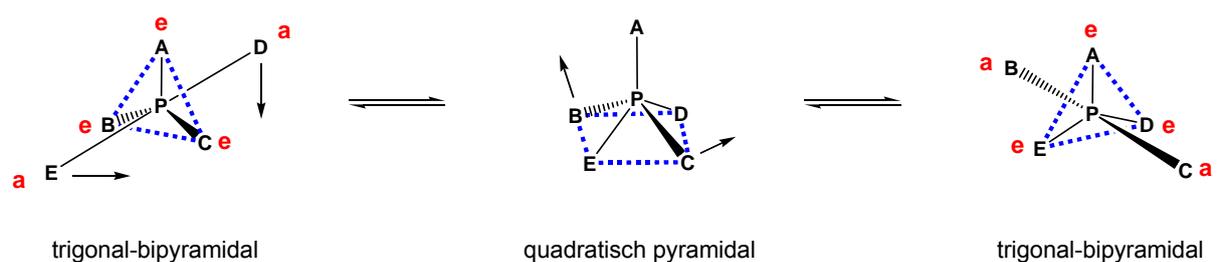


Abbildung 3: Pseudorotation (a = axial, e = äquatorial)

Das Prinzip der Pseudorotation ist in Abbildung 3 verdeutlicht. Die axialen Liganden D und E vollziehen eine Scherenbewegung nach unten, während die äquatorialen Liganden eine nach oben gerichtete ausführen. Dabei wird ein quadratisch pyramidaler Zustand durchlaufen, an deren Spitze der unbewegte Ligand A steht. Schließlich nehmen die Liganden D und E eine äquatoriale Position ein und B und C eine apicale.

Es sei noch erwähnt, dass durch das interne Nucleophil in Form der 2'-OH-Gruppe RNA chemoselektiv in Anwesenheit von DNA gespalten werden kann. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn eine künstliche Ribonuclease ein Antisense-Oligo(deoxy)nucleotid zur Bindung an das Substrat enthält (auch OBAN Oligonucleotide Based Artificial Nuclease).

Durch Einwirkung externer Nucleophile (die auch Teil oder Cofaktor einer Nuclease sein können) können sowohl RNA als auch DNA gespalten werden. Hier entfällt auch das Problem der Pseudorotation, wenn das Nucleophil entlang der entsprechenden Trajektorie angreifen kann.

Die Hydrolyse der RNA kann auf drei Arten katalysiert werden:

- **generelle Basenkatalyse:** Deprotonierung der 2'-OH Gruppe und die daraus resultierende Erhöhung ihrer Nucleophilie
- **elektrophile Katalyse:** partielle Ladungskompensation des dianionischen Phosphorans
- **generelle Säurekatalyse:** Protonierung des 5'-Sauerstoffs als Abgangsgruppe

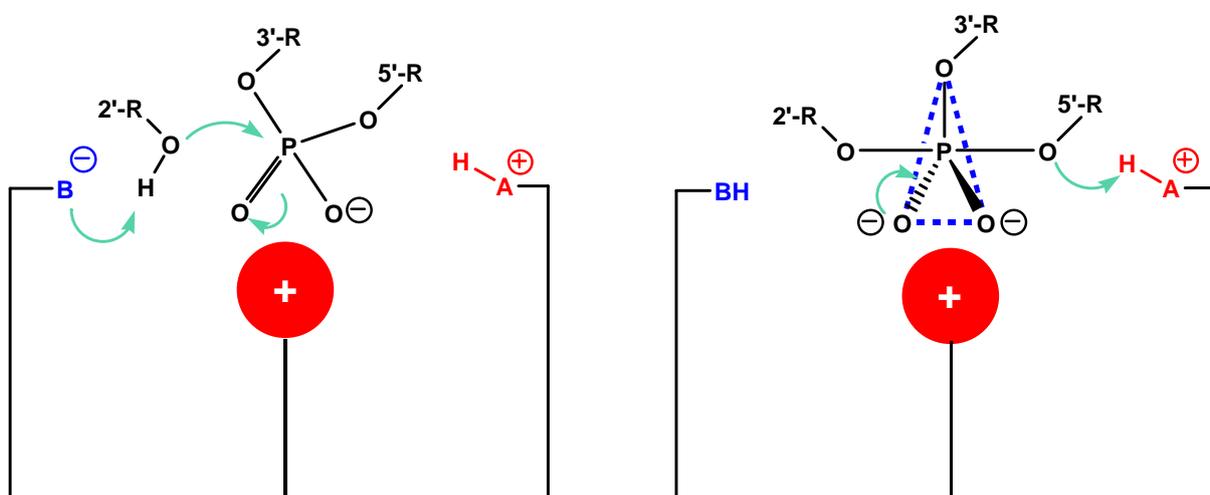


Abbildung 4: Schema der Katalyse Umesterung des Phosphorsäurediesters von RNA: Basen- (B⁻), elektrophile (+) und Säurekatalyse (A⁺-H)

Angesichts der Instabilität des dianionischen Phosphorans aufgrund der Ladungsrepulsion ist es nicht verwunderlich, dass die elektrophile Katalyse offensichtlich einen sehr großen Effekt auf die hydrolytische RNA-Spaltung hat. Dass Metallionen die Hydrolyse von RNA bei physiologischem pH katalysieren, ist seit den sechziger Jahren des vergangenen

Jahrhunderts bekannt⁶. Dementsprechend gehören Lanthanid-Ionenkomplexe als Lewisäuren mit hoher positiver Ladungsdichte zu den bisher mächtigsten katalytischen Gruppen künstlicher Nucleasen (vide infra). Der auf 2-Aminobenzimidazolen beruhende Ansatz unserer Arbeitsgruppe, der auch der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, basiert jedoch auf einer anderen Strategie. Hier setzt man auf das Zusammenspiel aller drei oben genannten Beiträge zur Katalyse. Durch das Zusammenspiel zweier oder mehrerer katalytisch aktiver Einheiten soll so ein hyperadditiver Gesamteffekt erzielt werden. Bevor genauer auf 2-Aminobenzimidazole als RNA-spaltende Moleküle eingegangen wird, folgt ein Überblick über natürliche und künstliche Nucleasen.

2.2 Beispiele für die enzymatische Hydrolyse von RNA

Eines der vielleicht am besten untersuchten Enzyme des zwanzigsten Jahrhunderts ist die Ribonuclease A (RNase A). Der Suffix A bezieht sich nicht auf ihre Spezifität, sondern vielmehr auf ihre unmodifizierte Form in bovinem Pankreas. Durch die Domestizierung von Rindern steht sie in großer Menge und Reinheit zur Verfügung. Die herausragende Rolle dieses Biomoleküls wurde im Jahre 1972 gewürdigt, als alle drei Nobelpreise der Chemie an Forscher gingen, die sich damit beschäftigten (Stein und Moore sowie Anfinsen). Eine ebensolche Würdigung erfuhr Merrifield 1984 für seine Festphasen-Totalsynthese der RNase A, die somit das erste vollsynthetisch dargestellte Protein war. Aus diesem Grunde soll ihr Katalysemechanismus hier als Beispiel dienen, auch wenn sie zwar sequenzunspezifisch, jedoch basenselektiv RNA spaltet.

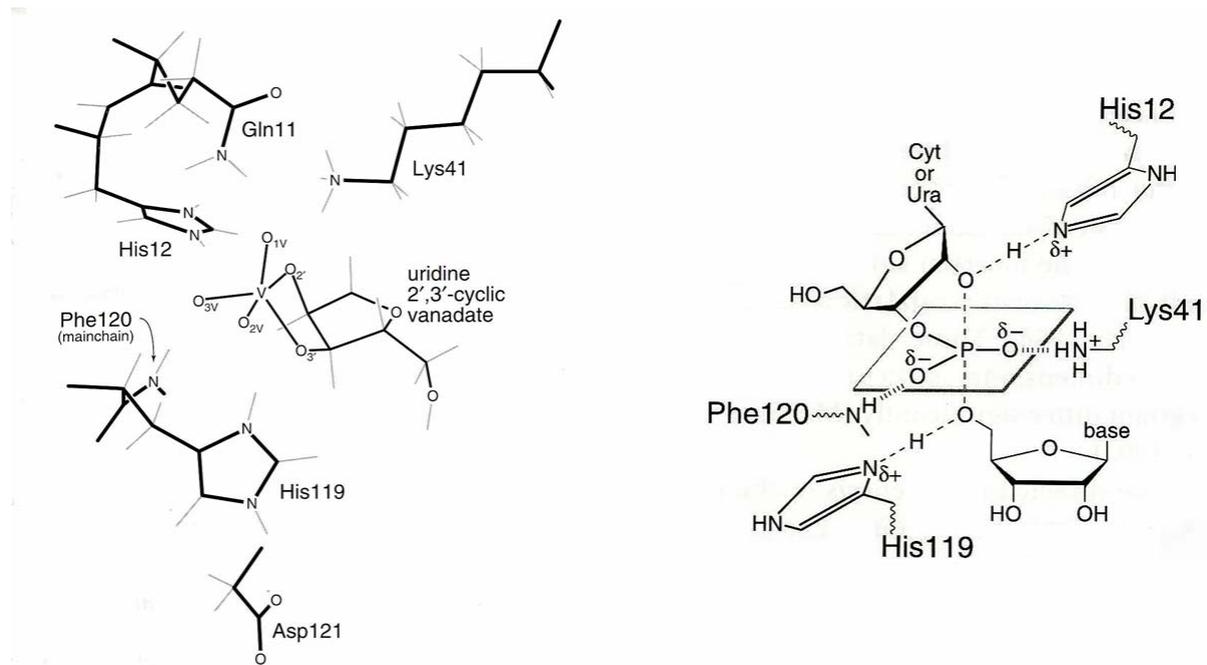


Abbildung 5: Röntgenstruktur des aktiven Zentrums der RNase A mit gebundenem 2'-3'-cyclischem Uridinvanadat (links) und mutmaßliche Struktur des Übergangszustands der RNA-Hydrolyse (rechts)¹

Die Spaltung der P-O^{5'}-Bindung von RNA durch RNase A findet am 3'-Ende von Cytidin- und Uridinresten statt. Abbildung 5 links zeigt die Röntgenstruktur des aktiven Zentrums der RNase A im Komplex mit einem 2'-3'-Cyclouridinvanadat als Modell für ein Phosphoran⁷. Daraus wurde ein Vorschlag für den rechts abgebildeten Übergangszustand abgeleitet⁸. Zunächst fallen die beiden Imidazolreste der Histidine 12 und 119 ins Auge. His12 fungiert als Base und deprotoniert die 2'-OH Gruppe. In Kombination mit der Ammoniumfunktion der Lysin-12-Seitenkette fungiert das Imidazoliumion anschließend als elektrophiler Katalysator. Auch das Peptidrückgrat-N-H an der Stelle des Phenylalanins 120 spielt eine kritische Rolle bei der elektrophilen Katalyse. Das Imidazolium des His119 erleichtert schließlich den Austritt der 5'-Hydroxylgruppe durch Protonierung. Dabei wird es wahrscheinlich in Form einer katalytischen Dyade durch den Asparaginsäurerest 121 unterstützt. Sicher hingegen ist, dass Asp121 kritisch ist für die konformationelle Stabilität der RNase A. Das Glutamin 11 schließlich trägt offensichtlich auf subtilere Weise zur Funktion der RNase A bei. Durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen seiner Seitenkette und einem Phosphorylsauerstoff hilft es bei der Orientierung des Substrats während der Bindung. Somit

wird eine unproduktive Konformation, die den Inline-Angriff der 2'-OH-Gruppe verhindert, unwahrscheinlicher.

Ein Beispiel für eine unspezifische Nuclease ist die Staphylokokkennuclease. Sie soll hier explizit Erwähnung finden, da in unserer Arbeitsgruppe künstliche Nucleasen als Mimetika ihres reaktiven Zentrums entworfen wurden, deren Weiterentwicklung schließlich zur Verwendung der 2-Aminobenzimidazole als katalytische Einheit geführt hat (s. Kapitel 3 "2-Aminobenzimidazole als RNA-spaltende Moleküle").

Die Staphylokokkennuclease ist im Gegensatz zur RNase A keine Ribonuclease, sondern eine Nuclease, die sowohl RNA als auch DNA hydrolytisch zu spalten vermag. Sie bedient sich eines Wassermoleküls als externem Nucleophil, so dass sie nicht auf das 2'-OH einer Ribose angewiesen ist.

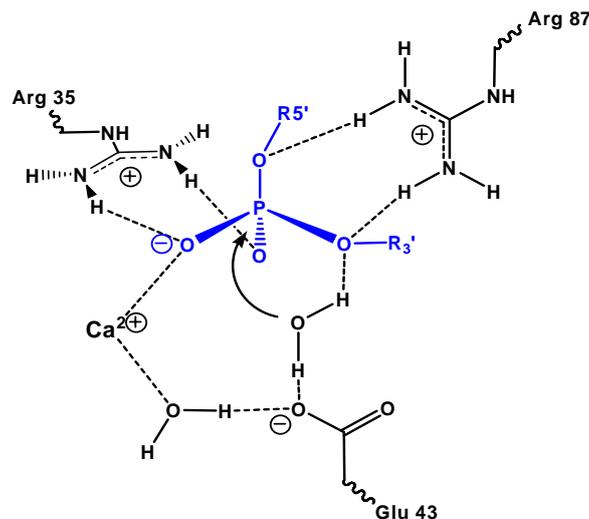


Abbildung 6: Schema des aktiven Zentrums der Staphylokokkennuclease

Eine Darstellung des aktiven Zentrums der Staphylokokkennuclease ist in Abbildung 6 zu sehen⁹. Ein Wassermolekül in unmittelbarer Nähe des Phosphats wird vom Carboxylat des Glutaminsäurerests 43 deprotoniert und kann somit den Phosphor nucleophil angreifen. Der partielle Ladungsausgleich erfolgt durch zwei Guanidiniumfunktionen der Arginine 35 und 87. Deren elektrophile Katalyse wird wiederum von einem Calciumion, das von zwei (nicht abgebildeten) Asparaginsäureresten in Position gehalten wird, unterstützt.

Nach diesem kurzen Einblick in die Wirkweise natürlicher (Ribo-)Nucleasen soll in der Folge auf künstliche Ribonucleasen eingegangen werden.

2.3 Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Metallkomplexen

2.3.1 Künstliche Nucleasen auf Basis von Lanthanid(III)-Komplexen

Wie bereits erwähnt, zählen Lanthanid-Komplexe zu den bisher effektivsten künstlichen Nucleasen. Die erste sequenzspezifische Ribonuclease dieser Klasse geht auf Komiyama zurück, der mit einem 5'-verknüpften Iminodiessigsäure-DNA-Konjugat ein Lu^{3+} -Ion chelatisierte (1)¹⁰. Die katalytische Aktivität dieses Konstrukts war jedoch noch recht bescheiden. Ein 39mer RNA-Substrat wurde ortsselektiv am Phosphat zwei Nucleotide Richtung 3'-Ende vom letzten Basenpaar entfernt gespalten. Nach 8 h bei 37 °C betrug die Spaltung 17 % (10 μM Nuclease, 0.3 μM Substrat, pH 8.0).

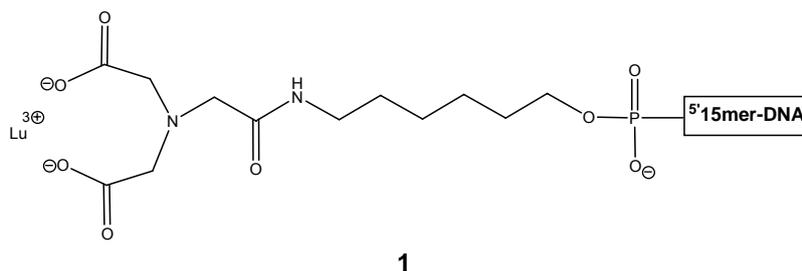


Abbildung 7: Lu^{3+} -Komplex-Konjugat (Komiyama)

Die Halbwertszeit des Substrats bei pH 7.5 und 37 °C entspräche damit ca. 30 h (bei $I = 100 \text{ mM}$). Auch im Folgenden werden Extrapolationen auf diese Werte erwähnt. Sie wurden von Niitimäki und Lönnberg errechnet und dienen der besseren Vergleichbarkeit unterschiedlicher Nucleasen. Oft sind sie jedoch nur sehr grobe Annäherungen, da die Daten keine genaue Extrapolation auf diese Bedingungen erlaubten¹¹. Der analoge La^{3+} -Komplex zeigte eine vergleichbare Aktivität, während der Eu^{3+} -Komplex um die Hälfte weniger effektiv spaltete. Negativ geladene Liganden wie Carboxylate weisen zwar eine hohe Affinität zu Lanthanid-Ionen auf, senken aber auch stark deren katalytische Aktivität.

Ein anderer Ansatz bestand daher darin, Lanthanid-Ionen mit ungeladenen macrocyclischen Chelatliganden zu komplexieren, was in der Tat eine drastisch höhere katalytische Aktivität zur Folge hatte.

RNA et. al. synthetisierten hierzu Pyridincyclophane, die Europium (III) chelatisierten (Abbildung 8). Die am 5'-Ende konjugierten Komplexe **2** und **3** konnten hierbei bis zu 88 % des Substrats nach 16 h bei 37 °C spalten (400 nM Nuclease, 500 nM Substrat, pH 7.4)¹². Die Spaltstelle liegt am 3'-Ende des dritten Nucleotids nach dem letzten Basenpaar. Hierfür schätzten Niittimäki und Lönnerberg Halbwertszeiten von 4 (**2**) bzw. 10 h (**3**)¹¹.

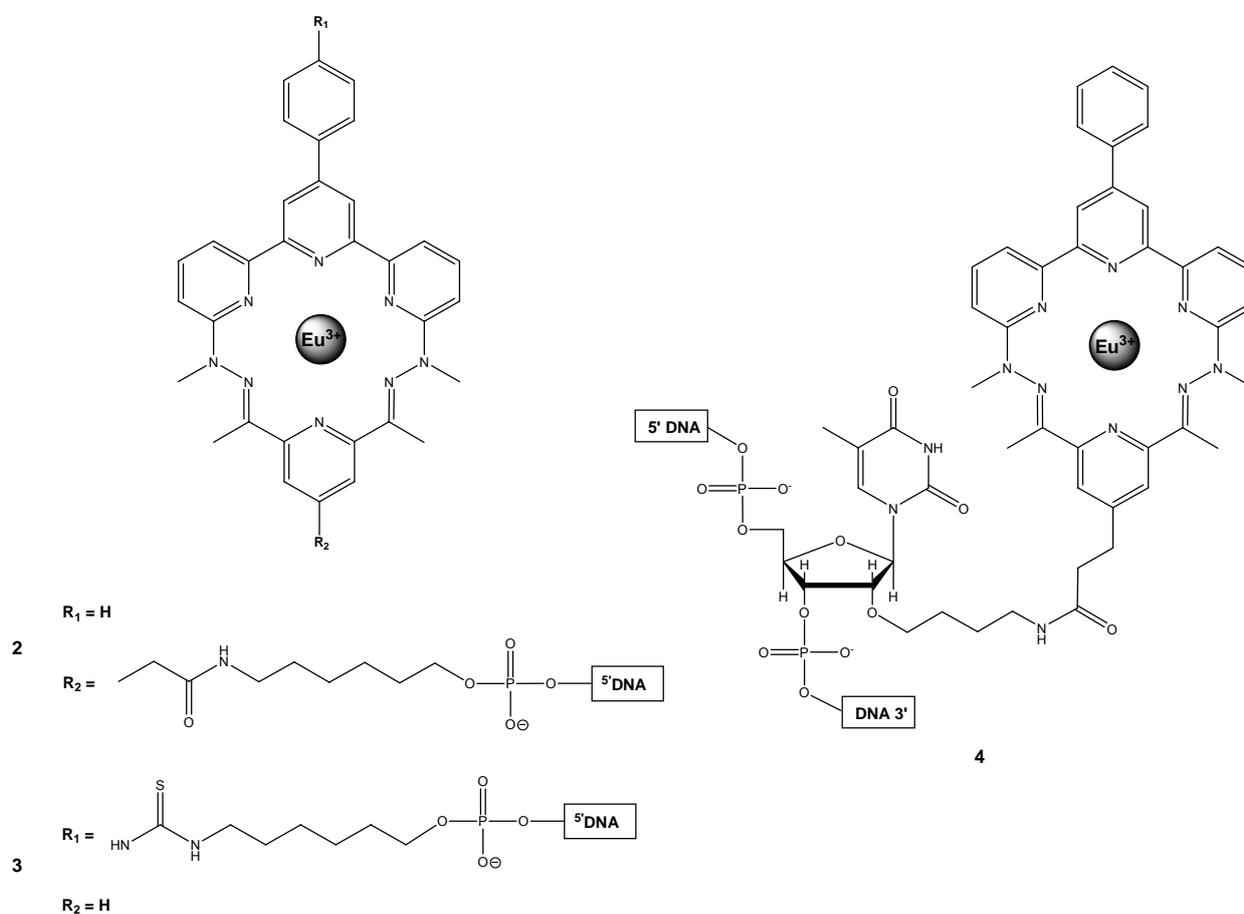


Abbildung 8: Künstliche Nucleasen auf Basis von Eu(III)-Pyridincyclophankomplexen (Häner und Moser)

Der Gruppe um Häner und Moser gelang es, Ribonucleasen mit katalytischem Turnover herzustellen¹³. Die Strategie bestand darin, die katalytisch aktive Einheit inmitten der Antisense-DNA zu konjugieren (**4**). Da jedoch innerhalb des Doppelstrangs keine hydrolytische Spaltung möglich ist (s. Kapitel 2.1 "Mechanismus und Katalyse der RNA-Hydrolyse"), wurde die Sequenz der Antisense-DNA dermaßen gewählt, dass in

unmittelbarer Nähe des Spalters ein Dinucleotid-Bulge entstand. Hierdurch wurden bis zu 92 % des Substrats innerhalb von 16 h bei 37°C gespalten (600 nM Nuclease, 50 nM Substrat, pH 7.4). Außerdem konnte ein Turnover erzielt werden. Wurde eine voll komplementäre Sequenz zur Hybridisierung angeboten und damit kein Bulge gebildet, stieg die Halbwertszeit von 4 auf 100 h (geschätzt für pH 7.5, 37 °C, I=1)¹¹. Auch die Stelle der Konjugation spielt eine große Rolle. Wurde das Europiumchelate nicht an die 2'-OH-Gruppe eines 5'-Methyluridin-Nucleosids (**4**), sondern über denselben Linker an das 5'-C eines 2'-Deoxyuridins gekuppelt, war die Effizienz um eine Größenordnung kleiner. Es wird vermutet, dass katalytische Gruppen, die den Bulge über die kleine Furche hinweg erreichen, effektiver sind als solche, die über die große Furche wechselwirken. Mit **2** konnte die Gruppe um Häner und Moser einen 39fachen Turnover nachweisen (1 µM Nuclease, 50 µM Substrat)¹⁴.

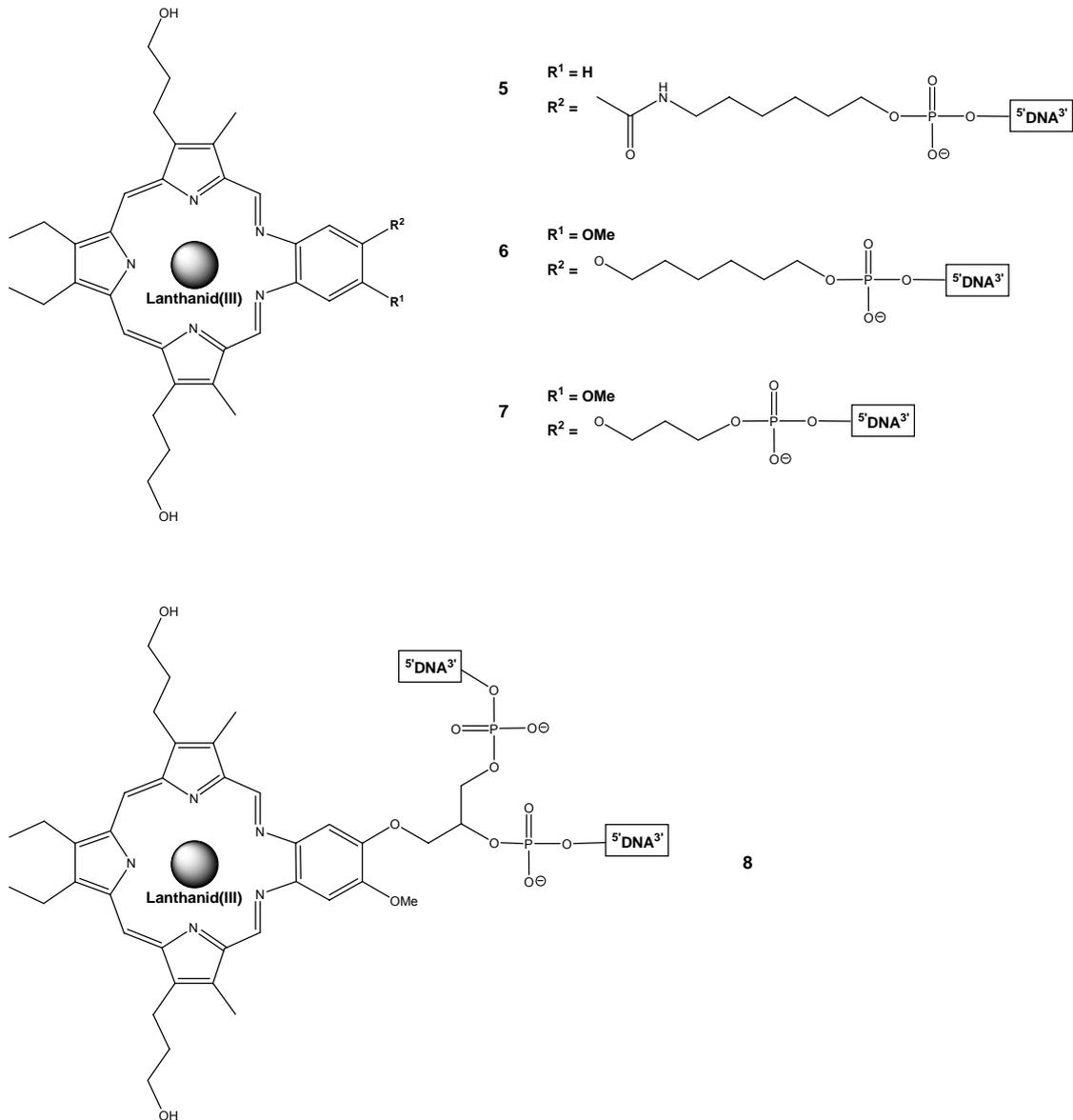


Abbildung 9: Künstliche Nucleasen auf Basis von Lanthanid(III)-Texaphyrinkomplexen (Magda)

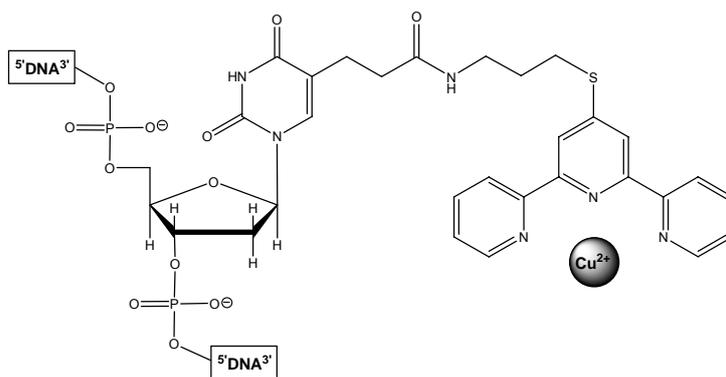
Auch die Gruppe um Magda stellte sehr effiziente Ribonucleasen auf Basis ungeladener Chelate für Lanthanid-Ionen dar. Sie nutzte Texaphyrinderivate als Liganden für Europium(III) oder Dysprosium(III) (Abbildung 9)¹⁵. Der Dy-Komplex mit dem C₃-Linker (7) erzielte hier die besten Spaltergebnisse. Das Konjugat spaltete am ersten ungepaarten Nucleotid auf der 3'-Seite. Die Halbwertszeit hierbei betrug 2 h, die der anderen Konjugate war nicht größer als 10 h^{15b}.

Der Dy(III)-Texaphyrinkomplex wurden ebenfalls in die Mitte eines Antisense-Oligonucleotids eingebaut (8), im Gegensatz zur RNA-Gruppe jedoch in nicht-nucleosidischer Form. Hier

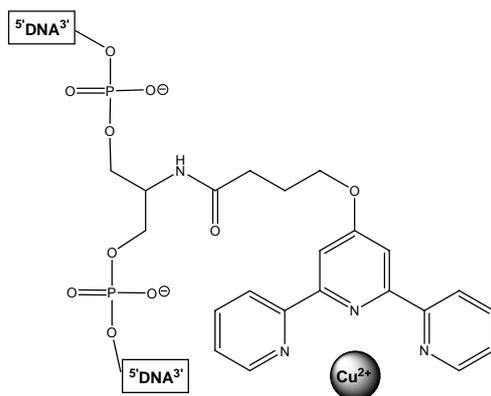
genügte ein Mononucleotid-Bulge (das ungepaarte Nucleosid gegenüber der katalytischen Einheit), um einen Turnover zu erzielen¹⁶.

2.3.2 Künstliche Nucleasen auf Basis von Cu(II)-Komplexen

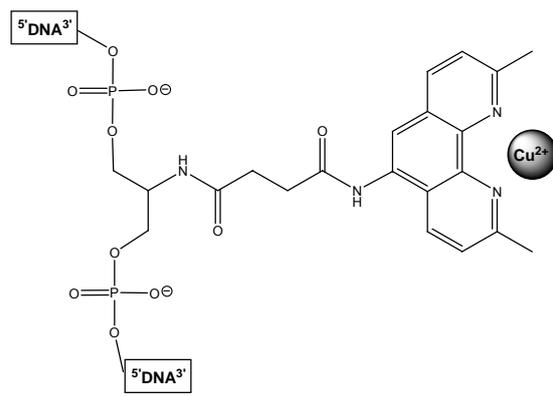
Kupfer(II)-Ionen kommen im intrazellulären Medium in hinreichender Konzentration vor, um von hochaffinen, fest bindenden Liganden auch in einem derartigen Medium komplexiert zu werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber den Lanthanid-Ion-basierten künstlichen Nucleasen. Allerdings muss gesagt werden, dass beispielsweise die Texaphyrin-Lanthanid-Komplexe der Magda-Gruppe dermaßen stabil sind, dass sie in einem intrazellulären Medium Bestand haben sollten¹⁵.



9



10



11

Abbildung 10: Künstliche Nucleasen auf Basis von Cu(II)-Komplexen (Bashkin)

Künstliche Ribonucleasen auf Cu(II)-Basis gehen auf Bashkin et. al. zurück, die einen Terpyridin-Liganden an ein in einem 17mer-Antisense-Oligonucleotid befindliches Uracil banden (**9**). Getestet an einem 159mer-Segment aus *gag*-mRNA (eine mRNA des HI-Virus) spaltete es in Anwesenheit von CuCl₂ 11 % bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 72 h (5 μM Nuclease, ~10 nM Substrat, pH 7.5)¹⁷. Die Halbwertszeit betrug ca. 400 h¹¹. Das Konzept konnte durch Kupplung des Terpyridins an ein Serinol, das ins Phosphatrückgrat des Antisense-Oligonucleotids eingebunden war (**11**), stark verbessert werden¹⁸. Hier konnte eine Spaltung von bis zu 80 % des Substrats nach 10 h erreicht werden. Nachdem man beiderseits des Serinols einen 1,3-Propandiolspacer eingesetzt und gegenüber dem Kupferkomplex einen Trinucleotid-Bulge im Substrat gebildet hatte, konnte eine Spaltung von 64 % des Substrats nach 40 h bei 45° C beobachtet werden (5 μM Nuclease, 250 nM Substrat, pH 7.5; extrapolierte Halbwertszeit 40 h¹¹). Bei einem Substratüberschuss konnte ein Turnover beobachtet werden¹⁹. Eine Steigerung der Hydrolyseaktivität konnte durch die Verwendung eines Dimethylphenanthrolinliganden erreicht werden (**10**). Die Methylgruppen sind hier von eminenter Bedeutung, da sie die Dimerisierung der Cu²⁺-Chelate und damit einen drastischen Aktivitätsverlust der Phenanthrolinkonjugate verhindern²⁰.

Inoue et. al. griffen das Terpyridin-basierte Konzept Bashkins auf und untersuchten die Kooperativität zweier Terpyridine. An das 3'- und 5'-Ende von 2'-MethoxyRNA konjugierte katalytische Gruppen (**12** und **13**) wiesen eine hohe Kooperativität auf, sofern die Antisense-Sequenzen so gewählt wurden, dass keine Lücke zwischen den beiden Terpyridinen blieb. Während die 5'-konjugierte Verbindung eine Halbwertszeit von 70 h bei 45 °C und pH 7.5 aufwies, war die 3'-konjugierte Spezies inaktiv. Setzte man beide gleichzeitig ein, betrug die Halbwertszeit 5 h²¹. Verband man die zwei Spezies über einen flexiblen Linker (**14**), sank sie auf unter 1 h²². Damit ist **14** (mit n = 1) die bisher schnellste künstliche Ribonuclease überhaupt. Sie zeigt außerdem katalytischen Turnover bei Substratüberschuss.

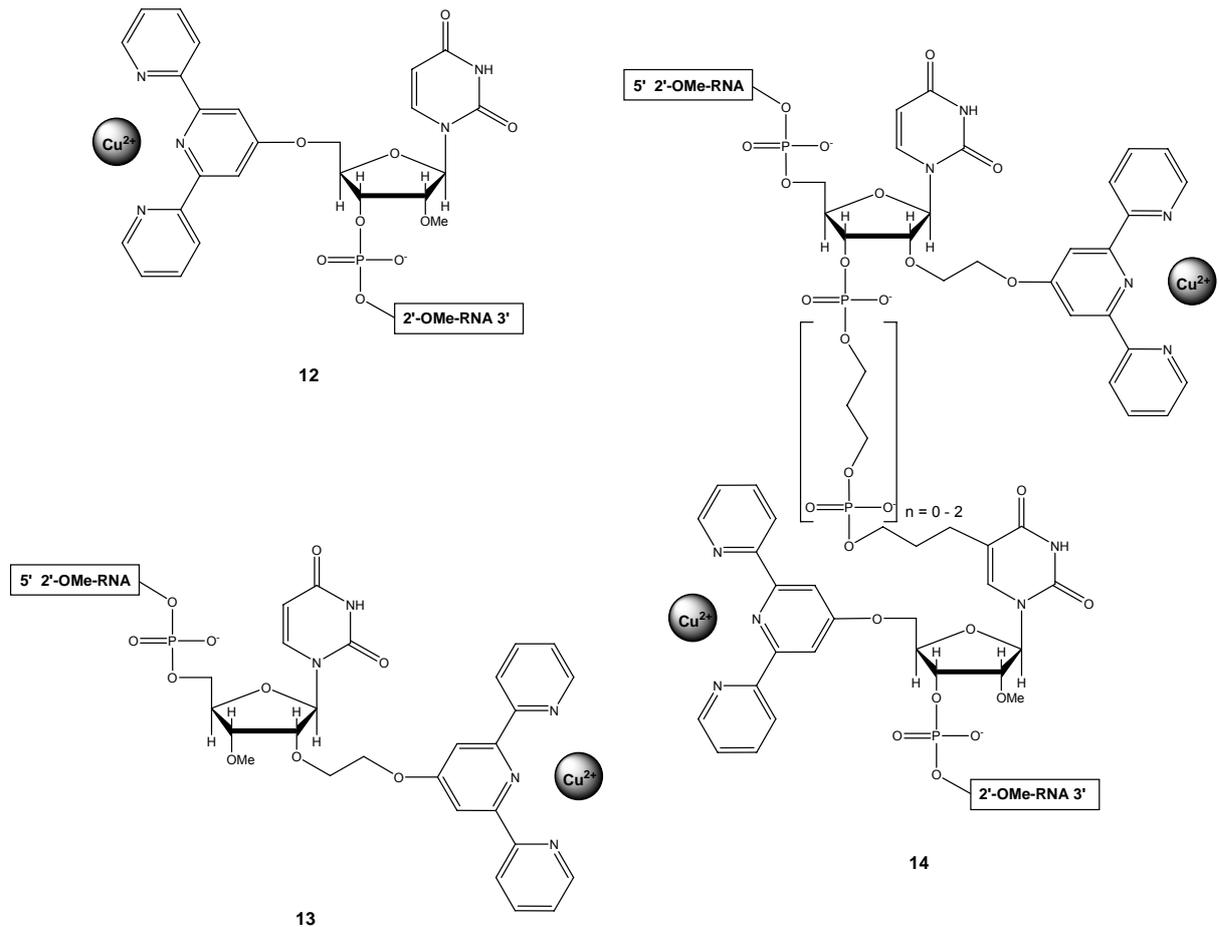
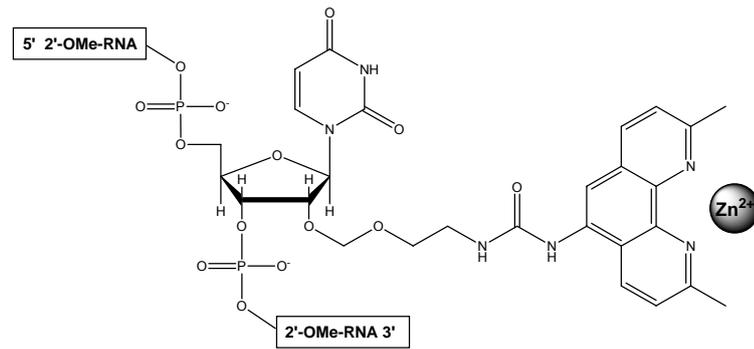


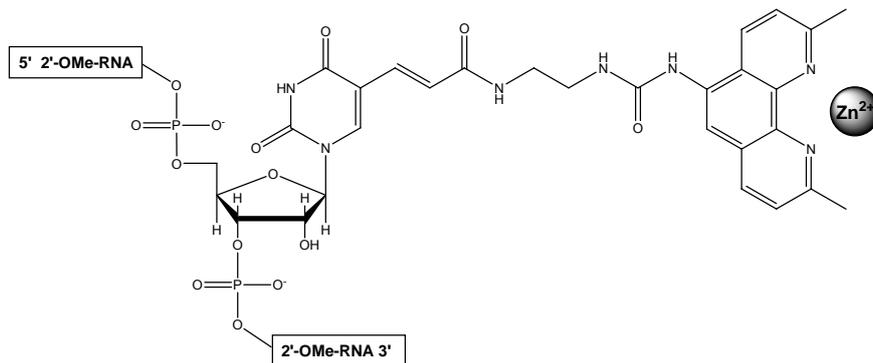
Abbildung 11: Kooperativität zweier Terpyridin-Cu(II)-Komplexe (Inoue)

2.3.3 Künstliche Nucleasen auf Basis von Zn(II)-Komplexen

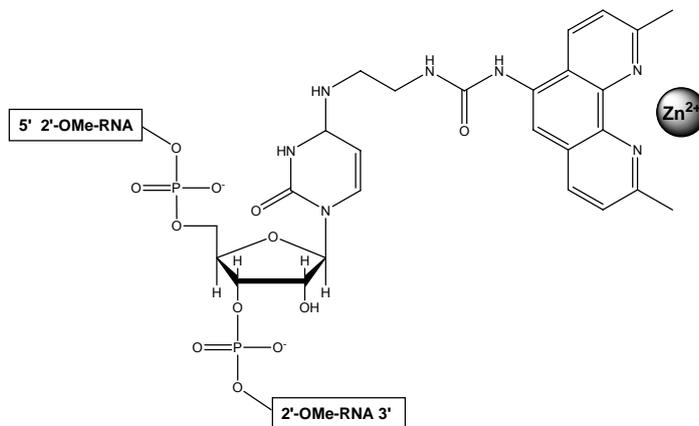
Auch Zn(II)-Ionen eignen sich für die Katalyse der RNA-Hydrolyse. Zink kommt ebenso wie Kupfer im intrazellulären Medium vor. Der mikromolare Konzentrationsbereich sollte die Bildung von Komplexen mit nanomolaren Bildungskonstanten ohne weiteren Zusatz von Ionen ermöglichen. Zn(II)-Ionen sind allerdings weniger effektiv als Cu(II)-Ionen. So war die Aktivität des 2,9-Dimethylphenanthrolin-Konjugats **11** (Abbildung 10) mit einem Zink- statt einem Kupferion um 60 % verringert^{18b}. Wegen der Präzipitation von Cu(II)-Hydroxid entschied sich die Gruppe um Strömberg, für ihre Studien zu Linkerstrukturen Konjugationsstellen und Bulgegrößen für Zn(II)-Dimethylphenanthrolin als katalytische Einheit zu verwenden (Abbildung 12)²³.



15



16



17

Abbildung 12: Künstliche Nucleasen auf Basis von Zn(II)-Dimethylphenanthrolin-Komplexen (Strömberg)

Zu diesem Zweck hatten sie die Dimethylphenanthrolin-2'-OMe-RNA-Konjugate **14** – **17** hergestellt und an verschiedenen RNA-Substraten mit Bulgegrößen von 1 bis 5 Nucleosiden gegenüber dem Spalter getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Spaltaktivität der Konjugate **16** und **17**, bei denen die katalytisch aktive Einheit an der Base angebracht war, größer war als die der Verbindung **15** mit der katalytischen Einheit am 2'-O der Ribose. Als ideale Bulgegröße erwiesen sich Tri- und Tetranucleotidbulges, die bis zu 5 mal schneller

gespalten wurden als kleinere oder größere. Da der Zink(II)-Komplex des 2,9-Dimethylphenanthrolins nicht besonders stabil ist, mussten hohe Zn^{2+} -Konzentrationen von bis zu $100 \mu\text{M}$ im Spaltbuffer vorliegen. Unter diesen Bedingungen wies ein Substrat mit Tetranucleotid-Bulge in Anwesenheit der Konjugate **15**, **16** und **17** Halbwertszeiten von 40, 11 bzw. 14 h auf (pH 7.4, 37°C). Dies entspricht einer um knapp zwei Größenordnungen gesteigerten Geschwindigkeit gegenüber dem freien Dimethylphenanthrolin-Zn(II)-Komplex. Alle Konjugate zeigten Turnover.

Eine weitere Klasse von Liganden für Zn(II)-Ionen wurde von Lönnberg et. al. als katalytische Gruppe gewählt. 1,4,7-Triazacyclododecan bildet stabilere Komplexe mit Zn^{2+} und wurde für 3'-terminale sowie innerhalb der Antisense-Sequenz angelegte Konjugate an 2'-OMe-RNA eingesetzt (Abbildung 13)²⁴.

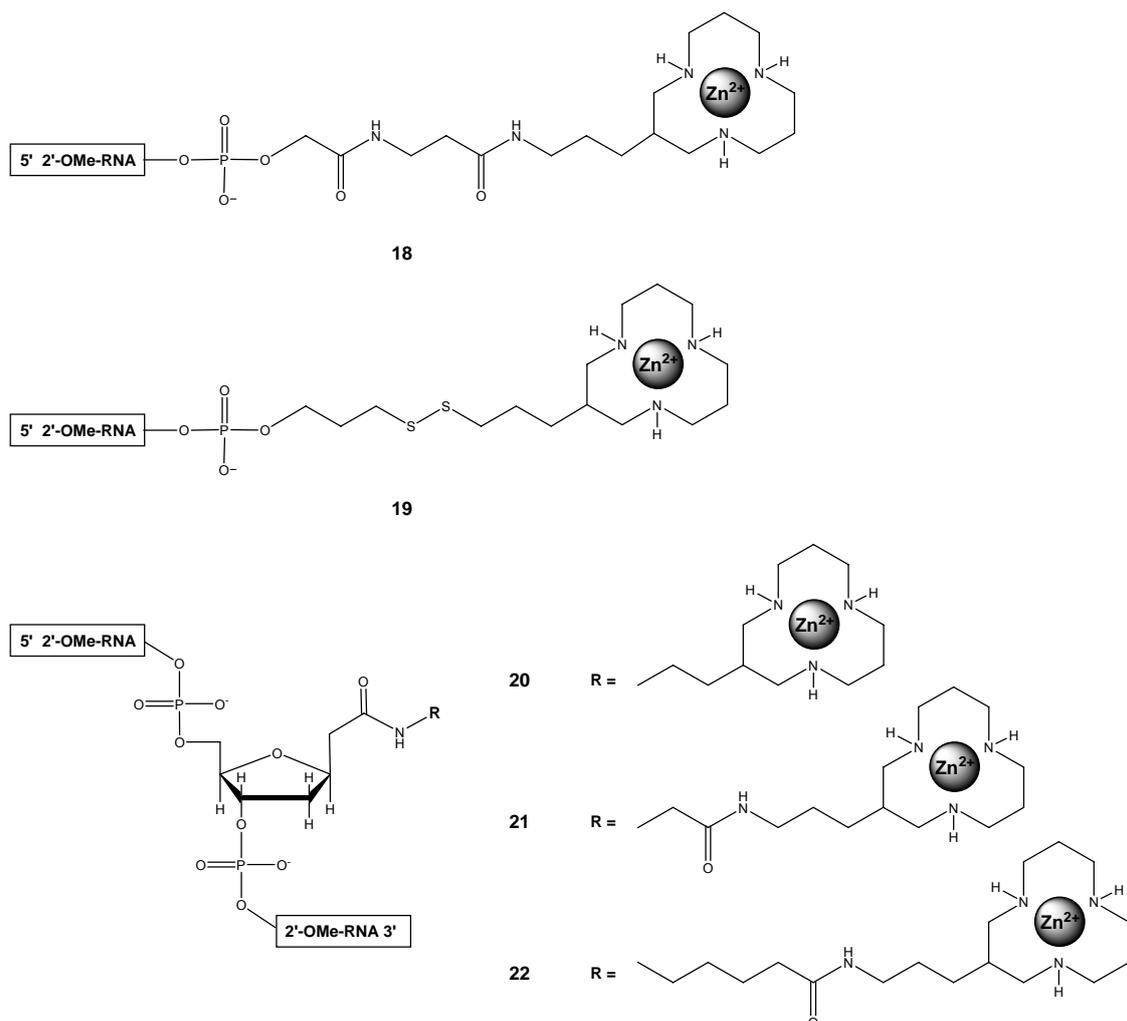


Abbildung 13: Künstliche Nucleasen auf Basis von Zn(II)-Azacrown-Komplexen (Lönnberg)

Die konjugierten Komplexe wiesen, wie schon bei Strömbergs Gruppe, eine um zwei Größenordnungen schnellere Spaltaktivität auf als die unkonjugierten. Interessanterweise schnitten hier die terminalen Konjugate **18** und **19** um bis zu 40 % besser ab als die innerhalb der Antisense-Sequenz und zeigten außerdem ebenfalls Turnover. Das Disulfidkonjugat **19** spaltete 50 % eines RNA-Substrats nach 20 h bei 35 °C (4.5 μM Nuclease, 4.5 μM Substrat, 100 μM Zn²⁺, pH 7.3)^{24a}. Extrapoliert auf pH 7.5 und 37°C entspricht dies einer Halbwertszeit von ca. 13 h¹¹.

2.4 Metallfreie künstliche Ribonucleasen

Die erste Oligonucleotid-basierte Ribonuclease auf rein organischer Basis wurde 1994 von Komiyama und seinen Mitarbeitern beschrieben²⁵.

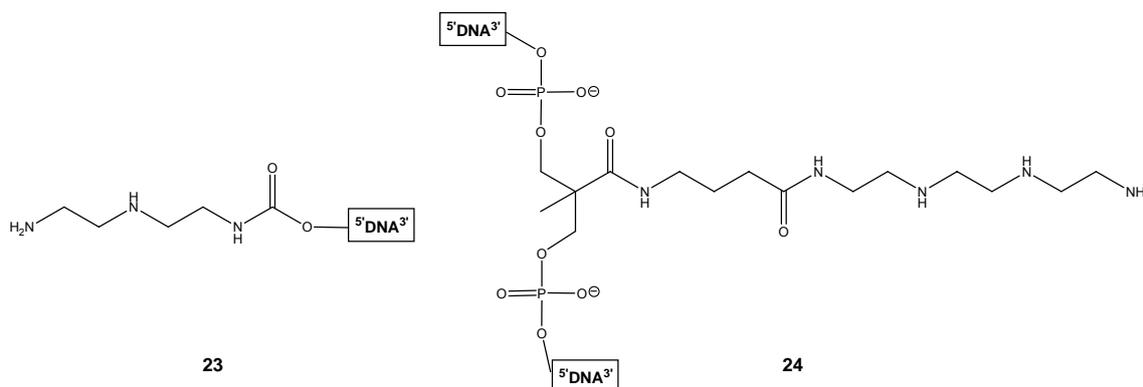


Abbildung 14: Künstliche Nucleasen auf Basis von Diethylentriamin (Komiyama)

Ein 19mer-DNA-Strang, an dessen 5'-Ende ein Diethylentriaminrest gekuppelt worden war (**23**), spaltete das erste ungepaarte Nucleosid des Substrats am 3'-Ende mit einer Halbwertszeit von 40 h bei pH 8 und 50 °C (100 μM Nuclease, 1 μM Kat). Nach der Extrapolation von Lönnberg und Niittimäki entspricht dies 200 h bei pH 7.5 und 37 °C¹¹. Das innerhalb der Antisense-Sequenz konjugierte Amin **24** war sogar ineffizienter ($\tau_{1/2} \approx 400$ h¹¹).

Die Spaltaktivität des Diethylentriamins konnte von van Boom et. al. durch Konjugation an eine Peptidnucleinsäure-Sequenz (PNA) signifikant gesteigert werden (Abbildung 15). PNA

besitzt ein Peptidrückgrat und ist somit kein Substrat für natürliche Nucleasen (und künstliche Ribonucleasen). Sie bildet Duplexe mit DNA und RNA. Durch ihr ungeladenes Rückgrat ist die Stabilität dieser Duplexe im Vergleich zu reinen Nucleinsäureduplexen sogar größer, so dass PNA im Stande ist, DNA aus einer DNA-Doppelhelix zu verdrängen²⁶.

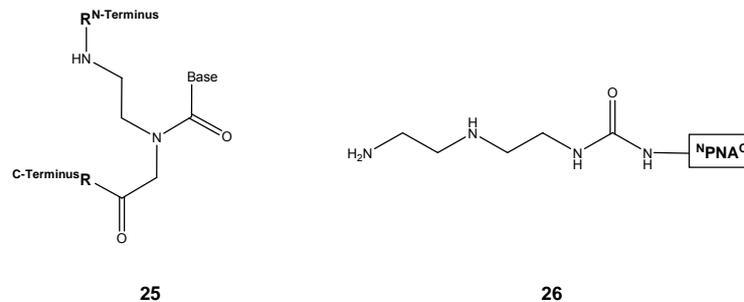


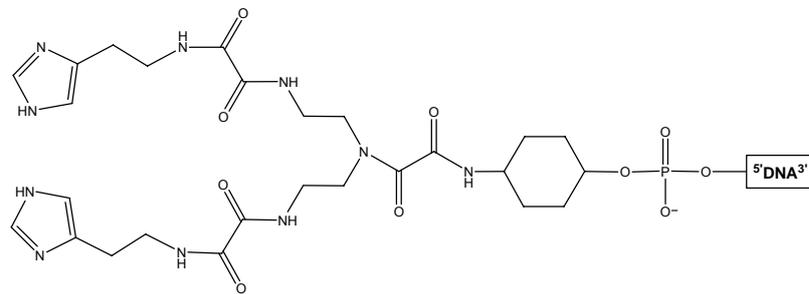
Abbildung 15: Struktur von PNA und Ethylendiamin-PNA-Konjugat (van Boom)

Das N-terminale Ethylendiaminkonjugat **26** spaltete das Substrat an der dritten Base nach dem Duplex mit einer Effizienz von 30 % nach 4 h bei pH 7.0 und 40 °C²⁷. Dies entspricht einer Halbwertszeit 8 h (extrapoliert auf 5 h bei pH 7.5 und 37 °C¹¹).

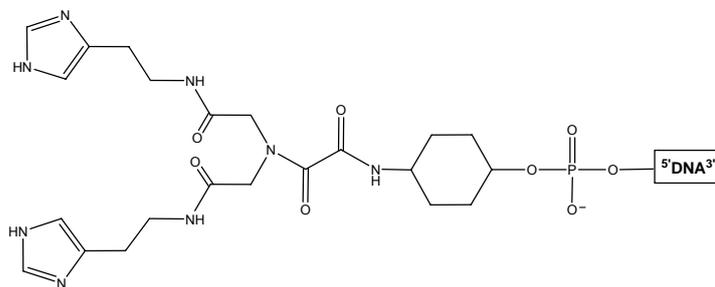
Die Gruppe um Vlassov verfolgte einen auf Imidazol basierenden Ansatz, der auf der Mimetik des aktiven Zentrums der RNase A aufbaute (s. Kapitel 2.2 "Beispiele für die enzymatische Hydrolyse von RNA"). Diese Arbeiten stellen jedoch einen gewissen Sonderfall dar. Die in Abbildung 16 gezeigten Konjugate wurden an *tRNA*^{Phe} als Substrat getestet und zielten auf eine Region, die für ihre inhärente hydrolytische Instabilität bekannt ist²⁸. So wurden die katalytischen Imidazoleinheiten der Verbindung **27** auf die Sequenz C61-ACA-G65 gerichtet und spalteten die C63-A64-Bindung in einem 50 mM Imidazol-Puffer mit einer Halbwertszeit von 1.5 h (pH 7.0, 37 °C, I = 0.2 M)^{28e}. Es wurde vermutet, dass hier nicht die Spaltgeschwindigkeit, sondern die Hybridisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war. Die Konjugate **28** und **29** spalteten *tRNA*^{Phe} auf ähnlich schnelle Weise.

Den Sonderstatus dieser Untersuchungen zeigten Experimente mit ähnlichen RNase A-Mimetika in Form von terminalen Diimidazol-DNA-Konjugaten, die sich linearen RNA-Substraten gegenüber als inaktiv herausstellten²⁹. Auch Diimidazolkonjugate innerhalb eines

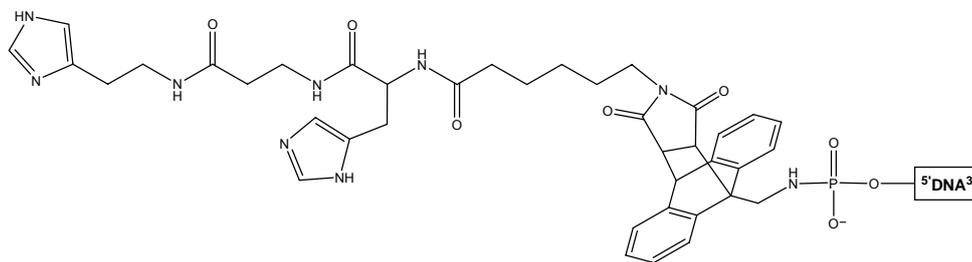
Stranges aus Methylphosphonat-DNA konnten ein lineares RNA-Substrat nur sehr langsam spalten³⁰ (auf pH 7.5 und 37°C extrapolierte Halbwertszeit von 130 h¹¹).



27



28



29

Abbildung 16: Künstliche Nucleasen auf Basis von Imidazol (Vlassov)

2.5 Weitere Strategien zur sequenz- und ortsspezifischen RNA-Spaltung

Neben der Konjugation katalytisch aktiver synthetischer Moleküle oder Ionen gibt es noch andere Strategien, RNA spezifisch zu spalten. Sie sollen an dieser Stelle jedoch nur kurz Erwähnung finden.

Eine Möglichkeit zum gezielten Schneiden von RNA *in vitro* besteht in der hybridisierungsgerichteten Spaltung durch frei in Lösung befindliche kleine Moleküle oder Metallionen. Hierbei wird das Substrat durch Duplexbildung mit DNA vor der Hydrolyse geschützt. Innerhalb des Duplex wird jedoch ein Bulge erzeugt, der für die Spaltung zugänglich ist^{30,31}. Hier ist selbst das Zuschneiden einer RNA-Sequenz möglich, indem an zwei Stellen gespalten wird.

Durch die Konjugation von sequenzspezifischen natürlichen Nucleasen an Antisense-DNA konnte ebenfalls eine Sequenzspezifität erwirkt werden³².

Weitere Möglichkeiten zur RNA-Spaltung bestehen in der Nutzung natürlicher Moleküle und Mechanismen wie Ribozyme oder RNA-Interferenz. Auf diese soll jedoch in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

3 2-Aminobenzimidazole als RNA-spaltende Moleküle

Wie bereits im Kapitel 2.2 "Beispiele für die enzymatische Hydrolyse von RNA" erwähnt, diente das reaktive Zentrum der Staphylokokkennuclease in unserem Arbeitskreis als Modell für Nucleasemimetika auf Basis von Guanidinfunktionen³³.

Zunächst wurden hier Experimente zur Umesterung eines zyklischen Catecholphosphats mit Phenylethanol in DMF durchgeführt.

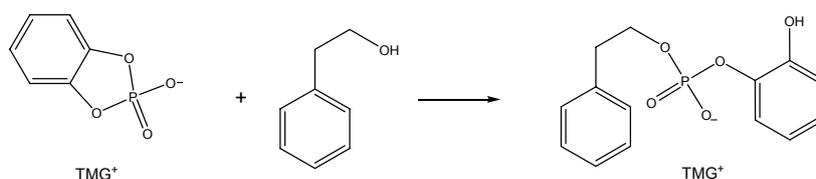


Abbildung 17: Modellreaktion der Umesterung eines Phosphorsäurediesters

In Analogie zur Staphylokokkennuclease (s. Abbildung 6) konnte bereits eine signifikante Kooperativität zweier mit einem entsprechenden Spacer verbundenen Guanidiniumgruppen nachgewiesen werden. Eine Steigerung der katalytischen Aktivität um eine Größenordnung konnte durch einen Wechsel von Guanidin zu seinem heterocyclischen Analogon **31** erreicht werden. Dieser Effekt wurde auf dessen erhöhte Acidität zurückgeführt. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken zum Substrat gestärkt und damit der Übergangszustand besser stabilisiert. Neben der so verbesserten elektrophilen Katalyse wird das Kation dazu befähigt, generelle Säure/Base-Katalyse zu leisten. Während die Guanidin-basierten Verbindungen **30** und **31** (Abbildung 18) die Modellreaktion in DMF gegenüber der Hintergrundreaktion um den Faktor 360 bzw. 4800 beschleunigten, waren sie im wässrigen Medium gegenüber RNA als Substrat inaktiv. Dies hat mehrere Gründe. Zunächst ist die Reduktion der Ionenpaarstabilität durch den Wechsel von DMF zu Wasser, also in ein protisches Medium, zu nennen. Wasser stellt durch seine hohe Polarität selbst ein gutes Elektrophil dar und erschwert es der katalytischen Einheit, die Hydrathülle des Phosphats (bzw. des Phosphorans im Übergangszustand) zu durchbrechen. Schließlich wird das Protonierungsgleichgewicht in Wasser zum Kation verschoben, so dass Guanidin und sein verbrücktes Derivat nicht genügend Acidität aufweisen, um Protonentransferkatalyse zu leisten. Der verbleibende

Beitrag dieser Gruppen zur elektrophilen Katalyse reicht nicht aus, um eine nennenswerte Beschleunigung der Umesterung von RNA zu erzeugen.

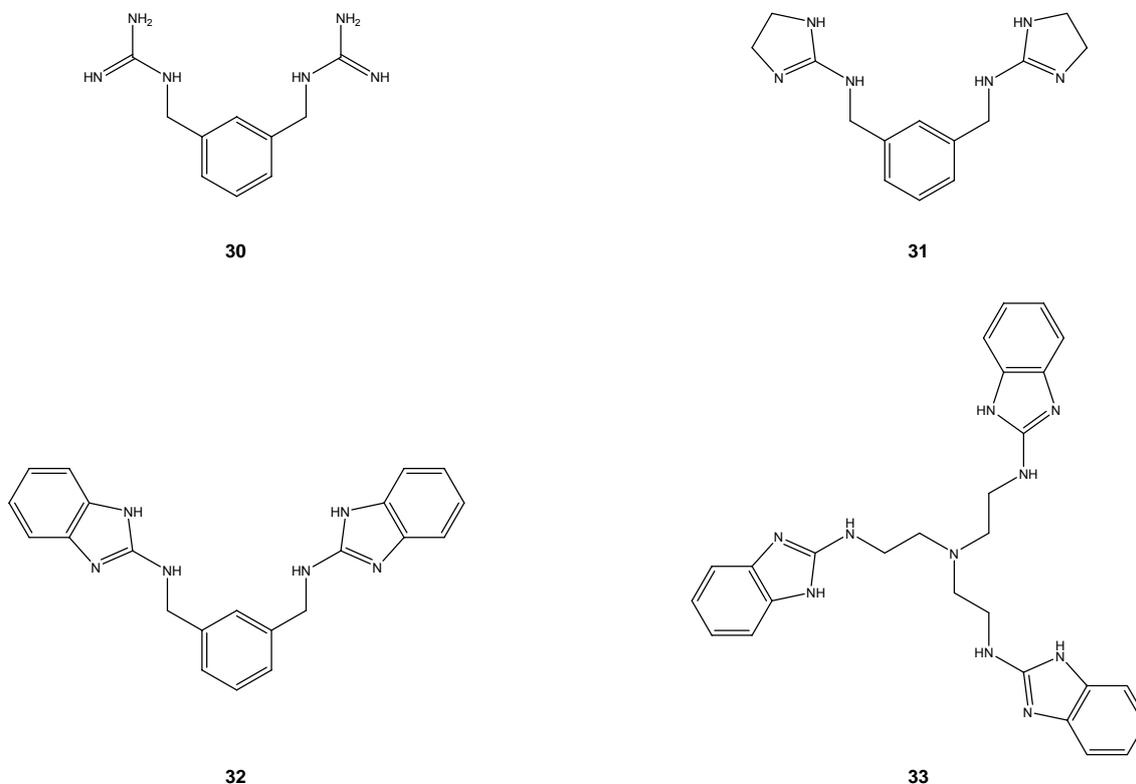


Abbildung 18: Entwicklung von Mimetika der Staphylokokkennuclease

Durch Erhöhung der Acidität der katalytischen Einheiten, also eine Verschiebung des pK_a in Richtung 7 sollten die oben genannten Effekte kompensiert werden. Dies gelang durch die Verwendung von 2-Aminobenzimidazolen. Während die Guanidinderivate **30** und **31** pK_a -Werte von etwa 14 aufweisen (14.4 für unsubstituiertes Guanidin³⁴), wurden für die 2-Aminobenzimidazole **32** und **33** pK_a -Werte um die 7 gemessen (pK_a des unsubstituierten 2-Aminobenzimidazols = 7.45³⁵; s. auch Kapitel 5.6 "Der Zusammenhang zwischen pK_a und Aktivität von RNA-Spaltenden Molekülen").

2-Aminobenzimidazol sollte somit als katalytisch aktive Gruppe in der Lage sein, einen Beitrag zu allgemeiner Säure/Base- wie auch zur elektrophilen Katalyse der RNA-Hydrolyse zu leisten. In der Tat haben sich die 2-Aminobenzimidazolderivate **32** und **33** als effektive RNA-Spalter bewährt. Das Trisbenzimidazolderivat **33** zeigte, dass durch die Kooperativität dreier statt zweier katalytischer Einheiten ein noch größerer hyperadditiver Effekt der

Aktivität erzielt werden kann^{33d}. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, Konjugate von 2-Aminobenzimidazolen an RNA-Liganden herzustellen und zu untersuchen.

4 Eigene synthetische Arbeiten

4.1 Darstellung kupplungsfähiger 2-Aminobenzimidazol-Derivate

Nachdem sich die 2-Aminobenzimidazole als hervorragend zur Katalyse der RNA-Hydrolyse geeignete Molekülklasse herausgestellt hatten, galt es, Derivate dieser Moleküle zu synthetisieren, die sich zur Konjugation an Antisense-DNA und RNA-Liganden eignen. Die Darstellung dieser Moleküle wird im Folgenden beschrieben.

4.1.1 Synthese des Bisbenzimidazols

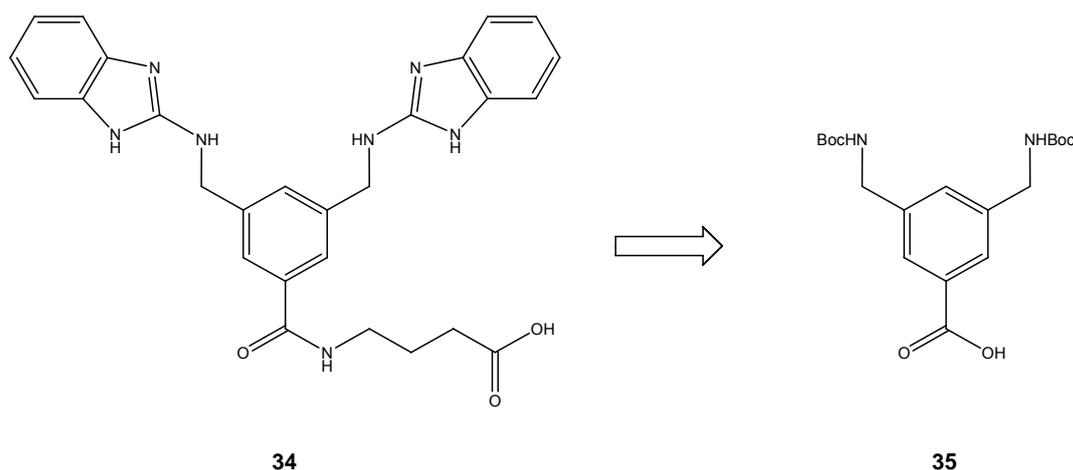
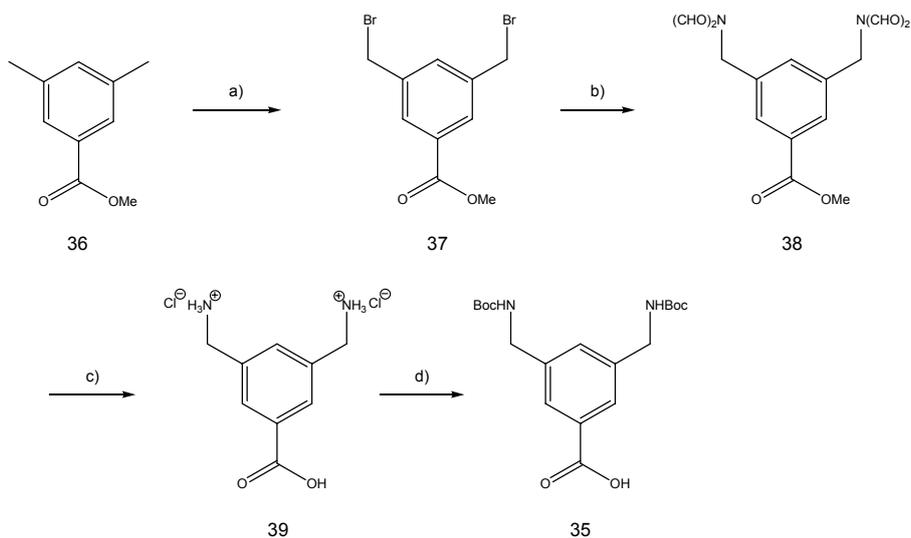


Abbildung 19: kupplungsfähiges Bisbenzimidazol und sein zentraler Synthesebaustein

Obwohl zu Anfang der vorliegenden Arbeit bereits fest stand, dass das Trisbenzimidazol **33** dem Bisbenzimidazol **32** als Katalysator für die RNA-Hydrolyse weit überlegen ist, war es doch logisch, ein Konjugat des Bisbenzimidazols herzustellen. Zum Einen war dies die Fortführung meiner Diplomarbeit, zum Anderen bietet sich ein Vergleich von Bis- und Trisbenzimidazolderivaten natürlich auch bei Peptid- und Nucleinsäurekonjugaten an. Die Synthesewege des Bisbenzimidazols verlaufen bis zur Stufe des Benzoesäurederivats **35** zunächst identisch^{33c,36}, daher soll hier auch nicht weiter auf die Synthese dieses Bausteins eingegangen werden (Abbildung 21).



a) NBS, AIBN, Methylformiat, Reflux, hn, 20 h, 83%; b) Natriumdiformylamid, ACN, Reflux, 4 h, 72%; c) HCl, Dioxan, Reflux, 2 h, 95%; d) Boc₂O, NaOH, DCM, RT, 5d, 82%

Abbildung 21: Synthese des Bausteins 35

Auf der Stufe der Boc-geschützten Benzoesäure wurde ein C₄-Linker in Form von GABA-Methylester eingeführt. Dieser war durch Refluxieren von 4-Aminobuttersäure (GABA) in Methanol mit Thionylchlorid einfach präparativ zugänglich³⁷. Durch die Nutzung von Methanol als Lösungsmittel und Reagenz wird das Reaktionsgleichgewicht fast vollständig auf die Seite des Esters verschoben.

Das Thionylchlorid stellt eine HCl-Quelle dar, die sich im Vakuum restlos entfernen lässt. So war es möglich, den Methylester **41** in guter Ausbeute ohne weitere Aufreinigung analysenrein zu erhalten.

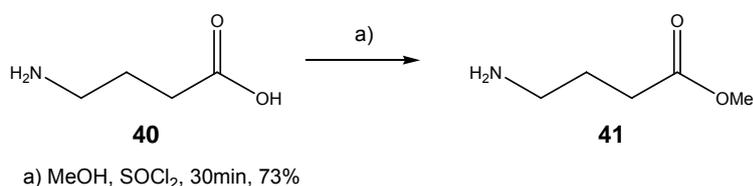
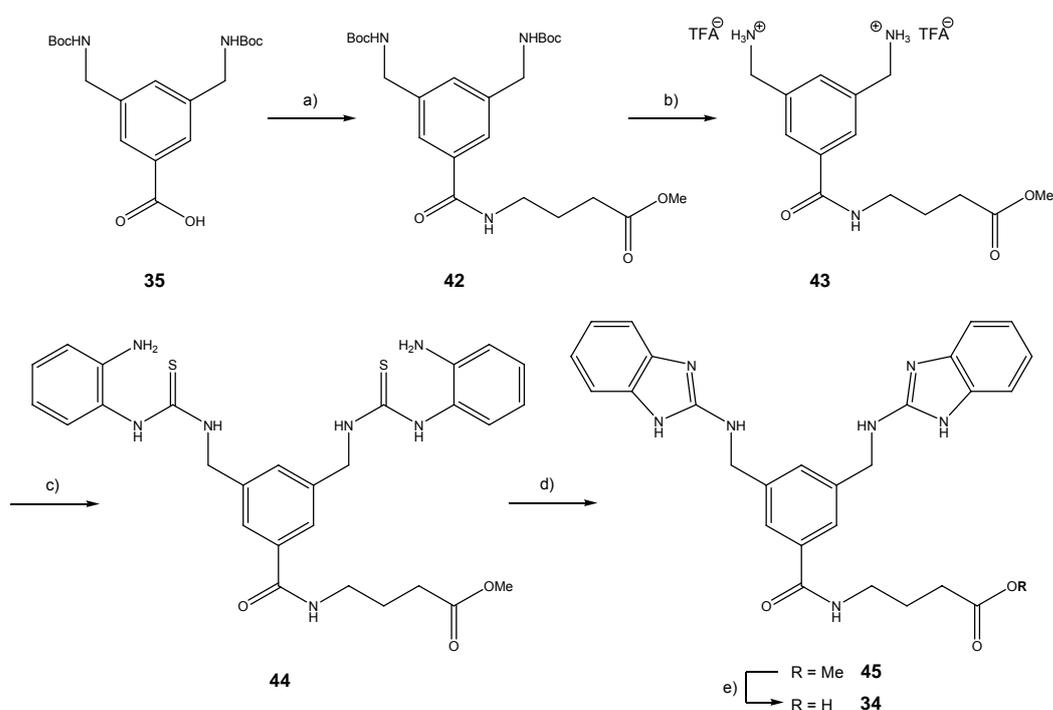


Abbildung 20: Darstellung von GABA-Methylester

Der Linker wurde mit DIC und HOBt an das Benzoesäurederivat **35** gekuppelt. Nun sollten die beiden Benzimidazole aufgebaut werden. Dazu wurde zunächst mit Hilfe von TFA Boc-entschützt. Das freie Amin konnte ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden; allerdings wurde das Reaktionsgemisch mit NEt₃ alkalisiert, um die Aminogruppen zu deprotonieren. Zur Synthese des 2-Aminobenzimidazols konnte im vorliegenden Fall die Syntheseroute

mittels Thiocarbonyldiimidazol und Phenylendiamin eingeschlagen werden. Aufgrund der Rigidität des zentralen Benzolkerns und des relativ großen Abstands der beiden Aminoethylfunktionalitäten war eine intramolekulare Reaktion der zweiten Aminogruppe des Phenylendiamins mit dem jeweils anderen aktivierten Thioharnstoff nicht zu befürchten.



a) DIC, HOBt, DCM, 78%; b) TFA, DCM, quant.; c) 1. TCDI, Imidazol (kat.), NEt₃, ACN; 2. Phenylendiamin, 50 °C, 61%; d) HgO, EtOH, Reflux, 63%; e) LiOH, MeOH / H₂O, Reflux, 53%

Abbildung 22: Darstellung des kupplungsfähigen Bisbenzimidazols 34

Dieser Reaktionsweg hatte sich im Zuge meiner Diplomarbeit bereits bewährt. Somit wurde direkt der cyclisierbare Aminophenylthioharnstoff **44** erhalten. Dieser wurde mit Hilfe von HgO als Thiophil in das 2-Aminobenzimidazol überführt. Schließlich wurde der GABA-Methylester mit LiOH entschützt und man erhielt die kupplungsfähige Verbindung **34**. Der Grund für die niedrige Ausbeute liegt nicht in der unvollständigen Umsetzung, sondern der schwierigen Aufarbeitung des Zwitterions.

4.1.2 Synthese des Trisbenzimidazols

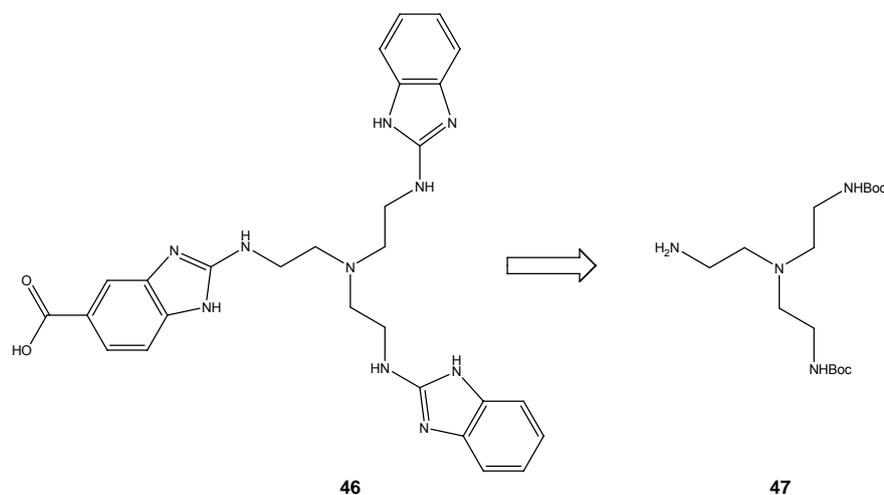


Abbildung 23: Kupplungsfähiges Trisbenzimidazol und der Synthesebaustein Bisboc-Tren

Das bisher in unserer Gruppe beste unspezifisch RNA-spaltende Molekül war das von A. Strick synthetisierte Trisbenzimidazol **33**. Um dieses Molekül in eine künstliche Nuclease einzubauen, sollte das kupplungsfähige Trisbenzimidazol **46** synthetisiert werden^{33d}. Als Funktionalität, die als "Henkel" für Konjugationen dienen sollte, wurde hier wie schon beim Bisbenzimidazol eine Carboxylgruppe gewählt. Bemerkenswert hierbei ist, dass die Funktionalität, die die Konjugation ermöglichen sollte, nicht wie beim Bisbenzimidazol fernab der katalytisch aktiven Gruppen, sondern direkt an einem der drei 2-Aminobenzimidazole zu finden ist. Einerseits stellt dies eine minimale Änderung der Gesamtstruktur im Vergleich zu **33** dar, andererseits bestand aber auch das Risiko, dass das 2-Aminobenzimidazol, welches die Carboxylfunktion trägt, in seiner Eigenschaft als katalytisch wirksame Gruppe für die RNA-Hydrolyse eingeschränkt sein würde. Dies sollte sich jedoch nicht bewahrheiten; der Methyl ester der Verbindung **46** weist die gleiche unspezifische Spaltaktivität gegenüber RNA auf wie die unsubstituierte Trisbenzimidazolverbindung (s. Kapitel 5.2 "Unspezifische RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole").

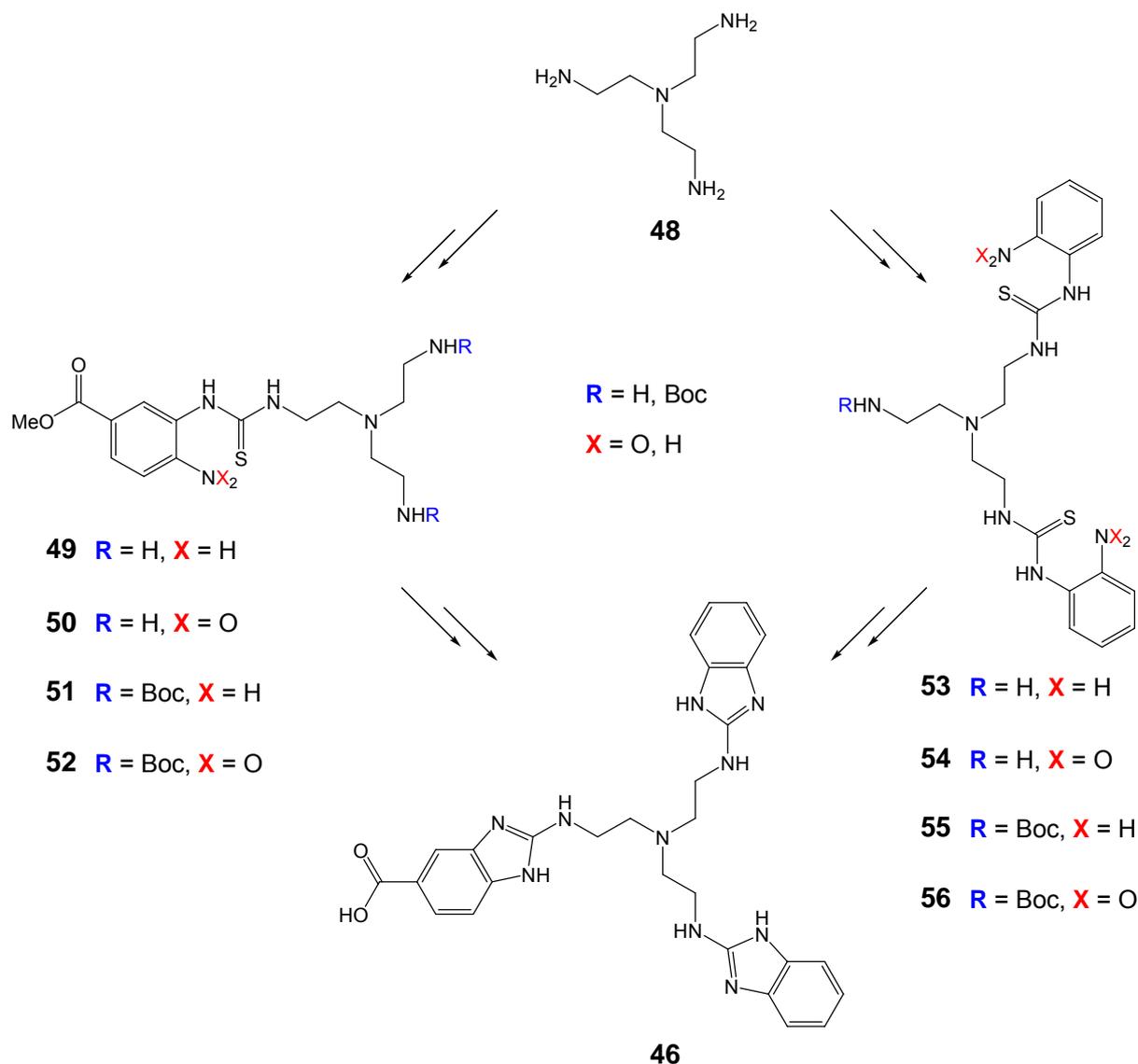


Abbildung 24: Denkbare Syntheserouten zur Darstellung von 46 über cyclisierbare 2-Aminophenylthioharnstoffe

Zur Synthese des Zielmoleküls boten sich mehrere theoretische Möglichkeiten (s. Abbildung 24). Ausgehend von Tren **48** könnte man erst die zwei unsubstituierten Benzimidazole und anschließend jenes mit Carboxylfunktion synthetisieren oder umgekehrt. Auch stellte sich die Frage, ob man zunächst eine oder zwei Aminogruppen des Trens schützen sollte oder nicht (**R**). Zum Aufbau der Benzimidazole über cyclisierbare 2-Aminophenylthioharnstoffe gab es die Option, diese über die 2-Nitrophenylthioharnstoffe aus Nitrophenylisothiocyanat mit anschließender Reduktion oder direkt mit Hilfe von Phenylendiamin darzustellen^{38,39} (**X**). Versuche, Tren direkt mit Nitrophenylisothiocyanat zu disubstituieren (**54**, **R** = H, **X** = O) führten nicht zum Erfolg, da man zwar das Produkt nachweisen konnte, aber erwartungsgemäß ein Gemisch von mono-, di- und trisubstituiertem Tren vorfand. Dies ließ

sich auch nicht durch Variation der Reaktionsbedingungen (höhere Verdünnung, langsames Zutropfen des 2-Nitrophenylisothiocyanats) zu Gunsten des gewünschten Produkts verschieben. Außerdem stellte sich die chromatographische Aufreinigung des Produkts mit freiem aliphatischem Amin aufgrund der hohen Polarität als diffizil heraus. Ein weiterer Punkt, der angesichts der geringen Ausbeute an gewünschtem Produkt stark gegen diesen Syntheseweg sprach, war der hohe Preis von 2-Nitrophenylisothiocyanat. Dieses ließ sich zwar auch aus *o*-Nitroanilin und Thiophosgen herstellen, was jedoch aufgrund der damit verbundenen Gefahren nur bei immer wieder auftretenden Lieferengpässen praktiziert wurde. Daher wurde dieser Weg recht schnell verworfen. Aufgrund der Tatsache, dass schon die einstufige Synthese des Bis-Nitrophenylthioharnstoffs **54** ($R = H$, $X = O$) nicht auf diese Weise zu realisieren war, wurde auf Versuche, ungeschütztes Tren in einer Eintopfreaktion mit Thiocarbonyldiimidazol und anschließend mit Phenylendiamin umzusetzen, um Aminophenylthioharnstoff **53** ($R = H$, $X = H$) zu erhalten, von vorne herein verzichtet.

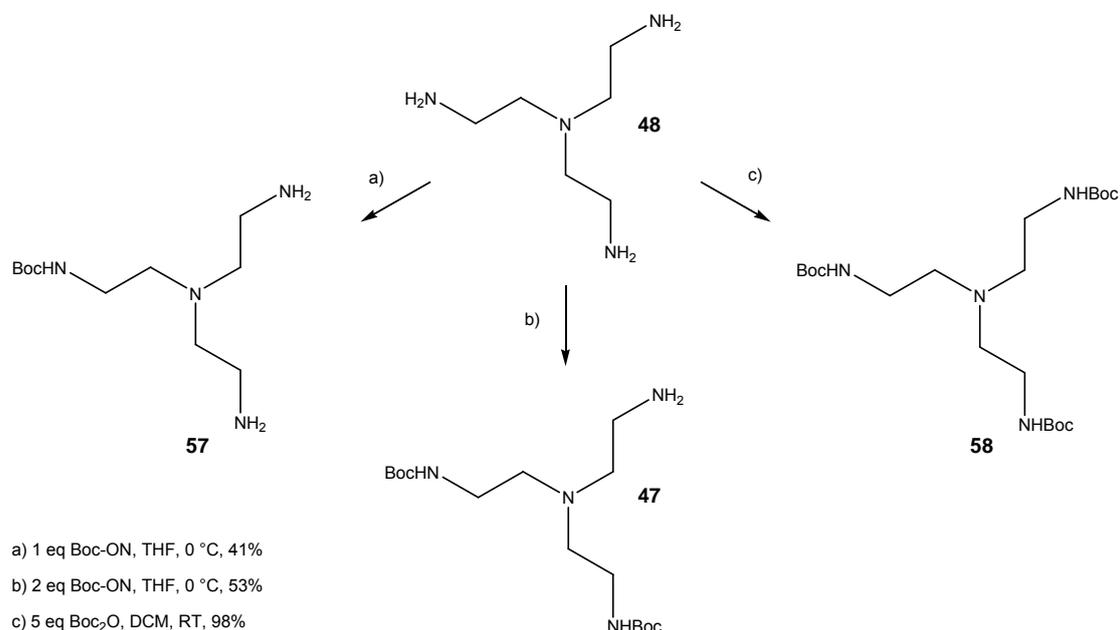


Abbildung 25: Boc-Schätzung eines oder mehrerer Amine des Trens

Anders stellte sich die Situation beim Schützen eines oder mehrerer Amine des Trens dar (s. Abbildung 25). Sowohl Mono-, als auch Bis- und Trisboc-Tren konnten dargestellt werden. Erwartungsgemäß stieg die Ausbeute vom Mono- zum Tris-geschützten Produkt stark an, da

bei ein- bzw. zweifacher Substitution auch Produktgemische entstanden; hier konnte man jedoch durch die oben erwähnten Reaktionsbedingungen (hohe Verdünnung, langsames Zutropfen des Boc-Reagenz) sowie die Verwendung des reaktiveren Boc-ON an Stelle von Boc_2O passable Ausbeuten erzielen. Auch hier stellte sich jedoch wieder das Problem der schlechten Chromatographierbarkeit freier aliphatischer Amine. Gerade das Monoboc-Tren musste mit einer großen Menge sehr polaren Laufmittels über wenig Kieselgel getrennt werden (Ethylacetat : Methanol = 1:1, 1 % NH_3 , Kieselgel : Rohprodukt $\leq 10 : 1$).

Ausgehend von Bisboc-Tren 47 wurde nun die Route gewählt, bei der zuerst das 2-Aminobenzimidazol, das die Carbonylfunktion trägt, synthetisiert wird⁴⁰. Dies baute man aus 3,4-Diaminobenzoessäure 59 auf, die vorher mit Methanol verestert wurde. Auch hier wurde Thionylchlorid als HCl-Bildner eingesetzt⁴¹ (s. 41). In einer Eintopfreaktion konnte man Bisboc-Tren nun zunächst mit

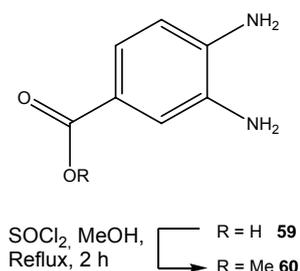
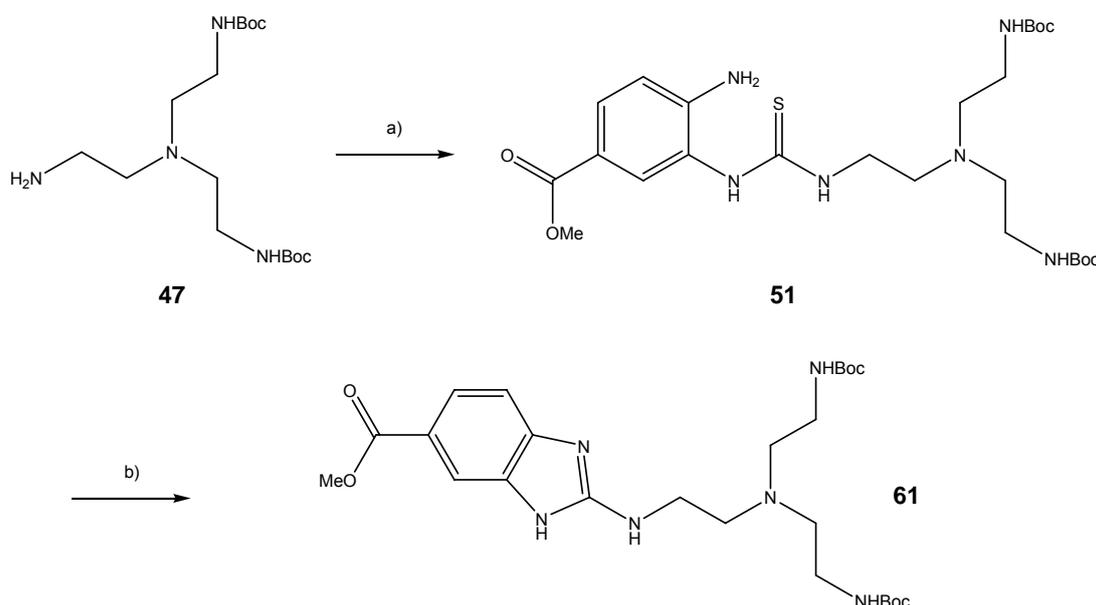


Abbildung 27: Synthese von 3,4-Benzoesäuremethylester

konnte man Bisboc-Tren nun zunächst mit Thiocarbonyldiimidazol und den dabei entstehenden Imidazolyl-Thioharnstoff gleich darauf mit 3,4-Diaminobenzoessäuremethylester 60 umsetzen. Man erhielt den 2-Aminophenylthioharnstoff 51, der mit gelbem Quecksilberoxid als Thiophil zum 2-Aminobenzimidazolderivat 61 umgesetzt wurde. Nun galt es, die beiden unfunktionalisierten 2-Aminobenzimidazole am Tren-Derivat darzustellen.

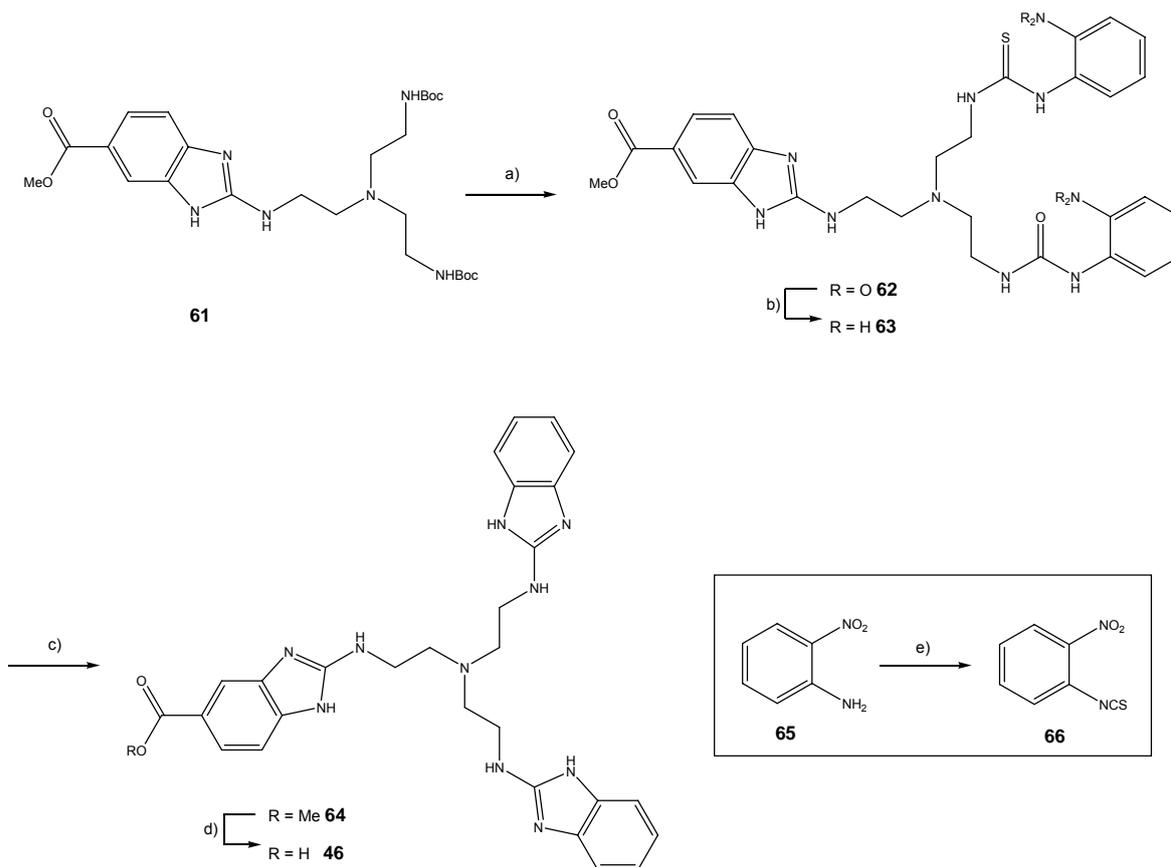


a) 1. TCDI, Imidazol (kat.) ACN, 0°, 1 h, 2. 60, 50 °C 4 h 80%; b) HgO , S (kat), EtOH, Reflux, 97%

Abbildung 26: Aufbau des funktionalisierten 2-Aminobenzimidazols 61

Wie bereits beim allgemeinen Syntheschema (s. Abbildung 24) erläutert, gibt es theoretisch auch hier den direkten Weg zur Cyclisierung über das 2-Aminophenylthioharnstoffderivat und den Umweg über den Nitrophenylthioharnstoff und anschließende Reduktion. Dadurch, dass hier zwei Aminobenzimidazoleinheiten gleichzeitig aufgebaut werden sollten, versprach die Umsetzung der beiden Amine mit Thiocarbonyldiimidazol und anschließend Phenylendiamin hier keinen großen Erfolg. Wie schon bei der Synthese des unsubstituierten Trisbenzimidazols gezeigt werden konnte, war zu befürchten, dass durch die zweite aromatische Aminogruppe macrocyclische oder polymere Thioharnstoffe entstünden⁴². Daher wurde der längere Weg über den 2-Nitrophenylthioharnstoff **62** gewählt. Hierzu wurde das Bisboc-Derivat **61** zunächst entschützt. Dies war durch Verwendung von Thionylchlorid einfach zu bewerkstelligen, da man dadurch in quantitativer Ausbeute das Hydrochlorid erhielt, welches ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden konnte. Das freie Bisamin konnte nun nach Zusatz von etwas Triethylamin in sehr guter Ausbeute mit *o*-Nitrophenylisothiocyanat **65** zum 2-Nitrophenylthioharnstoff **62** umgesetzt werden⁴³. Da das Isothiocyanat zwar kommerziell erhältlich ist, aber zeitweilig sehr lange Lieferzeiten hatte, wurde es auch aus *o*-Nitroanilin mit Hilfe von Thiophosgen selbst hergestellt⁴⁴.

Ein unerwartetes Hindernis in der Synthese stellte die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe zu Verbindung **63** dar. Während bei der Darstellung des unsubstituierten Trisbenzimidazols **33** eine Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle im Autoklaven unter 2.5 bar Wasserstoffdruck (oder gar Ballondruck) bei Raumtemperatur möglich gewesen war, konnte bei Verbindung **62** unter diesen Bedingungen kein Umsatz beobachtet werden. Auch der Verzicht auf Ammoniak als partielles Katalysatorgift im Lösungsmittel (MeOH) zur Vermeidung einer unerwünschten Hydrierung der C-S-Doppelbindung³⁸ brachte keinen Umsatz. Nun wurden diverse Alternativen zur Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe ausgelotet. So wurden Experimente mit Raney-Nickel, Eisen, SnCl₂, und Na₂S₂O₄ durchgeführt, die jedoch allesamt nicht zum Erfolg führten. In einigen Fällen war das Produkt zwar entstanden, ließ sich aber nicht isolieren.



a) 1.) SOCl₂, MeOH, 3 h, 2.) **66**, EtOH, 92% ; b) H₂/Pd, 50 bar, 60 °C, 5 h, MeOH, 70% ; c) HgO, S (kat.), EtOH, Reflux, 8 h, 58% ;
 d) HCl, H₂O, quant.; e) Thiophosgen, Ethylacetat, 70 °C, 2 h, 75%

Abbildung 28: Aufbau der unsubstituierten Benzimidazole zum kupplungsfähigen Trisbenzimidazol **46**

Extraktionsversuche blieben erfolglos, da der Aminophenylthioharnstoff selbst aus einer basischen wässrigen Phase nicht in Dichlormethan überging. Diese Beobachtung wurde auch bei anderen 2-Aminophenylthioharnstoffen immer wieder bestätigt; eine Trennung dieser Verbindungsklasse von anorganischen Salzen durch Extraktion konnte nicht beobachtet werden. Auch durch Versuche säulenchromatographischer Aufreinigung ließ sich das Produkt zunächst nicht isolieren. Schließlich wurde erneut versucht, die schon bewährte Methode der katalytischen Hydrierung im Autoklaven durch Optimierung der Bedingungen auch auf die Synthese der Verbindung **63** anwendbar zu machen, was letztendlich gelang. Durch immer drastischere Hydrierbedingungen konnten schließlich reproduzierbar gute Ausbeuten erreicht werden (Tabelle 1). Der Übergang von Filtration des Reaktionsgemischs über Celite zu Zentrifugation und Abdekantieren vom Aktivkohleschlamm brachte eine weitere geringfügigere Verbesserung der Ausbeute; dies ist vielleicht darauf zurückzuführen,

dass eventuell an der Aktivkohle adsorbiertes Produkt sich besser durch AufschlÄmmen und erneutes Abzentrifugieren als durch Spülen des Filterkuchens desorbieren lieÙ.

Pd/C* _{Massenproz.}	Solvens	Temperatur	Druck	Reaktionszeit	Ausbeute
50 %	MeOH / NH ₃	RT	2.5 bar	4 h	-
50 %	MeOH	RT	2.5 bar	4 h	-
40 %	MeOH / NH ₃	35 °C	20 bar	20 h	≤ 20 %
30 %	MeOH / NH ₃	50 °C	50 bar	5 h	≤ 50 %
20 %	MeOH / NH ₃	60 °C	50 bar	5 h	70 %

Tabelle 1: Optimierung der Hydrierung von 62

*Fluka, puriss, 10 % Pd

Einen Hinweis darauf, dass das Produkt an der Aktivkohle adsorbiert wird, liefert die Tatsache, dass bei sparsamerem Einsatz des Katalysators an Aktivkohle die Ausbeuten (auch die Masse des Rohprodukts aus Überstand/Filtrat) höher ausfallen. Ein weiterer Fallstrick bei Reaktionskontrolle und Aufreinigung der Verbindung **63** bestand in der beinahe identischen Polarität des Edukts und des Produkts, die besondere Sorgfalt bei der Wahl der Dünnschichtchromatographie-Bedingungen erforderte. Der Verlauf der Reaktion ließ sich am besten durch die EntfÄrbung des Reaktionsgemischs verfolgen, da der Aminophenylthioharnstoff farblos ist, wÄhrend der Nitrophenylthioharnstoff eine krÄftige gelbe Farbe aufweist. Im Verlauf der Reaktion musste die vollstÄndige Umsetzung des Edukts sichergestellt werden, da die chromatographische Trennung von Edukt und Produkt schwer möglich war.

SchlieÙlich mussten die 2-Aminophenylthioharnstoff-FunktionalitÄten noch zu 2-Aminobenzimidazolen cyclisiert werden. Zur Darstellung des Trisbenzimidazol-Methylesters **46** wurde auf die bewÄhrte Methode mit gelbem Quecksilberoxid zugegriffen. Im Gegensatz zur Cyclisierung der Verbindung **51**, die sich beinahe quantitativ in das 2-Aminobenzimidazol **61** berfhren lieÙ, konnte bei der gleichzeitigen Cyclisierung zweier Aminophenylthioharnstoffe nur eine Ausbeute von knapp 60 % des Trisbenzimidazols **64** erreicht werden. Allerdings liegt diese in derselben Größenordnung wie die des Bisbenzimidazols **45** mit gut 60 % (s. Abbildung 22). Der so gewonnene Trisbenzimidazol-

Methylester **64** wurde zunächst für Vergleiche mit dem unsubstituierten Trisbenzimidazol **33** und weiterführende Experimente bezüglich der unspezifischen RNA-Hydrolyse herangezogen (s. Kapitel 5.2 "Unspezifische RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole"). Um hier eine gute Vergleichsmöglichkeit zu haben, war der GABA-Linker nicht wie beim Bisbenzimidazol **45** schon zu Anfang an die Benzoessäurefunktion substituiert worden, sondern wurde als Fmoc-GABA an das Trisarginin **71** gekuppelt (s. Kapitel 4.2.1 "Synthese der Oligopeptidkonjugate").

Um kupplungsfähiges Material zu erhalten, musste nun noch der Methylester hydrolysiert werden. Dies war auf einfache Weise durch Refluxieren in halbkonz. HCl und anschließendes Evaporieren des Lösungsmittels zu erreichen und führte quantitativ zum Benzoessäurederivat **46** in Form des Trishydrochlorids. Mit diesem wurden ohne weitere Aufreinigung die anschließenden Kupplungsexperimente durchgeführt.

4.1.3 Synthese des Bisbenzimidazol-Trens

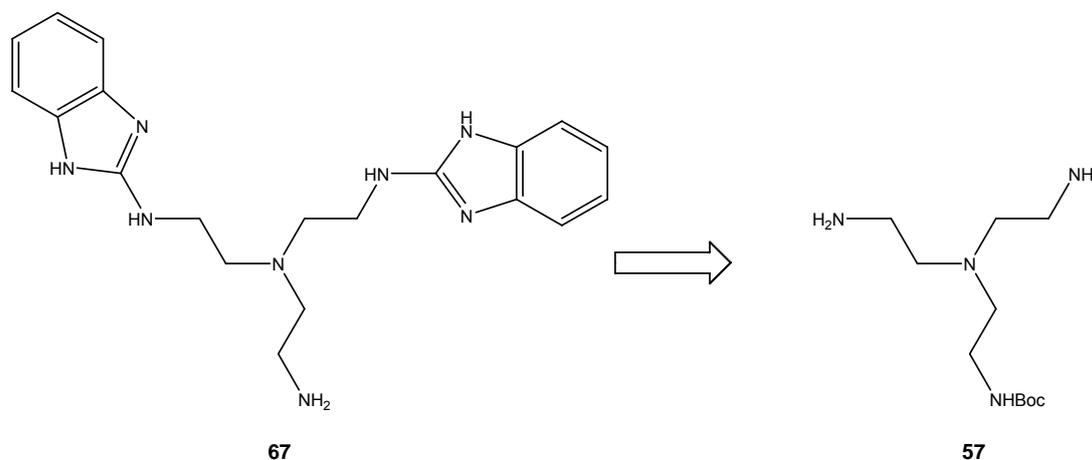
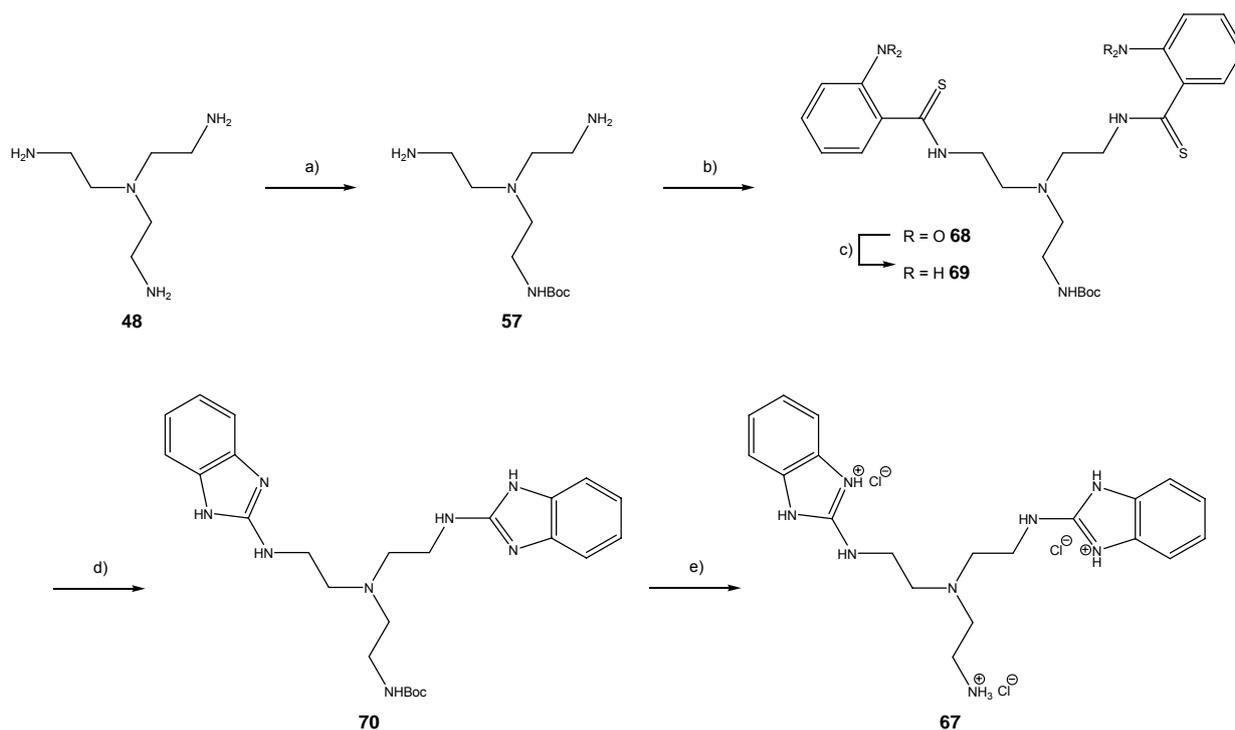


Abbildung 29: Kupplungsfähiges Bisbenzimidazoltren und der Synthesebaustein Monoboc-Tren

Bei Spaltexperimenten mit den Bis- und Trisbenzimidazolkonjugaten, die aus den Verbindungen **34** und **46** hervorgegangen waren, zeigte sich eine große Diskrepanz in den Spaltaktivitäten (s. Kapitel 3 "2-Aminobenzimidazol-Konjugate als künstliche Ribonucleasen"). Diese Beobachtung deckte sich auch mit den stark unterschiedlichen Spaltaktivitäten des unsubstituierten Bis- und Trisbenzimidazols (**32** und **33**) bei der unspezifischen RNA-Hydrolyse als auch bei Versuchen zur Affinitätsspaltung mit Konjugaten. Stellte vielleicht die rigide Struktur des Xylolmotivs des Bisbenzimidazols einen Nachteil oder der zentrale Tren-Stickstoff des Trisbenzimidazols mit seinem freien Elektronenpaar einen Vorteil für die Katalyse der RNA-Hydrolyse dar? Konnte es sein, dass einer dieser Effekte oder deren Kombination schwerer wog als die schiere Anzahl der katalytisch aktiven 2-Aminobenzimidazolgruppen? Um Rückschlüsse zur Beantwortung dieser Fragen ziehen zu können, synthetisierte man das Bisbenzimidazol-Tren **67**. Dieses Molekül vereint den zentralen Synthesebaustein Tren des Trisbenzimidazols **33** mit der Anzahl der Benzimidazole des Bisbenzimidazols **32** und bietet eine freie Aminofunktionalität, die die Konjugation an RNA-Liganden oder Antisense-DNA erlaubt.

Durch Tren als Molekülgerüst war der Syntheseweg aufgrund der bei der Darstellung des Trisbenzimidazols gewonnenen Erkenntnisse bereits vorgezeichnet (vgl. Abbildung 24). Ausgehend von Monoboc-Tren **57** wurde das Bis-Nitrophenylderivat **68** mit Hilfe von

o-Nitrophenylisothiocyanat dargestellt. Dieses wurde im Autoklaven hydriert und der so gewonnene Bis-Aminophenylthioharnstoff mittels HgO cyclisiert. Das erhaltene Bisbenzimidazol-Tren in seiner Boc-geschützten Form war auch hier quantitativ zum Amin umsetzbar. Durch Zugabe von Thionylchlorid als HCl-Quelle in methanolischer Lösung und anschließendes Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum fiel es als Trishydrochlorid an. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung in den Kupplungsexperimenten eingesetzt.



a) Boc-ON, THF, 0 °C, 41%; b) Nitrophenylisothiocyanat, NEt₃, MeOH, 77%; c) H₂/Pd, MeOH / NH₃, 40 °C, 56%; d) HgO, S (kat.), EtOH, 84% e) SOCl₂, MeOH, quant.

Abbildung 30: Synthese des Bisbenzimidazoltrens 67

4.2 Synthese der 2-Aminobenzimidazol-Konjugate

Die Minimalanforderung an eine künstliche (Ribo-) Nuclease besteht aus zwei Elementen: Einer katalytischen Gruppe zur unspezifischen Spaltung von (Ribo-) Nucleotiden und einem Molekülteil zur Erkennung und Bindung einer spezifischen Sequenz oder eines Strukturmotivs (s. Kapitel 2 "Künstliche Ribonucleasen"). Diese Minimalkonstitution wird durch einen Linker ergänzt, der die Variation des Abstands zwischen der/den katalytischen Einheit(en) und der substratbindenden Spezies erlaubt (Abbildung 31).

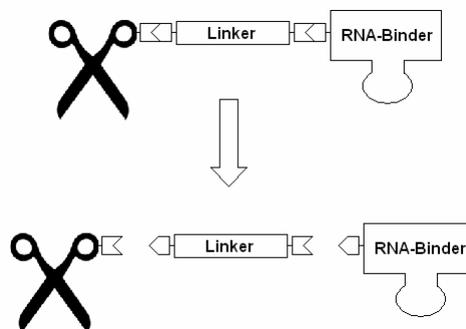


Abbildung 31: Aufbau einer künstlichen Ribonuclease und mögliche Konjugationsstellen

Wenn man also eine Klasse RNA-spaltender Moleküle zur Hand hat, gilt es nun, einen geeigneten RNA-Liganden zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit peptidischen Liganden und Antisense-Nucleotiden durchgeführt, doch bieten sich hier unzählige Moleküle zur Konjugation an. Dementsprechend sollte die Kupplungsmethode eine möglichst vielfältige Anwendbarkeit erlauben. Weiterhin war es wünschenswert, dass diese nicht nur von einem organischen Synthetiker durchgeführt werden kann, sondern von jedem, der sich mit der Erforschung von Nucleinsäuren befasst, wie beispielsweise (Molekular-) Biologen oder Biochemiker. Gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass artifizielle Nucleasen zunächst eher als Werkzeug für die Biotechnologie und Chemische Biologie denn als Pharmakon Anwendung finden werden, ist dieser Punkt von eminenter Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich auf die Kupplung von Carbonsäuren mit Aminen zu Amidn zurückgegriffen. Zum Einen kann so die Konjugation mit Hilfe von Standardmethoden der Peptidchemie erfolgen, zum Anderen ist die Amidbindung nicht nur

unter physiologischen Bedingungen äußerst stabil. Im Anschluss wird die Synthese der RNA-Liganden und Oligonucleotide sowie die Konjugation der 2-Aminobenzimidazole an diese beschrieben.

4.2.1 Synthese der Oligopeptidkonjugate

4.2.1.1 Synthese von Trisarginin und Trisarginin GABA

Als erstes RNA-bindendes Oligopeptid wurde Trisarginin synthetisiert. Die Wahl fiel aus mehreren Gründen auf diese Struktur (s. Kapitel 5.3 "Affinitätsspaltung von RNA durch 2-Aminobenzimidazol-Peptidkonjugate"). An dieser Stelle sei nur kurz erwähnt, dass in unserer Arbeitsgruppe RNA-Liganden in Form von Tripeptiden mit teilweise künstlichen Aminosäuren synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht werden. Arginin, Argininamid sowie argininhaltige Oligopeptide sind als Liganden für HIV-1 TAR-RNA bekannt. Trisarginin dient in unserer Gruppe unter anderem als Vergleich für artifizielle Tripeptid-Liganden.

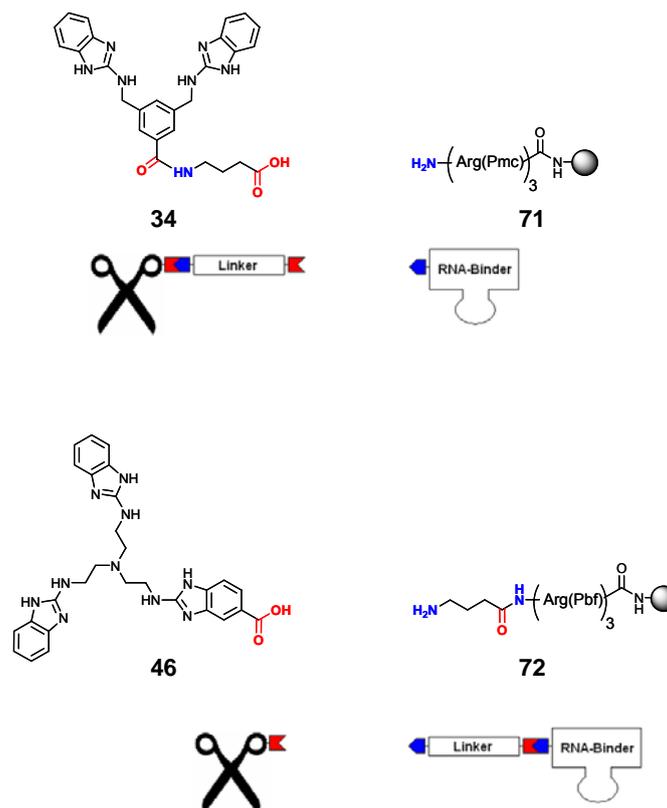


Abbildung 32: Festphasengebundenes Trisarginin und Trisarginin-GABA als Kupplungsbausteine

Da als kupplungsfähige Materialien Bisbenzimidazol **34** mit bereits vorhandenem GABA-Linker und Trisbenzimidazol **46** ohne Linker vorlagen, wurde das Trisarginin sowohl ohne (**71**) als auch mit Linker (**72**) hergestellt. Dies geschah nach Standardmethoden mit Rink-

Amid MBHA-Harz⁴⁵ und Fmoc-geschützten Aminosäuren⁴⁶ (s. Kapitel 8.2 "Arbeitsmethoden mit Oligopeptiden). Daraufhin wurden Kupplungsversuche mit den Verbindungen **34** und **46** durchgeführt (Abbildung 32; 4.2.1.3 ff.).

4.2.1.2 Synthese eines tripeptidischen RNA-Liganden und seines GABA-Analogons

Der oben erwähnte, am Tat-TAR-System entwickelte Assay zur Identifikation von Liganden wurde nach seiner Entwicklung an anderen RNAs getestet⁴⁷. Dabei wurde das Tripeptid **75** als Ligand eines 41mer-Ausschnitts der Bcr-Abl-*m*-RNA identifiziert. Bcr-Abl, ein Fusionsgen, das auch als Philadelphia-Chromosom bezeichnet wird, ist ein Humanonkogen, das als Hauptursache für die chronische myeloische Leukämie angesehen wird.

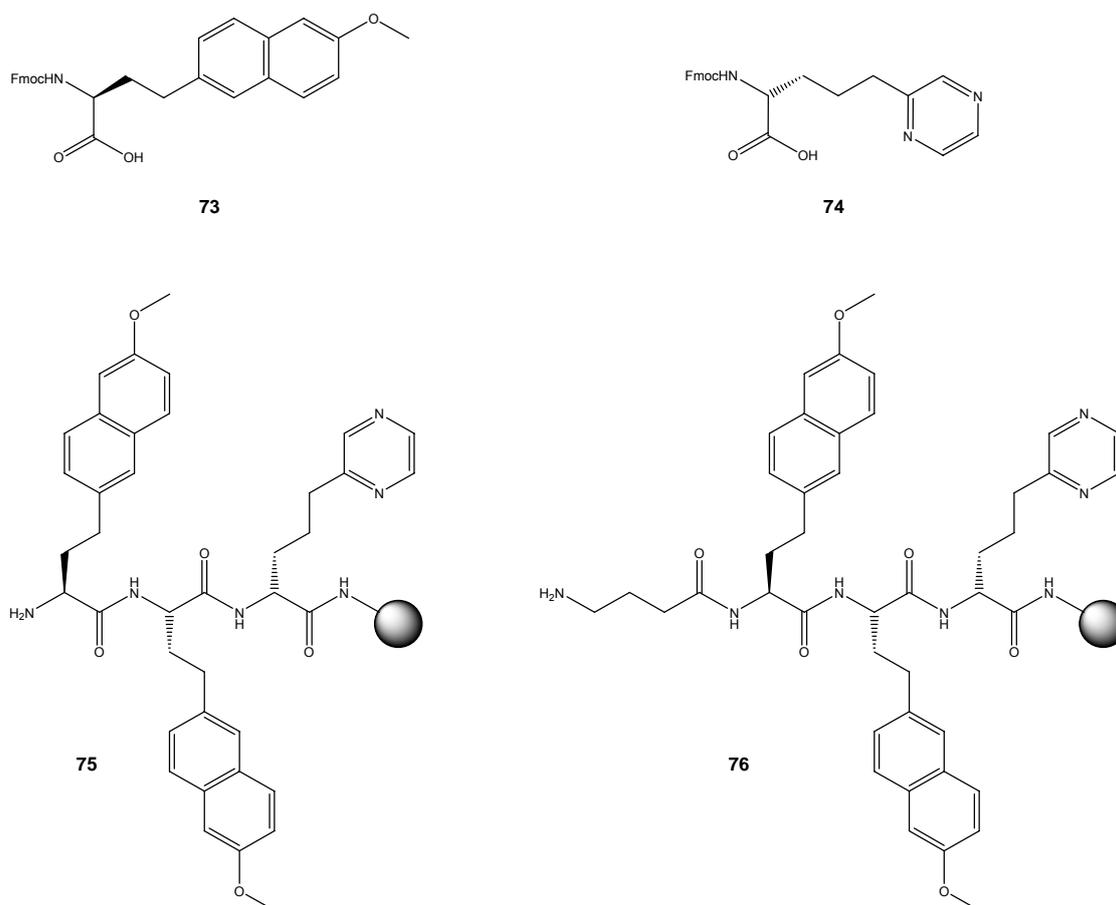
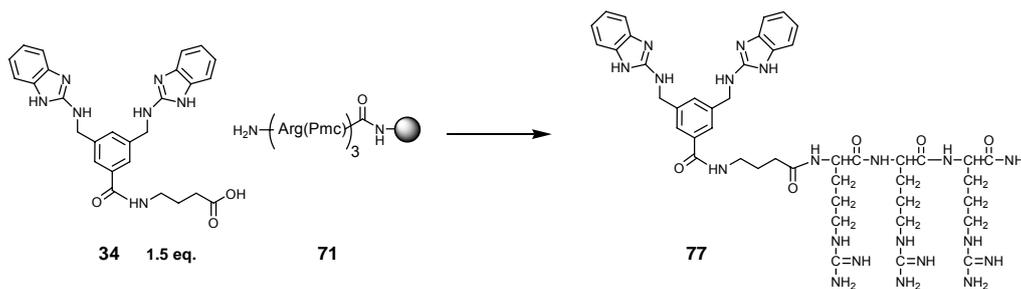


Abbildung 33: Der festphasengebundene tripeptidische Bcr-Abl-Ligand ohne (**75**) und mit GABA-Linker (**76**) und die künstlichen Fmoc-geschützten Aminosäuren Methoxynaphthyl und Piperazinyl

Die Synthese der Tripeptids erfolgte analog der des Trisarginins nach Standardmethoden. Auch hier wurde das Tripeptid ohne und mit GABA-Linker hergestellt, um es an Bis- und Trisbenzimidazol zu koppeln (vgl. Abbildung 32; 4.2.1.7). Die künstlichen Aminosäuren Fmoc-Piperazinyl **73** und Fmoc-Methoxynaphtyl **74** wurden freundlicherweise von Frau Dr. Verena Ludwig und Herrn Dipl. Chem. Marcel Suhartono zur Verfügung gestellt.

4.2.1.3 Kupplung von Bisbenzimidazol an Trisarginin

Das erste Konjugat eines 2-Aminobenzimidazolderivats, mit dem die Spaltung von RNA untersucht werden konnte, war Verbindung **77**. Bei den Oligopeptidkonjugaten war die Kupplung zum Amid besonders nahe liegend. Sie erfolgte an der festen Phase unter denselben Bedingungen wie bei der manuellen Oligopeptidsynthese.



a) 1) DIC, HOBT, DMF, rt, 1d (2 x); 2) Abspaltung und Entschützen: Standardbed. + TIS

Abbildung 34: Kupplung von Bisbenzimidazol-GABA an trägergebundenes Trisarginin

Die Bedingungen hierbei waren identisch mit denen der Festphasensynthese des Trisarginins, mit Ausnahme der Variation der Äquivalente der Reaktanden.

Im Falle der Kupplung des Bisbenzimidazols **34** an das Trisarginin **71** (Abbildung 34) konnte laut Kaiser-Test (s. Kapitel 8.2 "Arbeitsmethoden mit Oligopeptiden") und analytischer HPLC eine vollständige Kupplung erreicht werden. Es war kein ungekuppeltes Trisarginin nachzuweisen. Allerdings verursachte die Zugabe von Triisopropylsilan als Scavenger zur Abspalt- und Entschützungslösung die Bildung von Nebenprodukten. Scavenger sollen reaktive Schutzgruppenreste bei der Abspaltung vom polymeren Träger und der gleichzeitigen Entschützung der Seitenketten abfangen. Bei allen nachfolgenden Kupplungsexperimenten ab der Konjugation des Trisbenzimidazols wurde daher bei der Abspaltung der Konjugate von der Festphase auf die Zugabe von TIS zur Abspatlösung verzichtet. Nach dieser Maßnahme wurden keine derartigen Nebenprodukte mehr beobachtet.

Das erwünschte Produkt, dessen Identität mit Hilfe eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums aufgeklärt werden konnte, wurde in einer Ausbeute von ca. 10 % (gravimetrisch bestimmt nach HPLC-

Reinigung und Charakterisierung durch ESI-MS) in Bezug auf das eingesetzte festphasengebundene Peptid erhalten. Abbildung 35 zeigt das Spektrum mit H/D-Austausch der Verbindung **77**. Man kann sehr deutlich erkennen, wie neben dem Verschwinden der Aminosignale das Dublett der benzylichen Protonen eine Signalvereinfachung zum Singulett und gleichzeitig einen Hochfeldshift erfährt.

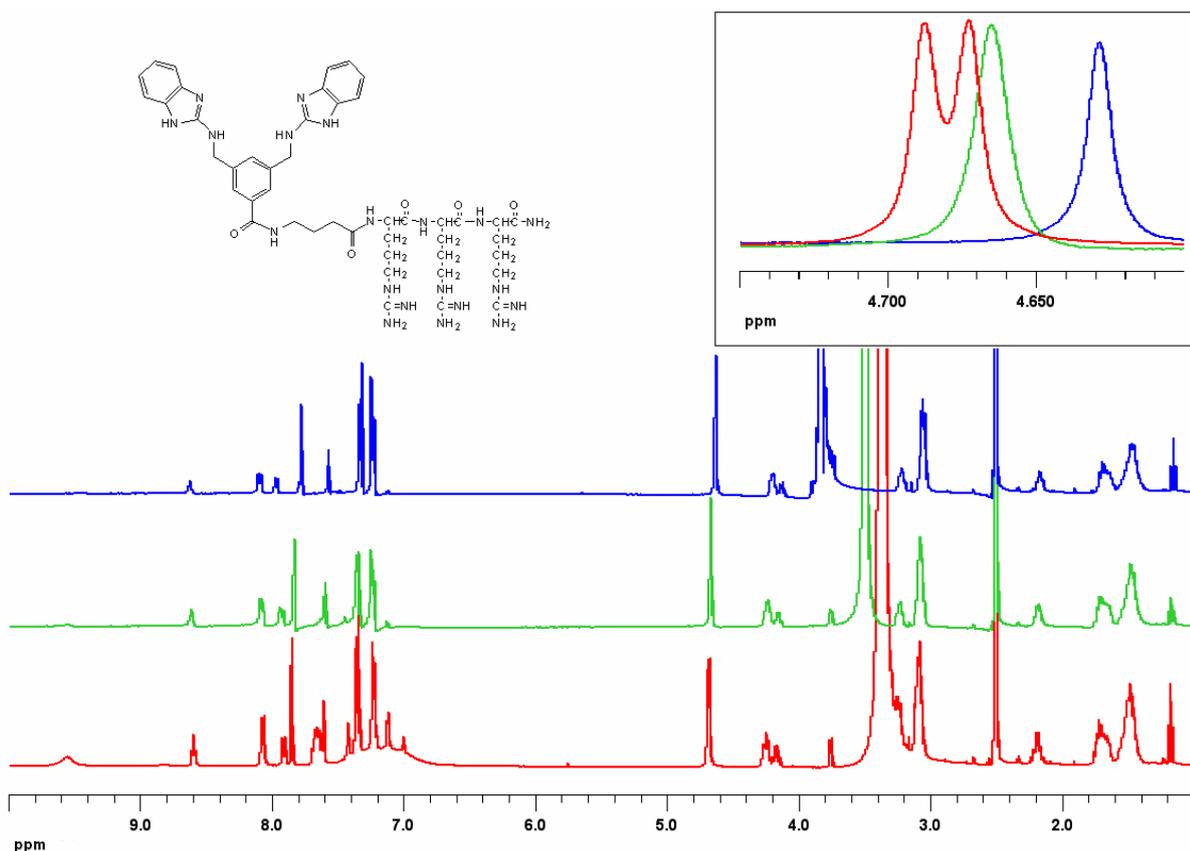
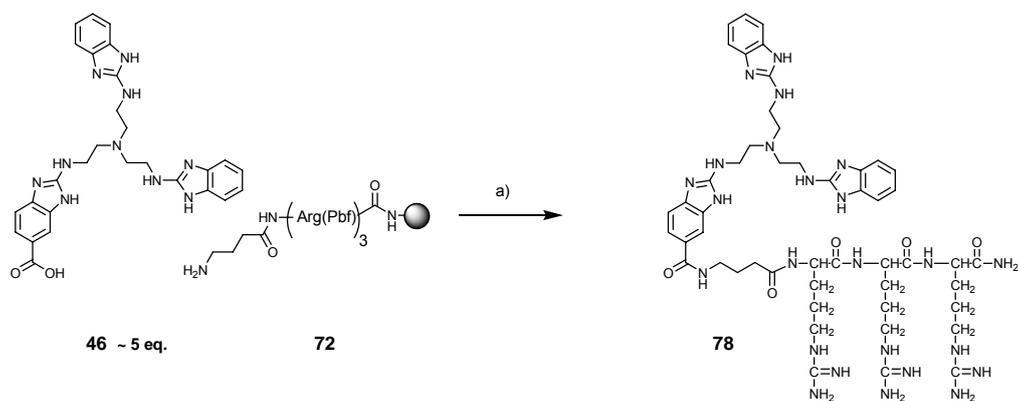


Abbildung 35: H/D-Austausch für Verbindung **77**: Vor Zugabe (rot), nach 1 Tropfen (grün), nach 3 Tropfen (blau) D₂O; der Bereich von 4.5 bis 4.7 ppm ist rechts oben vergrößert dargestellt

4.2.1.4 Kupplung von Trisbenzimidazol an Trisarginin-GABA

Die Konjugation des Trisbenzimidazols **46** an Trisarginin-GABA **72** erfolgte analog zu der des Bisbenzimidazol-GABAs an Trisarginin.



a) 1) DIC, HOBT, DMF, RT, 1d (2 x); 2) Abspaltung und Entschützen: Standardbed.

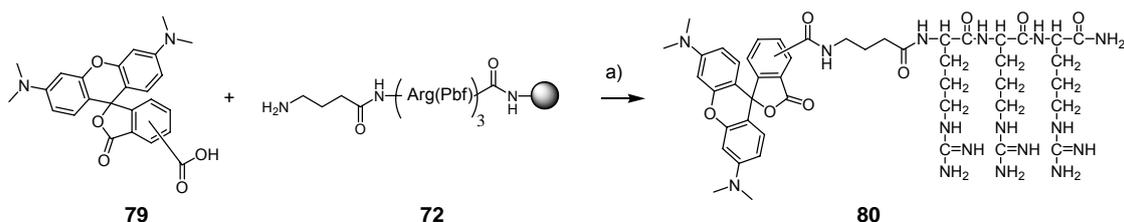
Abbildung 36: Kupplung von Trisbenzimidazol an trägergebundenes Trisarginin-GABA

Hier zeigten sich in der analytischen HPLC zwei Fraktionen. Eine entsprach ungekuppeltem Trisarginin-GABA **72**, die andere dem erwünschten Konjugat **78**. Im Gegensatz zur Kupplung des Bisbenzimidazols, wo man kein freies Tripeptid nachweisen konnte, betrug die Kupplungsrate hier laut HPLC nur etwa 30 %, und das trotz eines beinahe fünffachen Überschusses an Carbonsäure. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass die Carboxylfunktionalität an **46** als Benzoessäureanalogon weniger gut zu aktivieren ist als die aliphatische des GABA in Verbindung **34**. Die beobachtete Kupplungsrate entspricht auch der Ausbeute von Versuchen, bei denen GABA-Methylester in der flüssigen Phase an das Trisbenzimidazol **46** gekuppelt werden sollte (Verbindung **110**, s. Kap. 8.5.9). Das Konjugat **78** wurde in einer Ausbeute von 10 % in Bezug auf das eingesetzte trägergebundene Oligopeptid erhalten.

4.2.1.5 Kupplung von Tetramethylrhodamin an Trisarginin-GABA

Für weitere Untersuchungen der Bindungseigenschaften des Trisarginins sollte TAMRA-gelabeltes Trisarginin **80** hergestellt werden.

Das Labelling geschah analog der Konjugation der 2-Aminobenzimidazolderivate.



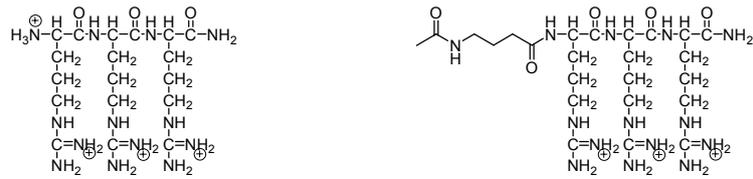
a) 1) DIC, HOBT, RT, 1d; 2) Abspaltung und Entschützen Standardbed,

Abbildung 37: Kupplung von TAMRA-Isomerengemisch an Trisarginin-GABA

Erwähnenswert ist an dieser Stelle noch, dass TAMRA kommerziell als Isomerengemisch erhältlich ist. Durch HPLC-Aufreinigung kam jedoch nur das Hauptisomer des Konjugats in den Experimenten zum Einsatz.

4.2.1.6 Acylierung von Trisarginin-GABA

Um die Auswirkungen der Konjugation verschiedener Moleküle wie RNA-Spaltern oder Farbstoffen an Arginin auf dessen Bindungsverhalten zu untersuchen, sollte Trisarginin-GABA acyliert werden. Trisarginin weist in physiologischer Lösung vier positive Ladungen auf, da es neben den drei Guanidiniumseitenketten noch eine freie Aminofunktion besitzt, die ebenfalls protoniert vorliegt. Durch die Acylierung von Trisarginin-GABA konnte man die Bindungseigenschaften des Liganden mit ungeladenem Linker mit denen des Liganden in seiner unmodifizierten Form vergleichen.



71b

81

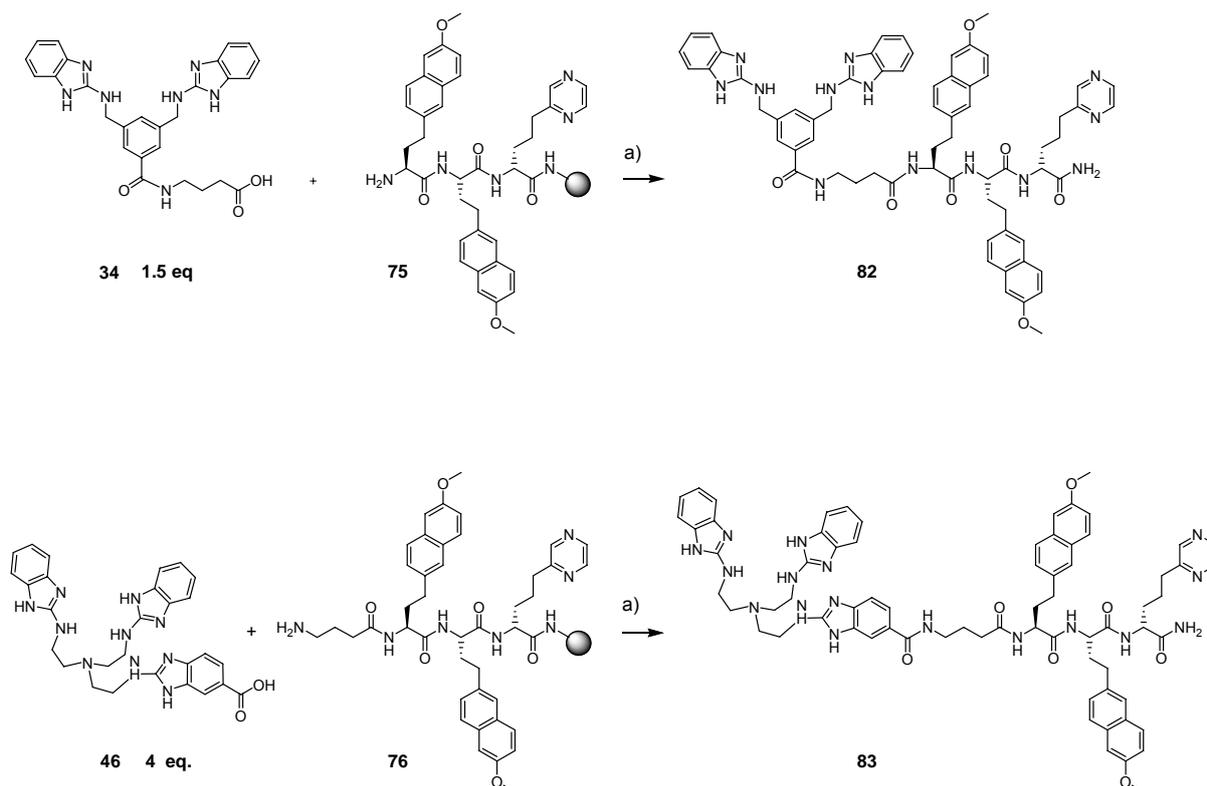
Abbildung 38: Trisarginin und acyliertes Trisarginin-GABA als Polykationen in physiologischer Lösung

Die Acylierung von **71** erfolgte am polymeren Träger mit einer Lösung von Acetanhydrid in Dichlormethan. Das acylierte Trisarginin-GABA **81** konnte in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

4.2.1.7 Kupplung von Bisbenzimidazol und Trisbenzimidazol an einen tripeptidischen RNA-Liganden

Die Bcr-Abl-Ligand-Konjugate **82** und **83** wurden auf demselben Wege wie die Trisarginin-Konjugate hergestellt.

Das Bisbenzimidazol wurde wie schon bei der Kupplung an Trisarginin in einem geringeren Überschuss zugesetzt, da man erwartete, hier eine bessere Kupplungsrate zu erreichen als beim Trisbenzimidazol. Trotzdem korrelierten die Ausbeuten von 30 % für das Bisbenzimidazolkonjugat **82** und 60 % für das Trisbenzimidazolkonjugat **83** eher mit den eingesetzten Äquivalenten als mit der erwarteten höheren Kupplungsrate für das primäre Carboxylat des Bisbenzimidazols. Aufgrund der Kostspieligkeit des Peptids wurde jeder Kupplungsversuch jedoch nur einmal durchgeführt.



a) 1) DIC, HOBt, DMF, RT, 1d; 2) Abspaltung: Standardbed.

Abbildung 39: Kupplung von Bis- und Trisbenzimidazol an trägergebundenen Bcr-Abl-Liganden ohne bzw mit GABA-Linker

4.2.1.8 Peptidkonjugate durch Kupplung zweier Amine zum Harnstoff

Wie bereits im Kapitel 4.1.3 "Synthese des Bisbenzimidazol-Trens" erwähnt, sollte die Frage geklärt werden, warum das Trisbenzimidazol eine so viel größere Spaltaktivität aufweist als das Bisbenzimidazol. Um einen besseren Vergleich der Abhängigkeit der Spaltaktivität von der Anzahl der 2-Aminobenzimidazole zu ermöglichen, war das Bisbenzimidazol-Tren **67** synthetisiert worden. Dies sollte nun ebenfalls an Trisarginin-GABA **72** gekuppelt werden. Hier stand allerdings keine Carboxylfunktion zur Verfügung, um mit dem freien Amin der trägergebundenen Trisarginin-GABA eine Amidbindung zu formen. Daher wurde auf eine Kupplung der beiden Aminogruppen mit Hilfe von Carbonyldiimidazol (CDI, **84**) zurückgegriffen⁴⁸ (Abbildung 40).

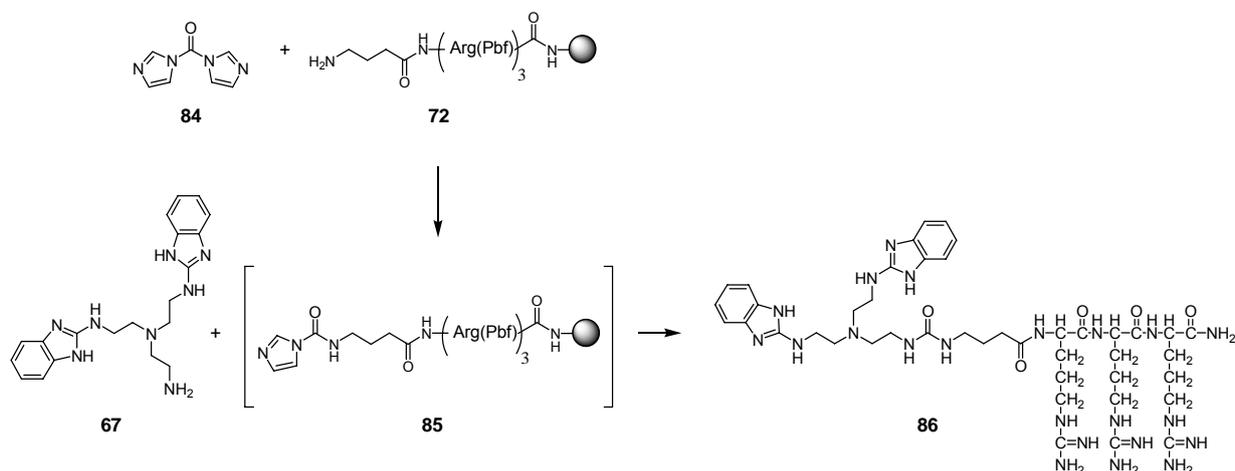


Abbildung 40: Kupplung von Bisbenzimidazoltren an Trisarginin-GABA

Diese Reaktion verläuft analog der Darstellung der 2-Aminophenylthioharnstoffe mit Thiocarbonyldiimidazol (s. Kapitel 4.1.1 "Synthese des Bisbenzimidazols").

Die gewählte Kupplungsmethode konnte ohne Probleme am trägergebundenen Trisarginin angewendet werden. Es wurde jedoch DCM an Stelle von DMF als Lösungsmittel verwendet. Nach der Kupplung von CDI an die feste Phase wurde Bisbenzimidazol-Tren **67** mit NEt_3 vom Trishydrochlorid in die Neutralform überführt und an das Harnstoffintermediat **83** gekuppelt. Die Kupplung verlief bei dieser Reaktion quantitativ und auch die Gesamtausbeute des Konjugats **86** lag bei 95 % in Bezug auf die Belegung des Rink-Amids.

Analog dazu wurde schließlich das Tren-Trisarginin-Konjugat **87** synthetisiert. Dies sollte zu Vergleichsmessungen der Spaltaktivität mit anderen künstlichen Nucleasen mit (Poly-) Aminen als katalytisch aktiven Gruppen dienen.

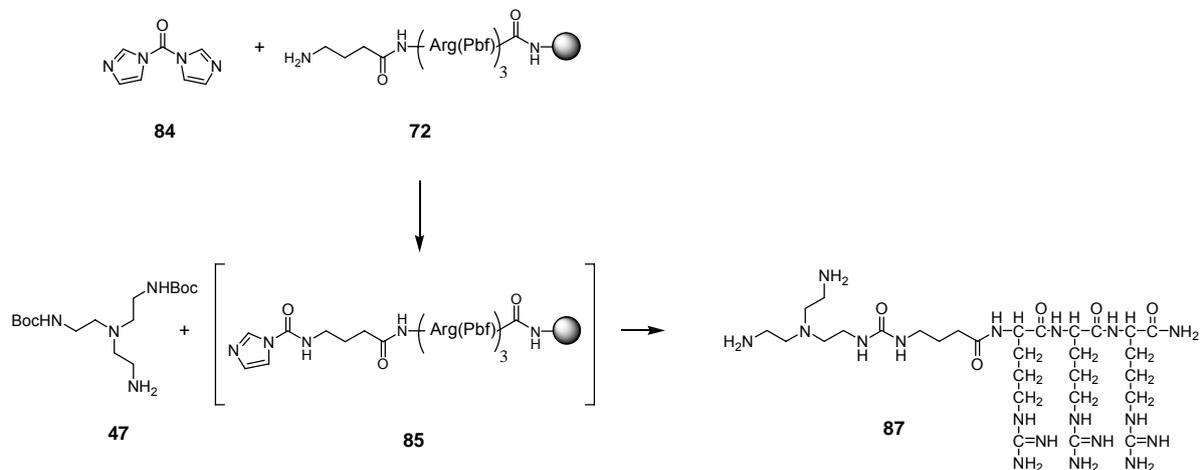
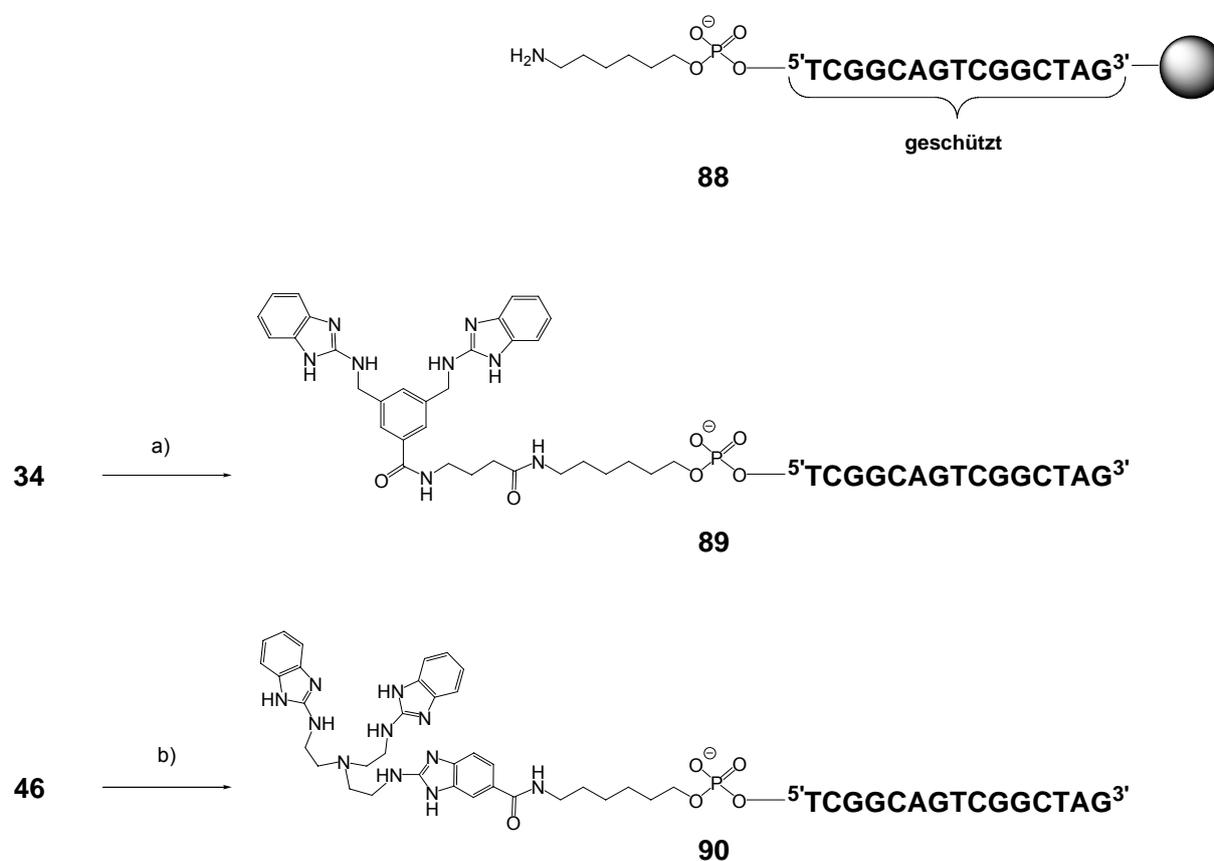


Abbildung 41: Kupplung von Tren an Trisarginin-GABA

Anstelle von Bisbenzimidazol-Tren **67** wurde Bisboc-Tren **47** an das Harnstoffintermediat **85** gekuppelt. Unter den Abspaltbedingungen wurde auch das Tren mit entschützt; schließlich gehört Boc zu den Standardschutzgruppen der Seitenketten (z. B. der des Lysins). Hier konnte laut HPLC trotz identischer Reaktionsbedingungen nur eine Kupplungsrate von ca. 60 % zum Konjugat **87** erreicht werden.

4.2.2 Synthese der Nucleinsäurekonjugate

Zu weitergehenden Untersuchungen des Spaltverhaltens der 2-Aminobenzimidazol-Derivate sollten schließlich Antisense-Oligonucleotidkonjugate synthetisiert werden. Als Antisense-DNA diente ein 15mer, das komplementär zu einem sekundärstrukturfreien RNA-Substrat nach Häner und Moser¹² ist (s. Kapitel 2.3 "Künstliche Ribonucleasen auf Basis von Metallkomplexen"). Auch hier wurde auf die Amidkupplung an der festen Phase zurückgegriffen.



a) 1) **34**, DIC, HOBT, DMF, 5 h; 2) 25%NH₃ : EtOH (1:3), 55 °C 12h

b) 1) **46**, NEt₃, DIC, HOBT, DMF, 5 h; 2) 25%NH₃ : EtOH (1:3), 55 °C 12h

Abbildung 42: Manuelle Kupplung der Oligonucleotidkonjugate

Zunächst wurde die DNA Sequenz **88** maschinell synthetisiert. Sie trägt am 5'-Ende einen C₆-Aminolinker. Dieser wurde in Form eines monomethoxytrityl-geschützten

Aminohexylphosphoramidits eingeführt, das im Synthesizer gekuppelt und detrityliert worden war. Daraufhin entnahm man die CPG-Säule und führte manuelle Kupplungsversuche durch. Hierzu steckte man 1 mL Spritzen auf die 1 μ mol CPG-Säule, die das trägergebundene, geschützte Oligonucleotid mit Linker **88** enthielt. Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden analog zur Festphasenkupplung an trägergebundenen Oligopeptiden gewählt; sie wurden jeweils im 20fachen Überschuss eingesetzt. Bei der Kupplung des Trisbenzimidazols **46**, das als Hydrochlorid eingesetzt wurde, gab man zum Alkalisieren der Reaktionslösung einige Tropfen NEt_3 hinzu. Die Kupplungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 5 h, wobei die Reaktionslösung durch alternierendes Hin- und Herdrücken der Spritzenkolben über das CPG-Material gespült wurde (s. Kapitel 8.3 "Arbeitsmethoden mit Nucleinsäuren", Abbildung 87).

Die Abspaltung vom Trägermaterial und anschließende Entschützung der Nucleobasen erfolgte mit einem Gemisch aus einem Teil 25 % NH_3 -Lösung und drei Teilen EtOH. Hierbei stellte es sich als äußerst wichtig heraus, dass nach erfolgter Abspaltung die Lösung noch bei 55 °C inkubiert wurde, um die Abspaltung der Basen-Schutzgruppen zu vervollständigen. Nach dem Entsalzen über NAP-10-Säulen wurden die Konjugate zunächst mittels silbergefärbter denaturierender PAGE-Minigele analysiert. Hierbei wurden Kupplungsraten von 70 – 90 % abgeschätzt. Die Aufreinigung erfolgte mit präparativen PAGE-Gelen. Die Banden wurden durch UV-Shadowing sichtbar gemacht, ausgeschnitten und eluiert.

4.3 Weitere synthetische Arbeiten

4.3.1 Zur Synthese trismethylierten Trisbenzimidazols

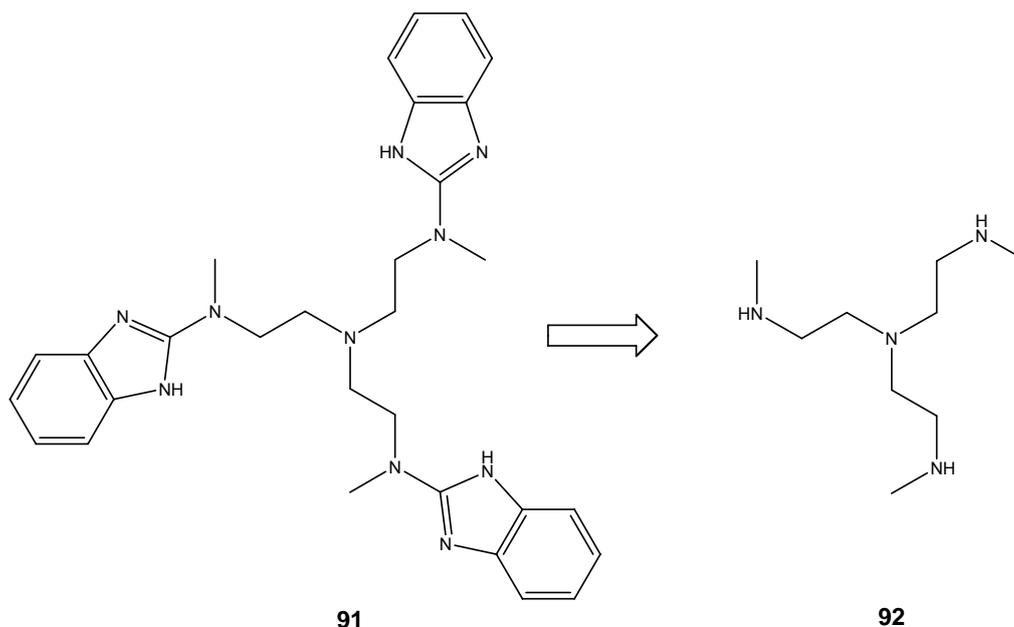
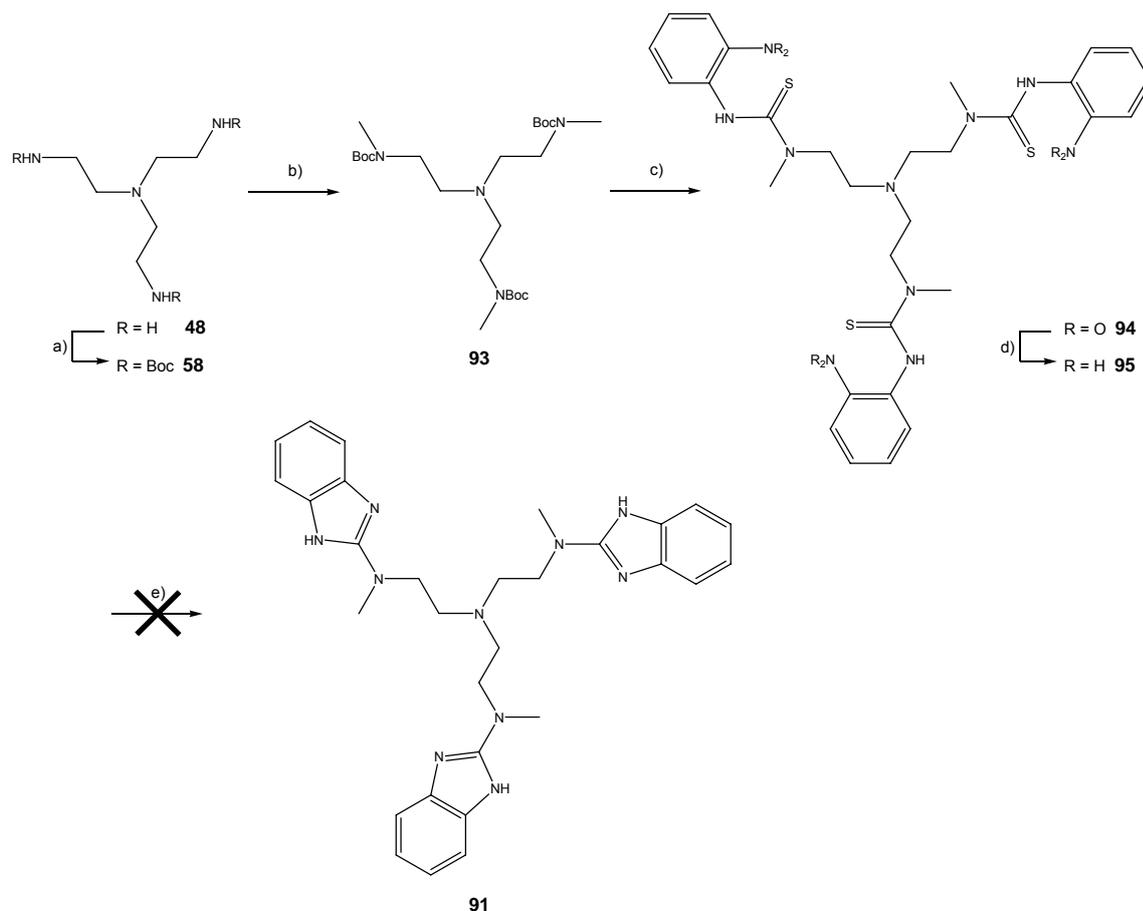


Abbildung 43: Tris-N-Methyl-Trisbenzimidazol und der Baustein Trismethyltren

Für weitergehende mechanistische Untersuchungen der Katalyse der RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole sollte das exocyclisch tris-N-methylierte Trisbenzimidazol **91** synthetisiert werden.

Dies konnte nicht einfach durch Methylierung des Trisbenzimidazols **33** erreicht werden, da hier zuerst die endocyclischen Stickstoffe des Benzimidazols substituiert worden wären⁴⁹. Trismethyltrisbenzimidazol **91** sollte daher analog zu **33** aus Tren aufgebaut werden. Dieses sollte vorher trismethyliert werden (**92**). Zur Vermeidung einer Permethylierung wurden die Aminogruppen des Tren Boc-geschützt. Trisboc-Tren **58** war quantitativ zugänglich (vgl. Abbildung 26) und wurde mit Methyljodid oder Dimethylsulfat trismethyliert, wobei *n*-Butyllithium als Base Verwendung fand⁵⁰. Anschließend wurden die Boc-Schutzgruppen mit SOCl_2 entfernt und das Trismethyl-Tren **92** mit *o*-Nitrophenylisothiocyanat zum 2-Nitrophenylthioharnstoffderivat **94** umgesetzt.



a) Boc₂O, DCM, RT, 98%; b) THF, *n*-BuLi, MeI, 72%; c) 1) SOCl₂, MeOH, quant.; 2) 2-Nitrophenylisothiocyanat, NEt₃, MeOH, 83%;
 d) Sm, NH₄Cl, MeOH, Ultraschall, 41%; e) HgO, EtOH, Reflux / CuCl, DIEA, ACN, 80 °C

Abbildung 44: Geplante Synthese von Trismethyl-Trisbenzimidazol

Nun sollte die Hydrierung der Nitrogruppe zur cyclisierbaren Aminogruppe erfolgen. Sämtliche Versuche, diese wie schon beim Trisbenzimidazol im Autoklaven zu bewerkstelligen, schlugen fehl. Die Palette der Reduktionsversuche, die dort bereits vergeblich angewendet worden war (s. Kapitel 4.1.2 "Synthese des Trisbenzimidazols"), brachte auch hier keinen Erfolg. Schließlich führte man Versuche mit Samarium durch⁵¹. Erste Experimente erfolgten mit Samarium(II)iodid. Die hierzu benötigte Lösung stellte man unter Schlenck-Bedingungen aus elementarem Samarium (40 mesh) her, auf das man eine Lösung von 1,2-Diodethan in THF tropfte, so dass man eine 40 mM Sml₂ Lösung erhielt⁵². Zu dieser tropfte man die Nitroverbindung **94** in THF ebenfalls unter Schlenck-Bedingungen, wobei sich die dunkelgrüne Lösung gelb färbte⁵³. Die Sml₂-Lösung war unter Argonatmosphäre einige Tage lagerbar. Nichtsdestotrotz war sie sehr oxidationsempfindlich,

so dass sie sich schon beim geringsten Kontakt mit der Laboratmosphäre entfärbte. Daher wurde eine andere Methode zur Reduktion mit elementarem Samarium und Ammoniumchlorid erprobt, die schließlich akzeptable Ausbeuten des 2-Aminophenylthioharnstoffderivats **95** generierte. Hierzu wurden in einem ausgeheizten Kolben Samarium und Ammoniumchlorid vorgelegt. Das Gemisch wurde mit einer Lösung der Nitroverbindung **94** in Methanol und möglichst wenig Dichlormethan zum vollständigen Lösen des Edukts überschichtet. Das Reaktionsgemisch wurde dann für einige Stunden mit Ultraschall bei RT behandelt⁵⁴. Mit Hilfe dieser milden Methode konnten für den 2-Aminothioharnstoff **95** Ausbeuten um 40 % erzielt werden. Die Verbindung erwies sich in Lösung als instabil. Als gut getrocknetes, amorphes Pulver konnte sie jedoch länger aufbewahrt werden. Nun sollte die Cyclisierung zum Zielmolekül **91** erfolgen. Die im Arbeitskreis etablierte Methode mit Quecksilberoxid brachte nur Spuren des Produkts. Auch die Verwendung von Kupfer als Thiophil in Form von CuCl ⁵⁵ führte nicht zum gewünschten Produkt.

Daraufhin wurde eine andere Synthesestrategie erprobt. Hierbei sollten die methylierten Aminogruppen des Trismethyl-Trens **92** direkt mit 2-Chlorbenzimidazol zur Reaktion kommen⁵⁶. Hierbei war allerdings auch eine Substitution an den cyclischen Stickstoffen des Chlorbenzimidazols zu erwarten⁵⁷. Auch in diesem Fall konnte das Produkt **91** nur in Spuren nachgewiesen werden.

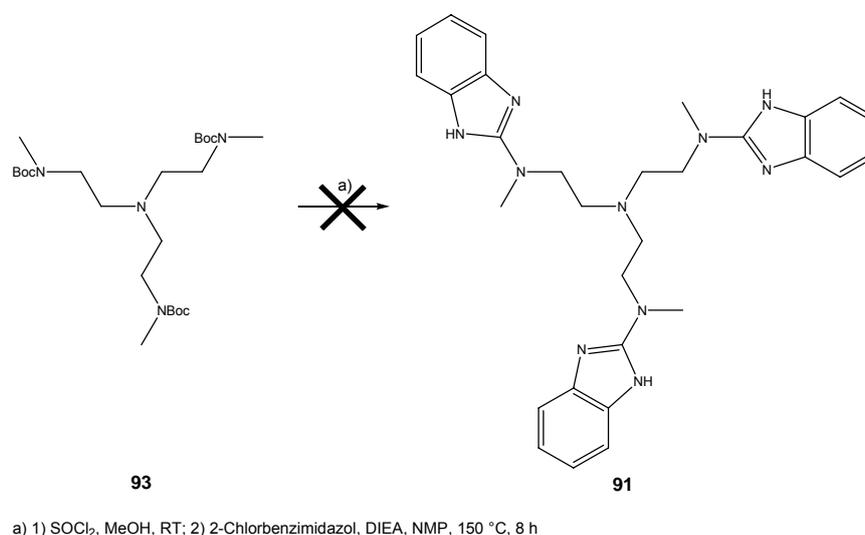
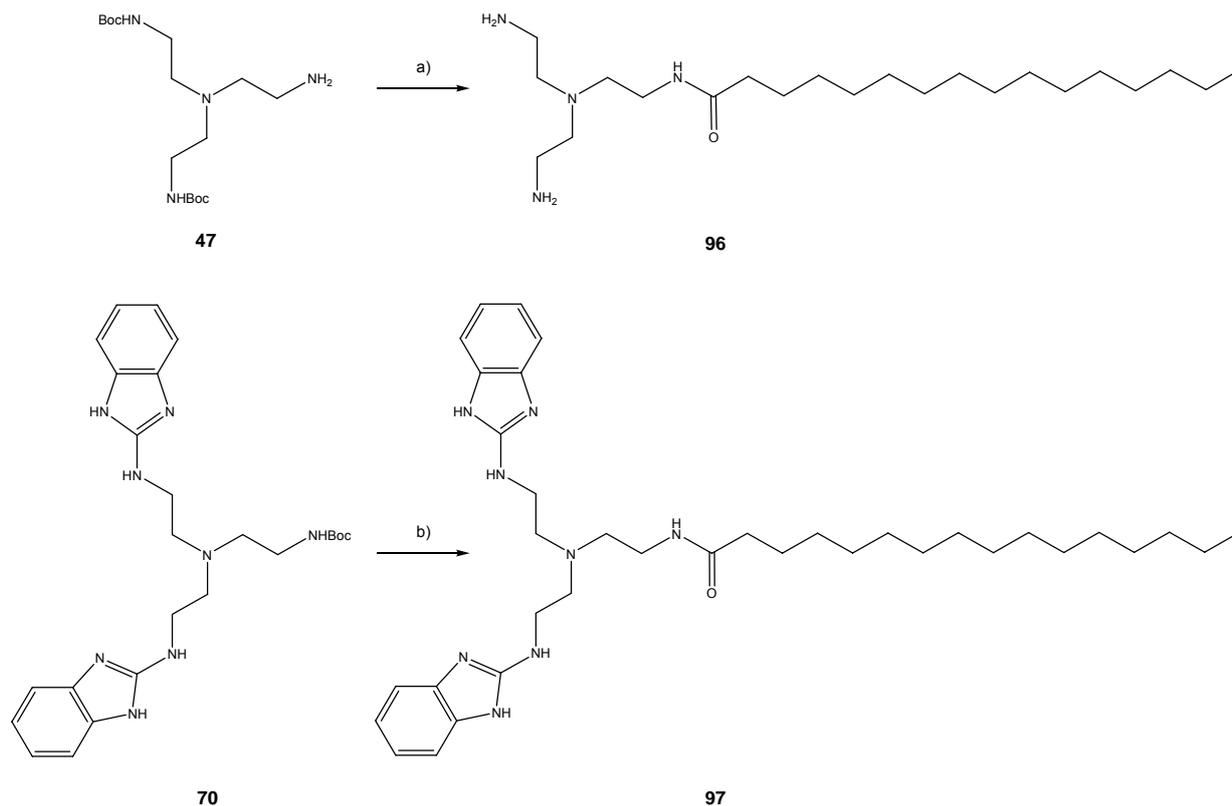


Abbildung 45: Reaktion von Trismethyltren mit Chlorbenzimidazol

4.3.2 Synthese von Palmitoylverbindungen

Um Untersuchungen an aggregierten 2-Aminobenzimidazolderivaten und Polyaminen durchzuführen, sollten diese mit Fettsäureresten gekuppelt werden. Hierzu wurden Bisbenzimidazol-Tren **70** und Bisboc-Tren **47** verwendet. Diese wurden in Anwesenheit von Hünigbase mit Palmitoylchlorid umgesetzt.



a) 1) Palmitylchlorid, DIEA, DMAP (kat.), DCM, RT, 12 h; 2) SOCl₂, MeOH, 97%; b) 1) SOCl₂, MeOH; 2) Palmitylchlorid, DIEA, DMAP, DMF, RT, 12 h, 67%

Abbildung 46: Palmitoyltren und Palmitoyl-Bisbenzimidazoltren

Palmitoyl-Tren **96** konnte nach der Kupplung quantitativ durch Entschützen mit Thionylchlorid als Hydrochlorid erhalten werden.

5 2-Aminobenzimidazol-Konjugate als künstliche Ribonucleasen

5.1 Assay zur Messung der RNA-Hydrolyse

Im folgenden Kapitel werden die Experimente mit 2-Aminobenzimidazolen und deren Konjugaten beschrieben und diskutiert. An dieser Stelle soll kurz auf die experimentellen Bedingungen der RNA-Hydrolyse eingegangen werden.

Zur Messung der RNA-Hydrolyse kam ein *AlfExpress* DNA-Sequencer zum Einsatz, der die Echtzeit-Detektion fluoreszenzgelabelter Oligonucleotide erlaubt⁵⁸. Hierzu werden die RNA-Sequenzen mit den Ribonucleasen inkubiert und nach einer festgelegten Zeit auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel im Sequencer geladen. Bei der Elektrophorese durchlaufen kleine Fragmente das Gel schneller als große. Am Fuß des Gels befindet sich eine Anordnung aus einem Laser zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und je einer Fozelle pro Gelspur. Immer, wenn ein Oligonucleotid-Fragment, das ein Fluoreszenzlabel trägt, diesen Array passiert, wird eine Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 47).

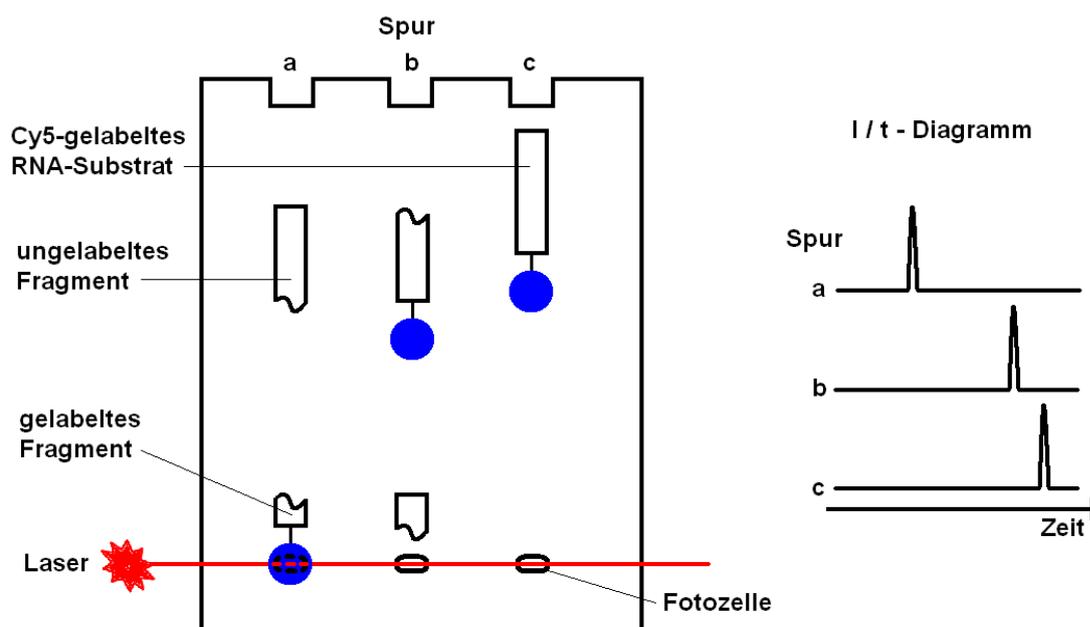


Abbildung 47: Funktionsprinzip des ALFExpress-Assays für die RNA-Hydrolyse

Der ALF*Express* Sequencer nimmt Gele mit 40 Spuren auf, was die gleichzeitige Messung einer großen Anzahl von Proben erlaubt. Durch die lange Laufstrecke von ca. 26 cm und die Elektrophorese bei konstanter Temperatur mit Hilfe eines Thermostaten ist die Auflösung der Banden hervorragend. Die Empfindlichkeit der Photodioden ist vergleichbar mit der moderner Laserfluoreszenzscanner. Somit stellt der Fluoreszenzassay mit Hilfe des ALF*Express* Sequencers eine schnelle, empfindliche quantitative Methode zur RNA-Elektrophorese dar. Im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden, bei denen die Elektrophorese in Standardkammern erfolgt und mittels Radiolabels ausgewertet wird, bietet sie eine Reihe von Vorteilen. Neben der exzellenten Auflösung durch das größere Gel und der empfindlichen quantitativen Echtzeit-Fluoreszenzmessung entfallen auch die mit der Nutzung von Radioisotopen verbundenen Unannehmlichkeiten wie deren kurze Halbwertszeit, die Notwendigkeit des Strahlenschutzes und die teure Entsorgung radioaktiver Substanzen. Die Echtzeitmessung ist außerdem schneller und weniger aufwendig als die Autoradiographie oder Phosphorimaging.

Die Auswertung des Fluoreszenzassays erfolgt durch Integration der Peaks im I / t – Diagramm, wodurch die prozentuale Spaltung an jeder Spaltstelle bestimmt wird, indem man die Summe der Integrale aller Peaks gleich 100 % setzt. Die Spaltstellen wiederum lassen sich einfach anhand einer Basenleiter bestimmen, die durch Inkubation des RNA-Substrats mit OH^- erhalten wird. Hierbei erhält man für jedes mögliche Fragment einen Peak und kann so die jeweilige Spaltstelle durch Abzählen der Basenleiter zuordnen.

Als Fluoreszenzlabel diente Cy5 am 5'-Ende des RNA-Substrats. Cy5 ist ein Carbocyaninfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 643 nm und einer Emissionswellenlänge von 667 nm. Die Anregung erfolgte bei 633 nm.

Weiterhin war bei allen Substraten zwischen Fluoreszenzlabel und RNA ein T_{10} -Linker eingefügt. Dieser durch die künstlichen Ribonucleasen nicht hydrolysierbare DNA-Linker sollte Problemen vorbeugen, die sich aus der Elektrophorese extrem kurzer RNA-Fragmente ergeben hätten. Weiterhin war ein T_4 -Spacer am 3'-Ende angebracht, um Substrat und sehr

lange Fragmente besser auflösen zu können (Abbildung 48). Die RNA-Sequenz der Substrate ist bei der Beschreibung der jeweiligen Hydrolyseexperimente abgebildet.

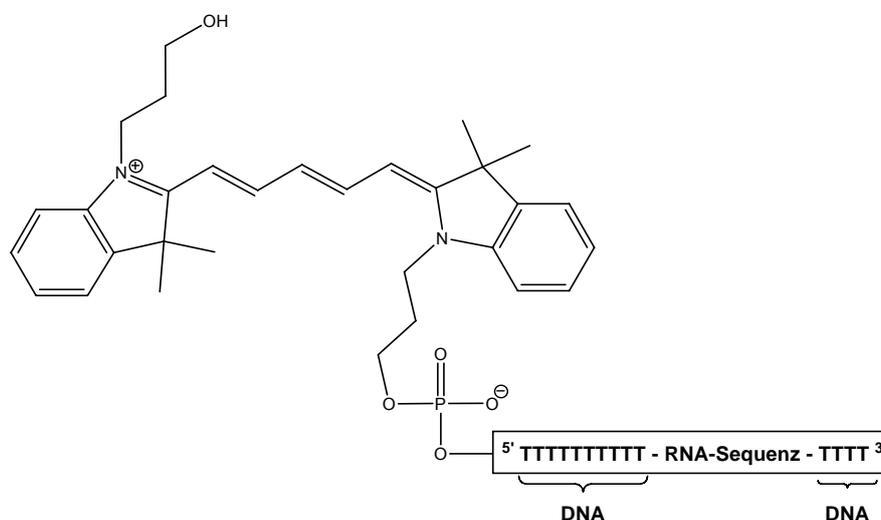


Abbildung 48: Cy5-Fluoreszenzlabel mit T₁₀-Linker am 5'-Ende und T₄-Linker am 3'-Ende der Oligoribonucleotide

Weiterhin wurde besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von Kontamination der 2-Aminobenzimidazolverbindungen und -Konjugate durch RNAsen gerichtet. Hierzu wurden die Katalysatoren, deren Synthese nicht unter sterilen Bedingungen erfolgt war, vor der Inkubation einer Ultrafiltration unterzogen⁵⁹ und in der Folge steril weitergearbeitet (s. Kapitel 8.3 "Arbeitsmethoden mit Nucleinsäuren"). Schließlich wurden auch Experimente mit *enantio*-RNA durchgeführt⁶⁰. Während diese kein Substrat für natürliche Ribonucleasen ist, wird ihre Hydrolyse von achiralen Katalysatoren wie den 2-Aminobenzimidazolgruppen ebenso beeinflusst wie die ihres natürlichen Widerparts. Eine Spaltaktivität an einem *ent*-RNA-Substrat ist somit über jeden Verdacht von Artefakten durch RNase-Kontamination erhaben und mit größter Wahrscheinlichkeit der künstlichen Nuclease zuzurechnen. Schließlich lief noch bei jedem Experiment eine Kontrollspur mit, bei der Puffer und Substrat ohne Katalysator aus gleicher Charge mit inkubiert worden waren. Damit konnte eine eventuell auftretende Hintergrundhydrolyse erkannt und ausgewertet werden.

Die Spaltexperimente wurden von Dr. Ute Scheffer durchgeführt, die mir auch bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse eine unschätzbare Hilfe war.

5.2 Unspezifische RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole

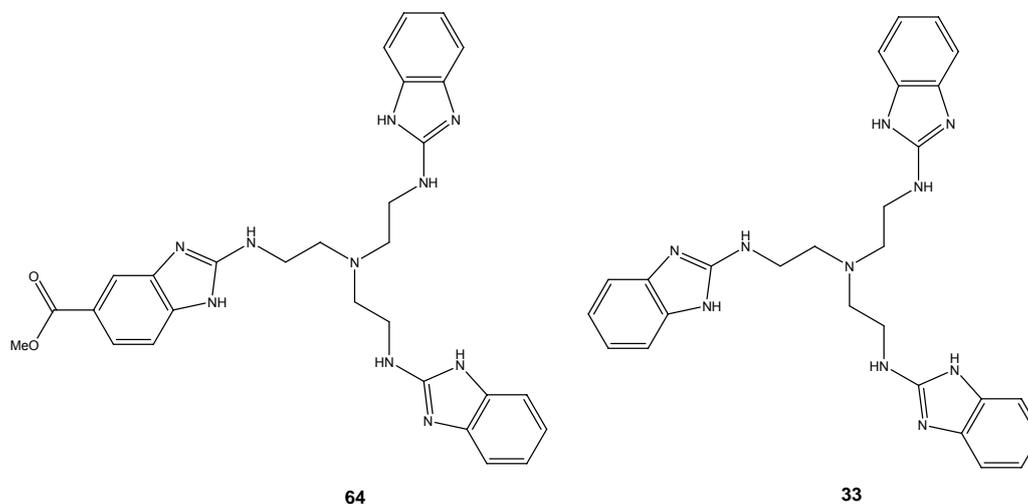


Abbildung 49: Kupplungsfähiges Trisbenzimidazol **46** und sein unsubstituiertes Analogon **33**

Wie bereits im Kapitel 3 "2-Aminobenzimidazole als RNA-spaltende Moleküle" diskutiert, stellen 2-Aminobenzimidazole hervorragende Katalysatoren für die RNA-Hydrolyse dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, künstliche Ribonucleasen auf Basis dieser Molekülklasse darzustellen und zu untersuchen. Hierzu war das kupplungsfähige Trisbenzimidazol **64** synthetisiert worden, dessen Spaltaktivität zunächst im ungekoppelten Zustand mit der des unsubstituierten Trisbenzimidazols **33** verglichen wurde^{33d}.

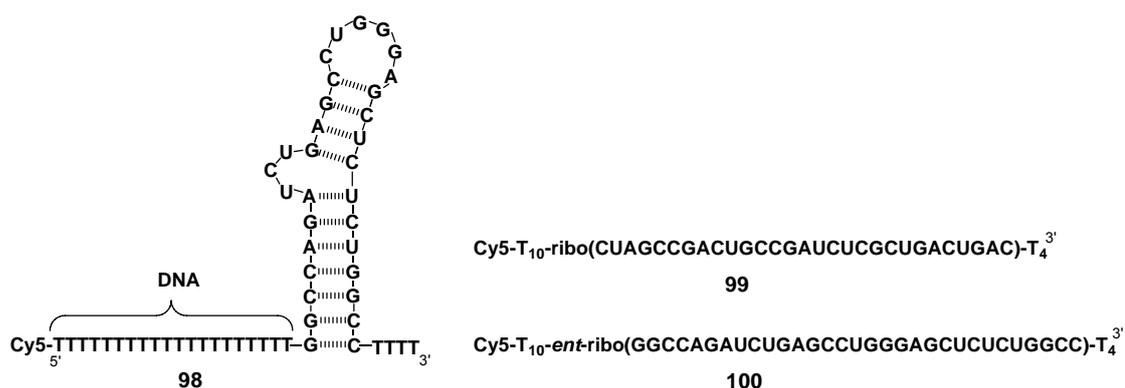


Abbildung 50: Hydrolysesubstrate für die unspezifische RNA-Spaltung

Das Katalysepotential sollte an RNA-Substraten mit und ohne Sekundärstruktur getestet werden. Hierzu kamen ein lineares 29mer nach Häner und Moser¹² **99** und ein Modell der HIV-1 TAR-RNA in Form des 32mer Hairpins **98** zum Einsatz. Um eine Kontamination durch

RNAsen auszuschließen, wurden die Ergebnisse durch Hydrolyseexperimente mit dem *enantio*-TAR-Substrat **100** überprüft (Abbildung 50).

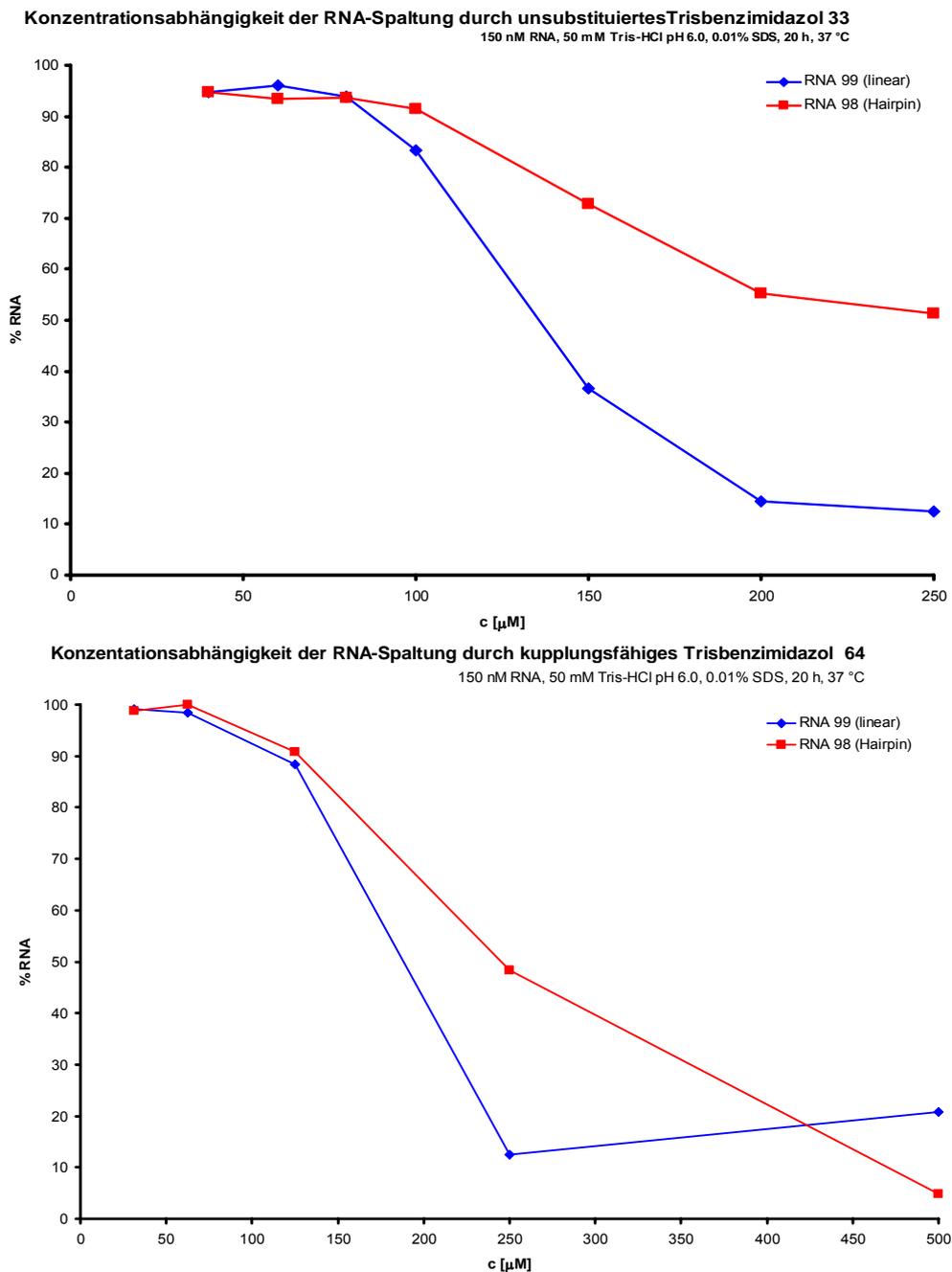
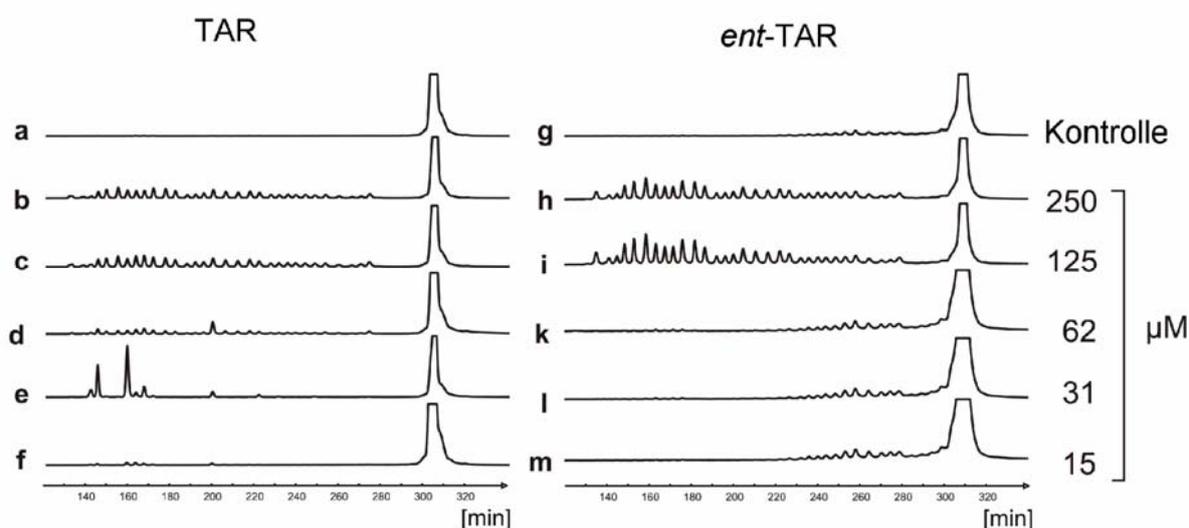


Abbildung 51: Konzentrationsabhängige RNA-Hydrolyse verschiedener Substrate durch **33** und **64**

Zur Minimierung unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Oligonucleotiden wurde 0.01 % Natrium-*n*-dodecylsulfat (SDS) zum Spaltpuffer gegeben⁶¹.

Abbildung 51 zeigt die RNA-Hydrolyse der Substrate **98** und **99** in Abhängigkeit der Konzentration der Trisbenzimidazole **33** und **64**. Das Substrat wurde hierbei in einer Konzentration von 150 nM eingesetzt und für jeweils 20 h bei 37 °C mit dem jeweiligen Katalysator inkubiert. Es zeigte sich, dass das Katalysepotential des Trisbenzimidazols mehr oder weniger unabhängig von der Funktionalisierung einer 2-Aminobenzimidazoleinheit ist. So wurde bei einer Konzentration des Katalysators von 250 μM nach einer Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C durch das Trisbenzimidazol **33** 87 % des linearen RNA-Substrats **99** bzw. 49 % des TAR-Hairpins **98** gespalten, durch den Trisbenzimidazol-Methylester **64** respektive 88 % bzw. 52 %.



c [μM]	% abs. RNA-Spaltung	
	TAR	<i>ent</i> -TAR
250	42	48
125	43	55
62	21	11
31	37	8
15	4	8

150 nM RNA, 50 mM Tris-HCl pH 6.0, 0.01% SDS, 20 h, 37 °C

Abbildung 52: Vergleich der Spaltung von TAR-RNA **96** und *ent*-TAR-RNA **98** durch Trisbenzimidazol-Methylester **64**

Es folgte der Vergleich der Spaltaktivitäten des kupplungsfähigen Trisbenzimidazols **64** gegenüber TAR-RNA **98** und *ent*-TAR **100**. Wie auf Spur e in Abbildung 52 exemplarisch zu sehen ist, traten bei Experimenten mit natürlichen Ribonucleinsäuresubstraten immer wieder Artefakte auf. Die leicht erhöhten Spaltaktivitäten an *ent*-TAR relativieren sich bei Betrachtung des Kontrollexperiments (Spur g), wo Verunreinigungen zu erkennen sind. Sieht man von diesen Effekten ab, liegen die Spaltaktivitäten im Rahmen der Messgenauigkeit sehr dicht beieinander. Wie erwartet spalten 2-Aminobenzimidazole natürliche Ribonucleasen also genauso gut wie deren Spiegelbilder.

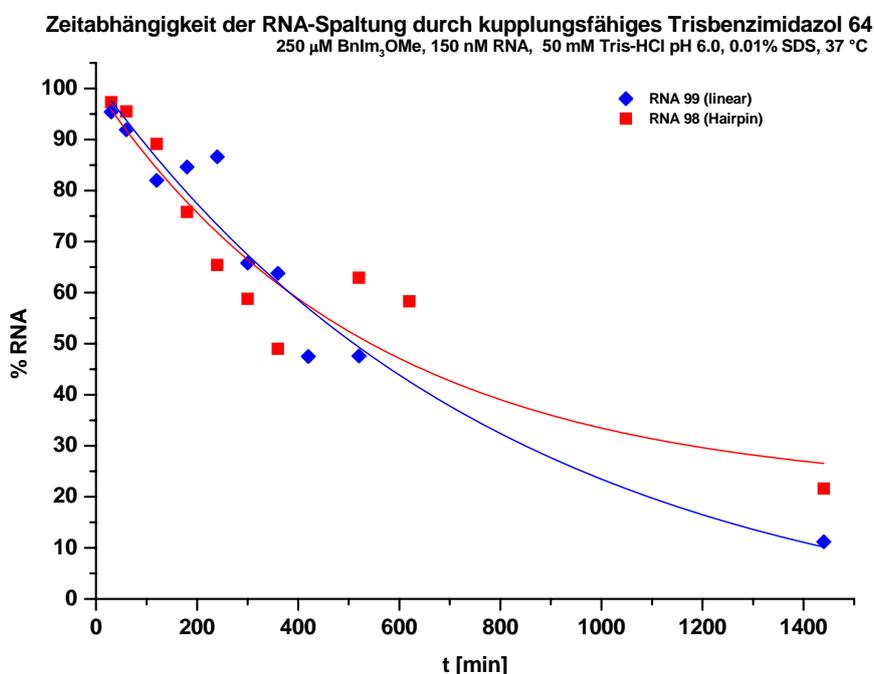


Abbildung 53: RNA-Hydrolyse durch kupplungsfähiges Trisbenzimidazol **64**

Als nächstes untersuchte man den zeitlichen Verlauf der RNA-Spaltung durch **64**. Hierbei wurde bei einem pH von 6.0 und einer Konzentration von 150 nM des jeweiligen RNA-Substrats die Spaltung durch 250 μM **64** gegen die Zeit aufgetragen. Auf die erhaltenen Werte wurde eine Zerfallskinetik erster Ordnung gefittet. Für das lineare RNA-Substrat **99** ergab sich eine Halbwertszeit von 9.3 ± 3 h, für das Hairpin-TAR-Substrat **98** von 6.3 ± 2.7 h. Die große Streuung der Werte sowie die daraus resultierende Abweichung zeigen jedoch, dass sie bestenfalls die Größenordnung einer Halbwertszeit abbilden können, zumal man für

das leichter zu spaltende sekundärstrukturfreie Substrat **99** eine kürzere Halbwertszeit erwarten würde (SDS wirkt allerdings denaturierend).

5.2.1 Aggregationsstudien mit kupplungsfähigem Trisbenzimidazol

Messungen der pH-Abhängigkeit der RNA-Spaltung durch den Trisbenzimidazol-Methylester **64** waren nicht möglich, da die Verbindung bei steigendem pH-Wert zu Aggregation mit den RNA-Substraten neigte, die zur Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur führten. Auch die UV-spektrometrische Messung des pK_a -Werts von **64** gelang nicht, da die Substanz bei pH-Werten über 6 zu präzipitieren begann. Somit war zu diesem Zeitpunkt noch nicht viel über den Mechanismus der RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole herauszufinden. Es bestand die Befürchtung, dass RNA-Spaltung hauptsächlich im aggregierten Zustand stattfinden könnte. So war nicht klar, ob 2-Aminobenzimidazole als Untereinheiten von Einzelmolekülen in Form von Konjugaten eine Spaltaktivität aufweisen würden.

Zur genaueren Untersuchung des Aggregationsverhaltens des Trisbenzimidazol-Methylesters **64** bediente man sich der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS)⁶². Diese Methode erlaubt es, Diffusionsgeschwindigkeiten fluoreszenzgelabelter Moleküle zu messen.

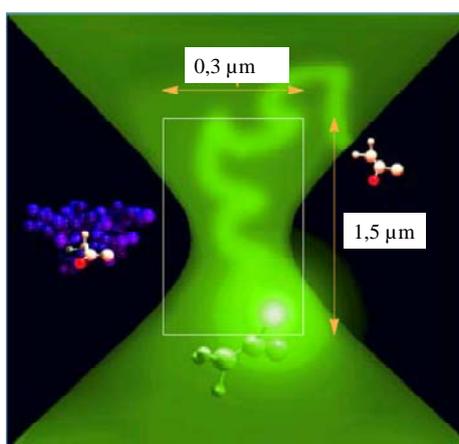


Abbildung 54: Schema des konfokalen Volumens eines FCS-Spektroskops

Durch die Brown'sche Molekularbewegung diffundieren diese durch das konfokale Volumen des Geräts, wo bei jedem Passieren eines markierten Moleküls das durch einen Laser

angeregte Fluoreszenzsignal von einer Fotodiode gemessen wird. Das konfokale Volumen ist kleiner als $\frac{1}{4}$ Femtoliter, was in Kombination mit Konzentrationen der zu messenden Moleküle im nanomolaren Bereich die Detektion einzelner Moleküle durch Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität ermöglicht. Im Autokorrelationsmodus, der den erfolgten Messungen zugrunde liegt, wird die Diffusionsgeschwindigkeit einer einzigen gelabelten Molekülsorte gemessen. Diese ändert sich zu größeren Zeiten, wenn das Molekül Aggregate bildet. Eine sprunghafte Änderung der Diffusionszeit durch das konfokale Volumen deutet so auf eine Aggregation hin. Die FCS-Messungen wurden von Dr. Ute Scheffer durchgeführt.

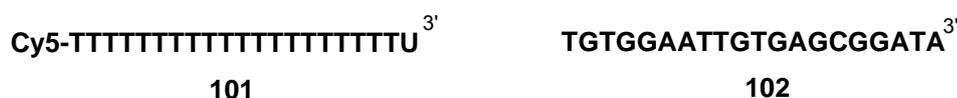


Abbildung 56: DNA-Sequenzen für die FCS-Aggregationsstudien des Trisbenzimidazols **64**

Für die Aggregationsstudien mit Trisbenzimidazol **64** kamen die Cy5-gelabelte DNA **101** und ungelabelte, zu **99** nicht komplementäre DNA **102** zum Einsatz. Es wurde bewußt DNA und nicht RNA gewählt, um zeitabhängige Effekte durch Substrathydrolyse zu vermeiden. Die Messungen wurden an einem ConfoCor II-Spektroskop durchgeführt. Cy5 (Absorptionsmaximum bei 643 nm, Emissionswellenlänge 667 nm) regte man mit einem HeNe-Laser bei 633 nm an.

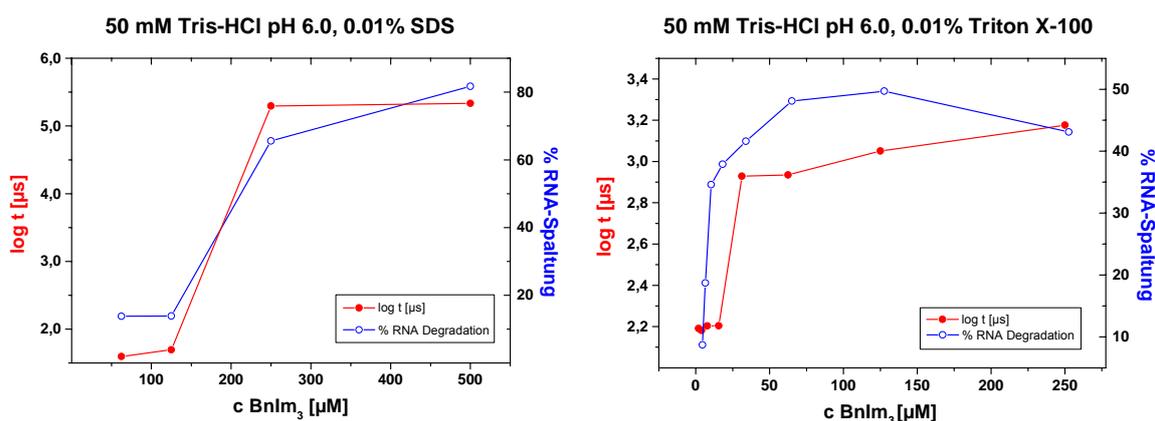


Abbildung 55: Zusammenhang zwischen Aggregation und Hydrolyseaktivität von **64**

Linke Ordinate: Diffusionszeit des Oligonucleotids **101** (25 nM **101** + 175 nM **102**)

Rechte Ordinate: Spaltung des *ent*-RNA-Substrats **100** (150 nM)

In dem Puffer, der auch bei den Hydrolyseexperimenten Verwendung gefunden hatte (Tris-HCl pH 6.0, 0.01 % SDS) betrug die Diffusionszeit der DNA **99** bei RT 150 – 180 μ s, was mit dem Molekulargewicht von 7.3 kDa konsistent ist. Überschritt die Konzentration von **64** jedoch 100 μ M, wurden plötzlich große Aggregate beobachtet, die mehrere Kopien der DNA **101** enthielten. Wie das linke Diagramm der Abbildung 55 zeigt, besteht eine Korrelation zwischen der Aggregation von **64** und der Spaltung von *ent*-RNA **98**. Ersetzte man aber das anionische Detergens SDS durch das nichtionische Triton X-100 (0.01 %, 160 μ M), waren Aggregate von **101** bis hinunter zu Konzentrationen von 4 μ M **64** zu beobachten. Auch erfolgte unterhalb 100 μ M **64** keine Deaktivierung des Katalysators (Abbildung 55 rechtes Diagramm). Auch bei Verwendung des Puffers ohne Detergens lag die kritische Konzentration des Trisbenzimidazols **64** bei 4 μ M. Mutet dies zunächst seltsam an, so wird es doch plausibel, wenn man bedenkt, dass ein Anteil von 0.01 % SDS (v/v) einer Konzentration von 350 μ M entspricht. Dieser Wert liegt zwar weit unter der kritischen Micellenkonzentration von SDS (in reinem Wasser 8.0 mM), ist aber äquivalent zur Konzentration der 2-Aminobenzimidazoleinheiten, wenn die des Trisbenzimidazols bei 117 μ M liegt. Daraufhin wurde die Aggregation der DNA **101** als Funktion der Trisbenzimidazolkonzentration bei verschiedenen SDS-Konzentrationen gemessen. In allen Experimenten fiel das Verschwinden der Aggregate von **101** mit dem Erreichen des Äquivalenzpunkts zwischen anionischem Detergens und 2-Aminobenzimidazoleinheiten zusammen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass das Trisbenzimidazol **64** beim Versuch der pK_a -Messung beim Titrieren über pH 6 ausgefallen war, führte in Verbindung mit analogen Beobachtungen beim unsubstituierten Trisbenzimidazol zur Hypothese, dass Trisbenzimidazol bei pH > 6 und Konzentrationen über 4 μ M unabhängig von der Anwesenheit von Oligonucleotiden Aggregate bildet. Nichtionische Detergenzien, die zur Minimierung unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen zugesetzt werden, beeinflussen weder die Aggregation noch die Bindung von RNA an die Aggregate. Die Anwesenheit von SDS hingegen mag vielleicht nicht die Aggregation der Trisbenzimidazole beeinflussen,

bindet aber aufgrund einer Kombination von Coulomb-Wechselwirkungen und Hydrophobie an die Aggregate und inhibiert so deren Wechselwirkung mit Oligonucleotiden.

Nach diesen Untersuchungen bestand immer noch die zentrale Frage, ob das Trisbenzimidazol **64** nur als Aggregat oder auch als Teil eines Einzelmoleküls eine Spaltaktivität aufweisen würde. Da nun aber mit ca. 4 μM der kritische Konzentrationswert für die Bildung von Aggregaten bekannt war, führte man Spaltexperimente in Abwesenheit von Detergenzien mit Katalysatorkonzentrationen auch unterhalb dieser Schwelle durch. Abbildung 57 zeigt die Spaltung von *ent*-TAR **100** (150 nM, 50nM Tris-HCl pH 6.0, 20 h, 37 °C) durch Trisbenzimidazol-Methylester **64**. Bei 125 μM **64** wurden 20 % des Substrats gespalten, bei 1.9 μM 10 %. Das Spaltmuster bildet zunehmend die Sekundärstruktur des Substrats ab. Dies liegt daran, dass in der Stem-Region von **100** aus Konformationsgründen keine Hydrolyse stattfinden kann (s. Kapitel 2.1 "Mechanismus und Katalyse der RNA-Hydrolyse") und zeigt auch, dass keine denaturierenden Bedingungen herrschten. Dasselbe Spaltexperiment war mit den vergleichbaren Resultaten auch mit dem natürlich konfigurierten TAR-Substrat durchgeführt worden.

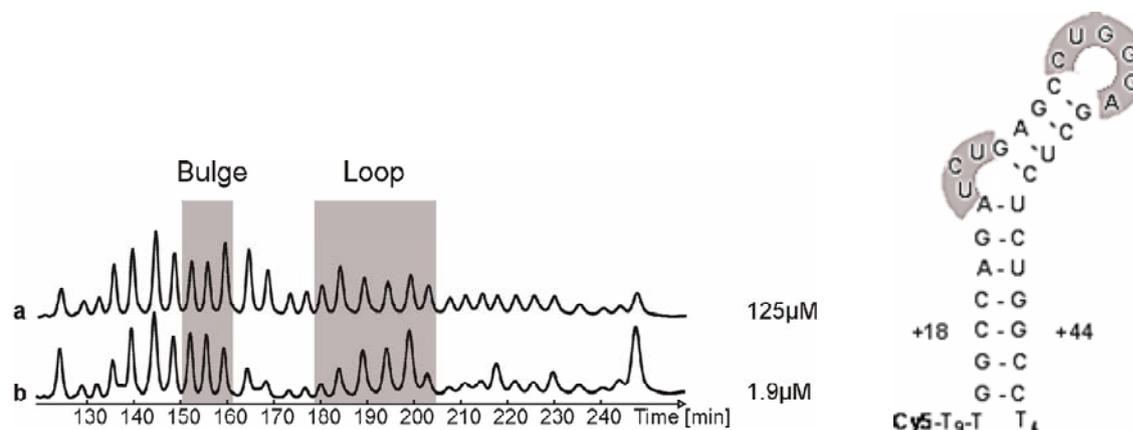


Abbildung 57: Spaltung von *ent*-TAR **100** durch Trisbenzimidazol-Methylester **64**

Damit existierte ein starker Hinweis, dass Trisbenzimidazole auch als Einzelmoleküle gute Katalysatoren sind. Der Beweis sollte jedoch erst durch Konjugate unumstößlich erbracht werden.

5.3 Affinitätsspaltung von RNA durch 2-Aminobenzimidazol-Peptidkonjugate

Die erste RNA-Spaltung mit einem 2-Aminobenzimidazolkonjugat gelang mit einem an Trisarginin gebundenen Bisbenzimidazol **77** an der Modell-RNA **98** als Substrat, die das Hauptstrukturmotiv der HIV-1-TAR-RNA darstellt.

Ein Grund für die Auswahl des Trisarginins (RRR) als RNA-Ligand liegt in seiner hohen Affinität zu RNA. Ein Standbein unserer Arbeitsgruppe ist neben der Entwicklung künstlicher Nucleasen die Erforschung von RNA-Liganden-Wechselwirkungen. Hierzu eignet sich das tat-TAR-System aus HIV-1 hervorragend als Modellsystem, da es einen der am besten erforschten Protein-RNA-Komplexe darstellt. Erkenntnisse, die an diesem System gewonnen werden, können so einfacher verifiziert und auf ihre Konsistenz überprüft werden. So lassen sich Methoden entwickeln, die dann auch auf andere, weniger gut erforschte Systeme anwendbar sind. Arginin, sein Analogon Argininamid⁶³ sowie argininhaltige Oligopeptide⁶⁴ sind gute TAR-Liganden. In unserer Arbeitsgruppe werden Tripeptide aus teils artifiziellen Aminosäuren als potentielle RNA-Liganden synthetisiert und getestet. Trisarginin dient hierbei als einer der Vergleichsliganden bei der Untersuchung der Bindungseigenschaften künstlicher Tripeptide.

Ein solches Tripeptid war Verbindung **75b** (nicht trägergebunden), welche als potentieller Ligand für die Bcr-Abl-*m*-RNA identifiziert worden war. Auch sie wurde mit 2-Aminobenzimidazolderivaten konjugiert und getestet.

5.3.1 Experimente mit Trisargininkonjugaten

Zunächst wurde die Spaltaktivität des Bisbenzimidazol-Trisargininkonjugats **77** und des Trisbenzimidazol-Trisargininkonjugats **78** am TAR-RNA-Substrat **98** sowie am *ent*-TAR-Substrat **100** getestet. Wie schon bei der unspezifischen RNA-Hydrolyse durch **64** sollten auch hier durch den Einsatz des enantiomeren Substrats Kontaminationsartefakte eliminiert werden. Obwohl die Komplexe aus den Trisargininkonjugaten und dem TAR- bzw. *ent*-TAR-

Substrat diastereomer sind, wurde aufgrund der Beobachtungen von Rana et. al. erwartet, dass die Affinität sowie die Bindungseigenschaften der Trisargininkonjugate gegenüber TAR bzw. *ent*-TAR sehr ähnlich sein sollten. Die Gruppe um Rana hatte die Wechselwirkungen von Tat und einem *ent*-Tat-Peptid aus D-Aminosäuren mit TAR untersucht und gezeigt, dass das Enantiomer des natürlichen Tat-Peptids dessen Bindung an TAR inhibiert⁶⁵.

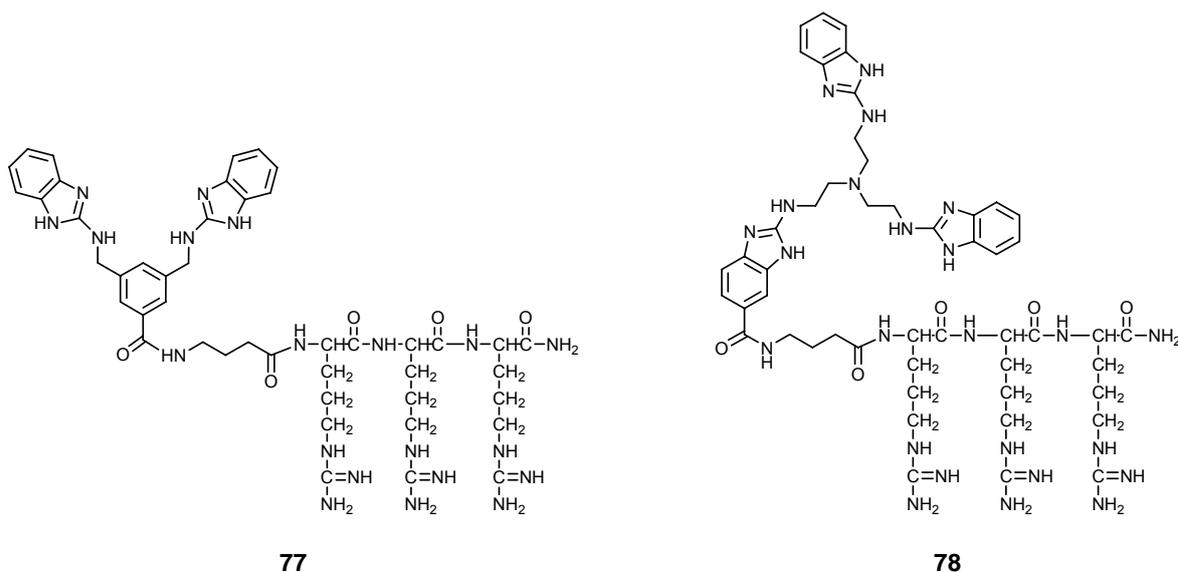


Abbildung 58: Bis- und Trisbenzimidazol-Trisargininkonjugate

Im Umkehrschluss wurde angenommen, dass die Trisargininkonjugate mit natürlichen Aminosäuren ebenso gut mit TAR wie mit dessen Enantiomer wechselwirken sollten, zumal die Wechselwirkungen des Trisarginins mit TAR viel weniger spezifisch sein sollten als die mit dem natürlichen Peptid und wohl hauptsächlich auf Coulomb-Wechselwirkungen der Guanidiniumgruppen mit dem Phosphatrückgrat der RNA beruhen. Dies konnte durch einen modifizierten FRET-Verdrängungsassay⁶⁶ mit Trisarginin und *ent*-Trisarginin bestätigt werden, in dem beide gegen Tat die gleiche IC_{50} aufwiesen.

Im Rahmen der Messgenauigkeit war kein Unterschied in der Spaltaktivität gegenüber den Substraten festzustellen; die Streuung der Werte lag im unteren einstelligen Prozentbereich. Auch die Spaltmuster zeigten keine nennenswerten Unterschiede. Im Folgenden sind daher lediglich die Experimente mit *ent*-TAR **100** dargestellt, obwohl die gleichen Experimente auch mit TAR-Substrat **98** durchgeführt worden waren.

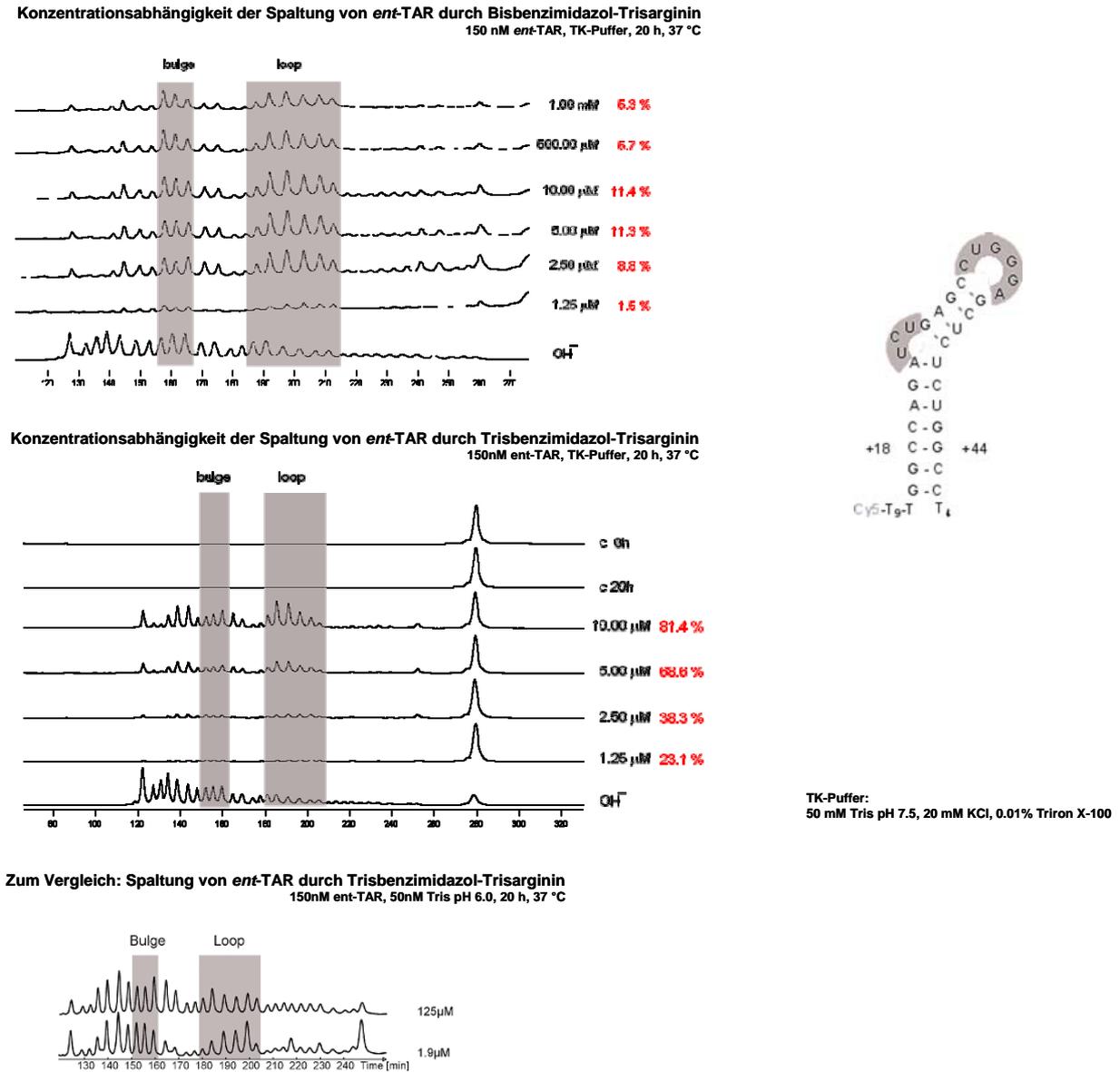


Abbildung 59: Konzentrationsabhängigkeit der *ent*-TAR-Spaltung durch Bis- und Trisbenzimidazoltrisarginin.

Abbildung 59 zeigt die ALF-Läufe der Hydrolyseexperimente mit *ent*-TAR **100**. In der oberen Kurvenschar ist die Spaltung durch Bisbenzimidazol-Trisarginin **77** zu sehen, in der unteren die durch Trisbenzimidazol-Trisarginin **78** sowie die Kontrollexperimente nach 0 und 20 h (bei **77** nicht abgebildet). Die Hydrolyse wurde in TK-Puffer (50 mM Tris pH 7.5, 20 mM KCl, 0.01 % Triton X-100) durchgeführt. Das *ent*-RNA-Substrat **100** wurde in einer Konzentration von 150 nM eingesetzt und mit der entsprechenden Katalysatorkonzentration für 20 h bei 37 °C inkubiert. In Abbildung 59 ist die Katalysatorkonzentration in schwarz, die dabei gemessene Gesamtspaltung des Substrats in rot neben den ALF-Spuren vermerkt. Es ist

noch anzumerken, dass die Spuren oben in der Abbildung überhöht dargestellt sind, um die Spaltpmuster deutlicher erkennbar zu machen. In den ALF-Spuren sind die Bulge- und Loop-Region des Substrats (rechts in der Abbildung) grau hervorgehoben. Man kann erkennen, dass das Spaltpmuster dessen Sekundärstruktur widerspiegelt. Beim Vergleich mit dem Hydrolyseexperiment des ungekuppelten Trisbenzimidazols **64** (s. Abbildung 59 unten) wird deutlich, dass die Spaltpmuster der Konjugate die Sekundärstruktur viel besser abbilden. Vergleicht man die Spaltpmuster des Bisbenzimidazol-Trisarginins **77** und des Trisbenzimidazol-Trisarginins **78** miteinander, ist außerdem festzustellen, dass das Trisbenzimidazolkonjugat nicht nur die größere Spaltaktivität aufweist, sondern auch noch einen deutlicheren Footprint liefert als sein Gegenstück mit nur zwei Aminobenzimidazolgruppen. Andererseits flacht die Kurve des Bisbenzimidazolkonjugats schneller ab, was darauf hindeuten könnte, dass **77** ein besserer Ligand für (*ent*)-TAR ist.

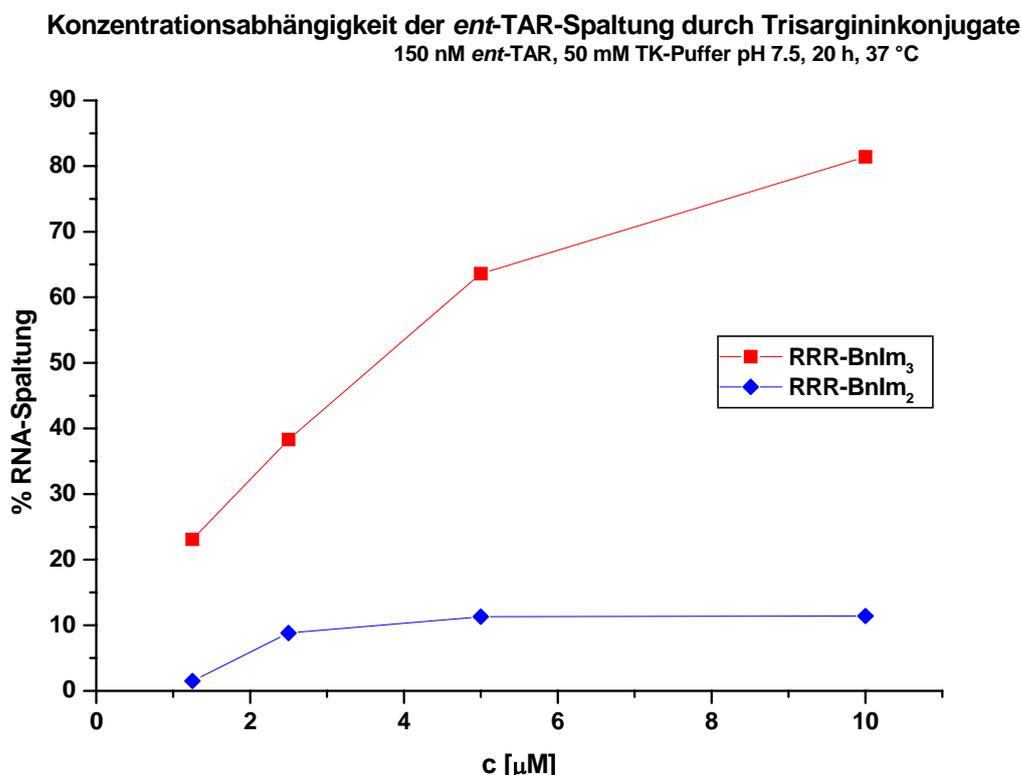


Abbildung 60: Spaltung von *ent*-TAR 100 durch **78** (rot) und **77** (blau)

Betrachtet man die Spaltung des *ent*-RNA-Substrats **100** als Funktion der Katalysatorkonzentration, erhält man beinahe perfekte Sättigungskurven (Abbildung 60). Nach wie vor war jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob Aggregate vorlagen, so dass der Begriff der Sättigung mit Vorsicht anzuwenden ist. Allerdings neigten die Konjugate nun auch bei höheren pH-Werten nicht mehr zur Präzipitation, was gegen eine Aggregation spricht.

Es konnte zwar keine Bindungsstelle identifiziert werden, was gegen Spezifität spricht, doch kann man zumindest sagen, dass eine erhöhte Affinität des Konjugats zum Substrat besteht. Ein wichtiges Kriterium der Affinitätsspaltung war jedoch noch nicht erfüllt, da man nicht von der Bildung eines definierten Ligand-Substrat-Komplexes ausgehen kann. Dies ist allerdings konsistent mit der Vermutung, dass Trisarginin zwar hochaffin gegenüber RNA ist, jedoch nicht sehr spezifisch.

Auch mit den Trisargininkonjugaten wurde eine Versuchsreihe in Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 61 zu sehen sind.

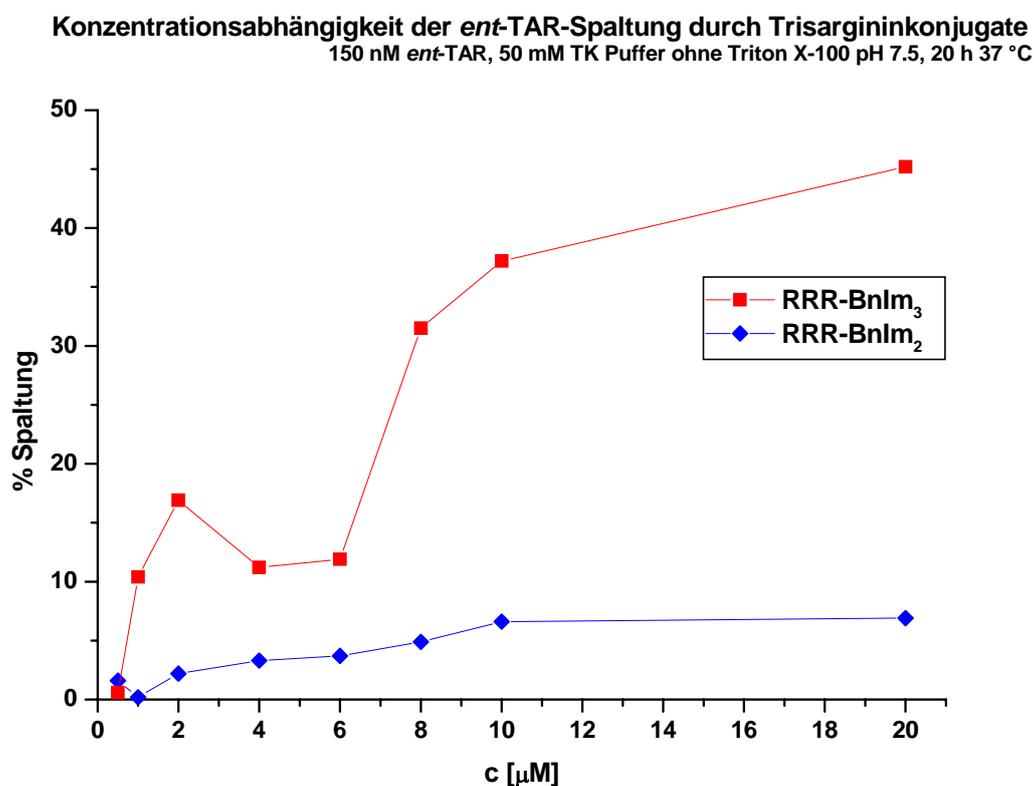


Abbildung 61: Spaltung von *ent*-TAR 100 durch 78 (rot) und 77 (blau) in Abwesenheit von Detergenzien

Hier war die Streuung der Werte zumindest im Falle des Trisbenzimidazolkonjugats um einiges größer. Was aber viel mehr ins Auge fällt, ist die signifikante Verringerung der Gesamtsplaltung von über 80 % auf weniger als 50 % im Falle des Trisbenzimidazolkonjugats. Dafür konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

Im Anschluss wurden Experimente zur Substratspezifität durchgeführt. Dazu wurden das Bisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **77** und das Trisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **78** in Konzentrationen von 0.25 – 4 μM an *ent*-TAR **100** sowie an *ent*-Bcr-Abl-RNA **104** und *ent*-RNA **105** getestet (Strukturen s. Abbildung 66 und Abbildung 78; 150 nM Substrat, TK-Puffer pH 7.5, 37 °C, 20 h). Die gleiche Versuchsreihe wurde noch einmal in Anwesenheit von 1 μM Mg^{2+} durchgeführt, was eine eventuelle Spezifität auf Kosten der Affinität verstärken sollte. Allerdings war in keiner dieser Versuchsreihen Substratspezifität nachzuweisen.

Trotz der Hinweise auf die Fähigkeit der 2-Aminobenzimidazole, auch im nicht aggregierten Zustand RNA zu spalten, war also auch durch die Trisargininkonjugate der Beweis noch nicht erbracht, dass Affinitätssplaltung mit 2-Aminobenzimidazolkonjugaten möglich ist, da Trisarginin als Ligand zu unspezifisch ist und offensichtlich keinen definierten Komplex mit (*ent*-)TAR-RNA bildet.

Mit Hilfe des Trisarginin-Rhodaminkonjugats **80** sollte eine eventuelle Spezifität der Bindung von Trisarginin an *ent*-TAR **100** im Vergleich zu *ent*-Bcr-Abl **104** und *ent*-RNA **105** noch einmal überprüft werden.

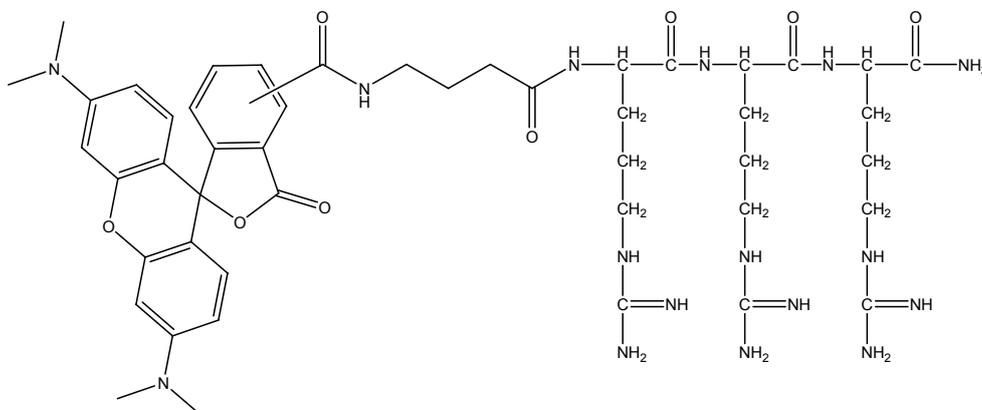


Abbildung 62: Trisarginin-Rhodaminkonjugat **80**

Die Messung basierte auf einem Fluoreszenz-Assay, der zunächst mit fluoresceingelabelter TAR-RNA und dem Trisarginin-Rhodaminkonjugat **80** etabliert worden war. (Abbildung 63).

Hierbei wurde die Fluoreszenz des Rhodamins (A_{\max} 555 nm, E_{\max} 570nm) durch das Fluorescein an der TAR-RNA gequencht. Dieser Effekt tritt nur dann auf, wenn die beiden Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander stehen, wie es bei der Bindung des Trisarginins an TAR der Fall ist.

Das Trisarginin-Rhodaminkonjugat **80** wurde vorgelegt (20 nM) und die Emission vor und nach Zugabe der Fluorescein-gelabelten RNA (100 nM) gemessen.

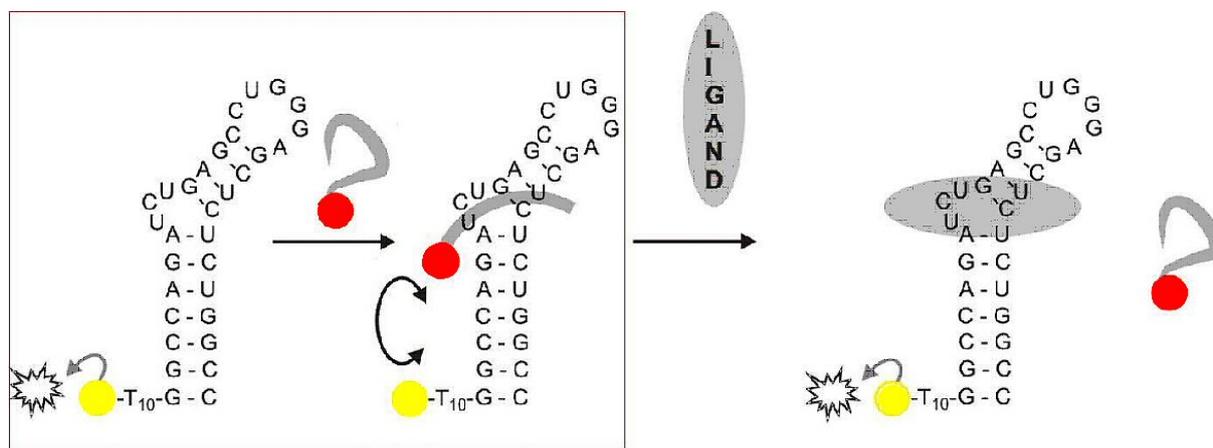


Abbildung 63: Funktionsweise des Fluoreszenz-basierten Assays zur Untersuchung der Trisarginin-TAR-Wechselwirkung

Durch Zugabe eines Verdrängungsliganden sollte die Fluoreszenz wieder auf ihr altes Niveau zurückkehren (Abbildung 63 rechts). Hierzu kamen ungelabeltes Trisarginin (10 μ M) sowie Polyarginin (200 nM) zum Einsatz.

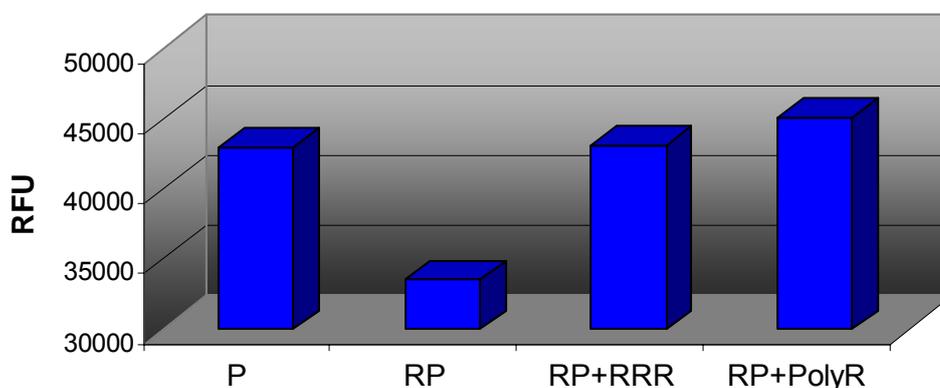
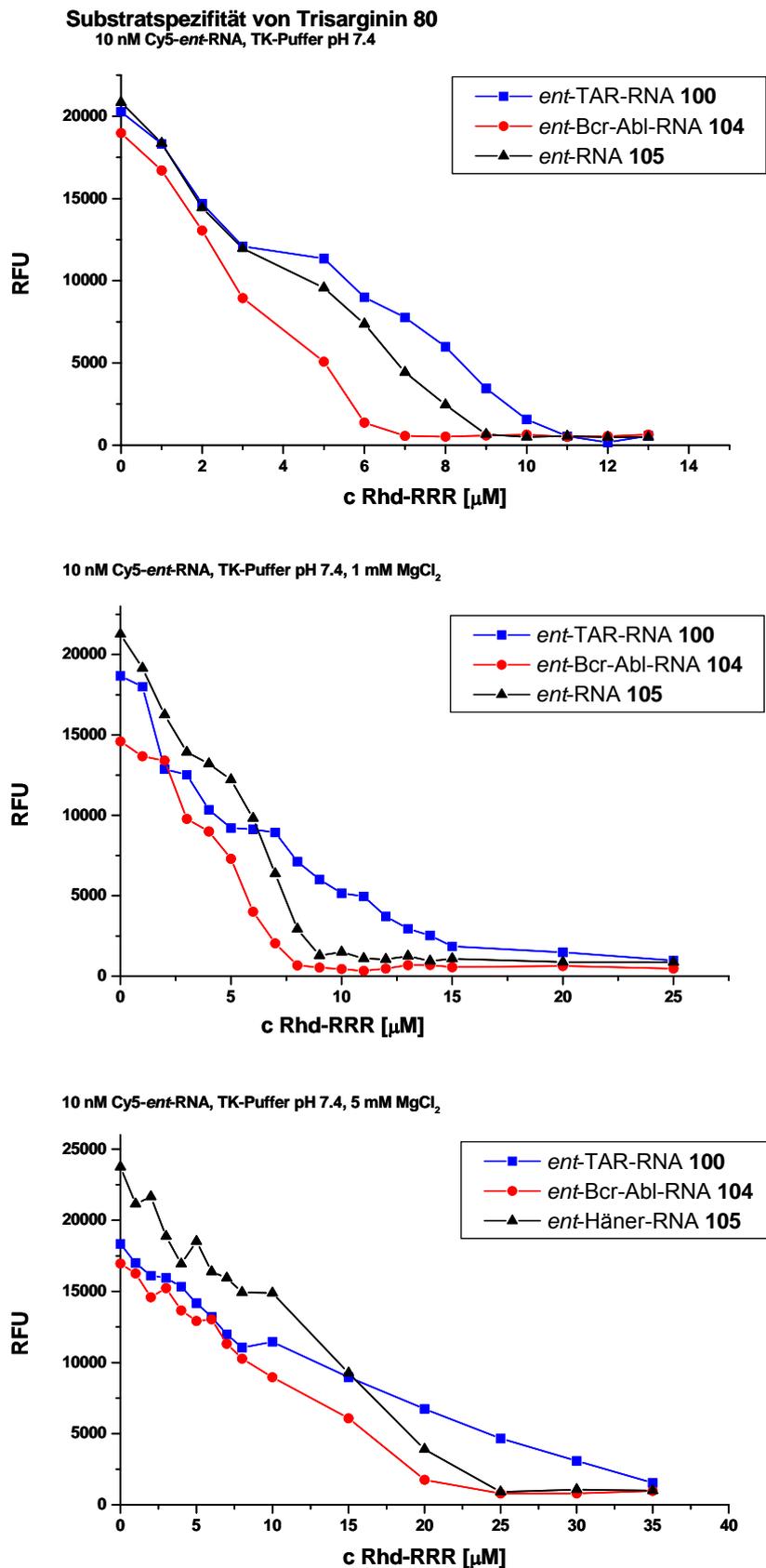


Abbildung 64: Fluoreszenzquenching von Trisarginin-Rhodamin 80 (P) durch Zugabe von Fluorescein-TAR-RNA (R) und anschließende Rücktitration mit Trisarginin (RRR) bzw. Polyarginin (PolyR)

Abbildung 64 zeigt das Fluoreszenzquenching durch die Zugabe des rhodamingelabelten Trisargininliganden **80** sowie die anschließende Rücktitration mit Trisarginin bzw. Polyarginin. Die Rücktitration sollte **80** wieder vom Substrat verdrängen. Diese Reversibilität war ein starkes Indiz dafür, dass auch eine echte Bindung gemessen worden war.

Dieser Assay wurde nun verwendet, um das rhodamingelabelte Trisarginin **80** im Hinblick auf seine Substratspezifität zu untersuchen. Da die Spaltexperimente mit Cy5-gelabelter *ent*-RNA durchgeführt worden waren, wurde hier Cy5-*ent*-RNA **100** (A_{\max} 643 nm, E_{\max} 667 nm) vorgelegt und Trisarginin-Rhodaminkonjugat **80** als Quencher zugegeben. Die Kurven zeigen die Fluoreszenzabnahme von Cy5 durch die Titration mit **80**. In Übereinstimmung mit den Spaltexperimenten konnte auch hier keine Substratspezifität nachgewiesen werden. In diesem Falle hätte die Fluoreszenz bei Titration mit dem Zielsubstrat **100**, also der *ent*-TAR-RNA, schneller abnehmen müssen als bei Titration mit den anderen. Auch durch Zugabe von Magnesiumionen konnte keine Spezifität induziert werden.

Abbildung 65: Fluoreszenzmessung zur Substratspezifität von 80 bei 0, 1 und 5 mM Mg²⁺

5.3.2 Experimente mit Bcr-Abl-Ligand-Konjugaten

Wie bereits eingangs erwähnt, werden in unserem Arbeitskreis Tripeptidliganden aus teilweise artifiziellen Aminosäuren kombinatorisch hergestellt und auf ihre Bindungsfähigkeit an RNA-Substrate getestet. Dabei war ein Tripeptid als potentieller Ligand für die Bcr-Abl-RNA **103** identifiziert worden⁴⁷. Bcr-Abl-*m*-RNA ist ein Fusionstranskript, dem eine entscheidende Rolle bei der chronischen myeloischen Leukämie zugeschrieben wird.

Cy5-T₁₀-riboGGCUGACCAUCAUAAGGAAGAAGCCCUUCAGCGGCCAGUA-T₄

103

Cy5-T₁₀-*ent*-ribo-GGCUGACCAUCAUAAGGAAGAAGCCCUUCAGCGGCCAGUA-T₄

104

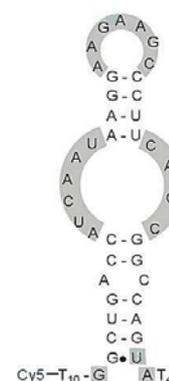


Abbildung 66: Cy5-gelabeltes Bcr-Abl-*m*-RNA-Substrat **103**, das *ent*-Substrat **104** und ein Strukturvorschlag

Abbildung 66 zeigt das eingesetzte Substrat **103** und dessen enantiomeren Widerpart **104**; ein Strukturvorschlag, der mit Hilfe von Mfold⁶⁷ berechnet worden war, ist in der Abbildung rechts zu sehen. Für die Spaltexperimente waren die beiden Konjugate **82** und **83** hergestellt worden.

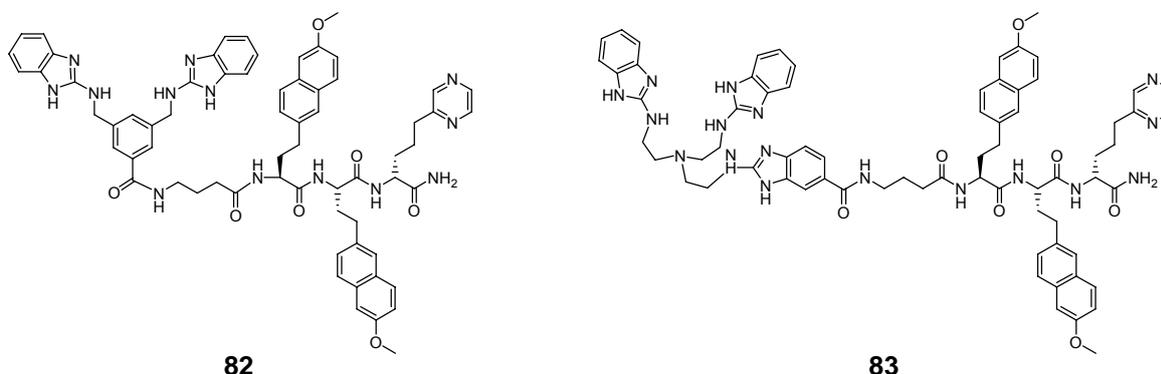


Abbildung 67: Bis- und Trisbenzimidazolkonjugate eines Bcr-Abl-RNA-Liganden-Tripeptids

Als Puffersystem kam wie schon bei den Versuchen mit den Trisargininkonjugaten TK-Puffer ohne Zusatz von Detergenzien zum Einsatz (150nM RNA, 50 mM Tris pH 7.5, 20 mM KCl, ohne Triton X-100). Die Spaltexperimente wurden parallel unter den gleichen Bedingungen mit ungekuppeltem Trisbenzimidazol-Methylester **64** durchgeführt..

Die Experimente mit dem Bisbenzimidazolkonjugat **82** brachten keine auswertbaren Ergebnisse. Die Intensität hob sich kaum vom Hintergrund ab.

Die Spaltung des natürlichen Bcr-Abl-Substrats **103** und des *enantio*-Substrats **104** mit dem Trisbenzimidazolkonjugat **83** hingegen lieferte interessante Daten. Da sich die Ergebnisse der Spaltung des natürlichen Oligonucleotids und des Enantiomeren nur marginal unterscheiden, wird im Folgenden nur auf den Datensatz mit *ent*-Bcr-Abl-Konjugat **83** eingegangen.

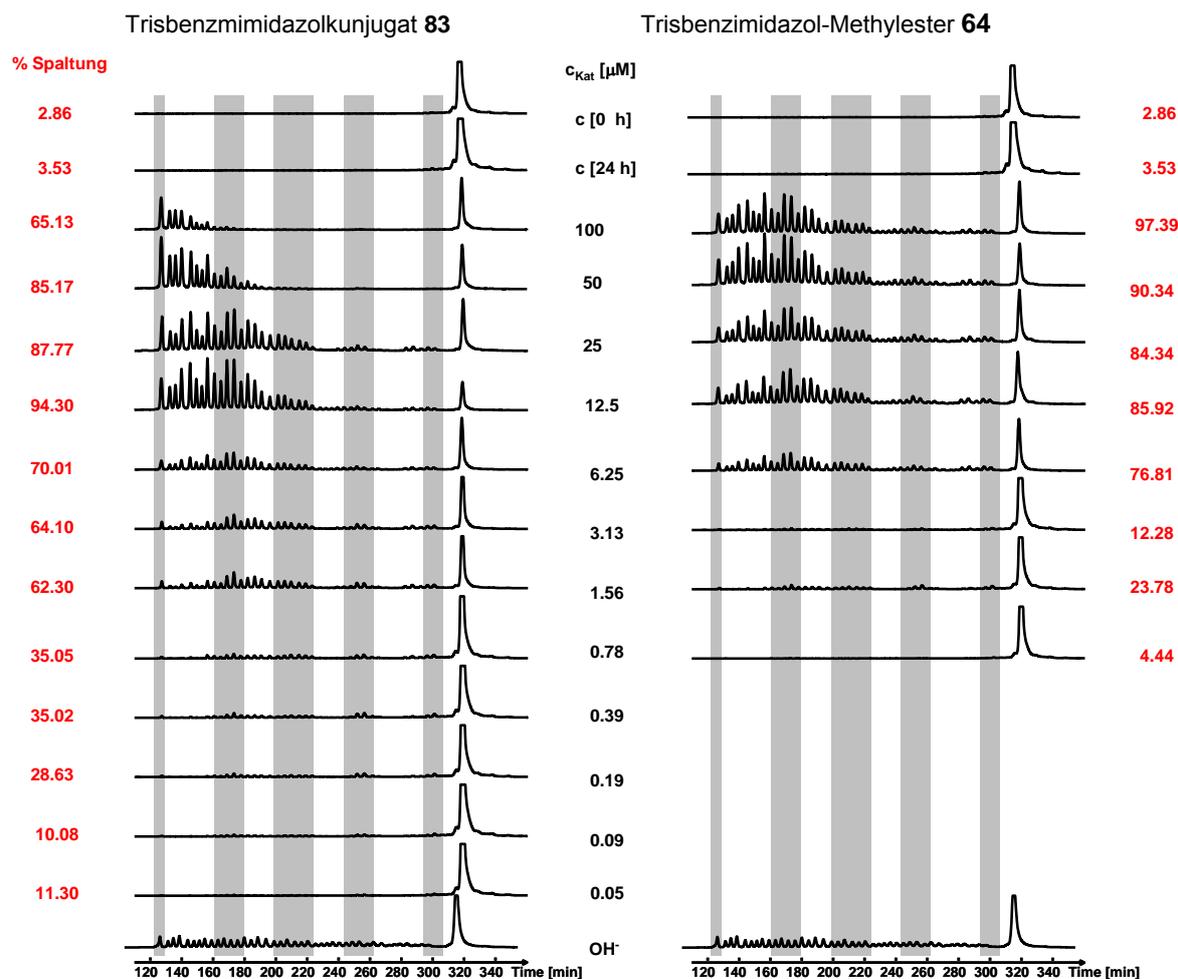


Abbildung 68: Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung von *ent*-Bcr-Abl-RNA **104** durch Trisbenzimidazolkonjugat **83** und unkonjugiertes Trisbenzimidazol **64** (150 nM **104**, TK Puffer ohne Triton, 50 mM Tris pH 7.5, 20 mM KCl, 37 °C, 24 h)

Abbildung 68 zeigt die Spaltung von *ent*-Bcr-Abl-RNA **104** bei sinkender Katalysatorkonzentration. Links sind die Lanes der Spaltung durch das Trisbenzimidazolkonjugat **83** zu sehen, rechts die des ungekuppelten Trisbenzimidazols **64**. Die Katalysatorkonzentration findet sich in der Mitte in schwarz, am Rand ist in rot die jeweilige prozentuale Spaltung des Substrats vermerkt. Die Sekundärstruktur der RNA ist in Abbildung 66 rechts zu sehen. Die der Hydrolyse frei zugänglichen Spaltstellen sind sowohl im Modell der RNA als auch auf den ALF-Lanes grau hinterlegt. Zunächst fällt kein großer Unterschied zwischen der Aktivität des Konjugats und des freien Katalysators auf. Bei 100 μM und 50 μM ist jedoch ein paradoxes Phänomen zu beobachten: Einerseits ergibt das Konjugat **83** einen höheren Anteil sehr kurzer Fragmente – ein Hinweis auf effiziente Mehrfachspaltung. Andererseits ist

der Gesamtanteil an Spaltprodukten kleiner als beim freien Katalysator **64**. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich ein Teil des Substrates durch Präzipitation mit dem hydrophoben Konjugat **83** der Reaktion entzieht. Ein ähnlicher Effekt wurde bei noch höherer Konzentration regelmäßig auch mit dem freien Katalysator **64** beobachtet. Beim Übergang zu niedrigen Konzentrationen treten weitere interessante Differenzen auf. Bei Katalysatorkonzentrationen unter $6 \mu\text{M}$ bricht die Aktivität des ungekuppelten Trisbenzimidazols stark ein. Wie die FCS-Experimente gezeigt hatten, liegt die kritische Konzentration für die Aggregation dieser Verbindung bei etwa $4 \mu\text{M}$. Das Konjugat hingegen hat eine signifikante Spaltaktivität bis herunter zu einer Konzentration von 190 nM (die Spaltung im Kontrollexperiment betrug nach 24 h 3.5%).

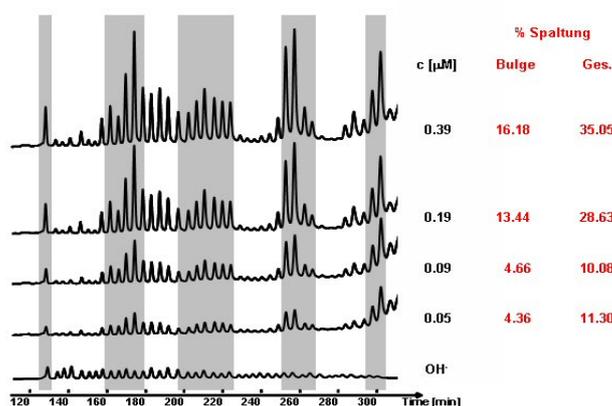


Abbildung 69: stark überhöhte Darstellung der untersten Lanes aus Abbildung 68 zur Verdeutlichung des Spaltmusters

Wie in Abbildung 69 zu sehen ist, wird bei Konzentrationen des Trisbenzimidazol-Konjugats **83** unter $1 \mu\text{M}$ die von Mfold berechnete Sekundärstruktur in beinahe idealer Weise abgebildet, während bei höheren Konzentrationen durch Sekundärspaltung nur kleinere Fragmente detektierbar waren. Die Gesamtsplaltung des Substrats beträgt bei einer Konzentration von 190 nM **83** noch immer annähernd 30% .

Es wäre allerdings möglich, dass durch die Hydrophobie des Liganden die Aggregationsschwelle des Konjugats **83** herabgesetzt wird, so dass die Spaltung bei niedrigen Konzentrationen von Aggregaten statt Einzelmolekülen herrühren könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Aggregation von **83** mittels der

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht (zur Methodik s. Kapitel 5.2.1. "Aggregationsstudien mit kupplungsfähigem Trisbenzimidazol"). Zwar zeigte das Experiment, dass die Aggregationsschwelle des Konjugats **83** gegenüber der freien Verbindung **64** von 4 – 6 μM zwar auf ca. 1 – 1.5 μM herabgesetzt worden war, doch zeigte das Konjugat noch weit unter dieser Schwelle eine beachtliche Aktivität (Abbildung 70).

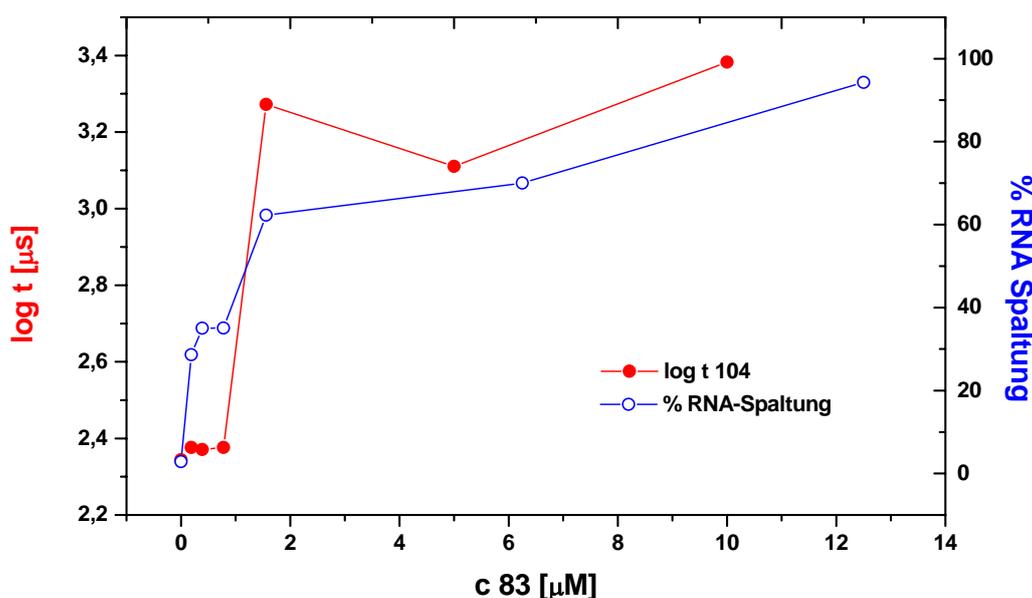


Abbildung 70: Zusammenhang zwischen Aggregation und Spaltaktivität des Bcr-Abl-Ligand-Konjugats **83**

Linke Ordinate: Diffusionszeit des Oligonucleotids **104** (25 nM **104** + 175 nM ungelabelte RNA **104a**)

Rechte Ordinate: Spaltung des *ent*-RNA-Substrats **104** (150 nM)

Um weitere Erkenntnisse zum Zusammenhang von Aggregation und Spaltaktivität zu erlangen, wurden noch Experimente mit Palmitoylkonjugaten durchgeführt (s. Kapitel 5.4. "Weitere Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von 2-Aminobenzimidazolen").

Schließlich wurde die Substratspezifität von **83** untersucht. Hierzu wurden *ent*-Bcr-Abl- **104** und *ent*-TAR-Substrat **100** mit dem Tripepid-*Tris*benzimidazolkonjugat **83** und zum Vergleich mit dem unkonjugierten *Tris*benzimidazol-Methylester **64** inkubiert (150nM RNA, TK-Puffer ohne Triton, 20 h, 37 °C). Hier zeigte sich ein leichter Trend zu einer gewissen Substratspezifität. So wurde das *ent*-Bcr-Abl-Substrat im Vergleich zum freien

Trisbenzimidazol effizienter gespalten, das *ent*-TAR-Substrat weniger effizient (s. Abbildung 71).

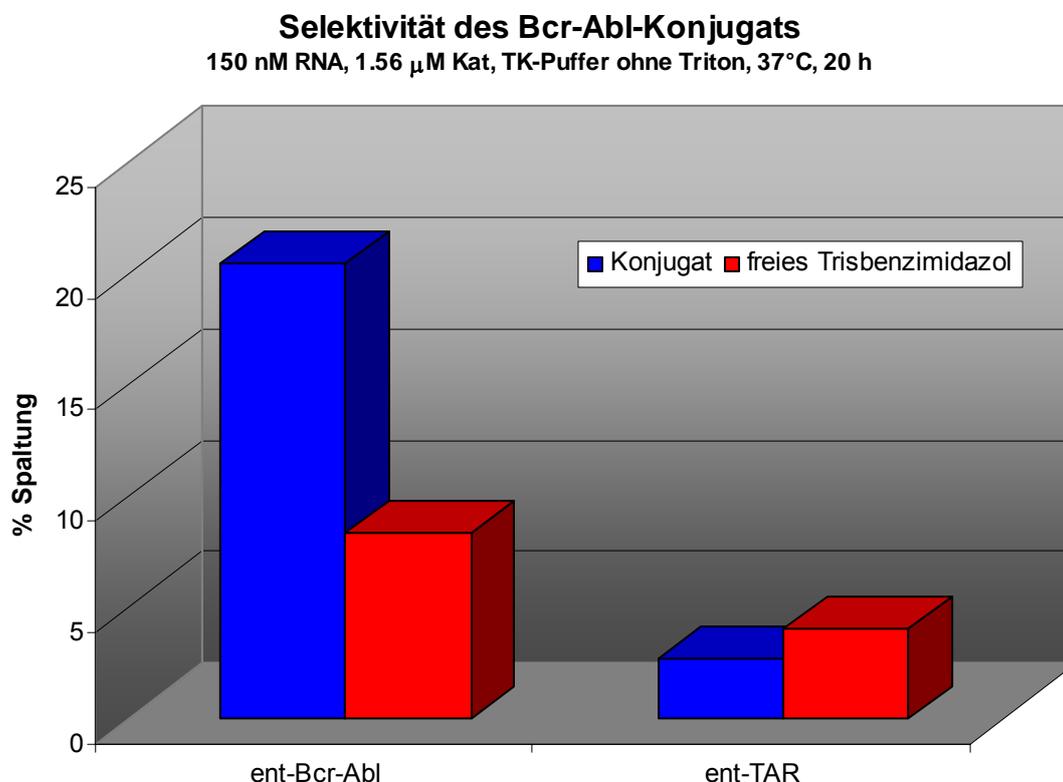


Abbildung 71: Trend zur Spezifität des Trisbenzimidazol-Bcr-Abl-Ligand-Konjugats 83

Allerdings überwiegen offensichtlich unspezifische Wechselwirkungen, da der Effekt nicht besonders ausgeprägt war und außerdem bei Bildung eines definierten Komplexes eine Region des Substrats bevorzugt oder idealerweise gar alleinig gespalten werden sollte.

Mit den Daten, die bei der Spaltung der *ent*-Bcr-Abl-RNA **104** durch das Trisbenzimidazol-Tripeptidkonjugat **83** gewonnen werden konnten, waren starke Indizien für die Tragfähigkeit des Konzepts der Konjugation von 2-Aminobenzimidazolen an RNA-Liganden erhalten worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Konjugation an verschiedene Peptidliganden möglich ist und dass sich die Konjugation eines Liganden auf die Spaltaktivität signifikant auswirkt.

Auf der anderen Seite scheinen weder Trisarginin noch das artifizielle Tripeptid hinreichend gute bzw. spezifische Liganden zu sein, um eine bevorzugte Bindungsstelle zu identifizieren. Bei allen Experimenten wurden die gesamten "freien" Sekundärstrukturelemente mit der

gleichen Intensität abgebildet. Zwar war gerade am Beispiel des Bcr-Abl-Ligandkonjugats **83** eine stark erhöhte Affinität gegenüber dem Substrat festzustellen und es konnte wenigstens ein Trend zur Spezifität aufgezeigt werden, doch handelte es sich anscheinend noch nicht überwiegend um echte Affinitätsspaltung. Hierzu ist neben einer starken Affinität zum Zielsubstrat außerdem die Bildung eines definierten Ligand-Substrat-Komplexes nötig. Bei Peptidliganden, die sehr spezifisch eine bestimmte Bindungsstelle besetzen, sollte sich diese jedoch mit Hilfe von ankonjugierten 2-Aminobenzimidazolen bestimmen lassen.

5.3.3 Bis- vs. Trisbenzimidazol: Katalytische Einheiten und Konstitution des Molekülgerüsts

In allen Experimenten mit 2-Aminobenzimidazolkonjugaten hatten sich die Trisbenzimidazole den Bisbenzimidazolen in ihrer katalytischen Aktivität deutlich überlegen gezeigt. Dies gilt sowohl für die unsubstituierten Moleküle^{36d}, als auch für die jeweiligen Konjugate. Dabei stellte sich die Frage, ob dies lediglich mit der Anzahl der Benzimidazoleinheiten im Molekül zusammenhing oder ob auch die Konstitution des die katalytischen Einheiten tragenden Molekülgerüsts eine Rolle spielte.

Man konnte spekulieren, dass die Rigidität der Xylolsstruktur die katalytische Aktivität verringerte oder dass der zentrale Stickstoff des Trengerüsts des Trisbenzimidazols mit seinem freien Elektronenpaar einen Beitrag zur Katalyse der RNA-Hydrolyse leistete.

Aus diesem Grund wurde das Trisargininkonjugat eines Moleküls synthetisiert, das zwei Benzimidazole trug, die aber von einem Trengerüst zusammengehalten wurden.

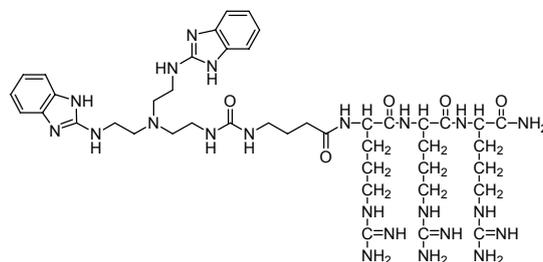


Abbildung 72: Bisbenzimidazol-Tren-Trisargininkonjugat **86**

Wenn also die Beschaffenheit dieses Gerüsts eine größere Rolle spielte als die Anzahl der Benzimidazole, müsste das Konjugat **86** eine dem Trisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **78** beinahe gleichwertige Spaltaktivität aufweisen, in jedem Fall jedoch eine höhere als die des Bisbenzimidazol-Trisargininkonjugats **77**.

Spaltexperimente an *ent*-TAR zeigten jedoch, dass das Bisbenzimidazol-Tren-Trisargininkonjugat **86** in seiner Spaltaktivität allenfalls dem Bisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **77** ebenbürtig ist (Abbildung 73).

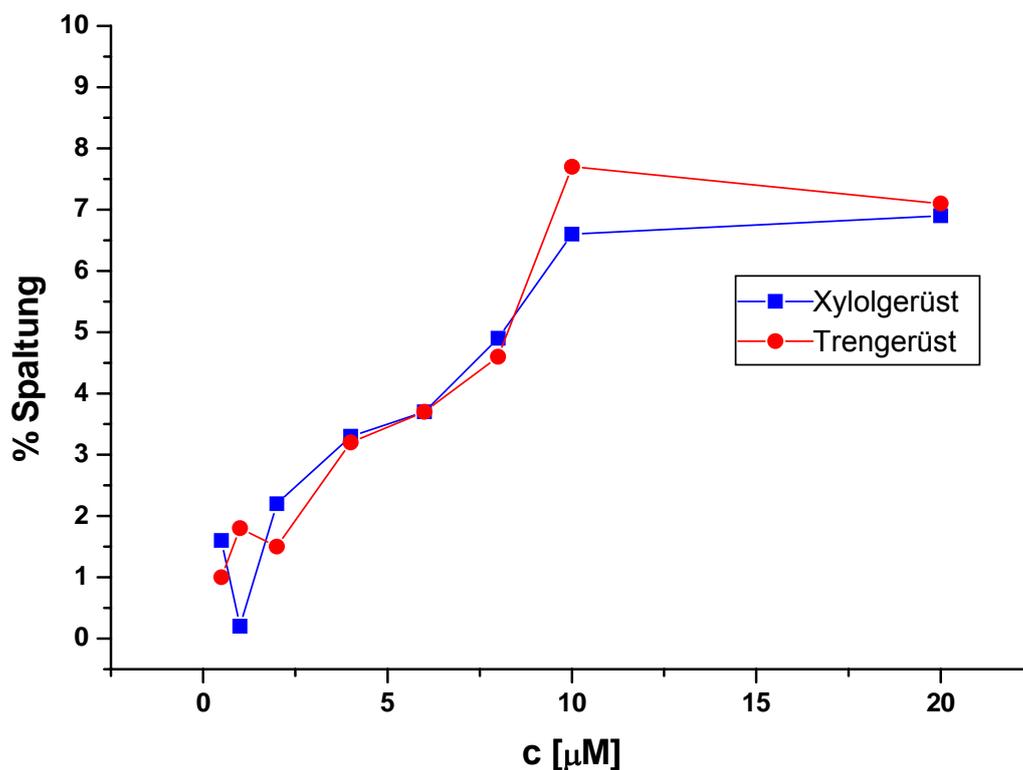
Vergleich der Spaltaktivität der Bisbenzimidazole an *ent*-TAR
150 nM *ent*-TAR, 50 nM TK Puffer ohne Triton X-100 pH 7.5, 20 h 37 °C

Abbildung 73: Spaltung von *ent*-TAR durch 77 (blau) und 86 (rot)

Die im Vergleich zum Xylolgerüst geringere Präorganisation der Benzimidazolgruppen beim Bisbenzimidazol-Tren und auch der zentrale Stickstoff des Tren spielen anscheinend keine Rolle für die Katalyse. Vielleicht ermöglicht die Anordnung der drei Benzimidazole am Trengerüst einen gleichzeitigen Beitrag zur Basenkatalyse an der 2'-OH Gruppe, der elektrophilen Katalyse am Phosphat sowie der Säurekatalyse an der abgehenden 5'-OH-Gruppe.

5.4 Weitere Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von 2-Aminobenzimidazolen

Nachdem das Aggregationsverhalten des kupplungsfähigen Trisbenzimidazols untersucht worden war, sollte im Folgenden der Zusammenhang zwischen RNA-Spaltung und Aggregation der 2-Aminobenzimidazolderivate genauer untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob die Aggregationsschwelle durch hydrophobe Liganden herabgesetzt wird und wie diese mit der Spaltaktivität korreliert. Hierzu waren das Bisbenzimidazol-Palmitoyl-Tren **97** und zum Vergleich das Palmitoyl-Tren **96** hergestellt worden. Beide Verbindungen wurden auf ihr Aggregationsverhalten und ihre Spaltaktivität hin getestet.

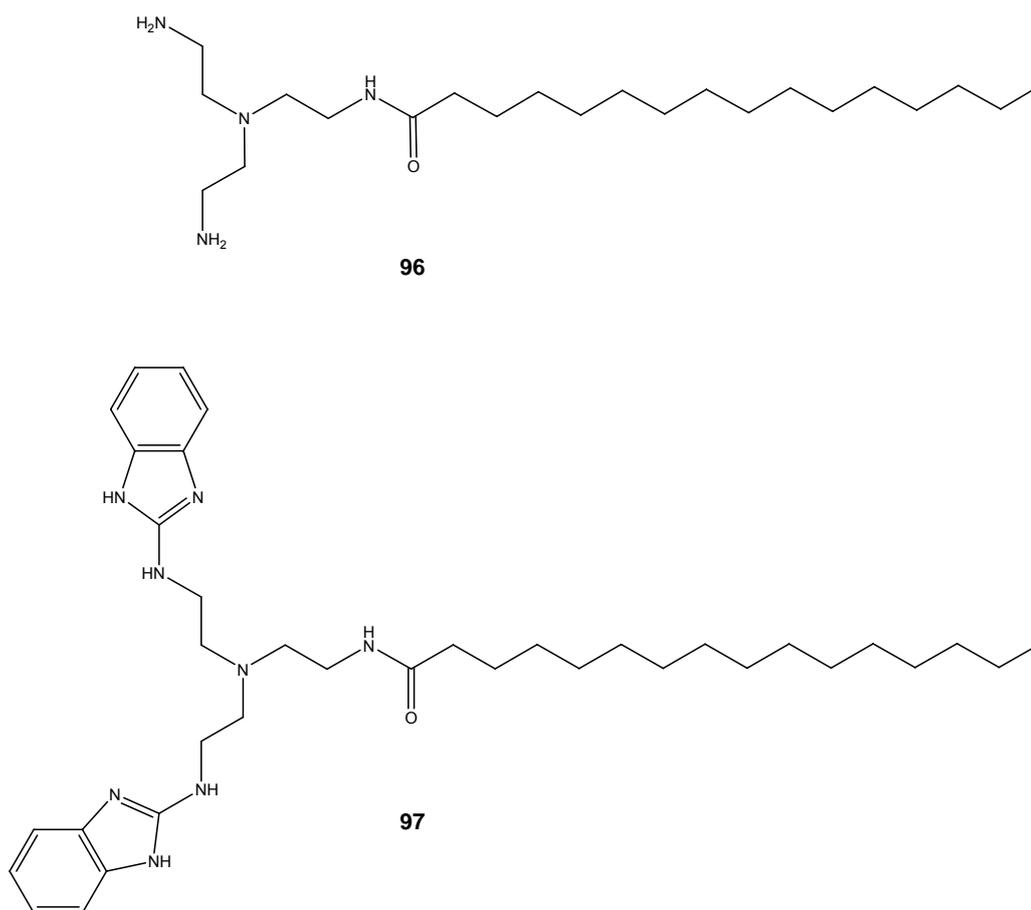


Abbildung 74: Palmitoyltren **96** und Bisbenzimidazol-Palmitoyltren **97**

Für die Aggregationsmessungen mittels FCS kamen die gleichen DNA-Hilfssequenzen zum Einsatz wie schon beim ungekuppelten Trisbenzimidazol. Da die Pufferbedingungen hier

etwas differierten, wurde das Trisbenzimidazol **64** zum Vergleich noch einmal mit vermessen. Es wurde wieder ein Gemisch aus der Cy5-gelabelten DNA **101** und der ungelabelten DNA **102** eingesetzt (25 nM : 175 nM) und die Diffusionszeit von **101** bei verschiedenen Konzentrationen von **96**, **97** und **64** bestimmt.

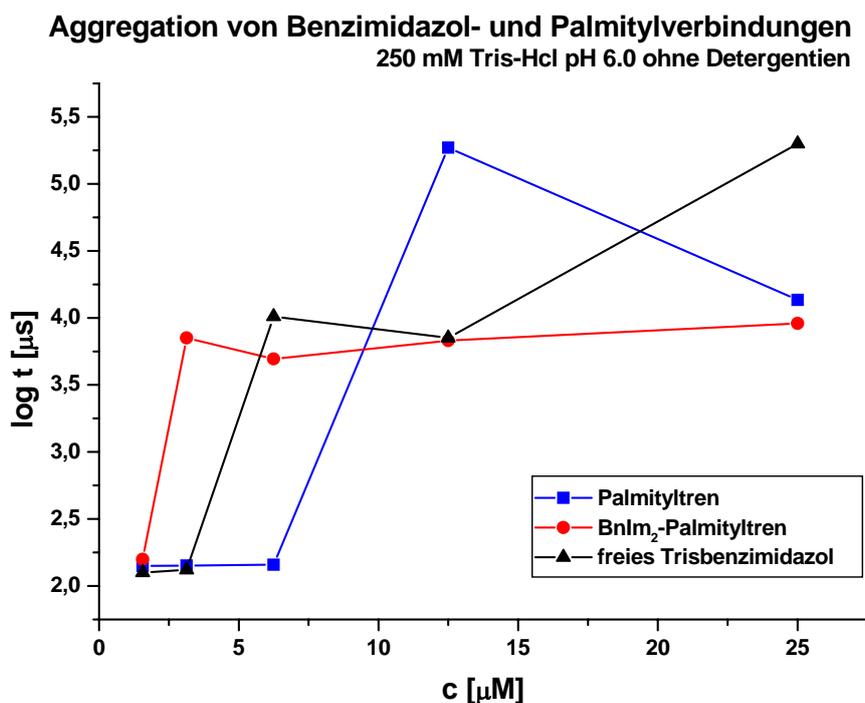


Abbildung 75: FCS-Messungen mit Palmitoyltren **96**, Bisbenzimidazol-Palmitoyltren **97** und Trisbenzimidazol **64**

Wider Erwarten stellte sich dabei heraus, dass die Aggregation durch den Palmitoylrest nur innerhalb einer Größenordnung beeinflusst wurde. Der kritische Konzentrationsbereich lag für das Bisbenzimidazol-Palmitoyltren zwischen 1.5 und 3 μM , für das Trisbenzimidazol zwischen 3 und 6 μM und für das Palmitoyl-Tren zwischen 6 und 10 μM (s. Abbildung 75). Dieser Befund zeigte, dass die hydrophoben Wechselwirkungen von 2-Aminobenzimidazolen in derselben Größenordnung liegen wie die des C_{16} -Kohlenwasserstoffrests im Palmitoyl-Tren. Die Palmitoylverbindungen wurden unter den gleichen Pufferbedingungen auf ihre Spaltaktivität hin getestet. Hierbei verwendete man als Substrat die *ent*-RNA **105** und *ent*-TAR-RNA **100**. Im Folgenden ist nur die Spaltung des *ent*- Substrats **105** dargestellt. *ent*-TAR wurde unter diesen Bedingungen von Palmitoyl-Tren gar nicht und von

Bisbenzimidazol-Palmitoyl-Tren in Konzentrationen von 25 und 12.5 μM nur zu etwa 8 % gespalten.

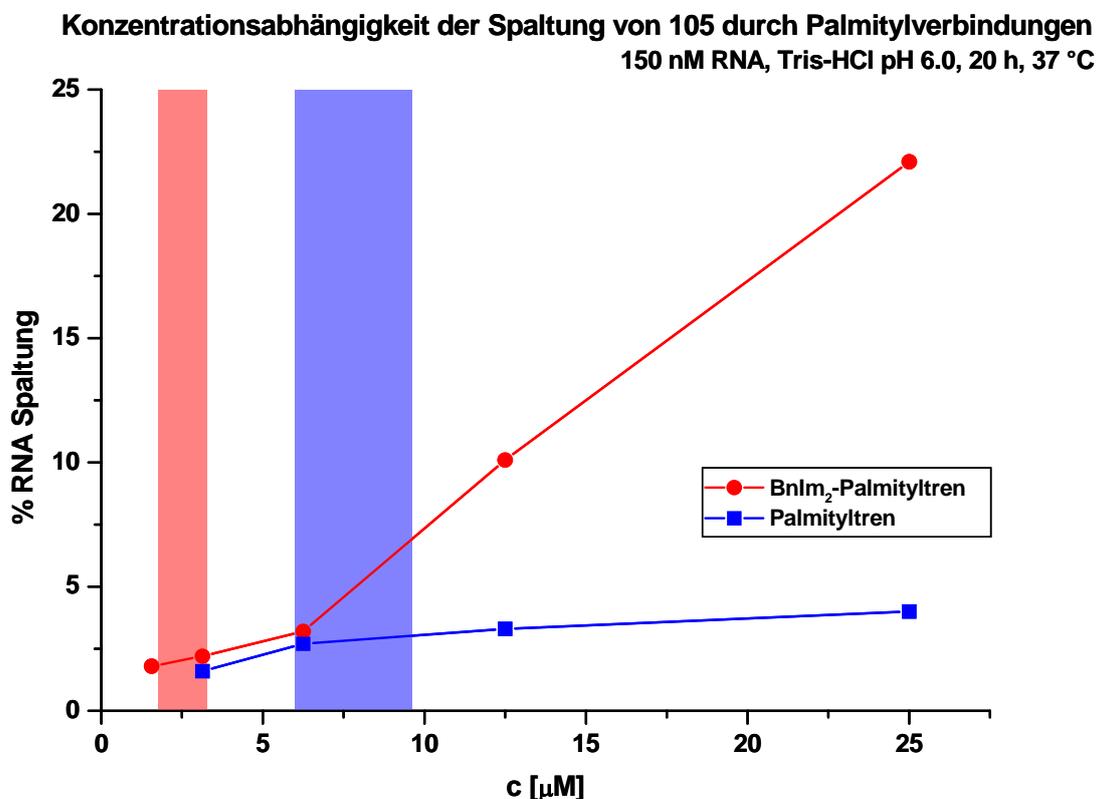


Abbildung 76: Spaltung des *ent*-Substrats 105 durch Bisbenzimidazol-Palmitoyl-Tren 97 (rot) und Palmitoyl-Tren 96 (blau). Die in rot und blau hinterlegten Konzentrationsbereiche entsprechen den in Abbildung 75 ermittelten kritischen Konzentrationsbereichen der Aggregation

Wie in Abbildung 76 zu erkennen ist, fällt die Spaltung durch 97 schon lange vor der Aggregationsgrenze stark ab, während 96 von vorne herein eine sehr niedrige Aktivität aufweist. Schließlich trägt es keine 2-Aminobenzimidazole, wohl aber zwei Aminogruppen, die den katalytischen Einheiten der künstlichen Nucleasen der Komiyama-Gruppe ähneln. Damit ist immerhin gezeigt, dass die – wenn auch geringe – Spaltaktivität dieser Amine nicht auf durch RNase-Kontamination hervorgerufenen Artefakten beruht. Im Vergleich mit den Aggregationsmessungen mit dem Tripeptidkonjugat 83 (s. Kapitel 5.3.2 "Experimente mit Bcr-Abl-Ligand-Konjugaten") wurde außerdem der Befund bestätigt, dass hydrophobe Liganden die Aggregationsschwelle nicht sehr weit herabsetzen.

5.5 Sequenz- und ortsspezifische RNA-Spaltung durch 2-Aminobenzimidazol-Nucleinsäurekonjugate

Durch die FCS-Experimente mit kupplungsfähigem Trisbenzimidazol und die Spaltung von sekundärstrukturhaltiger RNA durch Peptidkonjugate lagen zwar starke Indizien vor, dass 2-Aminobenzimidazol-derivate in der Lage sind, als Einzelmoleküle und nicht nur im aggregierten Zustand RNA zu spalten. Ein Beweis dafür sowie für die Fähigkeit von Benzimidazolkonjugaten zu echter Affinitätsspaltung stand allerdings noch aus. Durch die Konjugation von Benzimidazolen an Antisense-DNA sollten diese Fragen nun abschließend beantwortet werden⁶⁸. Im Gegensatz zu den vorher verwendeten Tripeptiden besteht dank der Watson-Crick-Basenpaarung bei komplementären Oligonucleotiden kein Zweifel, dass sie in der Lage sind, definierte Komplexe zu bilden.

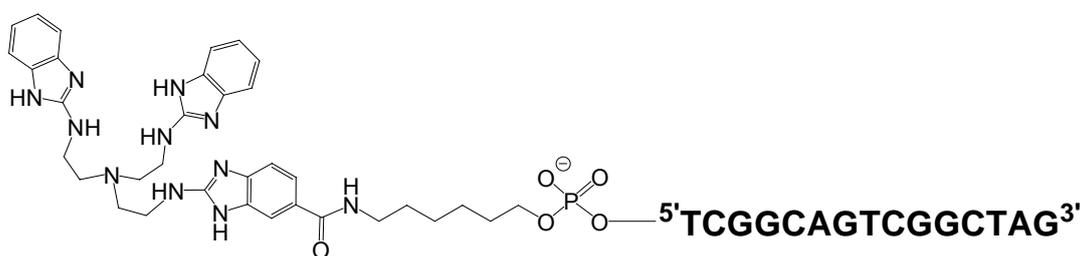
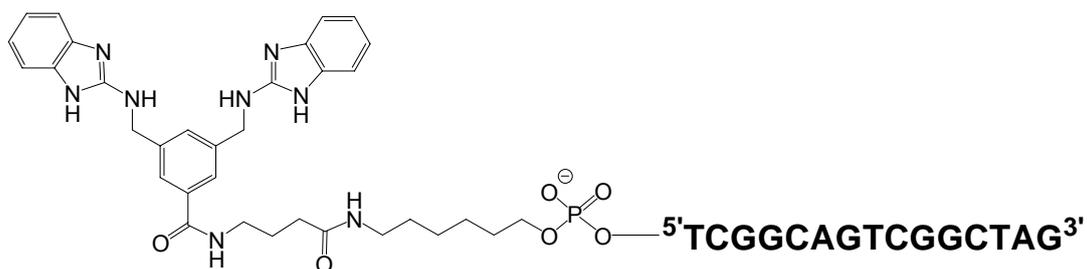


Abbildung 77 Die Nucleinsäurekonjugate des Bis- und Trisbenzimidazols

Für die Spaltexperimente waren die Nucleinsäurekonjugate **89** und **90** hergestellt worden. Ihre Antisense-DNA-Sequenz besteht aus einem 15mer, das komplementär zum bereits in vorangegangenen Experimenten benutzten RNA-Substrat **99** nach Häner und Moser ist. Als weitere Substrate kamen die Chimäre **105** und die RNA-Sequenz **106** nach Komiyama zum

Einsatz. Die Chimäre **105** enthielt einen Teil DNA zur Bindung des Antisense-Strangs und einen Teil *enantio*-RNA zur Hydrolyse. Es sei angemerkt, dass die Sequenzen von **99** und **105** identisch sind. Damit sollte auch bei den Experimenten mit Nucleinsäurekonjugaten die Bildung von Artefakten durch RNase-Kontaminationen verhindert werden. Die RNA-Sequenz **106** schließlich sollte zur Klärung der Substratspezifität beitragen. Sie enthält keine zum Antisense-Teil von **89** und **90** komplementären Elemente.

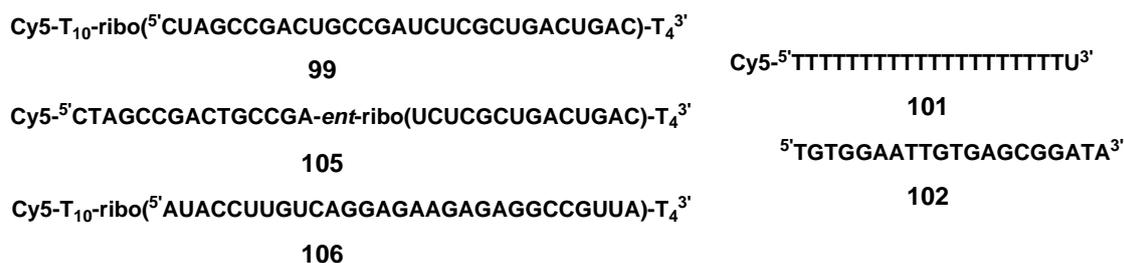


Abbildung 78: RNA-Substrat **99** und *ent*-RNA-Substrat **105** nach Häner und Moser sowie das nichtkomplementäre Substrat **106** nach Komiyama und DNA-Hilfssequenzen für Aggregationsstudien mit Hilfe von FCS

Vor Beginn der Spaltexperimente wurden auch hier Aggregationsstudien mit Hilfe der FCS durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die Spaltung der RNA durch Einzelmoleküle erfolgte. Dazu wurde wie schon bei den vorangegangenen FCS-Untersuchungen ein Gemisch aus der Cy5-gelabelten DNA **101** und der ungelabelten DNA **102** eingesetzt (25 nM : 175 nM) und anhand der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersucht. Durch Zugabe der Oligonucleotidkonjugate **89** und **90** (1.5 µM) war keine Änderung der Diffusionszeit von **101** zu beobachten. Daraufhin wurde die Diffusionszeit des Substrats **99** (200 nM) ohne und mit komplementärem Trisbenzimidazolkonjugat **90** (1.5 µM) gemessen, was ebenfalls keine signifikante Änderung ergab. Die Massezunahme der DNA **99** durch Hybridisierung mit dem Konjugat war also erwartungsgemäß nicht durch FCS messbar. Anhand dieser Experimente wurde die Bildung höherer Aggregate jenseits denen der Hybridisierung als ausgeschlossen angesehen.

Das erste Spaltexperiment bestand darin, das RNA-Substrat **99** mit den Oligonucleotidkonjugaten **89** und **90** zu inkubieren (150 nM RNA, 1.5 µM Nuclease, Tris-HCl pH 8.0, 37 °C, 20 h). Dabei stellte sich heraus, dass wie schon im Fall der Peptidkonjugate

für Bcr-Abl-*m*-RNA das Bisbenzimidazolkonjugat **89** keine signifikante Spaltung des Substrats induzieren konnte. Das Trisbenzimidazolkonjugat **90** hingegen wies drei Hauptspaltstellen an den Positionen 13, 14 und 15 auf, die in der Summe einer Spaltung des Substrats von über 50 % entsprachen. Um die Substratspezifität zu testen, wurde unter den gleichen Bedingungen die RNA-Sequenz **106** inkubiert. Hierbei war keine nennenswerte Spaltung zu beobachten (Abbildung 79).

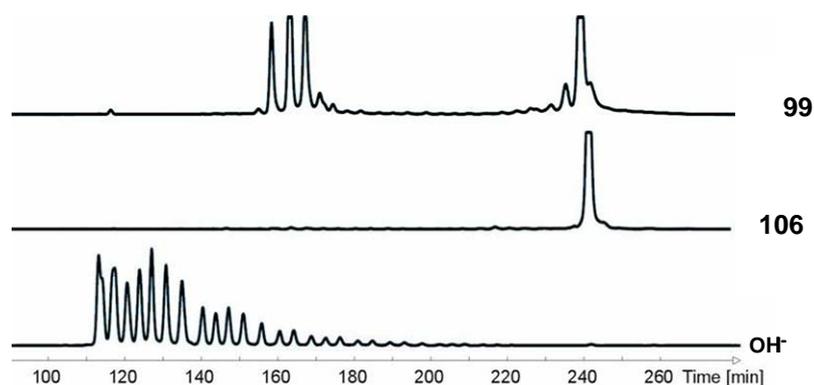


Abbildung 79: Substrat- und Ortsspezifische RNA-Spaltung durch Trisbenzimidazol-Oligonucleotidkonjugat **90** (150 nM RNA, 1.5 μ M Nuclease, Tris-HCl pH 8.0, 37 °C, 20 h)

Die Spaltstellen am RNA-Substrat **99** korrelieren mit der Position des Trisbenzimidazols am 15mer. Interessant an dem Spaltmuster ist, dass die Spaltstellen innerhalb des Duplex liegen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist Fraying durch das schwache A-T-Basenpaar an Position 15.

Ein Experiment mit einem 10fachen Überschuss des Substrats (1.5 μ M Substrat **99** 150 nM Nuclease **90**) zeigte keinen signifikanten Turnover. Diese Beobachtung deckt sich mit denen an anderen künstlichen Antisense-Nucleasen, die die katalytische Einheit am 3'- oder 5'-Ende der DNA tragen und keinen Bulge im Substrat induzieren.

Die Zugabe von 1 mM EDTA zum Spaltpuffer hatte weder auf die im Folgenden durchgeführten Kinetiken noch auf das Spaltmuster Auswirkungen, so dass eventuelle Kontaminationseffekte durch an die Benzimidazoleinheiten komplexierte Metallionen ausgeschlossen wurden.

Als nächstes wurde die pH-Abhängigkeit der RNA-Spaltung durch **90** untersucht. Da ionische Wechselwirkungen wahrscheinlich eine große Rolle bei der Interaktion von

Benzimidazol und Phosphat spielen, war die erste Versuchsreihe in Tris-HCl-Puffer (50 mM) ohne Zugabe von Salzen erfolgt. Unter diesen Bedingungen ist allerdings die Ionenstärke bei der Änderung des pH-Werts nicht konstant. Daher wurde das Experiment in Anwesenheit von 100 mM NaCl wiederholt. Hierbei zeichnete sich ein Optimum bei pH 8 ab, wie in Tabelle 2 zu sehen ist.

pH	% RNA-Spaltung		
	Kontrolle	reiner Puffer	100 mM NaCl
6.0	< 1	20.8	8.7
7.0	< 1	43.4	35.6
8.0	< 1	55.3	51
9.0	< 5	-	46.7

Tabelle 2: pH-Abhängigkeit der Spaltung des Substrats 99 durch Trisbenzimidazol-Nucleotidkonjugat 90

150 nM RNA, 1.5 μ M Substrat, 50 mM Tris-HCl, 37 °C, 20 h; Hintergrund bei 0 h subtrahiert

Da der pK_a derartiger 2-Aminobenzimidazolderivate knapp unter 7 liegt, sollte der Katalysator unter diesen Bedingungen überwiegend deprotoniert vorliegen. Dies wurde zunächst als Hinweis darauf gewertet, dass die generelle Basenkatalyse eine große mechanistische Rolle spielt.

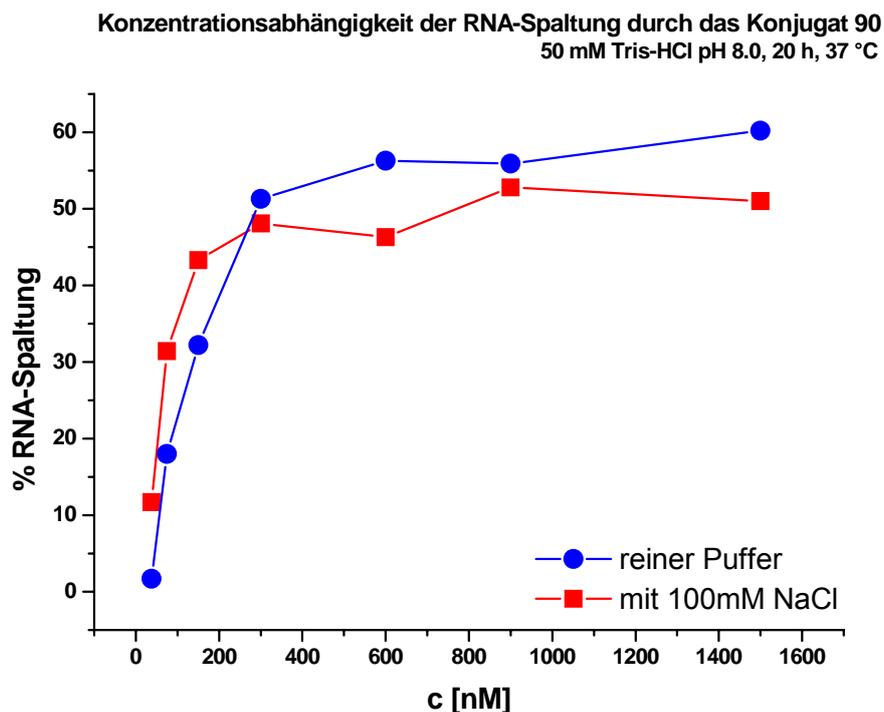


Abbildung 80: Spaltung des Substrats 99 durch das Trisbenzimidazol-Konjugat 90 ohne (blau) und mit (rot) konstanter Ionenstärke.

Wie Abbildung 80 zeigt, folgt die RNA-Spaltung durch **90** einer Sättigungskinetik, wobei die volle Aktivität bei Katalysatorkonzentrationen zwischen 200 und 300 nM erreicht wird. Dieser Befund zeigt, gemeinsam mit der Sequenz- und Ortsspezifität, dass die Spaltung eindeutig durch Hybridisierung von Katalysator und Substrat vermittelt wird. Eine höhere Ionenstärke resultiert in einer Stabilisierung des Duplex, so dass bei Zugabe von 100 mM NaCl die Sättigung etwas eher erreicht wird als ohne Salz. Die Katalysatorkonzentration von 1.5 μ M, der die pH-Abhängigkeitsmessung zugrunde lag, liegt also um eine Größenordnung über der Sättigungskonzentration sowohl im reinen Puffer, als auch mit NaCl. Daher kann man davon ausgehen, dass die in Tabelle 2 gezeigten Ergebnisse nicht durch pH-abhängige Stabilitätsänderungen der Duplexe beeinflusst werden sollten.

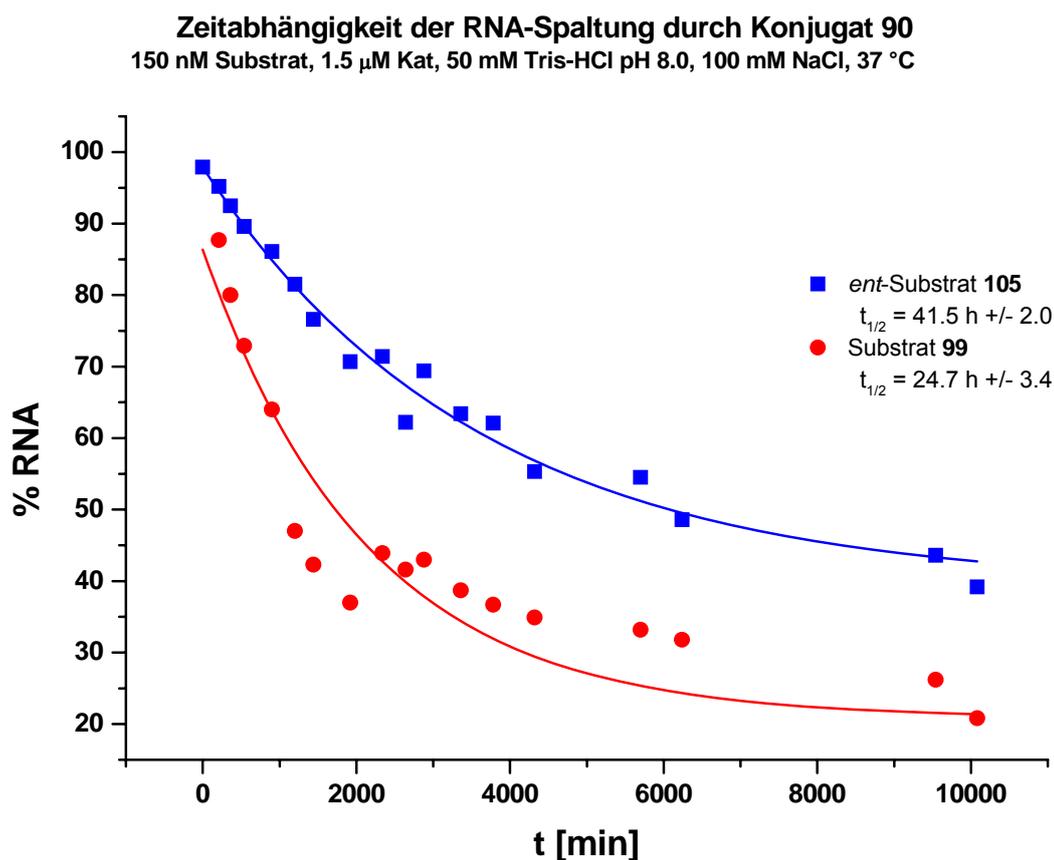


Abbildung 81: Kinetiken der Spaltung des RNA-Substrats 99 (rot) und des *ent*-RNA-Substrats 105 (blau) durch das Trisbenzimidazol-Nucleotidkonjugat 90

Durch die Substratspezifität des Konjugats 90 waren Kontaminationsartefakte bereits weitestgehend auszuschließen. Trotzdem wurde in einer folgenden Versuchsreihe, in der die zeitabhängige Spaltung des RNA-Substrats 99 untersucht werden sollte, auch das *enantiomere*-Substrat 105 mit getestet.

Während beim RNA-Substrat 99 das Spaltmuster drei Spaltstellen innerhalb des Duplex aufgewiesen hatte, war beim *ent*-Substrat 105 nur eine Spaltstelle an Position 16 zu beobachten. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, ist doch diese Position die, an der in der Chimäre aus DNA und *ent*-RNA der spaltbare RNA-Teil beginnt.

Abbildung 81 zeigt die Spaltkinetik der Substrate 99 und 105 in Anwesenheit des Trisbenzimidazolkonjugats 90. Kontrollexperimente mit beiden Substraten ohne Zugabe der künstlichen Nuclease ergaben keine auswertbare Spaltung. Die den Messwerten unterlegten Kurven stellen die Funktionen einer angenommenen Zerfallskinetik erster Ordnung dar. Aus ihnen wurde für 99 eine Halbwertszeit von 24.7 h, für 105 eine von 41.5 h errechnet. Die

Zerfallskonstanten der Kinetik erster Ordnung betragen $k_1 = 0.0028 \text{ h}^{-1}$ für **99** und $k_1 = 0.0017 \text{ h}^{-1}$ für **105**.

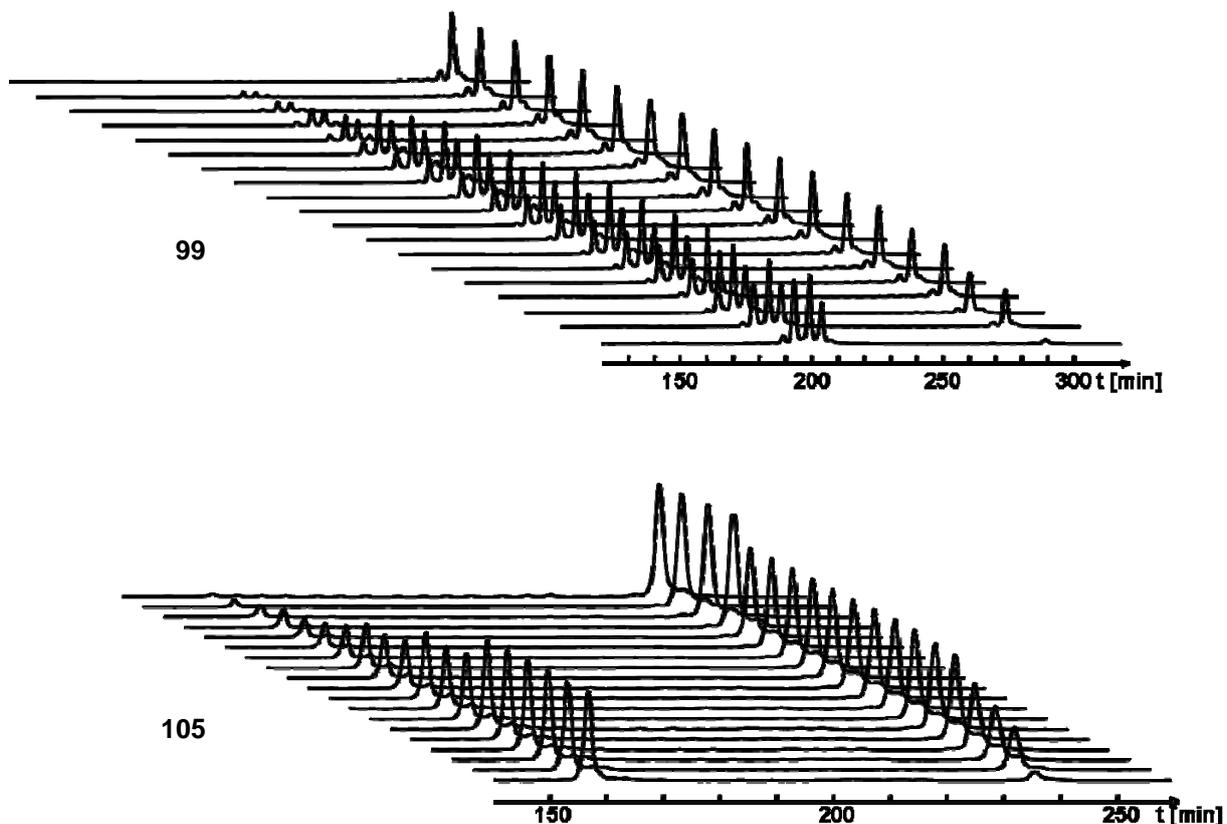


Abbildung 82: Darstellung der ALF-Spuren der Kinetiken aus Abbildung 81. Die Spuren sind der besseren Übersichtlichkeit wegen im gleichen Abstand zueinander angeordnet.

In Abbildung 82 kann man erkennen, wie der Peak des Substrats abnimmt und die der Spaltprodukte zunehmen. Die jeweils untere Spur entspricht Messungen nach ca. einer Woche, die in der Kinetik in Abbildung 81 nicht mit eingegangen waren. Auf beiden Spuren sieht man, dass das Substrat nicht vollständig abgebaut wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in Verunreinigungen der synthetischen RNA-Substrate liegen, die die Wechselwirkung mit der künstlichen Nuclease beeinflussen, wie etwa 2'-5'-Verknüpfungen oder nicht vollständig entfernte Schutzgruppen.

Das 2-Aminobenzimidazol-Oligonucleotidkonjugat **90** hatte eine effiziente sequenz- und ortsspezifische Spaltung der Ziel-RNA bewirkt und wies eine Sättigungskinetik auf, die eine Sättigung weit unter der kritischen Aggregationsgrenze der freien Trisbenzimidazolverbindung zeigte. Damit war der endgültige Beweis erbracht, dass 2-

Aminobenzimidazole mit Liganden, die definierte Komplexe mit RNA bilden, Affinitätsspaltung als einzelne Moleküle bewirken. Das Konzept war somit tragfähig.

5.6 Der Zusammenhang zwischen pK_a und Aktivität von RNA-Spaltenden Molekülen

Die Grundlage für die Auswahl von 2-Aminobenzimidazol als katalytische Gruppe für die RNA-Hydrolyse war die Verschiebung des pK_a -Werts in den physiologischen Bereich. Damit sollte die katalytisch aktive Gruppe idealerweise zur Hälfte deprotoniert vorliegen und die RNA-Hydrolyse durch eine Kombination aus genereller Säure- und genereller Basenkatalyse sowie elektrostatischer Stabilisierung des pentakoordinierten Übergangszustands leisten. Wie Experimente mit Acylguanidinen⁶⁹ und 2-Aminopyridinen^{33, 36d} gezeigt hatten, ist der pK_a im wässrigen Medium jedoch offensichtlich nicht das alleinige Kriterium für einen guten Katalysator. Diese Verbindungen wiesen zwar pK_a -Werte auf, die im erwünschten Bereich lagen (Acylguanidine ~ 6.9 , Aminopyridine ~ 6.5), erreichten aber bei weitem nicht die Aktivität der 2-Aminobenzimidazole.

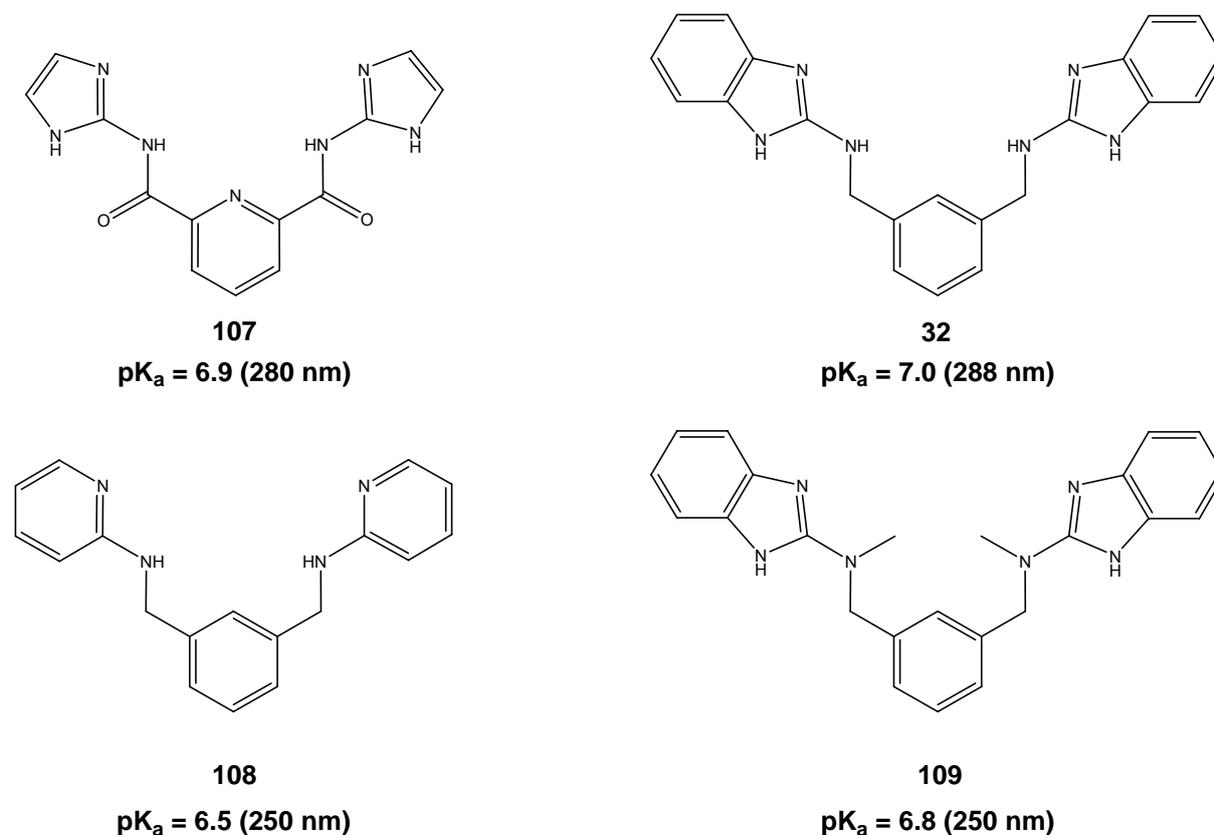


Abbildung 83: pK_a -Werte des Bisacylguanidins 107, des Bisaminopyridins 108, des Bisbenzimidazols 32 sowie des N-methylierten Bisbenzimidazols 109 (photometrisch bestimmt in 20 mM Phosphat titriert mit NaOH, Wellenlängen sind jeweils angegeben)

Wie bereits im Kapitel 5.2 "Unspezifische RNA-Hydrolyse durch 2-Aminobenzimidazole" erwähnt, war es nicht möglich gewesen, den pK_a -Wert der Trisbenzimidazole **33** und **64** photometrisch zu bestimmen. Sie waren bei $pH > 8$ präzipitiert und hatten schon bei niedrigeren pH -Werten Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz gezeigt. Auch das Trisbenzimidazol-Oligonucleotidkonjugat des Trisbenzimidazols **46** erlaubte keine photometrische pK_a -Bestimmung aufgrund der UV-Absorption seines Antisense-DNA-Rests. Die 2-Aminobenzimidazol-Trisargininkonjugate **77** und **78** hingegen wiesen einen nicht absorbierenden Peptidrest auf, so dass in diesem Falle ihr pK_a gemessen werden konnte.

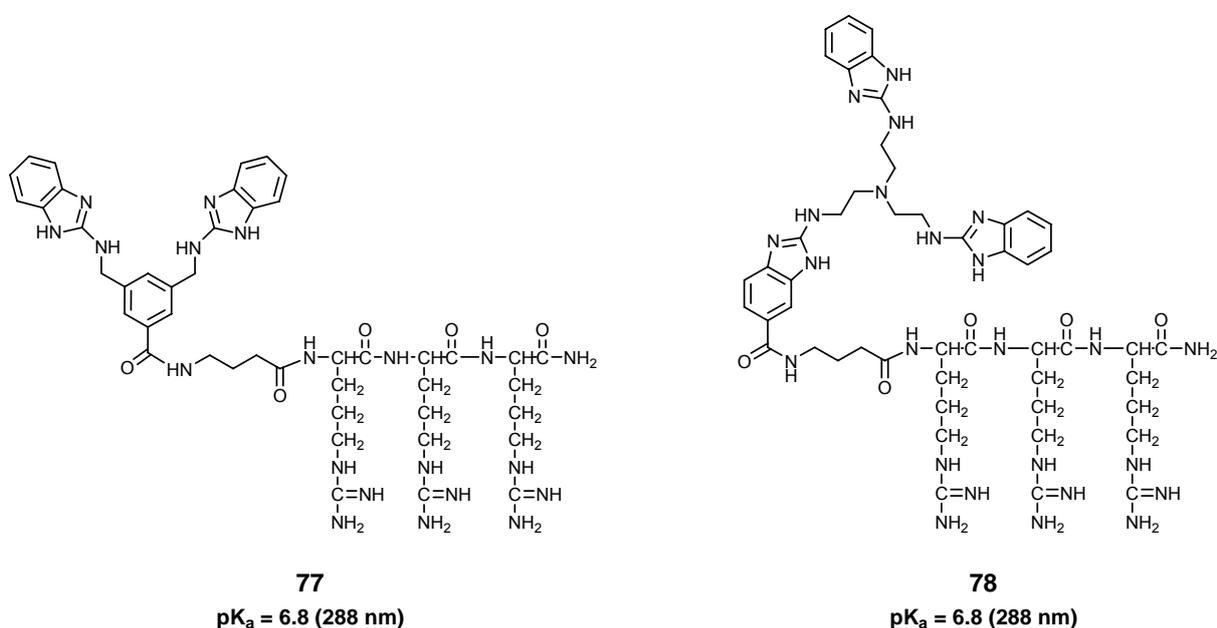


Abbildung 84: pK_a -Werte des Bisbenzimidazol-Trisarginins **77** und des Trisbenzimidazol-Trisarginins **78** (photometrisch bestimmt in 20 mM Phosphat titriert mit NaOH, Wellenlängen sind jeweils angegeben)

Wie in Abbildung 84 gezeigt, sind die pK_a -Werte der Bis- und Trisbenzimidazolverbindung identisch. Außerdem weicht der pK_a des Bisbenzimidazolkonjugats nur unwesentlich von dem des freien Bisbenzimidazols **32** ab, so dass der pK_a des Trisbenzimidazolkonjugats **78** dem des freien Trisbenzimidazols **33**, das sich der direkten Bestimmung entzogen hatte, ebenfalls annähernd gleichen sollte. Damit hatten alle mit 2-Aminobenzimidazolen durchgeführten Messungen einen pK_a von etwa 7 bestätigt.

Durch die Untersuchung der pH -Abhängigkeit der RNA-Spaltung des Trisbenzimidazol-Oligonucleotidkonjugats war jedoch gezeigt worden, dass das Maximum der Spaltaktivität dieser Verbindung bei pH 8 lag. Wenn es also nur um den Protonierungsgrad der freien 2-

Aminobenzimidazolverbindungen im Spaltpuffer ginge, müsste der generellen Basenkatalyse der überwiegende Anteil am Katalysepotential der 2-Aminobenzimidazole zugesprochen werden.

Unter diesem Aspekt kam die Vermutung auf, dass die 2-Aminobenzimidazole durch Interaktion mit dem anionischen Rückgrat einen pK_a -Shift erfahren könnten, der das Protonierungsgleichgewicht derart verschiebt, dass wieder ein Beitrag zu allen drei oben genannten Katalysearten geleistet werden könnte.

Zur photometrischen Bestimmung der pK_a -Werte wurden zunächst UV-Spektren im Sauren und im Basischen aufgenommen, um eine Wellenlänge zu finden, bei der sich die Extinktionen der protonierten und deprotonierten Spezies sehr stark unterschieden. Bei dieser Wellenlänge wurden dann die Verbindungen in Phosphatpuffer vermessen und mit NaOH titriert, wobei nach jeder Zugabe von NaOH die Extinktion und der zugehörige pH-Wert ermittelt wurden. Bei Auftragung der Extinktion gegen den pH-Wert konnte ein sigmoidaler Fit durch die Werte gelegt werden, dessen Wendepunkt dem gemittelten pK_a der Verbindung entsprach. Da die Verbindungen jedoch jeweils identische katalytisch aktive Gruppen tragen, sollte diese Näherung jedoch recht gut das Verhalten einer isolierten Gruppe von Acylguanidin, 2-Aminopyridin oder 2-Aminobenzimidazol widerspiegeln.

Um diese Methode zur Messung eines pK_a -Shifts der 2-Aminobenzimidazole durch Ionenpaarwechselwirkung heranziehen zu können, musste sie jedoch modifiziert werden. Zunächst war es nicht möglich, den Shift an RNA selbst zu testen, da RNA im Messbereich stark absorbiert. Außerdem sollte das verwendete Testion nicht selbst puffern, womit auch Phosphat ausgeschlossen war. So fiel die Wahl auf Sulfat als Modell für das Phosphatrückgrat. Als Puffersystem wurde Acetat gewählt, zum Titrieren verwendete man Tris-Puffer. Die gravierendste Änderung des Messsystems jedoch war die Abkehr vom rein wässrigen Medium. Wie sich gezeigt hatte, war schon die Bestimmung des pK_a des Trisbenzimidazols an dessen Präzipitation bei pH-Werten über 8 gescheitert. Die Messung des Bisbenzimidazols stieß ebenfalls an dessen Löslichkeitsgrenze, so dass eine Messung in Gegenwart von Sulfat keinen Erfolg versprach. Daher wurde zur Messung ein Gemisch

von Wasser und Methanol zu gleichen Teilen verwendet. Es sei ausdrücklich darauf verwiesen, dass es sich dabei nicht um Standardbedingungen handelt. Die hier ermittelten Werte können nicht mit publizierten pK_a -Werten für rein wässrige Lösungen verglichen werden, sondern nur untereinander. Durch Ionenpaarbildung mit Sulfat sollten die beobachteten pK_a -Werte ($H_2O / MeOH$) ins Basische verschoben werden.

Hierzu wurden das Bisbenzimidazol **32** und das Trisbenzimidazol **64** untersucht. Zum Vergleich zog man das N-methylierte Bisbenzimidazol **109** heran. Dieses Molekül zeigte im Gegensatz zu seinem unmethylierten Widerpart keine katalytische Aktivität⁷⁰ und sollte aufgrund der Methylierung und der daraus resultierenden Störung der Ionenpaarbildung auch keinen pK_a -Shift aufweisen.

Abbildung 85 zeigt die Auftragung der Extinktion gegen den pH der genannten Verbindungen. Die Messungen wurden bei einer Ionenstärke von 0.2 in NaCl und Na_2SO_4 durchgeführt. Die in Abbildung 85 angegebenen Ionenstärken beziehen sich auf das jeweils zugegebene Salz. Die Ionenstärke des Puffers wurde nicht mit berücksichtigt. Die Ionenstärke wurde nach folgender Formel berechnet:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

mit c = Konzentration und z = Ladung des jeweiligen Ions

Eine Ionenstärke von 0.2 in NaCl entspricht somit 200 mM, in Sulfat 66.6 mM.

Zunächst fällt auf, dass sich durch die Abkehr vom reinen Standard-Medium Wasser der pK_a nicht signifikant geändert hat (von 7.0 auf 6.8 für das Bisbenzimidazol **32** und von 6.8 auf 6.5 für das N-Methyl-Bisbenzimidazol **109**). Außerdem ist ein recht großer Shift des pK_a der unsubstituierten 2-Aminobenzimidazolverbindungen bei Anwesenheit von Sulfationen in der Pufferlösung zu verzeichnen (+ 0.5 beim Bis- und + 0.7 beim Trisbenzimidazol), wohingegen beim N-Methylbenzimidazol kein Shift zu beobachten ist. Chlorid hat keinen signifikanten Einfluss auf das System.

Trotz aller oben genannten Einschränkungen und Prämissen, die bei diesem Experiment gemacht wurden, ist der pK_a -Shift durch Ionenpaarbildung offenbar ein realer Effekt, der auf

ähnliche Weise auch bei der Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat eines Oligo(ribo)nucleotids zum Tragen kommen könnte.

Neben dem passenden pK_a muss eine für die RNA-Hydrolyse katalytisch aktive Gruppe außerdem eine Struktur aufweisen, die als Anionenrezeptor für Phosphat dienen kann. Dies zeigt der Vergleich zwischen Bisbenzimidazol **32** und dem N-methylierten Bisbenzimidazol **109**. Obwohl sie beinahe identische pK_a -Werte aufweisen, ist nur das unsubstituierte Bisbenzimidazol katalytisch aktiv, da das methylierte Derivat keinen exocyclischen N-Wasserstoff zur Ausbildung einer zweiten Wasserstoffbrücke besitzt. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass 2-Aminopyridine sich nicht als RNA-Spalter eignen, da sie zwar aufgrund ihres pK_a für die generelle Säure/Base-Katalyse geeignet sind, offenbar jedoch keine guten Anionenrezeptoren für Phosphat darstellen. Ihre Struktur weist im Gegensatz zu den Guanidinderivaten und 2-Aminobenzimidazolen keine C_2 -Symmetrie an der exocyclischen C-N-Bindung auf. Es wäre daher möglich, dass ein ungünstiges konformationelles Gleichgewicht, in dem das exocyclische N-H antiperiplanar zur C=N-Doppelbindung steht, die Ionenpaarbildung mit Phosphat negativ beeinflusst^{33d}.

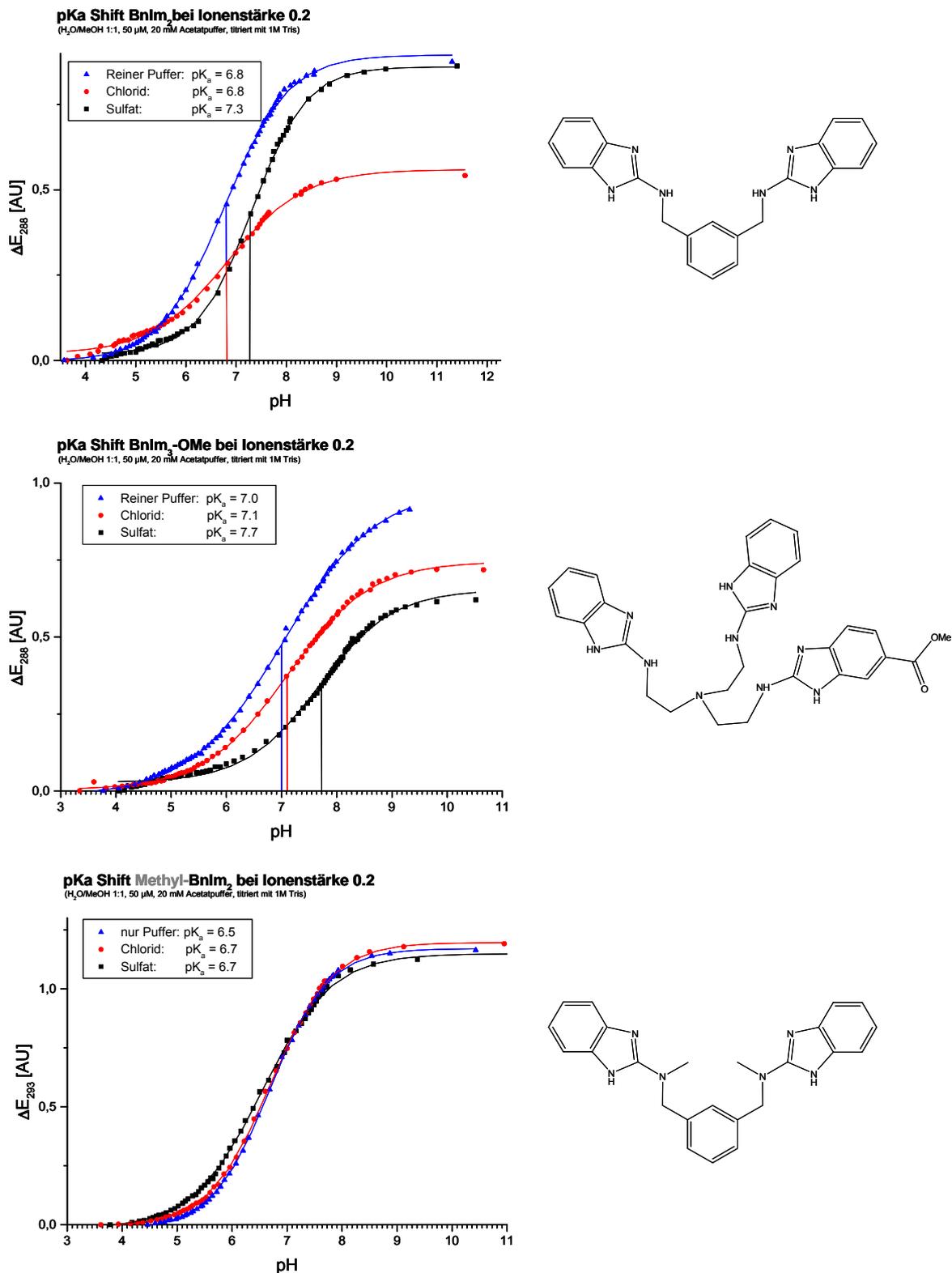


Abbildung 85: Messung des pK_a -Shifts durch Ionenpaarbildung mit Sulfat. Die angegebene Ionenstärke von 0.2 bezieht sich ausschließlich auf das zugegebene Salz. Die Ionenstärke des Puffers und deren Änderung durch die Titration wurden nicht berücksichtigt. Die Anfangspunkte der Kurven wurden gleich Null gesetzt.

6 Zusammenfassung

Durch die Darstellung von kupplungsfähigen 2-Aminobenzimidazolderivaten und deren Konjugation an RNA-Liganden konnte die Charakterisierung dieser Molekülklasse vorangetrieben und gezeigt werden, dass sie für die Herstellung von künstlichen Ribonucleasen geeignet ist.

Die Konjugation der 2-Aminobenzimidazole über Amidbindungen ist eine vielseitige, einfach durchzuführende Methode, die sowohl mit Oligopeptiden als auch Oligonucleotiden funktioniert. Auch die Konjugation an einen Neamin-Liganden für TAR-RNA gelang auf diese Weise⁷¹. Weitere Kupplungsmethoden stellen die Konjugation an Liganden über Harnstoff- sowie Disulfid-Brücken^{68,72} dar. 2-Aminobenzimidazole lassen sich also an eine Vielzahl von RNA-Liganden kuppeln.

Die freien Verbindungen des Bisbenzimidazols **32** und des Trisbenzimidazols **33** hatten aufgrund ihrer Neigung zur Aggregation mit Oligonucleotiden bei höheren pH-Werten keine genaue Charakterisierung ihres Verhaltens erlaubt, da keine pH-Abhängigkeit ihrer Spaltaktivität gemessen werden konnte. Auch die spektroskopische Messung des pK_a des Trisbenzimidazols war wegen seiner verminderten Löslichkeit im Basischen nicht möglich gewesen. Mit der Untersuchung der Trisargininkonjugate konnte der erwartete pH-Wert des Bis- und Trisbenzimidazols von ca. 7 bestätigt werden. Das Oligonucleotidkonjugat erlaubte schließlich die Messung der pH-Abhängigkeit der RNA-Spaltung, die überraschenderweise bei pH 8 ein Maximum erreicht. Dies stand zunächst im Widerspruch mit dem Modell, dass mehrere katalytische Gruppen in kooperativer Weise Beiträge zu den drei Katalysearten der RNA-Hydrolyse leisten sollten. Es hätte bedeutet, dass generelle Basenkatalyse den überwiegenden Anteil der Spaltaktivität der 2-Aminobenzimidazole ausmacht. Durch Messungen der Ionenpaarwechselwirkungen von Benzimidazolen mit Sulfat als Modell für Phosphat bzw. Phosphoran konnten jedoch starke Hinweise darauf erhalten werden, dass das dem ursprünglichen Design zugrunde liegende Modell Bestand hat. Durch die Bildung von Ionenpaaren aus Benzimidazolen und Sulfationen erfahren die Benzimidazole einen

pK_a-Shift von bis zu 0.7 Einheiten ins Basische. Sollte dies in ähnlicher Weise auf die Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat der RNA zutreffen, würde sich der pK_a wieder mit dem pH der höchsten Spaltaktivität decken und der Widerspruch zur Designidee wäre aufgelöst. Das Kontrollexperiment mit dem N-methylierten Benzimidazolderivat bewies, dass durch Störung des Guanidinmotivs die Ionenpaarwechselwirkung stark beeinträchtigt wird und somit kein pK_a-Shift mehr zu beobachten ist.

Ferner konnte durch die Darstellung und Testung eines Bisbenzimidazol-Trederivats gezeigt werden, dass die überproportionale Steigerung der Spaltaktivität vom Bisbenzimidazol **32** zum Trisbenzimidazol **33** offensichtlich auf der synergistischen Kooperation der drei Benzimidazole und nicht auf der Beschaffenheit des Molekülgerüsts in Form eines Xylol- oder Trederivats beruht.

Die Experimente mit Tripeptidkonjugaten zeigten, dass die Benzimidazole auch als Konjugat ihre Aktivität beibehalten. Da die verwendeten Liganden zwar hohe Affinität, aber bestenfalls ansatzweise Spezifität gegenüber ihren Substraten zeigten, wurden keine definierten Komplexe gebildet und man konnte nur Spaltpatterns erlangen, die die Sekundärstruktur der Substrate widerspiegeln.

Durch die substrat- und ortsspezifische Spaltung des Oligonucleotidkonjugats schließlich wurde der Beweis erbracht, dass 2-Aminobenzimidazole in monomerer Form zur RNA-Spaltung befähigt sind. In Konzentrationen weit unter der Aggregationsschwelle des unkonjugierten Trisbenzimidazols wurde die Sättigung erreicht und eine beeindruckende Spaltaktivität beobachtet.

Auch wenn Zepik und Benner erst kürzlich bezweifelt haben, dass auf dem heutigen Kenntnisstand die Entwicklung effizienter rein organischer künstlicher Nucleasen per Design möglich ist⁷³, deutet doch alles darauf hin, dass genau dies gelungen ist.

7 Ausblick

Durch die Darstellung kupplungsfähiger 2-Aminobenzimidazolderivate, deren Kupplung an verschiedene RNA-Liganden und Untersuchung der so hergestellten Konjugate konnte gezeigt werden, dass das Konzept künstlicher Ribonucleasen auf dieser Basis tragfähig ist. Die gewonnenen mechanistischen Erkenntnisse stehen im Einklang mit der Designidee der Benzimidazole.

Trisbenzimidazol-Oligonucleotidkonjugate stellen effiziente künstliche Ribonucleasen dar, die einer Vielzahl von metallhaltigen RNA-Spaltern und den meisten metallfreien Vertretern ihrer Gattung ebenbürtig sind^{33d}. Der Vorteil von metallfreien Spaltern besteht darin, dass sie weder auf die Gegenwart von Metallionen angewiesen sind, noch dass die Gefahr besteht, dass sie einen wichtigen Teil ihrer katalytischen Aktivität verlieren können, wie es selbst bei stabilen Metallkomplexen der Fall ist.

Bisher konnte noch kein katalytischer Turnover erzielt werden. Es existieren jedoch Strategien, dies zu bewerkstelligen, wie beispielsweise die Spaltung von im Substrat erzeugten Bulges und die dadurch resultierende Destabilisierung des Duplex. Durch Einfügen eines Bulge-affinen "Hilfsliganden" zwischen Linker und Benzimidazoleinheit lässt sich vielleicht ein so geschaffener Bulge noch gezielter adressieren. Die Implementierung solcher Überlegungen ist bereits im Gange.

Obwohl es bereits eine große Anzahl künstlicher Ribonucleasen gibt, existieren bis heute nur sehr wenige Anwendungen wie beispielsweise der Zuschnitt langer RNA-Sequenzen *in vitro*. Neben der möglichen Anwendung künstlicher Benzimidazol-Ribonucleasen im Antisense-Feld ist die Affinitätsspaltung von RNA-Substraten durch Konjugate von Benzimidazolen an RNA-bindende Proteine, Oligopeptide und kleine Moleküle, die bestimmte RNA-Sequenzen adressieren, von großem Interesse. Derartige Experimente könnten dem Sonderforschungsbereich 579 "RNA-Liganden-Wechselwirkungen" zuträglich sein.

Auch für die Affinitätsspaltung von RNA gibt es nur sehr wenige Beispiele, die meist auf der Verwendung von Fe-EDTA beruhen.

Liegt auch die medizinische Anwendung künstlicher Ribonucleasen noch in weiter Ferne, so stellen sie doch attraktive Werkzeuge für die Erforschung von RNA und deren Wechselwirkungen dar. Es bleibt abzuwarten, ob dieses Potenzial in Zukunft genutzt wird und zu hoffen, dass die Ribonucleasen auf Benzimidazolbasis und deren Weiterentwicklungen hier einen festen Platz einnehmen werden. Vielleicht leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Erreichen dieses Ziels.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine Experimentelle Bedingungen

Schmelzpunkte: Heiztischmikroskop nach Kofler, unkorrigiert

Dünnschichtchromatographie: Alufolien Kieselgel 60 F254, *Merck*; die Verbindungen wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht.

Färbereagenzien für die DC: Zum Färben der DC-Flecken wurden Ninhydrin- und Cer-Lösungen verwendet. Die Ninhydrin-Lösung bestand aus 3.75 g Ninhydrin gelöst in einem Gemisch aus 25 mL *n*-Butanol und 25 mL Aceton. Amine färben (in der Regel nach Erwärmen) gelb bis rotbraun. Boc-geschützte Amine wurden vor Behandeln mit Ninhydrin-Lösung HCl-Gas ausgesetzt.

Die Cer-Lösung erhielt man durch Auflösen von 2 g Phosphormolybdänsäure und 1 g Cer(IV)-sulfat in 10 mL konz. Schwefelsäure und 90 mL Wasser. Oxidierbare Verbindungen färben nach Erwärmen blau.

Hydrierversuche im Autoklaven: Zur Reduktion mit Wasserstoff kam ein Hochdruck-Laborautoklav Modell I von *Carl Roth* zum Einsatz. Er besteht aus einem Bombenrohr mit Berstscheibe (links), Manometer (oben) und Gasventil (rechts), das im Heizmantel des Rühr- und Heizgeräts festen Halt findet (Abbildung 86). Vor jeder Anwendung wurden die Dichtungen sowie die Berstscheibe optisch kontrolliert und das Gewinde des Bombenrohrs gereinigt und mit Teflonspray eingesprüht. Das Reaktionsgemisch kam in eine Quarzglaschülse mit einem Magnetrührkern, die in das Bombenrohr gesteckt wurde. Nach Verschließen des Autoklaven wurde das Bombenrohr durch Befüllen und Ablassen je drei Mal mit

Argon gespült (ca. 2 bar) und Wasserstoff (max. 5 bar) gespült. Erst dann stellte man den gewünschten Wasserstoffdruck ein. Es wurde darauf geachtet, dass der Autoklav nach Ablauf der Reaktion wieder auf Umgebungstemperatur abgekühlt war, bevor man den Druck abließ. Dieser Schritt war besonders wichtig, wenn die eingestellte Temperatur größer oder gleich der Siedetemperatur des Lösungsmittels bei Normaldruck war. Das Ablassen des Drucks erfolgte langsam; bei 5 bar wurde noch eine Pause von 1 min eingelegt. Dies sollte verhindern, dass im Reaktionsgemisch gelöster Wasserstoff plötzlich ausgaste und das Quarzrohr zum Übersäumen brachte. Vor dem Aufschrauben des Bombenrohrs wurde sichergestellt, dass es wirklich drucklos war.



Abbildung 86: Laborautoklav Modell I (Carl Roth)

Elementaranalyse (EA): *HERAEUS CHN Rapid*, Die Elementaranalysen wurden im Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt durchgeführt.

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR): *Perkin Elmer 1600 Series*, die Wellenzahlen wurden auf ganze Zahlen gerundet und in cm^{-1} angegeben; die Bandenintensitäten sind mit *s* = stark, *m* = mittel und *w* = schwach abgekürzt. Feststoffe und zähe Öle wurden als KBr-Presslinge vermessen.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): *Bruker AM 250* (250 MHz ^1H -NMR), chemische Verschiebungen (δ) wurden in ppm und Kopplungen in Hz angegeben. Als interner Standard diente das $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ -Signal ($\delta = 2.50$), die Multiplizitäten wurden mit *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett und *m* = Multipllett bezeichnet.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60, *Merck* oder *Macherey & Nagel*, Korngröße 0.040-0.063 mm; neutralisiertes Kieselgel erhielt man durch Zusatz von Triethylamin oder wss. NH_3 zum Laufmittel.

Ultraviolettspektroskopie (UV): *Cary 1-E* UV-VIS-Spektrometer ausgerüstet mit einem *Cary*-Thermostaten.

RNA-Spaltexperimente: DNA-Sequenzer *ALFexpress*, *Pharmacia Biotech*, mit Steuersoftware *AlleleLinks V1.0*

8.2 Arbeitsmethoden mit Oligopeptiden

Herstellung der Oligopeptide⁴⁶: Trisarginin und seine Derivate sowie das Oligopeptid **88** wurden manuell mit Hilfe von Spritzen mit Filtereinsatz hergestellt. Der Filtereinsatz wurde aus einer Cellopore Filterplatte, Porengröße 40 – 100 μm (XS-49040 PE, *Esters Filtertechnik Produktions- und Vertriebsgesellschaft*), in der für die jeweilige Spritze passenden Größe herausgestanzt. Als Trägermaterial wurde Rink-Amid MBHA-Harz von *Novabiochem* mit verschiedenen Belegungen nach Herstellerangaben verwendet. Die Fmoc-Arginin-Bausteine kamen ebenfalls von *Novabiochem*. Die nicht natürlichen Aminosäuren in Fmoc-geschützter Form wurden freundlicherweise von Frau Dr. Verena Ludwig und Herrn Dipl. Chem. Marcel Suhartono zur Verfügung gestellt.

Alle Kupplungs- und Spülschritte wurden durchgeführt, indem man die jeweilige Lösung mit etwas Luft zur besseren Durchmischung auf die Spritze mit Filtereinsatz und Harzkügelchen zog und diese dann an einem Schüttler befestigte.

Abspalt- und Entschützungslösung: 81.5 Teile TFA, 10 Teile Thioanisol, 5 Teile H₂O, 5 Teile Ethandithiol, eine Microspatelspitze Phenol. Das Volumen der Abspalllösung wurde je nach Ansatzgröße der Peptidsynthese angesetzt.

Kaiser-Test: Lösung I) 80 g Phenol auf 20 mL EtOH; Lösung II) 5 g Ninhydrin auf 100 mL EtOH; Lösung III) 2 mL 1 mM wss. KCN auf 98 mL Pyridin

Der Kaiser-Test wurde durchgeführt, indem man einige Harzkügelchen und je drei Tropfen der drei Lösungen in einem Eppendorfgesäß vortexte und dieses anschließend im Wasserbad erhitze. Bei unvollständiger Kupplung (also Anwesenheit freier Amine) verfärbte sich die Lösung tiefblau.

8.3 Arbeitsmethoden mit Nucleinsäuren

Herstellung der Oligonucleotide: Die Antisense-Oligonucleotide zur Konjugation mit 2-Aminobenzimidazol-Derivaten wurden in unserem Arbeitskreis mit einem *Applied Biosystems 381A* DNA-Synthesizer hergestellt. Dabei kamen 2-Cyanoethyl-Phosphoramidite von *Proligo* zum Einsatz. Die Benzimidazolderivate wurden mit Hilfe von 1 mL Spritzen (Luer Fittings), die man fest auf die CPG-Säule steckte, manuell gekuppelt (Abbildung 87).



Abbildung 87: 1mL Spritzen auf CPG-Säule zur manuellen Kupplung der Benzimidazolderivate

Cy5-gelabelte Oligonucleotide zur Durchführung der Spaltexperimente wurden von *Biospring* geliefert.

Ent-TAR-RNA **100** wurde freundlicherweise von Prof. Stefan Pitsch, EPFL Lausanne, bereitgestellt. *Ent*-RNA **105** sowie *ent*-Bcr-Abl *m*-RNA **104** stellte die *NOXXON-Pharma AG*, Berlin, zur Verfügung

Steriles Arbeiten: Um Kontaminationen mit RNAsen vorzubeugen, wurden während der Durchführung der Experimente mit Nucleinsäuren Einweg-Latexhandschuhe getragen. Außerdem kamen sterile Einweggeräte oder Diethylpyrocarbonat-behandelte und autoklavierte (20 min, 121 °C, 2.1 bar) Plastikgeräte zum Einsatz. Steriles Wasser, das auch zum Ansetzen der Laufpuffer Verwendung fand, erhielt man durch Behandeln von bidestilliertem Wasser mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht und anschließendem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 2.1 bar). Die Wirkungsweise von DEPC beruht auf der Alkylierung primärer und sekundärer Amine; natürliche RNAsen werden dadurch irreversibel inhibiert. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC in CO₂ und Ethanol.

Entsalzen durch Gelfiltration: Die Entsalzung der Konjugate erfolgte über *Sephadex-G25*-Fertigsäulen (*NAP-10, Pharmacia Biotech*). Diese wurden zunächst mit insgesamt 25 mL sterilem Wasser äquilibriert. Max. 1 mL der zu entsalzenden Probe wurde aufgetragen und anschließend viermal mit je 500 µl sterilem Wasser eluiert. Die Nucleinsäurekonjugat-haltigen Fraktionen (photometrische Bestimmung bei 260 nm) wurden in der SpeedVac bis zur Trockne eingeeengt und in sterilem Wasser aufgenommen.

Analytische Minigele (16 % PAGE, 100x100x1 mm): 10 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung wurden mit 100 µl APS und 10 µl TEMED versetzt und in die Gelkammer gegossen. Man ließ das Material 45 min auspolymerisieren. Die Proben wurden in 5 µl sterilem Wasser aufgenommen, mit 5 µl Ladepuffer (80 % Formamid, 20 mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (200 V) für ca. 1 h.

Silberfärbung: Das zu färbende Minigel wurde vorsichtig von den Glasplatten gelöst und mit 20 % (v/v) Trichloressigsäure für 20 min fixiert. Es folgten drei Waschschriffe, bei denen das Gel mit bidest. Wasser bedeckt und für jeweils 5 min umgeschwenkt wurde. Anschließend wurde es zum Färben mit frisch zubereiteter 0.1 % (m/v) Silbernitratlösung für 20 min behandelt. Darauf folgte die Farbentwicklung mit einer auf 10 °C vorgekühlten Entwicklerlösung (3 % Natriumcarbonat, 0.03 % Formaldehyd). Nach Visualisierung der Banden wurde das entwickelte Gel mit 10 % (v/v) Essigsäure für 5 min fixiert. Abschließend wusch man zwei Mal je 2 min mit bidest. Wasser; das silbergefärbte Minigel konnte man entweder trocknen oder bis zu einer Woche lang befeuchtet lagern.

Präparative Maxigele (16 % PAGE, 200x250x1.5 mm): Zunächst wurden 60 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung mit 600 µl APS versetzt. Mit 5 mL dieser Gelmischung, zu der man 5 µl TEMED gab, wurde das Bodengel angefertigt. Nach 10-15 min wurde die restliche Gelmischung mit 60 µl TEMED versetzt und auf das Bodengel gegossen. Nach 2 h ließ man das Gel für 1 h vorlaufen (U = 100 V). Die Proben wurden in 125 µl sterilem Wasser aufgenommen, mit 125 µl Ladepuffer (80 % Formamid, 20 mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (110 V) für ca. 16 h.

UV-Shadowing von Nucleinsäurebanden: Um Nucleinsäurebanden sichtbar zu machen, wurde eine DC-Platte mit Fluoreszenzindikator mit Frischhaltefolie bedeckt und das von den Glasplatten abgelöste Gel darauf gelegt. Unter UV-Licht erschienen die Banden als dunkle Flecken auf fluoreszierendem Grund.

Extraktion der Nucleinsäurekonjugate aus PAA-Gelen: Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden wurden in ein 15 mL Zentrifugengefäß überführt und mit ca. 5 mL Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0; 0.1 mM EDTA) bedeckt. Die

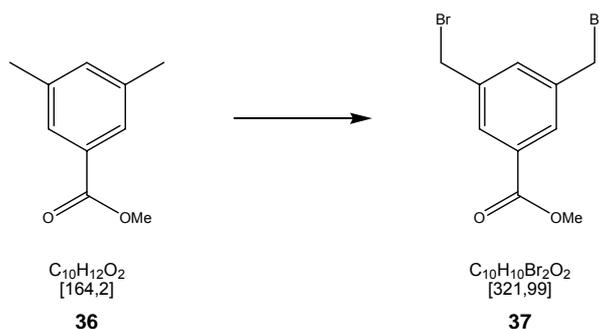
Inkubation der Gelfragmente erfolgte bei 4 °C über Nacht. Anschließend überführte man den Überstand in 2 mL Eppendorf-Gefäße und zentrifugierte für 5 min bei 14000 rpm, um die Gelfragmente zu pelletieren. Den Überstand pipettierte man ab und engte ihn in der SpeedVac ein.

Quantifizierung von Nucleinsäurekonjugaten: Die Probe wurde 1:100 verdünnt und im Photometer bei 260 nm vermessen. Die Konzentration der Proben wurde wie folgt berechnet:

$$c(\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 33 \mu\text{g/mL} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

8.4 Synthese des Bisbenzimidazols

8.4.1 Synthese von 3,5-Bis-brommethyl-benzoessäuremethylester **37**



3,5-Dimethylbenzoessäuremethylester (10.68 g, 65.0 mmol) wurde in 100 mL wasserfreiem Ameisensäuremethylester gelöst, mit NBS (40.56 g, 228.0 mmol) und einer Spatelspitze AIBN versetzt und unter Bestrahlung mit einer 100-Watt-Lampe 20 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurde aus der Suspension eine dunkelrote Lösung. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum vollständig entfernt und der Rückstand in 200 mL Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen. Die Suspension wurde erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Das Filtrat, eine orangefarbene Lösung, wurde mit ges. Na_2SO_3 -Lösung bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum blieb ein gelbes, zähes Öl zurück, aus dem in der Kälte über Nacht ein weißer Feststoff kristallisierte. Nach Umkristallisieren aus Ethylacetat / Hexan erhielt man 17.17 g (53.7 mmol, 83 %) farblose Kristalle.

3,5-Bis-brommethyl-Benzoessäuremethylester **37**:

Schmp.: 91-93 °C (Lit.: 92 – 93 °C^{33c})

DC: EE / Hexan 1:5, $R_f = 0.6$, UV-aktiv

IR: (KBr) 3431 w , 3069 m , 3042 m , 3000 m , 2979 m , 2950 m , 2844 m , 1874 w , 1814 w , 1728 s , 1544 m , 1450 m , 1436 s , 1321 s , 1232 s , 1163 m , 1132 m , 1108 m , 996 s , 942 w , 907 m , 898 m , 884 w , 856 w , 772 m , 698 s , 600 s , 556 w cm⁻¹

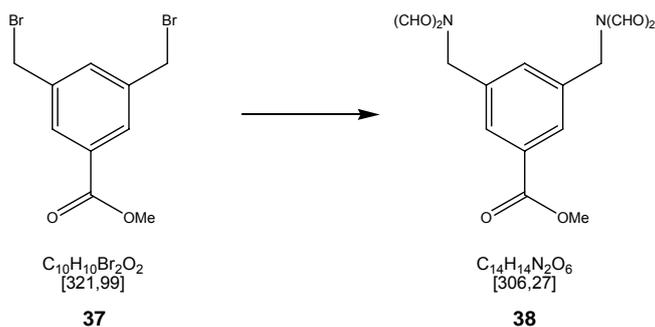
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO- d_6) δ 3.87 (s, 3H, OCH₃); 4.79 (s, 4H, benzyl. H); 7.79 (t, J = 1.6 Hz, 1H, C-4-H); 7.98 (d, J = 1.7 Hz, 2H, C-2-H und C-6-H)

EA: für C₁₀H₁₀Br₂O₂:

ber.: C37.30 H3.13

gef.: C37.34 H3.31

8.4.2 Synthese von 3,5-Bis-diformaminomethylbenzoessäuremethylester **38**



Die Bisbromverbindung **37** (10.0 g, 31.3 mmol) wurde in 45 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst und mit Natrium(diformyl)amid (26.79 g, 87.5 mmol) versetzt. Die Suspension wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt und der verbleibende Feststoff heiß abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum vollständig entfernt und das verbleibende gelbliche Öl in

Ethylacetat aufgenommen. Durch Zugabe von Hexan erhielt man 6.95 g (22,7 mmol, 72 %) farblose Kristalle.

3,5-Bis-diformylaminomethyl-Benzoesäuremethylester **38**:

Schmp.: 139 °C (Lit.: 138 – 139 °C^{33c})

DC: EE / Hexan, $R_f = 0.3$, UV-aktiv

IR: (KBr) 3399w, 3086w, 2997w, 2953w, 2923w, 1705s, 1660s, 1608m, 1522w, 1442s, 1414m, 1372m, 1320s, 1266s, 1229s, 1153s, 1101s, 985 m, 966s, 953m, 933m, 899m, 867w, 774s, 743s, 700m, 668w, 605m cm^{-1}

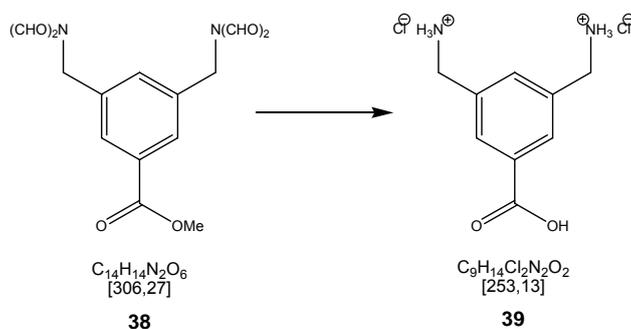
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃); 4.70 (s, 4H, benzyl. H); 7.44 (s, 1H, C-4-H); 7.71 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 9.08 (s, 4H, N(CHO₂))

EA: für C₁₄H₁₄N₂O₆:

ber.:	C54.90	H4.61	N9.15
-------	--------	-------	-------

gef.:	C54.89	H4.83	N9.18
-------	--------	-------	-------

8.4.3 Synthese von 3,5-Bis-diaminomethyl-benzoesäure-bis-hydrochlorid **39**



Eine Lösung von **38** (1.95 g, 6.38 mmol) in 100 mL Dioxan wurde nach Zusatz von 35 mL konz. HCl 2 h unter Rückfluss erhitzt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von Ether erhielt man 1,54 g (6,10 mmol, 95 %) weiße Nadeln.

3,5-Bis-diaminomethyl-benzoesäure-bis-hydrochlorid **39**:

Schmp.: Substanz schmilzt nicht bis 320 °C

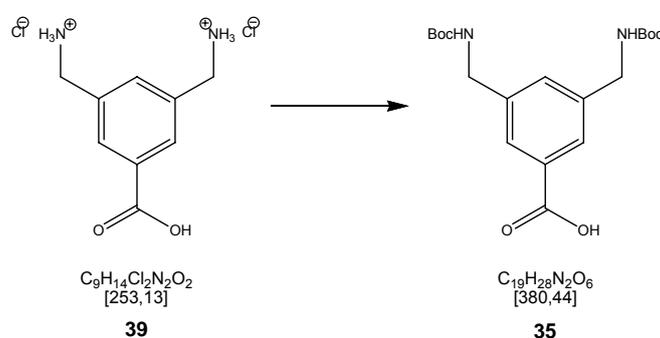
DC: *i*-PrOH / H₂O / HOAc 5:2:1, NaCl ges., R_f = 0.7, UV-aktiv, färbt mit Ninhydrin

IR: (KBr) 3852 m , 3674 w , 3648 w , 3384 m , 3016 s , 2599 m , 2035 w , 1684 s , 1607 m , 1513 m , 1480 m , 1405 m , 1388 m , 1376 m , 1312 m , 1217 m , 1182 m , 1123 m , 1095 m , 922 w , 905 w , 870 w , 823 m , 772 w , 702 m cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.08 (s, 4H, benzyl. H); 7.89 (s, 1H, C-4-H); 8.10 (s, 2H, C2-H und C-6-H); 8.66 (br. s, mit D₂O austauschbar, 6H, NH₃⁺); 13.24 (br. s, mit D₂O austauschbar, 1H, CO₂H)

EA:	für $C_9H_{14}Cl_2N_2O_2 \cdot 0.7 H_2O$:		
ber.:	C40.68	H5.84	N10.54
gef.:	C40.89	H5.67	N10.40

8.4.4 Synthese von 3,5-Bis-*tert*-butoxycarbonylaminomethylbenzoesäure **35**

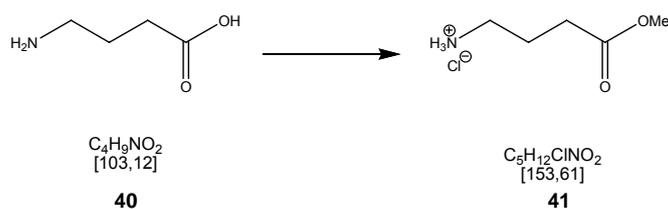


Das Hydrochlorid **39** (1000 mg, 3.95 mmol) wurde in 30 mL 1 N NaOH gelöst und mit einer Lösung aus Boc_2O (2.16 g, 9.98 mmol) in 30 mL Methylenchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 d intensiv gerührt, wobei darauf geachtet wurde, dass der pH-Wert der wässrigen Lösung >12 blieb. Nach Ablauf der Reaktionszeit war aus dem Zweiphasen-Gemisch eine milchige Emulsion geworden. Diese wurde mit 100 mL Ethylacetat versetzt und mit konz. Phosphorsäure auf pH 5 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit Ethylacetat wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. Kochsalzlösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Lösung wurde bis zur beginnenden Kristallisation eingeeengt und mit Hexan versetzt. Es wurden 1.23 g (3.24 mmol, 82 %) eines weißen Feststoffs isoliert.

3,5-Bis-*tert*-butoxycarbonylaminomethyl-benzoesäure **35**:Schmp.: 163 °C (Lit.: 165 °C^{33c})DC: EE / Hexan 1:1, $R_f = 0.4$, UV-aktiv, Färbt nach Räuchern mit HCl mit NinhydrinIR: (KBr) 3361s, 2975s, 2927s, 2716m, 2605m, 1684s, 1606s, 1534s, 1450s, 1432s, 1393s, 1366s, 1292s, 1252s, 1178s, 1050s, 1031m, 1002w, 951s, 926m, 896w, 882s, 861m, 774m, 736m, 694m, 636m, 598m cm^{-1} $^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.39 (s, 18H, t-Bu-H); 4.14 (d, $J = 6.2$ Hz, nach D_2O -Austausch Signalvereinfachung zu s, 2H, benzyl. NH); 7.33 (s, 1H, C-4-H); 7.44 (t, $J = 6.2$ Hz, mit D_2O austauschbar, 2H, Boc-NH); 7.69 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 12.90 (s, mit D_2O austauschbar, CO_2H)EA: für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$:

ber.: C59.98 H7.42 N7.36

gef.: C60.13 H7.39 N7.31

8.4.5 Synthese von 4-Aminobuttersäuremethylester Hydrochlorid **41**

Zu einer Suspension von γ -Aminobuttersäure (5 g, 48.49 mmol) in 40 mL MeOH wurde bei 0 °C SOCl_2 zugetropft (2.5 mL). Als die Aminosäure aufgelöst war, wurde noch 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit kaltem DCM gewaschen. Es wurden 5.409 g (35.21 mmol, 73 %) des Hydrochlorids in Form eines farblosen Feststoffs isoliert.

4-Aminobuttersäuremethylester **41**:

Schmp.: 120 °C

DC: MeOH / EE 1:1: Startfleck

IR: (KBr) 2956s, 2663m, 2492m, 1959w, 1733s, 1599s, 1515s, 1467m, 1429s, 1386s, 1299s, 1215s, 1173s, 1152s, 1135m, 1068m, 1031w, 970s, 882m, 791m, 758m, 701w, 644w, 587w cm⁻¹

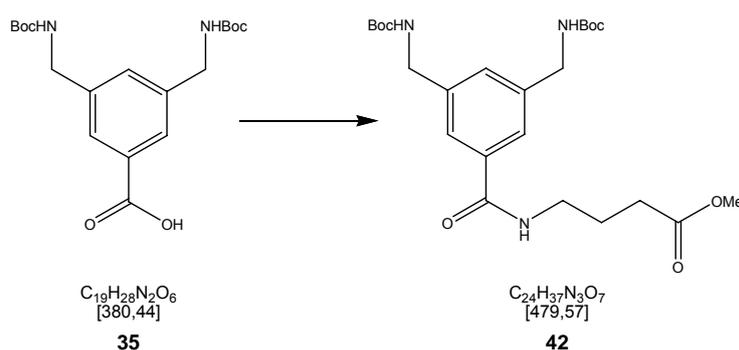
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.77 – 1.89 (m, überlagert von DMSO, 2H, Methylen-3-H); 2.45 (t, J = 7.5, 2H, Methylen-2-H); 2.72 -2.85 (m, 2H, Methylen-4-H); 3.60 (s, 3H, Methyl-H); 8.26 (br. s, austauschbar mit D₂O, 2H, NH₂)

EA: für C₅H₁₁NO₂ • HCl:

ber.: C39.10 H7.87 N9.12

gef.: C38.57 H7.72 N9.40

8.4.6 Synthese von 4-[3,5-Bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-benzoyl-amino]-buttersäuremethylester **42**



Das Boc-geschützte Benzoessäurederivat **35** (500 mg, 1.31 mmol) wurde zusammen mit HOBt (604 mg, 3.94 mmol) in 80 mL Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von DIC (611 µL, 3.94 mmol) wurde zunächst 10 min bei RT gerührt und dann in wenig Dichlormethan gelöster γ -Aminobuttersäuremethylester **41** (308 mg, 2.63 mmol) zum Reaktionsgemisch gegeben. Es

wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender Säulenchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / Hexan = 1:1 → Ethylacetat / Hexan = 3:1, 1 % NEt₃) erhielt man 501 mg (1.04 mmol, 79 %) des Amids **42**.

4-[3,5-Bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-benzoyl-amino]-buttersäuremethylester **42**:

DC: EE / Hexan 1:1, 1 % NEt₃, R_f = 0.2 (UV-aktiv, färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3406*m*, 3347*m*, 3005*m*, 2981*m*, 2933*m*, 1748*s*, 1718*s*, 1686*s*, 1630*s*, 1594*s*, 1545*s*, 1515*s*, 1456*m*, 1438*m*, 1392*m*, 1365*m*, 1332*m*, 1289*s*, 1253*s*, 1214*s*, 1173*s*, 1128*m*, 1099*m*, 1050*m*, 974*w*, 946*w*, 930*w*, 908*w*, 860*m*, 789*w*, 766*w*, 706*w*, 670*w* cm⁻¹

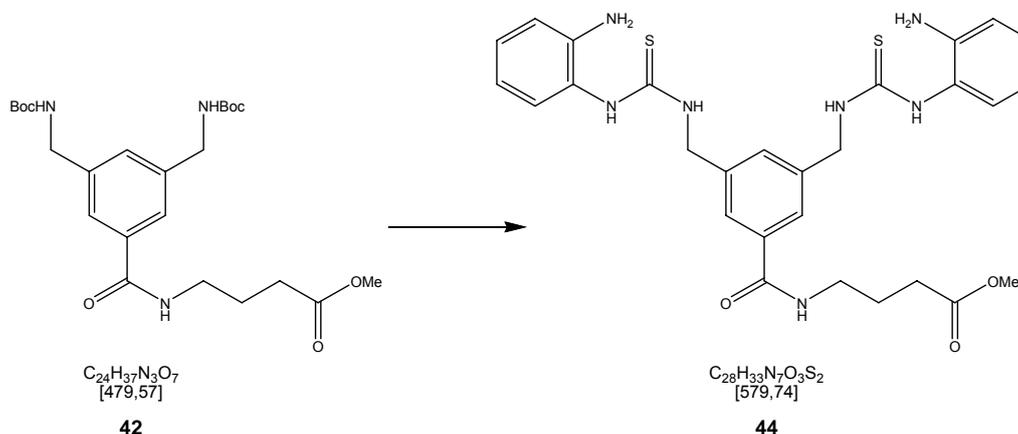
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.40 (s, 18H, *tert*-Butyl-H); 1.71 – 1.83 (m, 2H, Methylen-3-H); 2.36 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Methylen-2-H); 3.22 – 3.30 (m, 2H, Methylen-4-H); 3.58 (s, 3H, Methyl-H); 4.15 (d, J = 6.0 Hz, nach Austausch mit D₂O Signalvereinfachung zu s, 4H, benzyl. H); 7.25 (s, 1H, C-4-H); 7.39 (t, J = 4.8 Hz, austauschbar mit D₂O, 2H, Boc-NH); 7.56 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 8.43 (t, J = 5.4 Hz, 1H, Amid-NH)

EA: für C₂₄H₃₇N₃O₇

ber.: C60.11 H7.78 N8.76

gef.: C59.95 H7.74 N8.91

8.4.7 Synthese von 4-{3,5-Bis-[3-(2-amino-phenyl)-thioureidomethyl]-benzoylamino}-buttersäuremethylester **44**



Die Bisbocverbindung **42** (500 mg, 1.04 mmol) wurde in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Es wurde unter DC-Kontrolle für ca. 4 h bei RT gerührt, bis kein Edukt mehr vorhanden war und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Diaminoverbindung **43** wurde nach NMR-Kontrolle ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.73 – 1.86 (m, 2H, Methylen-3-H); 2.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Methylen-2-H); 3.27 – 3.35 (m, 2H, Methylen-4-H); 3.59 (s, 3H, OMe); 4.09 (d, $J = 5.0$ Hz, nach Austausch mit D_2O Signalvereinfachung zu s, 4H, benzyl. H); 7.64 (s, 1H, C-4-H); 7.97 (2H, C-2-H und C-6-H); 8.37 (br. s, austauschbar mit D_2O , 6H, $\text{NH}_3^+\text{-H}$); 8.57 (t, $J = 4.8$ Hz, austauschbar mit D_2O , 1H, Amid-NH)

Thiocarbonyldiimidazol (557 mg, 3.13 mmol) wurde mit einer katalytischen Menge Imidazol (20 mg) in Acetonitril (30 mL) gelöst. Dazu tropfte man eine Lösung des zuvor entschützten Diaminoderivats in Acetonitril (20 mL), die mit Pyridin basisch gestellt worden war. Es wurde für 3 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde in 20 mL Acetonitril gelöstes, frisch sublimiertes *o*-Phenylendiamin (451 mg, 4.17 mmol) zum Reaktionsgemisch gegeben und für 4 h bei 50 °C

gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat : Hexan = 1:1, 1 % NEt₃), was 368 mg (0.63 mmol, 61 %) **44** ergab.

4-{3,5-Bis-[3-(2-amino-phenyl)-thioureidomethyl]-benzoylamino}-buttersäuremethylester **44**:

DC: EE / Hexan 2:1, 1 % NH₃, R_f = 0.5 (färbt mit Ninhydrin, UV-aktiv)

IR: (KBr) 3292s, 3035m, 1738m, 1636m, 1618m, 1540s, 1500s, 1453m, 1358m, 1306m, 1249m, 1091w, 974w, 861w, 747w, 687w cm⁻¹

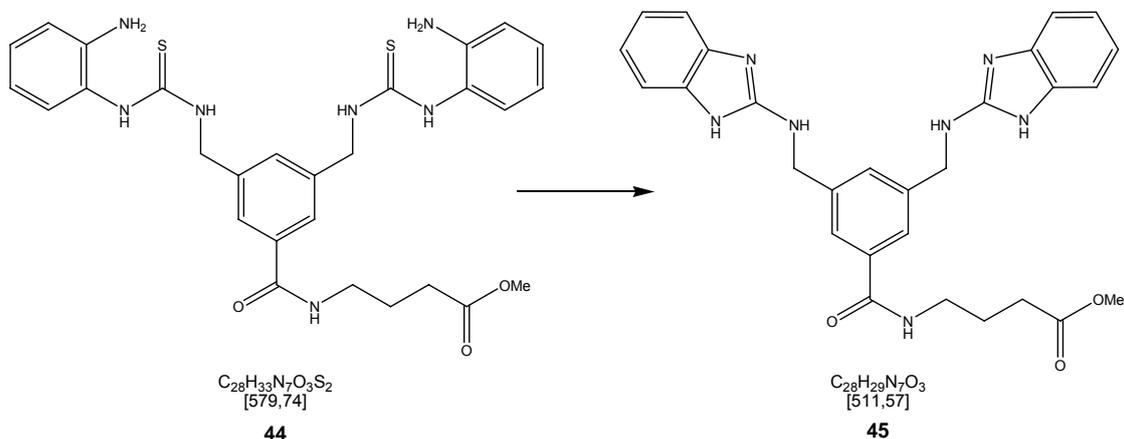
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.76 – 1.82 (m, 2H, Methylen-3-H); 2.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Methylen-2-H); 3.22 – 3.30 (m, 2H, Methylen-4-H); 4.75 (d; J = 5.4, bei Austausch mit D₂O Signalvereinfachung zu s, 4H, benzyl. H); 4.85 (s, 4H, Ar-NH₂); 6.58 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 6.76 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-H); 6.95 – 7.06 (m, 4H, Ar-H); 7.41 (s, 1H, C-4-H); 7.63 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 7.76 (br. s, austauschbar mit D₂O, 2H, Thioharnstoff-NH); 8.42 (t, J = 5.7 Hz, austauschbar mit D₂O, 1H, Amid-NH); 8.96 (s, austauschbar mit D₂O, 2H, Thioharnstoff-NH)

MS: (ESI⁺) für C₂₈H₃₄N₇O₃S_s⁺ (M+H⁺):

ber.: 580.22

gef.: 580.3

8.4.8 Synthese von 4-{3,5-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäuremethylester **45**



Das Thioharnstoffderivat **44** (200 mg, 0.03 mmol) wurde mit einer katalytischen Menge Schwefel in 30 mL abs. Ethanol gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Über einen Zeitraum von 8 h wurde portionsweise gelbes HgO (299 mg, 1.38 mmol) zugegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich vor jeder Zugabe von HgO das Reaktionsgemisch von orange nach schwarz verfärbte. Nach Beifügung der letzten Portion wurde noch 8 h unter Reflux gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Rückstands (Ethylacetat / MeOH = 5:1, 1 % NH₃) erhielt man 112 mg (0.02 mmol, 63 %) des Bisbenzimidazols **45**.

4-{3,5-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäuremethylester **45**:

DC: EE / MeOH 5:1, 1 % NH₃, R_f = 0.3 (UV-aktiv)

IR: (KBr) 3295 m , 2949 m , 1720 m , 1633 s , 1602 s , 1581 s , 1464 m , 1327 w , 1270 m , 1174 w , 1097 w , 1043 s , 872 w , 743 m cm⁻¹

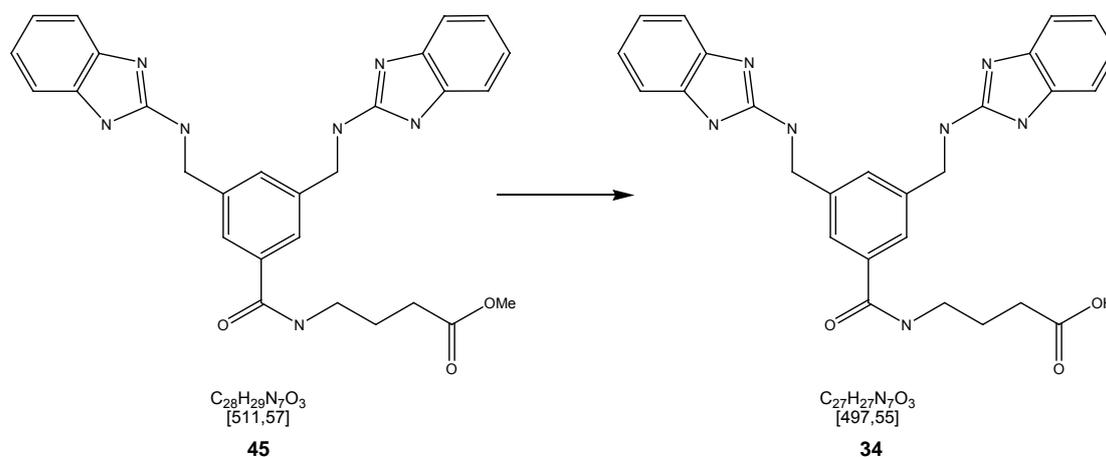
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.70 – 1.82 (m, 2H, Methylen-3-H); 2.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Methylen-2H); 3.21 – 3.32 (m, 2H, Methylen-4-H); 3.57 (s, 3H, Methyl-H); 4.54 (d, $J = 6.0$ Hz, bei Zugabe von D_2O Signalvereinfachung zu s, 4H, benzyl. H); 6.82-6.89 (m, 4H, Ar-H); 7.07 – 7.16 (m, 6H, Ar-H und NH [austauschbar mit D_2O]); 7.36 (s, 1H, C-4-H); 7.74 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 8.48 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, Amid-NH); 10.83 (br. s, 2H, NH)

MS: (ESI $^+$) für $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_3^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 512.1

gef.: 512.2

8.4.9 Synthese von 4-{3,5-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäure **34**



Der Methyl ester **45** (100 mg, 0.2 mmol) wurde in 15 mL eines Gemisches aus Methanol und Wasser (1:1) gelöst, LiOH Monohydrat (25 mg, 0.6 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 N HCl aufgenommen. Bei Zugabe von Dichlormethan fielen an der Phasengrenze 56 mg (0.1 mmol, 58 %) der Verbindung **34** in Form eines hellbraunen Niederschlags aus, der abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen wurde.

4-{3,5-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoylamino}-buttersäure **34**:

DC: EE / MeOH 1:1, 1 % NH₃, R_f = Startfleck (UV-aktiv)

IR: (KBr) 3407*m*, 1675*s*, 1578*s*, 1479*m*, 1407*m*, 1349*w*, 1262*w*, 1029*w*, 744*m*, 668*w*,
620*w* cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.70 – 1.81 (m, 2H, Methylen-3-H); 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Methylen-3-H); 3.24 – 3.32 (m, 2H, Methylen-4-H); 4.70 (d, J = 5.0 Hz, 4H, benzyl. H); 7.14 – 7.17 (m, 4H, Ar-H); 7.30 – 7.35 (m, 4H, Ar-H); 7.67 (s, 1H, C-4-H); 7.89 (s, 2H, C-2-H und C-6-H); 8.62 (t, J = 5.5 Hz, 1H, Amid-NH); 9.11 (br. s, 2H, NH)

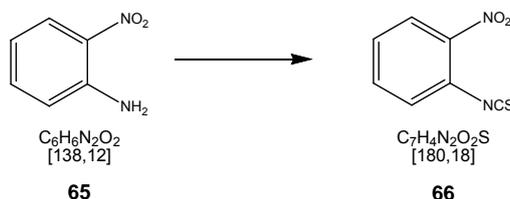
MS: (ESI⁺) für C₂₇H₂₈N₇O₃⁺ (M+H⁺):

ber.: 498.2

gef.: 498.2

8.5 Synthese des Trisbenzimidazols

8.5.1 Synthese von 2-Nitrophenylisothiocyanat **66**



Zu einer Lösung von *o*-Nitroanilin (6.77 g, 48.956 mmol) in 50 mL Ethylacetat wurde bei RT Thiophosgen (3 mL, 39.16 mmol) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 75 °C gerührt. Dabei fiel aus der dunkelorange Lösung ein gelber Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockne eingengt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat / Hexan = 6:1, 1 % NH₃). Man erhielt 5.28 g (29.33 mmol, 75 %) 2-Nitrophenylisothiocyanat **66** als hellgelben Feststoff.

2-Nitrophenylisothiocyanat **66**:

Schmp.: 72 °C

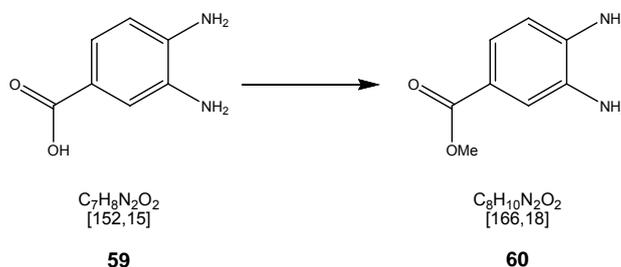
DC: EE / Hexan 6:1, 1 % NH₃, R_f = 0.27 (stark UV-aktiv)

IR: (KBr) 2117s, 1599s, 1572m, 1524s, 1474m, 1368w, 1344s, 1309m, 1275m, 1251m, 1143m, 958w, 938m, 870w, 850m, 780m, 736s, 702m, 683m, 645m cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.57 – 7.64 (m, 1H, Ar-H); 7.43 – 7.87 (m, 2H, Ar-H); 8.18 – 8.21 (m, 1H, Ar-H)

EA: für C₇H₄N₂O₂S:

ber.:	C46.66	H2.24	N15.55
gef.:	C46.85	H2.45	N15.35

8.5.2 Synthese von 3,4-Diaminobenzoessäuremethylester **60**

Zu einer Suspension von 3,4-Diaminobenzoessäure (9.89 g, 65 mmol) in 80 mL abs. Methanol wurde bei 0 °C SOCl_2 (2.36 mL, 32.5 mmol) getropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum kristallisierte man das Rohprodukt aus Ethanol um und erhielt 8,03 g (48 mmol, 74 %) des Methylesters **60**.

3,4 Diaminobenzoessäuremethylester **60**:

Schmp.: 107 °C

DC: EE / MeOH 5:1, 1 % NEt_3 , $R_f = 0.7$ (stark fluoreszierend unter UV)

IR: (KBr) 3438 m , 3365 m , 3332 m , 3200 m , 2949 w , 2721 w , 1699 s , 1671 m , 1627 m , 1589 s , 1522 m , 1451 s , 1430 m , 1318 s , 1298 s , 1238 s , 1224 m , 1189 w , 1161 w , 1103 w , 1064 w , 993 w , 908 w , 894 w , 828 w , 807 w , 766 s , 721 w , 640 w cm^{-1}

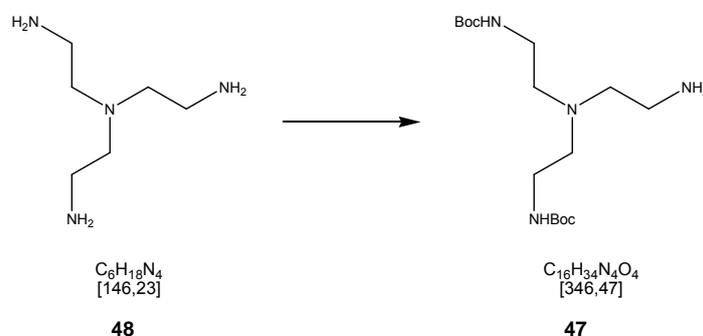
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3.71 (s, 3H, Methyl-H); 4.64 (s, austauschbar mit D_2O , 2H, Ar- NH_2); 5.26 (s, austauschbar mit D_2O , 2H, Ar- NH_2); 6.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-5-H); 7.08 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H, Ar-6-H); 7.15 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar-2-H)

EA: für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$

ber.: C57.82 H6.07 N16.86

gef.: C57.94 H5.92 N16.82

8.5.3 Synthese von Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin **47**



Tris(2-aminoethyl)amin (1.49 mL, 9.50 mmol) wurde in 40 mL abs. THF gelöst und bei 0 °C eine Lösung von Boc-ON (4.95 g, 20.10 mmol) in 50 mL abs. THF über 1 h zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das erhaltene gelbe Öl in Essigsäureethylester aufgenommen und zwei Mal mit 0.5 N NaOH ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit ges. Kochsalzlösung versetzt und mit Essigsäureethylester reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Chromatographie an Kieselgel (CH_2Cl_2 / MeOH = 5:1, 1 % NEt_3) ergab 5.06 mmol **47** (53 %) als gelbliches Öl.

Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]-(2-aminoethyl)amin **47**:

DC: DCM / MeOH 5:1, 1 % NEt_3 , $R_f = 0.4$ (färbt mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3356 m , 2876 m , 2818 m , 1695 s , 1520 s , 1456 m , 1391 m , 1365 s , 1276 s , 1251 s , 1172 s , 1066 w , 968 w , 864 w , 780 w , 758 w cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.37 (s, 18H, tert-Butyl-H); 2.38-2.44 (m, 6H, Methylen-1-H); 2.49-2.54 (m, 2H, Methylen-2-H); 2.95 (dt; $J = 6.1$ Hz, 4H, Methylen-2-H); 6.72 (t, $J = 5.2$ Hz 2H, NH)

EA: für $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4 \bullet 0.1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$

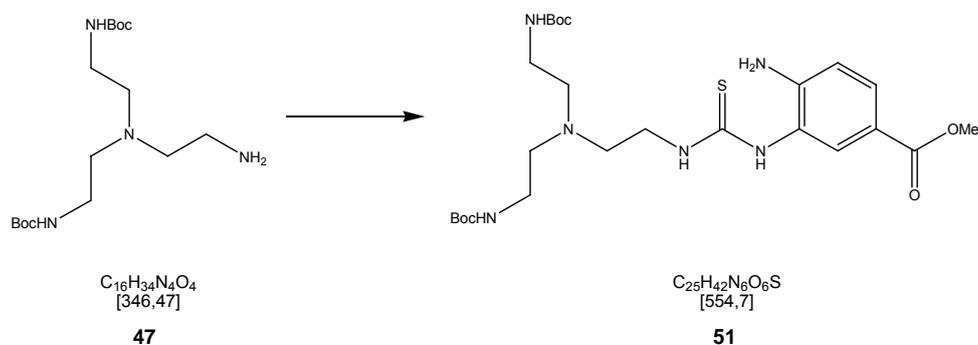
ber.: C54.48 H9.71 N15.78

gef.: C54.41 H9.51 N15.82

MS: (ESI^+) für $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 347.2 gef.: 347.1

8.5.4 Synthese von 4-Amino(3-{2-[bis-(2-{tert-butoxycarbonylamino}ethyl)amino]ethyl}thioureido)benzoesäure-methylester **51**



Eine Lösung von BisBoc-Tren **47** (1.97 g, 5.68 mmol) in 20 mL Acetonitril wurde bei 0 °C zu einer Mischung von Thiocarbonyldiimidazol (1.52 g, 8.55 mmol) und Imidazol (0.116 g, 1.71 mmol) in 30 mL Acetonitril getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. 3,4-Diaminobenzoesäuremethylester **60** (1.42 g, 8.55 mmol) wurde in 10 mL Acetonitril gelöst und zum Reaktionsgemisch zugetropft. Anschließend wurde für 4 h bei 50 °C gerührt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Aufreinigung (Ethylacetat / Hexan = 1:1 → Ethylacetat) erhielt man 2.80 g (5.04 mmol, 88 %)

51.

4-Amino(3-{2-[bis-(2-{*tert*-butoxycarbonylamino}ethyl)-amino]ethyl}thioureido)benzoesäure-Methylester **51**:

DC: EE / Hex 1:1, $R_f = 0.45$, färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin

IR: (KBr) 3330s, 2977s, 2949m, 2839w, 1694s, 1625s, 1519s, 1438m, 1392m, 1366s, 1292s, 1251s, 1168s, 1103m, 1062w, 995w, 859w, 769m cm^{-1}

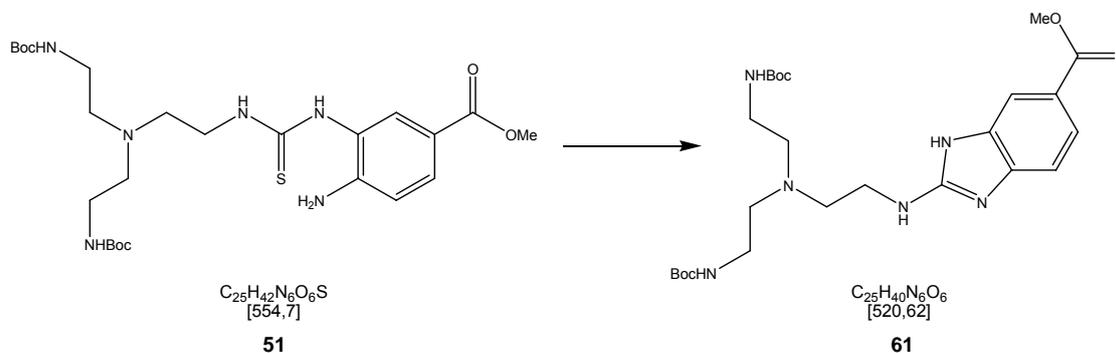
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.38 (s, 18 H, *tert*-Butyl-H); 2.45-2.54 (m, 4H, Methylen-1-H); 2.59 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, Methylen-1'-H); 2.86-3.91 (m, 4H, Methylen-2-H); 3.40-3.54 (m, 2H, Methylen-1'-H); 3.76 (s, 3H, OCH_3); 5.70 (s, austauschbar mit D_2O 2H, Ar- NH_2); 6.78 (t, $J = 4.7$ Hz, austauschbar mit D_2O , 2H, Boc-NH); 6,76 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, C-5-H); 7.34 (br. s, austauschbar mit D_2O , 1H); 7.58-7.61 (m, 2H, C-2-H und C-6-H); 8.87 (s, austauschbar mit D_2O , 1H, N-H)

EA: für $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$:

ber.: C54.13 H7.63 N15.15

gef.: C54.15 H7.40 N15.02

8.5.5 Synthese von 2-{2-[Bis-(-2{*tert*-butoxycarbonylamino}ethyl)amino]-1*H*-benzimidazol-5-carbonsäure-methylester **61**



Zu einer refluxierenden Lösung des Thioharnstoffs **51** (1.50 g, 2.70 mmol) in 60 mL abs. EtOH mit einer katalytischen Menge Schwefel wurde portionsweise gelbes HgO (2.34 g, 10.8 mmol) im Argongegenstrom über einen Zeitraum von 5 h zugegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich vor jeder Zugabe von HgO das Reaktionsgemisch von orange nach schwarz verfärbte. Die Suspension wurde abzentrifugiert (6000 min⁻¹, 10 min) und das Lösungsmittel des Überstands im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat / MeOH = 5:1, 1 % NH₃) und man erhielt 1.36 g (2.617 mmol, 97 %) **61**.

2-{2-[Bis-(-2{*tert*-butoxycarbonylamino}ethyl)amino]-1*H*-benzimidazol-5-carbonsäure-Methylester **61**:

DC: EE / MeOH 5:1, 1 % NH₃, R_f = 0.35, färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin

IR: (KBr) 3358s, 2977s, 2826m, 1690s, 1636s, 1602s, 1578s, 1522s, 1458m, 1436s, 1392m, 1366s, 1290s, 1252s, 1170s, 1088m, 987w, 859w, 776m, 752w cm⁻¹

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.37 (s, 18H, tert-Butyl-H); 2.49-2.54 (m, 4H, Methylen-1-H); 2.67 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, Methylen-1'-H); 2.95-3.02 (m, 4H, Methylen-2-H); 3.26-3.40 (m; 2H; Methylen-2'-H); 3.82 (s, 3H, OCH_3); 6.78 (t, $J = 4.6$ Hz, austauschbar mit D_2O , 2H, Boc-NH); 6.89 (br. s, austauschbar mit D_2O , 1H); 7.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, C-7-H); 7.59-7.62 (m, 1H, C-6-H); 7.74 (d, $J = 1.56$, 1H, C-4-H); 10.96 (s, austauschbar mit D_2O , 1H, NH)

EA: für $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6 \cdot \text{MeOH}$:

ber.: C56.16 H8.02 N15.21

gef.: C56.78 H7.65 N15.55

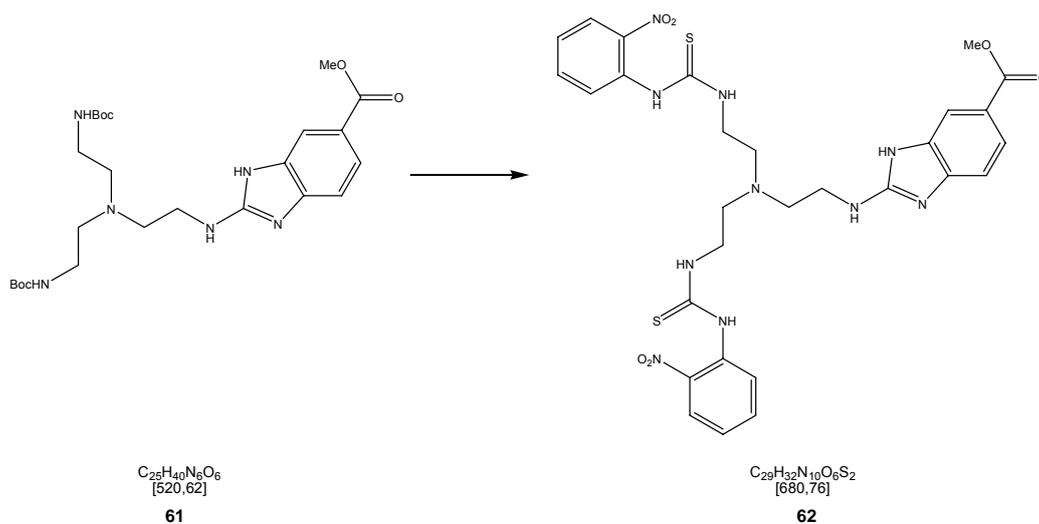
MS: (ESI^+) für $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_6^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 521.3 gef.: 521.4

8.5.6 Synthese von 2-[2-{Bis-{2-[3-(2-

Nitrophenyl)thioureido]ethyl]amino)

ethylamino]-3*H*-benzimidazol-5-carbonsäure-methylester **62**



Eine Lösung der Bis-Bocverbindung **61** (1.27 g, 2.44 mmol) in 30 mL abs. MeOH wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise SOCl₂ (1.77 mL, 24.4 mmol) zugegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und man erhielt quantitativ das Boc-entschützte Hydrochlorid des Diamins. Die Entfernung der Boc-Schutzgruppen wurde durch ein NMR-Spektrum bestätigt und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Hierzu wurde zunächst eine Lösung von 2-Nitrophenylisothiocyanat (967 mg, 5.37 mmol) in 30 mL abs. EtOH mit 10 mL NEt₃ versetzt. Das entschützte Diamin wurde in 20 mL abs EtOH mit 10 mL NEt₃ gelöst und bei 0 °C zur Nitrophenylisothiocyanat-Lösung gegeben. Man ließ die Reaktionsmischung auf RT kommen und über Nacht rühren. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das erhaltene Rohprodukt an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat → Ethylacetat / MeOH = 5:1, 1 % NH₃). Man erhielt 1.54 g (2.27 mmol, 92 %) eines gelben Feststoffs **61**

2-[2-{Bis-{2-[3-(2-Nitrophenyl)thioureido]ethyl}amino)ethylamino]-3*H*-benzimidazol-5-Carbonsäure-Methylester **61**:

Schmp.: 104 °C

DC: EE / MeOH 5:1, 1 % NH₃, R_f = 0.4

IR: (KBr) 3300*m*, 3040*w*, 2947*m*, 2841*w*, 1701*m*, 1686*m*, 1635*m*, 1605*s*, 1578*m*, 1508*s*, 1458*m*, 1439*m*, 1341*s*, 1286*s*, 1206*m*, 1160*m*, 1088*m*, 1044*w*, 863*w*, 776*m*, 724*m* cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.67-2.89 (m, 6H, Methylen-1-H); 3.40-3.53 (m, 2H, Methylen-2-H); 3.54-3.71 (m, 4H, Methylen-2'-H); 3.81 (s, 3H, MeO-H); 6.86-6.96 (br. t, austauschbar mit D₂O, 1H, NH); 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H); 7.37 (t, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H); 7.55-7.82 (m, 6H, Ar-H); 7.98 (dd, J = 8.2 Hz, 1.3 Hz, 2H, Ar-H); 8.44 (t, J = 4.4 Hz, austauschbar mit D₂O, 2H, NH); 9.81 (s, austauschbar mit D₂O, 2H, NH), 11.0 (s, austauschbar mit D₂O, 1H)

MS: (MALDI⁺) für C₂₉H₃₃N₁₀O₆S₂⁺ (M+H⁺):

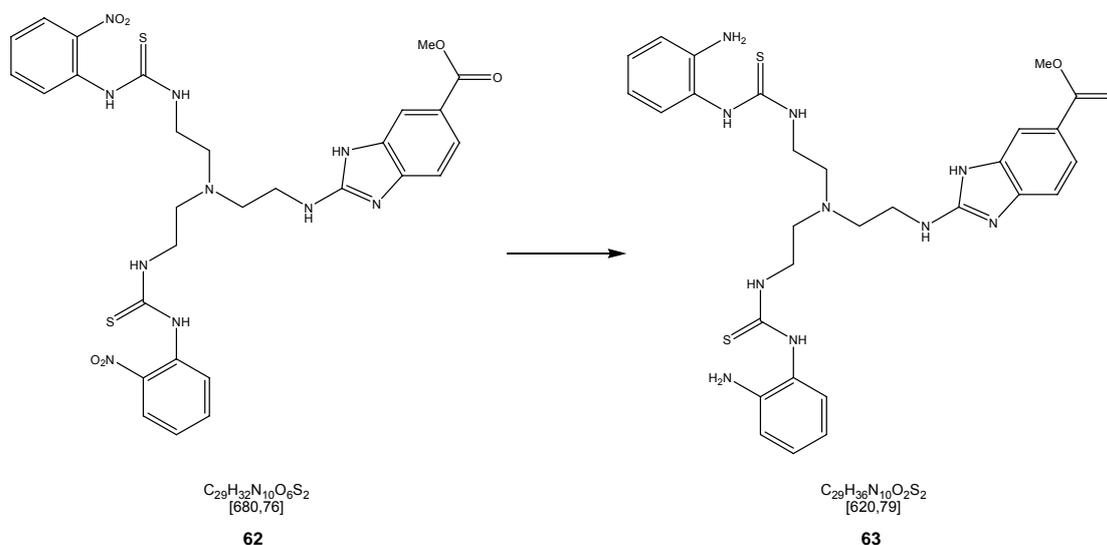
ber.: 681.2

gef.: 681.8

8.5.7 Synthese von 2-[2-{Bis-[2-[3-(2-

Aminophenyl)thioureido]ethyl}amino)

ethylamino]-3*H*-benzimidazol-5-carbonsäure-methylester **63**



Die Nitroverbindung **62** (1.00 g, 1.47 mmol) wurde in 50 mL NH₃-gesättigten MeOH gelöst. 20 % Pd auf Aktivkohle (200 mg) wurden unter Argon zugegeben und das Reaktionsgemisch im Autoklaven bei 50 bar Wasserstoffdruck für 5 h bei 60 °C gerührt. Der Katalysator wurde abzentrifugiert (6000 min⁻¹, 15 min) und der klare Überstand dekantiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Chromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / MeOH = 9:1, 1 % NH₃) erhielt man 635 mg (1.02 mmol, 70 %) des Produkts **63** als farblosen, amorphen Feststoff.

2-[2-{Bis-{2-[3-(2-Aminophenyl)thioureido]ethyl}amino)ethylamino]-3*H*-benzimidazol-5-Carbonsäure-Methylester **63**:

Schmp.: 120 °C

DC: EE / MeOH 5:1, 1 % NH₃, R_f = 0.4

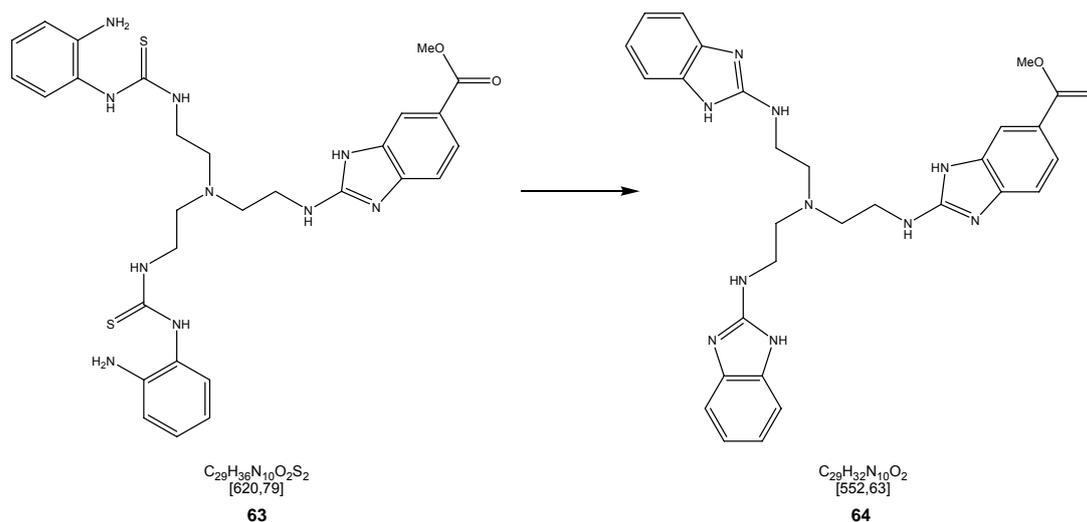
IR: (KBr) 3364s, 3055m, 2948m, 1694s, 1634s, 1602s, 1575s, 1464s, 1404w, 1362w, 1290s, 1271s, 1237m, 1210m, 1163w, 1117w, 1089w, 1059w, 1013w, 742m cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.59-2.76 (m, 6H, Methylen-1-H); 3.26-3.40 (m, 2H, Methylen-2-H); 3.43-3.57 (m, 4H, Methylen-2'-H); 3.82 (s, 3H, MeO-H); 4.85 (s, austauschbar mit D₂O, 4H, Ar-NH₂); 6.52-6.51 (dt, J = 7.5 Hz, 1.3 Hz, 2H, Ar-H); 6.77 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ar-H); 6.83 (br. s, austauschbar mit D₂O, 1H); 6.93-7.00 (m, 4H, Ar-H); 7.14-7.22 (m, 3H, 2H austauschbar mit D₂O, 1 Ar-H, 2 NH); 7.56-7.64 (m, 1H, Ar-H); 7.73 (d, J = 1.3 Hz, 1H); 8.95 (s, austauschbar mit D₂O, 2H, NH); 10.97 (br. s, austauschbar mit D₂O, 1H)

MS: (MALDI⁺) für C₂₉H₃₇N₁₀O₂S₂⁺ (M+H⁺):

ber.: 621.3

gef.: 623.0

8.5.8 Synthese von 2-(2-{Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-3*H*-benzimidazol-5-carbonsäure-methylester **64**

Zu einer refluxierenden Lösung des Thioharnstoffs **63** (582 mg, 0.94 mmol) mit einer katalytischen Menge Schwefel wurde unter Argongegenstrom in mehreren kleinen Portionen gelbes HgO (609 mg, 2.81 mmol) über einen Zeitraum von 8 h zugegeben. Dabei wurde nach jeder Zugabe gewartet, bis sich das Reaktionsgemisch schwarz gefärbt hatte. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Chromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / MeOH = 5:1, 1 % NH₃) erhielt man 218 mg (0.40 mmol, 58 %) des Trisbenzimidazolmethylesters **64** in Form eines hellbraunen Feststoffs.

2-(2-{Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)ethyl]amino}ethylamino)-3*H*-benzimidazol-5-Carbonsäure-Methylester **64**:

Schmp.: 155-158 °C

DC: EE / MeOH 3:1, 1 % NH₃, R_f = 0.1

IR: (KBr) 3312s, 2947s, 1686s, 1633s, 1603s, 1579s, 1464s, 1435m, 1401m, 1362m, 1289s, 1162m, 1117m, 1089m, 1058w, 1013w, 896w, 742s cm⁻¹

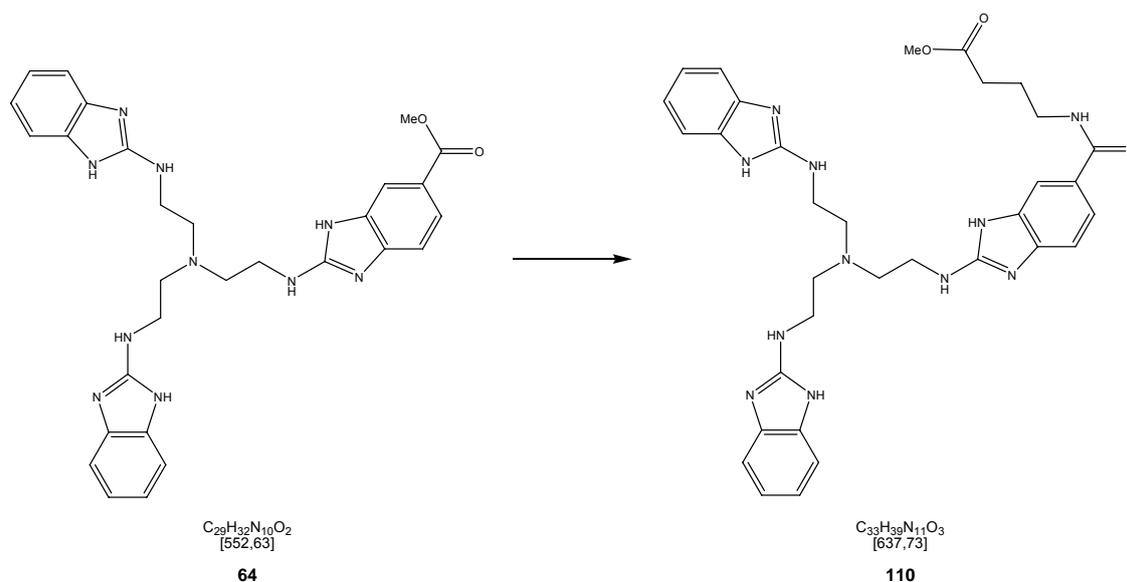
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.73-2.83 (m, 6H, Methylen-1-H); 3.34-3.51 (m, 6H, Methylen-2-H); 3.81 (s, 3H, Methyl-H); 6.77 (s, austauschbar mit D₂O 2H, NH); 6.87-6.92 (m, 4H, Ar-H); 7.00 (s, austauschbar mit D₂O 2H, 1H, NH); 7.11-7.19 (m, 5H, Ar-H); 7.59 (dd, J = 8.3 Hz, 1.7 Hz, 1H, Ar-H); 7.72 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H)

MS: (ESI⁺) für C₂₉H₃₃N₁₀O₂⁺ (M+H⁺):

ber.: 553.3

gef.: 553.5

8.5.9 Synthese von 4-[[2-(2-{Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)-3*H*-benzimidazol-5-carbonyl]-amino]-buttersäure-methylester **110**



Der Methylester **64** (138 mg, 0.25 mmol) wurde in 6 M. HCl (30 mL) aufgenommen und für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und man erhielt 162 mg (quant.) des Hydrochlorids der freien Säure (Spektrum s. Synthese der freien Säure des Trisbenzimidazols **46**).

Zu einer Lösung der freien Säure von **64** (161 mg, 0.25 mmol) und HOBT (114 mg, 0.75 mmol) in DMF (30 mL) tropfte man DIC (117 μ L, 0.75 mmol). Nach ca. 10 min gab man GABA-Methylester **41a** (Neutralverbindung) (58 mg, 0.50 mmol) zum Reaktionsgemisch. Es wurde 6 h bei 50 °C und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat / MeOH = 1:1, 1 % NH_3). Man erhielt 62 mg (0.09 mmol, 38 %) des GABA-Trisbenzimidazols **110**.

4-[[2-(2-{Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)-3*H*-benzimidazol-5-carbonyl]-amino]-Buttersäure-Methylester **110**:

DC: EE / MeOH 1:1, 1 % NH₃, R_f = 0.1

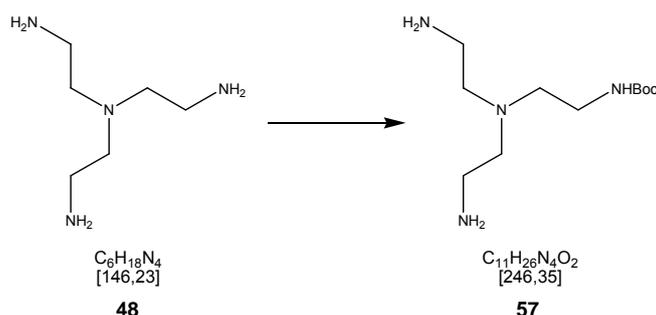
¹H-NMR: (250 MHz, CD₃OD): δ 1.86 – 1.97 (m, 2 H, GABA-Methylen-3-H); 2.42 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, GABA-Methylen-2-H); 2.86 (br. t, J = 6.1 Hz, 6 H, Tren-Methylen-1-H); 3.37 – 3.50 (m, 8 H, 2 GABA-Methylen-1-H, 6 Tren-Methylen-2-H); 3.64 (s, 3 H, Methyl-H); 6.90 – 6.98 (m, 4 H, Ar-H); 7.09 – 7.17 (m, 5 H, Ar-H); 7.46 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 1 H, Ar-H); 7.60 (d, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H)

MS: (ESI⁺) für C₃₃H₄₀N₁₁O₃⁺ (M+H⁺):

ber.: 638.3 gef.: 638.4

8.6 Synthese des Bisbenzimidazol-Trens

8.6.1 Synthese von 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl-bis-(2-aminoethyl)-amin **57**



Eine Lösung von Tris(2-aminoethyl)amin (3 mL, 20.06 mmol) in 150 mL abs. THF wurde auf 0 °C abgekühlt und in 100 mL abs. THF gelöstes Boc-ON (4.941g, 20.06 mmol) über einen Zeitraum von 2 h zugetropft. Es wurde über Nacht gerührt, wobei das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an wenig Kieselgel (Rohprodukt : Kieselgel 1:10, Ethylacetat / Methanol 1:1, 1 % NH₃) chromatographiert. Man erhielt 2,01 g (8.14 mmol, 41 %) **57** in Form eines zähen gelben Öls.

2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl-bis-(2-aminoethyl)-amin **57**:

DC: EE / MeOH 1:1, 1 % NH₃, R_f = 0.1 (färbt stark mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3298 m , 2974 s , 1691 s , 1578 s , 1365 s , 1314 m , 1252 m , 1172 s , 969 w , 868 w , 819 w , 780 w cm⁻¹

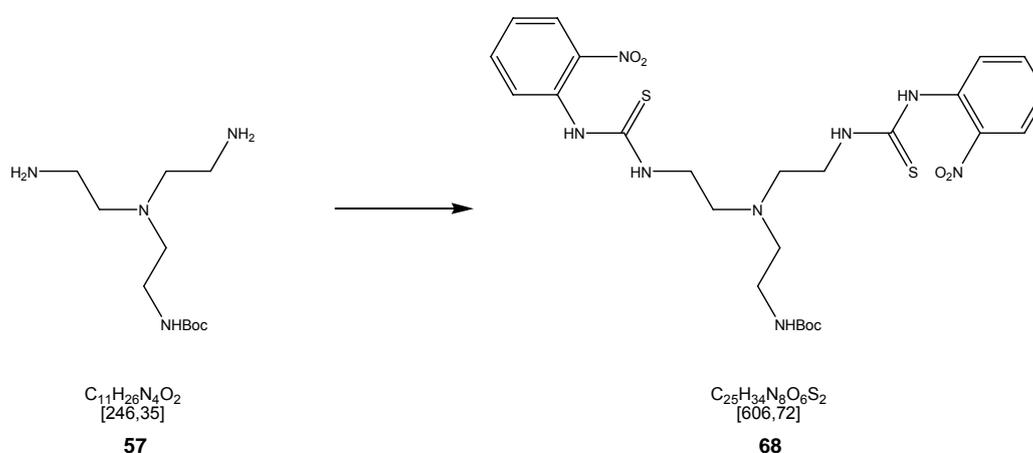
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl-H); 2.36 – 2.48 (m, 6H, Methylen-1-H); 2.50 – 2.54 (m, überlagert von DMSO, 4H, Methylen-2-H); 2.96 (dt, 2H, Methylen-2'-H); 6.79 (t, 1H, Boc-NH)

MS: (ESI⁺) für C₁₁H₂₇N₄O₂⁺ (M+H⁺):

ber.: 247.21

gef.: 246.9

8.6.2 Synthese von Bis-{2-[3-(2-nitrophenyl)-thioureido]-ethyl}-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **68**



Das Mono-Boc-Tren **57** (2000 mg, 8.12 mmol) wurde in 60 mL Methanol aufgenommen und mit 20 mL NEt₃ versetzt. Dazu gab man eine Lösung von 2-Nitrophenylisothiocyanat **68** (3.66 g, 20.30 mmol) in 30 mL Methanol und 10 mL NEt₃. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat / Hexan 2:1, 1 % NEt₃), worauf man 3.80 g (6.27 mmol, 77 %) des Bis-Nitrophenylthioharnstoffderivats **68** in Form eines gelben Schaums erhielt.

Bis-{2-[3-(2-nitro-phenyl)-thioureido]-ethyl}-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **68**:

DC: EE / Hexan 1:1, R_f = 0.2 (UV-aktiv, färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3309m, 2975m, 2932m, 1685s, 1608s, 1584m, 1508s, 1457m, 1341s, 1280s, 1164s, 1043m, 864w, 781m, 726m cm⁻¹

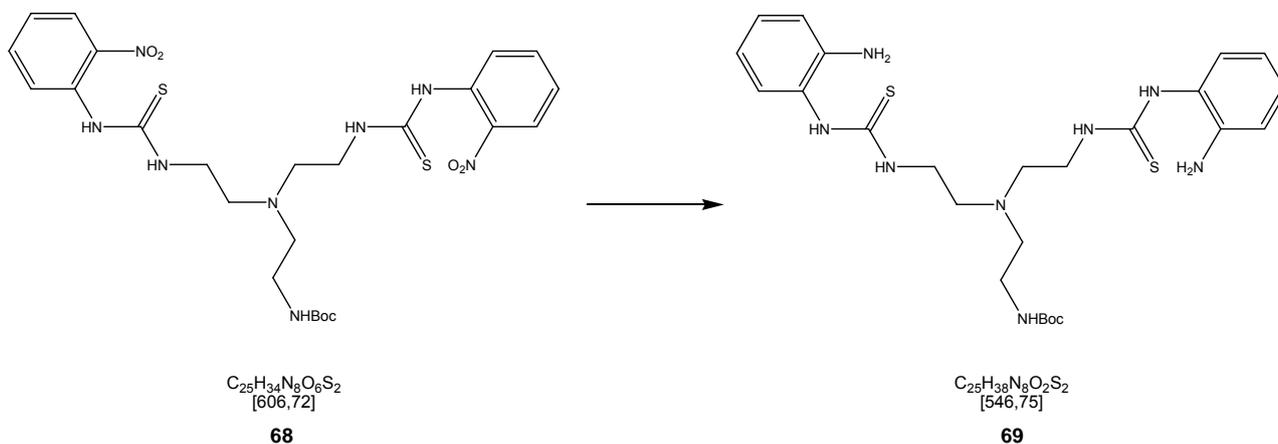
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.36 (s, 9H, *tert*-Butyl-H); 2.58 (t, J = 6.8 Hz; 2H, Methylen-1-H); 2.70 (t, J = 6.0 Hz, 4H, Methylen-1'-H); 2.97 – 3.00 (m, nach Zugabe von D₂O Signalvereinfachung zu t, 2H, Methylen-2-H); 3.48 – 3.63 (m, nach Zugabe von D₂O Signalvereinfachung zu t, 4H, Methylen-2'-H); 6.72 (t, J = 5.4 Hz, austauschbar mit D₂O, 1H, Boc-NH); 7.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 7.67 (t, J = 7.2 Hz, 2H, Ar-H); 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H); 7.99 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H); 8.34 (t, J = 4.9 Hz, austauschbar mit D₂O, 2H, Thioharnstoff-NH); 9.72 (s, austauschbar mit D₂O, 2H, Thioharnstoff-NH)

EA: für C₂₅H₃₄N₈O₆S₂:

ber.: C49.49 H5.65 N18.47

gef.: C49.63 H5.71 N18.33

8.6.3 Synthese von Bis-{2-[3-(2-aminophenyl)-thioureido]-ethyl}-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **69**



800 mg (1.32 mmol) des Bis-Nitrophenylthioharnstoffderivats **68** wurden zusammen mit 200 mg Pd auf Aktivkohle (25 % m/m) unter einem Argonstrom in 50 mL mit Ammoniak gesättigtem MeOH aufgeschlämmt. Das Reaktionsgemisch wurde im Autoklaven für 2 h bei 40 °C und 50 bar Wasserstoffdruck hydriert. Nach Filtration des Reaktionsgemischs über Celite und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat / Hexan = 5:1, 1 % NEt_3) und man erhielt 407 mg (0.74 mmol, 56 %) des Bis-Aminophenylthioharnstoffs **69** in Form eines farblosen Schaums.

Bis-{2-[3-(2-amino-phenyl)-thioureido]-ethyl}-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **69**:

DC: EE / Hexan 5:1, 1 % NEt₃, R_f = 0.3 (UV-aktiv, färbt mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3404*m*, 3319*m*, 2974*m*, 2937*m*, 1691*s*, 1618*m*, 1522*s*, 1498*s*, 1476*m*, 1449*m*, 1392*m*, 1365*m*, 1311*m*, 1353*m*, 1158*m*, 1126*m*, 1104*m*, 869*w*, 806*w*, 764*m*, 749*m*, 676*w*, 651*w*, 614*w* cm⁻¹

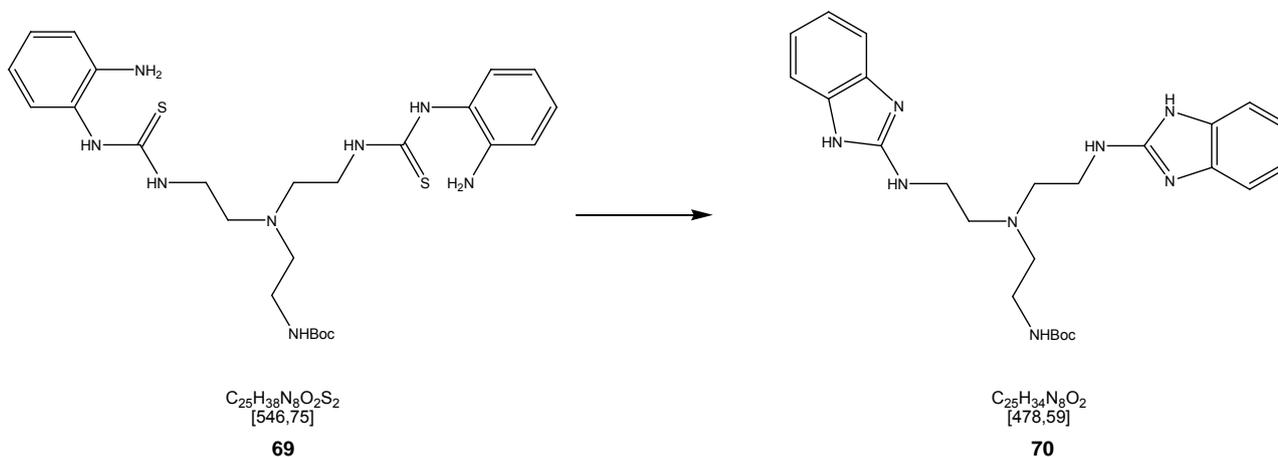
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.37 (s, 9H, *tert*-Butyl-H); 2.47 (t, überlagert von DMSO, J = 6.9 Hz, 2H, Methylen-1-H); 2.58 (t, J = 6.3 Hz, 4H, Methylen-1'-H); 2.85 – 2.98 (m, 2H, Methylen-2-H); 3.37 – 3.52 (m, 4H, Methylen-2'-H); 4.80 (s, austauschbar mit D₂O, 4H, Ar-NH₂); 6.54 – 6.64 (m, teilweise austauschbar mit D₂O, 3H, 2 Ar-H und ein Boc-NH); 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 2H, Ar-H); 6.93 – 7.02 (m, 4H, Ar-H); 7.11 (br. s., austauschbar mit D₂O, 2H, Thioharnstoff-NH); 8.91 (s, austauschbar mit D₂O 2H, Thioharnstoff-NH)

EA: für C₂₅H₃₈N₈O₂S₂:

ber.: C54.92 H7.01 N20.49

gef.: C54.68 H7.01 N20.25

8.6.4 Synthese von Bis-[2-1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **70**



Zu einer refluxierenden Lösung des Thioharnstoffs **69** (209 mg, 0.38 mmol) mit einer katalytischen Menge Schwefel wurde unter Argongegenstrom in mehreren kleinen Portionen gelbes HgO (331 mg, 1.53 mmol) über einen Zeitraum von 8 h zugegeben. Dabei wurde nach jeder Zugabe gewartet, bis sich das Reaktionsgemisch schwarz gefärbt hatte. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Chromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / MeOH = 9:1, 1 % NH₃) erhielt man 153 mg (0.33 mmol, 84 %) des Boc-geschützten Bisbenzimidazol-Trens **70** in Form eines rötlichen, amorphen Feststoffs.

Bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-2-(*tert*-butoxy-carbonylamino)ethyl-amin **70**:

DC: EE / MeOH 9:1, 1 % NH₃, R_f = 0.48 (UV-aktiv, färbt mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3379*m*, 3055*m*, 2975*m*, 1687*m*, 1633*s*, 1604*s*, 1584*s*, 1512*m*, 1464*s*, 1392*m*, 1366*m*, 1270*s*, 1167*m*, 1061*m*, 1012*m*, 917*w*, 856*w*, 760*m*, 742*m*, 618*w* cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.32 (s, 9H, *tert*-Butyl-H); 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, Methylen-1-H); 2.70 (t, J = 6.3 Hz, 4H, Methylen-1'-H); 2.92- 3.08 (m, 2H, Methylen-2-H); 3.30 – 3.38 (m, 4H, Methylen-4'-H); 6.46 (t, J = 4.5 Hz, austauschbar mit D₂O, 2H, NH); 6.78 (t, J = 5.9 Hz, austauschbar mit D₂O, 1H, Boc-NH); 6.78 – 6.87 (m, 4H, Ar-H); 7.07 – 7.15 (m, 4H, Ar-H); 10.83 (br. s, austauschbar mit D₂O, 2H, Ring-NH)

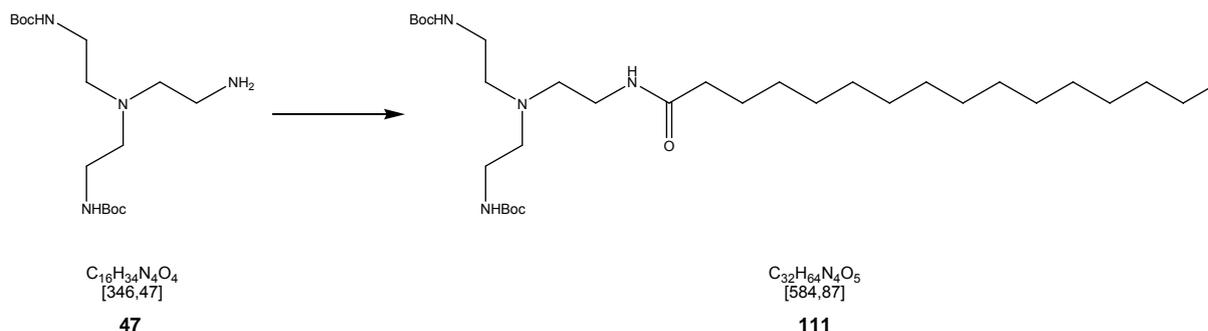
MS: (ESI⁺) für C₂₅H₃₅N₈O₂⁺ (M+H⁺):

ber.: 479.3

gef.: 479.3

8.7 Synthese der Palmitoylverbindungen

8.7.1 Synthese von Palmitoyl{2-bis-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-amino}ethyl}-amid **111**



Bisboc-Tren **47** (460 mg, 1.38 mmol) wurde in DCM gelöst (40 mL) und DIEA (250 μ L, 1.46 mmol) zugegeben. Dazu tropfte man bei RT eine Lösung von Palmitinsäurechlorid (402 μ L, 1.328 mmol) mit einer katalytischen Menge DMAP. Anschließend wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt zwischen Hexan und H₂O verteilt. Die wässrige Phase wurde noch ein Mal mit Hexan gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man das Bisbocpalmitoyl-Tren **111** (755 mg, 97 %) in Form eines gelblichen, zähen Öls.

Palmitoyl{2-bis-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-amino}ethyl}-amid **111**:

DC: EE / Hex 1 : 1, 1 % NEt₃, R_f = 0.3 (färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3312_w, 2925_s, 2854_m, 1700_s, 1654_m, 1534_m, 1458_w, 1391_w, 1365_m,
1251_w, 1174_s, 670_w cm⁻¹

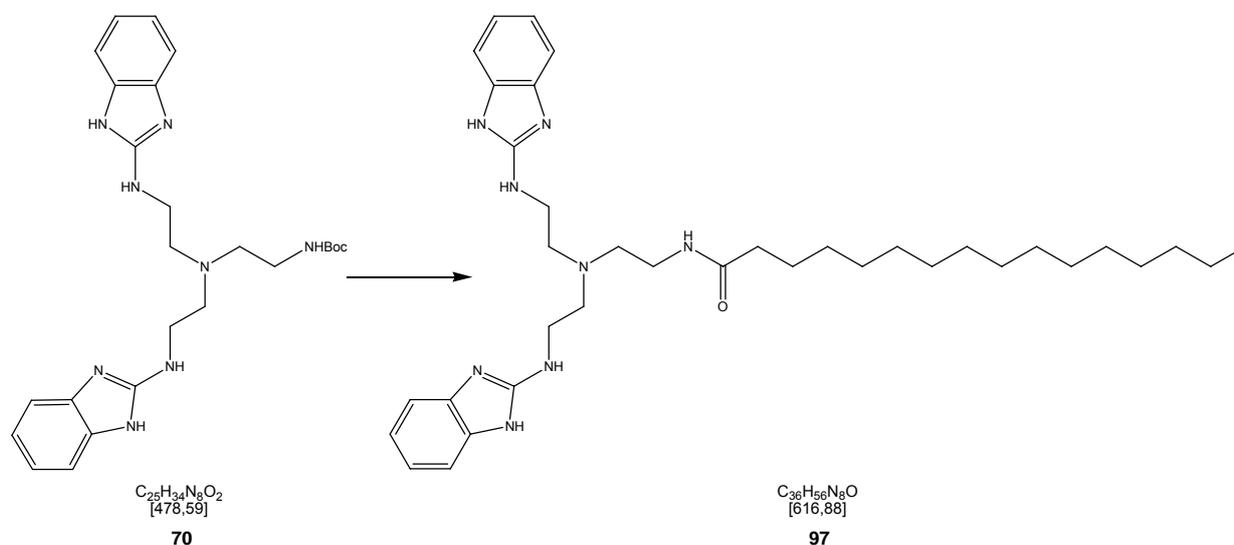
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.87 (t, 3H, $J = 6.4$, C-16-H); 1.19 – 1.31 (m, 24H, C-13-H – C-4-H); 1.39 (s, 18H, tert-Butyl-H); 1.48 – 1.54 (m, 2H, C-3-H); 2.06 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, C-2-H); 2.41 – 2.46 (m, 6H, Methylen-1-H); 2.90 – 2.98 (m, 4H, Methylen-2-H); 3.04 (dt, 2H, Methylen-2'-H); 6.66 (br. t, 2H, Boc-NH); 7.63 (br. t, 1H, Amid-NH)

MS: (ESI $^+$) für $\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_5^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 585.5

gef.: 585.2

8.7.2 Synthese von Palmitoyl-(2-{bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethyl)-amid **97**



Bisbenzimidazol-Tren **70** (116 mg, 0.24 mmol) wurde in Methanol gelöst und mit SOCl_2 (89 μL , 1 mmol) versetzt. Die Lösung wurde für 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das quantitativ erhaltene freie Amin ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Hierzu wurde Palmitoylchlorid (112 μL , 0.37 mmol) in DMF vorgelegt (8 mL) und mit Hünig-Base (252 μL , 1.48 mmol), HOBt (56 mg, 0.37 mmol) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt. Das in 2 mL DMF gelöste Amin wurde zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt zwischen H_2O und DCM verteilt. Nach Waschen der wässrigen Phase mit DCM wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde präparativer HPLC unterzogen und man erhielt 100 mg des Bisbenzimidazol-Palmitoyl-Trens **97** (0.16 mmol, 67 %)

Palmitoyl-(2-{bis-[2-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-ethyl]-amino}-ethyl)-amid **97**:

DC: EE/MeOH 5:1, 1 % NEt_3 , $R_f = 0.2$

IR: (KBr) 3424*m*, 2923*s*, 2853*m*, 1685*s*, 1560*w*, 1466*w*, 1204*s*, 1137*s*, 780*w*, 743*w*, 722*w*, 620*w* cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, CD_3OD) δ 0.81 (t, 3H, $J = 6.2$ Hz, C-16-H); 1.00 – 1.40 (m, 26H, C-15-H – C-3-H); 2.00 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, C-2-H); 3.32 (br. t, 2H, Methylen-2-H); 3.43 – 3.64 (m, 6H, Methylen-1-H); 3.78 – 3.97 (m, 4H, Methylen-2'-H); 7.14 – 7.24 (m, 4H, Ar-H); 7.25 – 7.40 (m, 4H, Ar-H)

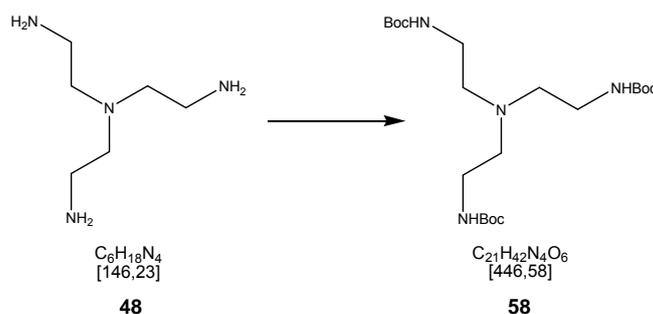
MS: (ESI⁺) für $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_8\text{O}^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 617.5

gef.: 617.6

8.8 Zur Synthese des trimethylierten Trisbenzimidazols

8.8.1 Synthese von Tris-[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]amin **58**



In 40 mL Dichlormethan wurde Tren (1.5 mL, 10.02 mmol) vorgelegt und bei RT eine Lösung von Boc-Anhydrid (10.94 g, 50.10 mmol) zugetropft. Dabei war nach kurzer Zeit eine weiße Trübung des Reaktionsgemischs zu beobachten. Es wurde über Nacht bei RT gerührt, wobei die Lösung wieder klar wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man ein farbloses Öl, das in wenig Ethylacetat aufgenommen und mit Hexan zur Kristallisation gebracht wurde. Nach Umkristallisieren aus Ethylacetat / Hexan erhielt man 4.39 g (9.84 mmol, 98 %) des Trisboc-Trens **58**.

Tris-[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]amin **58**:

Schmp.: 97 °C

DC: EE / Hexan 2:1, 1 % NEt₃, R_f = 0.4 (färbt nach Räuchern mit HCl mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 3346s, 3977s, 2933s, 2810s, 2742w, 1694s, 1542s, 1511s, 1457s, 1435m, 1391s, 1366s, 1299s, 1277s, 1244s, 1172s, 1070m, 1036m, 1011s, 982m, 928w, 862m, 782m, 758w, 648m cm⁻¹

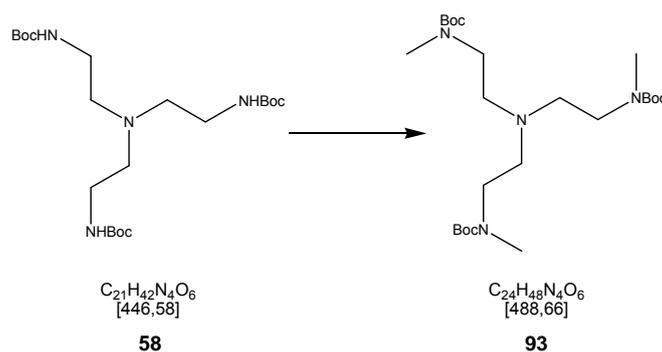
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.38 (s, 27H, *tert*-Butyl-H); 2.41 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H, Methylen-1-H); 2.93 (q, bei Zugabe von D_2O Signalvereinfachung zu t, $J = 5.8$ Hz, 6H, Methylen-2-H); 6.68 (br. s, austauschbar mit D_2O , 3H, Boc-NH)

EA: für $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$:

ber.: C56.48 H9.48 N12.55

gef.: C56.48 H9.37 N12.56

8.8.2 Synthese von Tris-[2-(*tert*-butoxycarbonyl-methyl-amino)ethyl]-amin **93**



Zu einer Lösung von Tris-boc-Tren **58** (3 g, 6.71 mmol) in 60 mL abs. THF tropfte man bei 0 °C *n*-BuLi (21 mL, 1.6M in THF, 33.59 mmol). Es wurde bei RT für 20 min gerührt. Daraufhin kühlte man das Reaktionsgemisch erneut auf 0 °C ab und tropfte Methyljodid (2.1 mL, 33.59 mmol) dazu. Anschließend wurde für 8 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 60 mL halbkonz. Ammoniaklösung versetzt und zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat : Hexan = 2:1, 1 % NEt_3) und man erhielt 2.35 g (4.81 mmol, 72 %) des Trismethyltris-boc-Trens **93** in Form eines gelblichen Öls.

Tris-[2-(*tert*-butoxycarbonyl-methyl-amino)ethyl]amin **93**:

DC: EE / Hexan 2:1, 1 % NEt₃, R_f = 0.4 (färbt nach Räuchern mit HCl schwach mit Ninhydrin)

IR: (KBr) 2975_m, 1693_s, 1482_s, 1393_s, 1366_s, 1250_m, 1161_s, 1047_w, 883_m, 773_m cm⁻¹

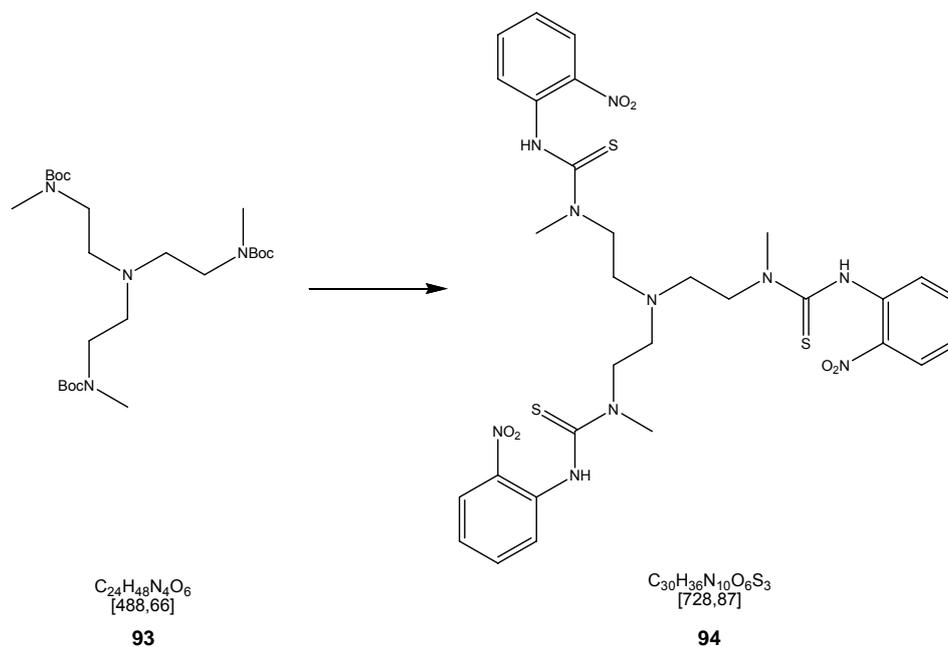
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.40 (s, 27H, *tert*-Butyl-H); 2.57 (t, 6H, Methylen-1-H); 2.79 (s, 9H, N-Methyl-H); 3.17 (t, 6H, Methylen-2-H)

MS: (ESI⁺) für C₂₄H₄₈N₄O₆⁺ (M+H⁺):

ber.: 488.4

gef.: 489.3

8.8.3 Synthese von Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-nitrophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin **94**



Zum Entschützen des Trismethyltrisboc-Trens **93** (1.23 g, 2.51 mmol) wurde es in 50 mL MeOH aufgenommen und bei 0 °C Thionylchlorid (1.82 mL, 25.90 mmol) zugetropft. Es wurde 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man in quantitativer Ausbeute Trismethyl-Tren als Trishydrochlorid. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Hierzu wurde es in 40 mL Methanol aufgenommen und 10 mL NEt_3 zugesetzt. Zu dieser Lösung gab man Nitrophenylisothiocyanat (2.11 g, 11.72 mmol) in 40 mL MeOH / 10 mL NEt_3 . Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufnehmen des Rohprodukts in wenig Ethylacetat war es möglich, das Produkt durch Zugabe von EtOH zu fällen. Der so erhaltene gelbe Feststoff von gummiartiger Konsistenz wurde anschließend an Kieselgel (Ethylacetat / Hexan = 1:1, 1 % NEt_3) chromatographiert, worauf man 1.62 g (30.13 mmol, 83 %) des gelben, amorphen Feststoffs **94** erhielt.

Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-nitrophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin **94**:

DC: EE / Hexan 2:1, 1 % NEt₃, R_f = 0.4 (UV-aktiv)

IR: (KBr) 3334w, 2928w, 1734w, 1608m, 1586m, 1506s, 1449m, 1381m, 1340s, 1271s, 1158m, 1109w, 1042w, 946w, 870w, 780w, 730m cm⁻¹

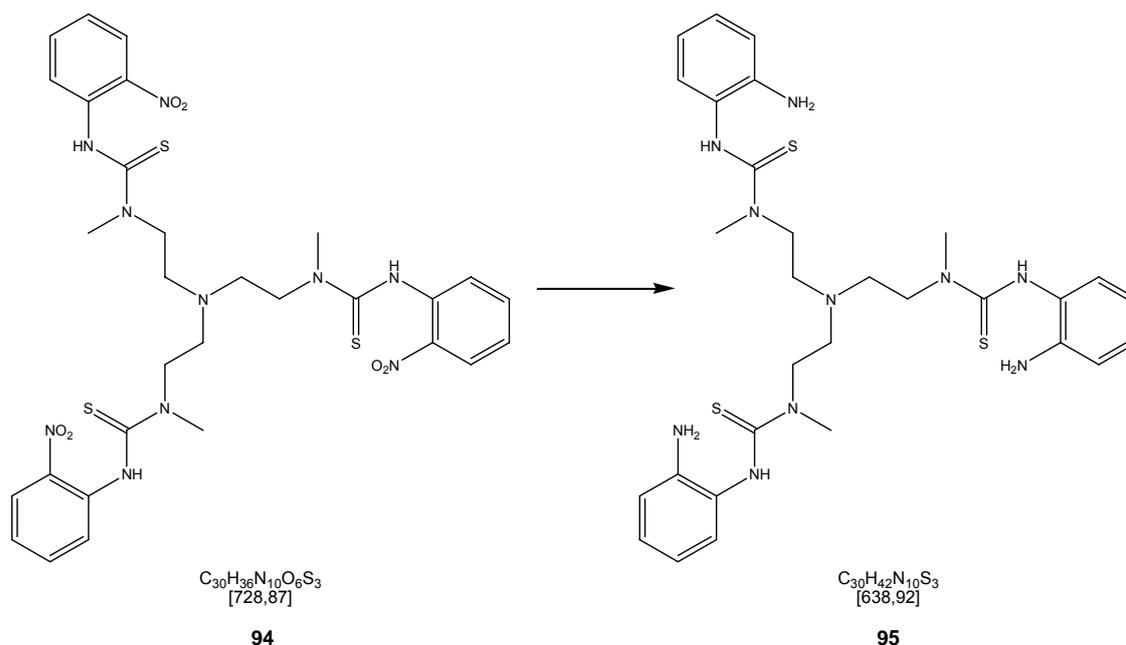
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.89 (t, J = 6.1 Hz, 6H, Methylen-1-H); 3.29 (s, 9H, N-Methyl-H); 3.91 (t, J = 7.0 Hz, 6H, Methylen-2-H); 7.37 – 7.48 (m, 6H, Ar-5-H und Ar-6-H); 7.67 (t, J = 8.0 Hz, 3H, Ar-4-H); 7.97 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar-3-H); 9.49 (br. s, austauschbar mit D₂O, 3H, Thioharnstoff-NH)

EA: für C₃₀H₃₆N₁₀O₆S₃:

ber.: C49.44 H4.98 N19.22

gef.: C49.38 H5.17 N19.13

8.8.4 Synthese von Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-aminophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin **95**



In einer ausgeheizten Apparatur wurde unter Argonatmosphäre der Nitrophenylthioharnstoff **94** (1000 mg, 1.37 mmol) in 60 mL MeOH gelöst und darin Samarium (40 mesh, 4.95 g, 32.93 mmol) und NH_4Cl (2.20 g, 41.16 mmol) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h mit Ultraschall behandelt und über Celite abfiltriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat / MeOH = 30:1 → 9:1, 1 % NH_3) und man erhielt das Aminoderivat **95** (361 mg, 0.57 mmol, 41 %) in Form eines farblosen, amorphen Feststoffs.

Tris-{2-[1-Methyl-3-(2-aminophenyl)-thioureido]-ethyl}-amin **95**:

DC: EE / MeOH 9:1, 1 % NH₃, R_f = 0.4 (färbt mit Ninhydrin, UV-aktiv)

IR: (KBr) 3317*m*, 2926*w*, 1619*m*, 1523*s*, 1458*m*, 1382*m*, 1344*s*, 1155*m*, 954*w*,
743*m*, 670*w* cm⁻¹

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.85 (t, J = 6.8 Hz, 6H, Methylen-1-H); 3.24 (s, 9H, N-Methyl-H); 3.90 (t, J = 6.0 Hz, 6H, Methylen-2-H); 4.74 (s, austauschbar mit D₂O, 6H, Ar-NH₂); 6.54 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar-H); 6.71 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar-H); 6.87 – 6.95 (m, 6H, Ar-H); 8.7 (br. s, austauschbar mit D₂O, Ring-NH)

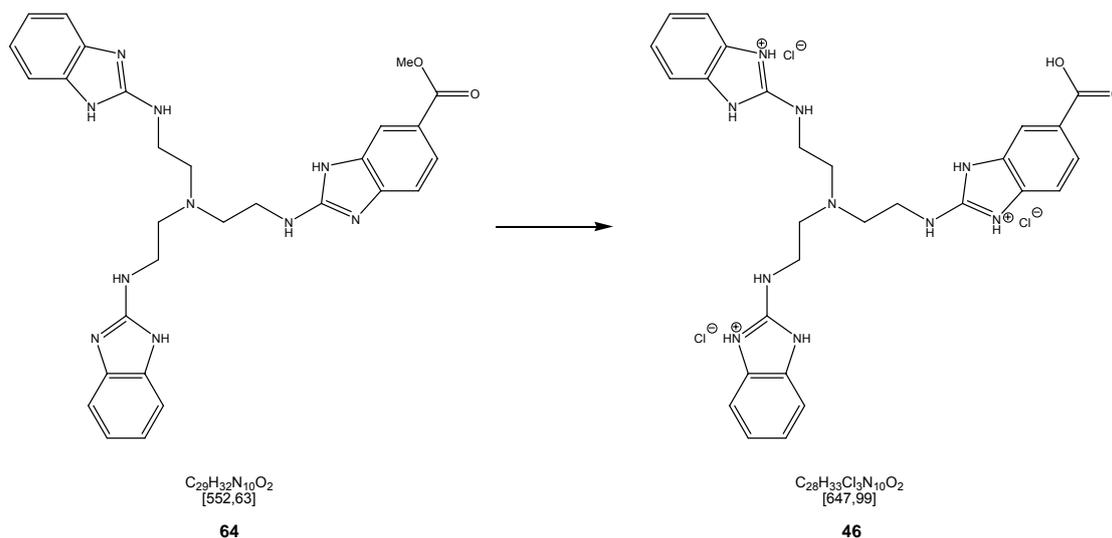
MS: (ESI⁺) für C₃₀H₄₃N₁₀S₃⁺ (M+H⁺):

ber.: 639.2

gef.: 639.4

8.9 Synthese der Peptidkonjugate

8.9.1 Synthese der freien Säure des Trisbenzimidazols **46**



Die freie Säure des Trisbenzimidazols **46** wurde durch Refluxieren des Methylesters **64** (230 mg, 0.37 mmol) in 30 mL 6M HCl für 2 h erhalten. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 277 mg (quant.) des Trishydrochlorids **46**. Dieses wurde nach NMR-Kontrolle ohne weitere Aufreinigung mit Oligopeptid oder Oligonucleotid gekuppelt.

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, CD_3OD): δ 3.90 (m, 6 H, Methylen-1-H), 4.19 (m, 6 H, Methylen-2-H), 7.33 (m, 8 H, Ar-H), 7.43 (m, 1 H, Ar-H), 7.96 (m, 1 H, Ar-H), 7.99 (m, 1 H, Ar-H)

MS: (ESI $^+$) für $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_{10}\text{O}_2^+$ (M+H $^+$):

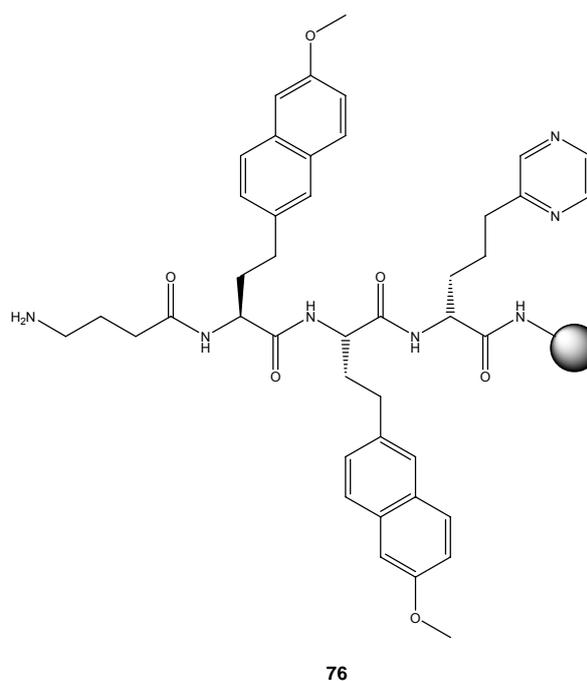
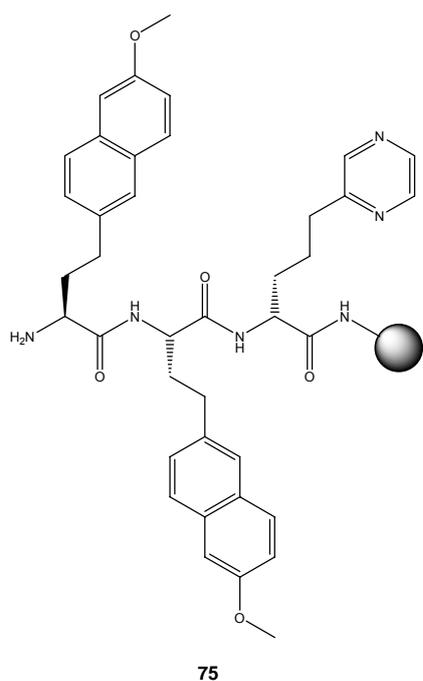
ber.: 539.3

gef.: 539.2

Schütteln mit 2 mL 25 % Piperidin in DMF für 20 min abgespalten. Nach erneutem Spülen mit DMF wurde auf DCM umgestellt (s. o.) und die Harzkugeln im Vakuum getrocknet. Auch das trägergebundene, Pmc-geschützte Trisarginin-GABA **72** war über mehrere Wochen im Kühlschrank lagerbar.

Die Synthese von Trisarginin und Trisarginin-GABA wurde analog auch mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH durchgeführt.

8.9.3 Synthese des Tripeptids **75** und des GABA-Tripeptids **76**



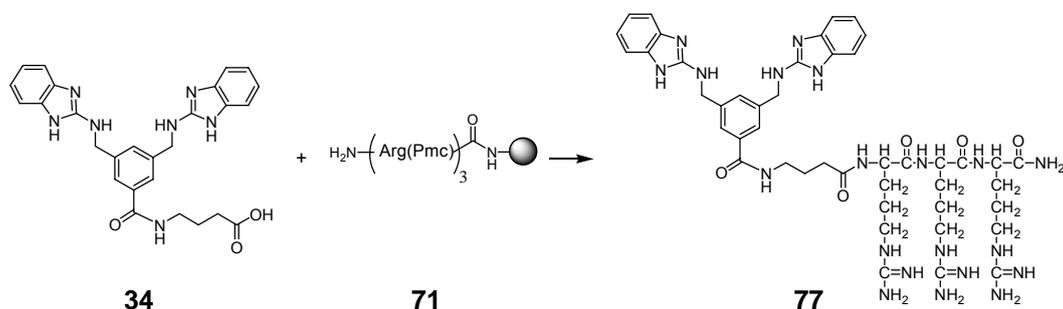
100 mg Rink-Amid-Harz (0.64 mM / g, 0.064 mmol) wurden in einer Spritze mit Filtereinsatz mit 2 mL DCM für 15 min zum Quellen gebracht. Es wurde drei Mal mit je 2mL DMF gespült (15, 10, 5 min).

Für den ersten Kupplungsschritt wurde eine Lösung der Fmoc-Piperaziny-Aminosäure **74** (40 mg, 0.096 mmol), HOBt (20 mg, 0.128 mmol) und DIC (20 μ L, 0.128 mmol) in 2 mL DMF

in die Spritze aufgezogen und für 3 h geschüttelt. Nach Spülen mit DMF wurden einige Harzkügelchen entnommen und ein Kaiser-Test durchgeführt, um die Vollständigkeit der Kupplung sicherzustellen. Daraufhin wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch 2 mL einer 25 %igen Piperidinlösung in DMF abgespalten (20 min Schütteln). Schließlich wurde mit DMF gespült.

Die zwei nachfolgenden Kupplungsschritte wurden mit Lösungen der Fmoc-Methoxynaphtyl-Aminosäure **73** (je 50 mg, 0.104 mmol), HOBt ((20 mg, 0.128 mmol) und DIC (20 μ L, 0.128 mmol) in 2 mL DMF in analoger Weise durchgeführt. Vor Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe überprüfte man den Erfolg der Kupplung jeweils mit einem Kaiser-Test. Nach Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde auf DCM umgestellt (je 2 mL, 15, 10, 5 min) und die Harzkügelchen im Vakuum getrocknet. Man erhielt das trägergebundene Tripeptid **75**. Dieses war im Kühlschrank lagerbar und wurde für die Kupplungsversuche aliquotiert.

Das GABA-gekuppelte Tripeptid erhielt man, indem man trägergebundenes Tripeptid **75** (0.032 mmol) mit einer Kupplungslösung aus 4-Fmoc-4-Aminobuttersäure (21 mg, 0.064 mmol), HOBt (15 mg, 0.096 mmol) und DIC (15 μ L, 0.096 mmol) für 3 h schüttelte. Nachdem wie oben beschrieben mit DMF gespült und durch einen negativen Kaiser-Test die Vollständigkeit der Kupplung festgestellt worden war, wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch Schütteln mit 2 mL 25 % Piperidin in DMF für 20 min abgespalten. Nach erneutem Spülen mit DMF wurde auf DCM umgestellt (s. o.) und die Harzkugeln im Vakuum getrocknet. Auch das trägergebundene GABA-Tripeptid **76** war über mehrere Wochen im Kühlschrank lagerbar.

8.9.4 Synthese des Bisbenzimidazol-Trisarginin-Konjugats **77**

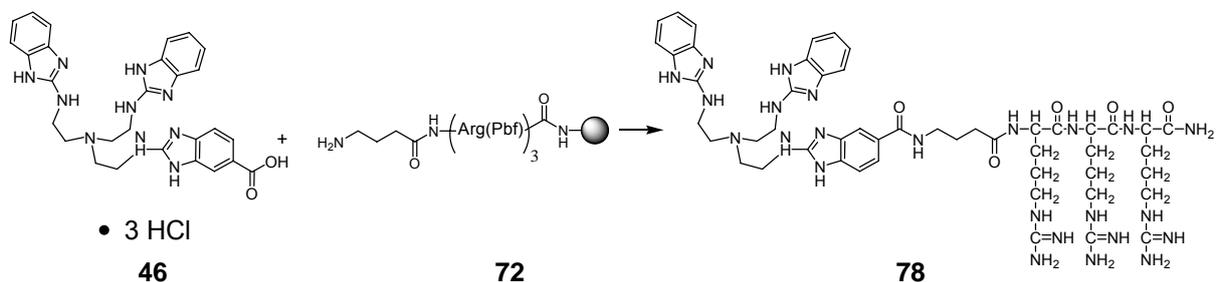
Ein Aliquot trägergebundenes, Pmc-geschütztes Trisarginin **71** (0.055 mmol) wurde in eine Spritze mit Filtereinsatz gegeben und das Trägermaterial in 2mL DCM (20 min) quellen gelassen. Es wurde auf DMF umgestellt (je 2 mL; 15, 10, 5 min) und mit einer Kupplungslösung aus Bisbenzimidazolderivat **34** (53 mg, 0.07 mmol), HOBt (25 mg, 0.165 mmol) und DIC (26 μ L, 0.165 mmol) über Nacht geschüttelt. Nach Spülen mit DMF (je 2 mL, 15, 10, 5 min) wurde ein Kaiser-Test durchgeführt, der ein positives Ergebnis brachte. Daraufhin wurde die Kupplungslösung noch einmal mit DIC (26 μ L, 0.165 mmol) versetzt und erneut über Nacht gekuppelt. Dann spülte man mit DMF, stellte auf DCM um und trocknete das Trägermaterial im Vakuum.

Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste wurde mit folgender Abspalllösung durchgeführt: 1630 μ L TFA, 100 μ L Thioanisol, 100 μ L H₂O, 50 μ L Ethandithiol, 20 μ L Triisopropylsilan, eine Microspatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 4.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspalllösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit 2 mL TFA gespült, die ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurden. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min⁻¹, 15 min,

4 °C) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H₂O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgeläße überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung (Reprosil RP 18-AQ, 250 x 25; 0.1 % TFA : ACN = 77 : 33) erhielt man das reine Bisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **77** (5 mg, 0.005 mmol, 9 %).

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.38 – 1.58 (m, 8H, Arg-C-4-H und Butyryl-C-4-H); 1.59 – 1.77 (m, 6H, Arg-C-3-H); 2.13 – 2.23 (m, 2H, Butyryl-C-2-H); 3.02 – 3.13 (m, 6H, Arg-C-5-H); 3.21 (dt, J = 7.7 Hz, 2H, Butyryl-C-4-H); 4.13 – 4.28 (m, 3H, Arg-C-2-H); 4.68 (d, J = 5.9 Hz, bei Zugabe von D₂O Signalvereinfachung zu s, 4H, benzyl.-H); 6.80 – 7.50 (sehr br., Arg-NH); 7.10 (s, austauschbar mit D₂O, 2H, N-H); 7.11 – 7.27 (m, 4H, Ar-H); 7.32 – 7.39 (m, 4H, Ar-H); 7.42 (s, austauschbar mit D₂O, 1H, N-H); 7.60 (s, 1H, Ar-C-4-H); 7.62 – 7.69 (m, austauschbar mit D₂O, 3H, N-H); 7.85 (s, 2H, Ar-C-2-H und Ar-C-6-H); 7.91 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Peptid-NH); 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Peptid-NH); 8.60 (t, J = 5.4 Hz, 1H Amid-NH); 9.47 – 9.61 (br. s, austauschbar mit D₂O 2H, Ring-NH)

MS: (MALDI⁺) für C₄₅H₆₅N₂₀O₅⁺ (M+H⁺):
ber.: 965.5 gef.: 965.9

8.9.5 Synthese des Trisbenzimidazol-Trisarginin-Konjugats **78**

Ein Aliquot trägergebundenes, Pbf-geschütztes Trisarginin-GABA (0.078 mmol) wurde in eine mit einem Filtereinsatz versehene Spritze gegeben und die Harzkügelchen wurden mit 2 mL DCM zum Quellen gebracht (20 min). Daraufhin wurde auf DMF umgestellt (je 2 mL, 15, 10, 5 min) und schließlich eine Kupplungslösung von Trisbenzimidazol **46** (240 mg, 0.37 mmol), HOBt (63 mg, 0.47 mmol) und DIC (72 μ L, 0.47 mmol) in 2 mL DMF auf die Spritze gezogen. Es wurde für 2 d geschüttelt. Ein anschließender Kaiser-Test zeigte, dass die Kupplung nicht vollständig verlaufen war. Daher wurde noch einmal DIC (24 μ L, 0.16 mmol) zur Kupplungslösung gegeben und über Nacht nachgekuppelt. Es wurde mit DMF gespült, auf DCM umgestellt und anschließend im Vakuum getrocknet.

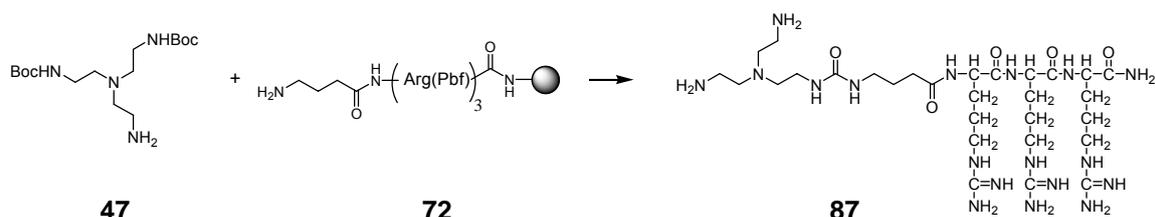
Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste wurde mit folgender Abspalllösung durchgeführt: 1650 μ L TFA, 100 μ L Thioanisol, 50 μ L H₂O, 50 μ L Ethandithiol, eine Microspatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspalllösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit 2 mL TFA gespült, die ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurden. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min⁻¹, 15 min, 4 °C) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und

wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H₂O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgläser überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung (Reposil AQ-RP 18, 250 x 20; 0.1 % TFA : ACN = 79 : 21) erhielt man das Trisbenzimidazol-Trisargininkonjugat **78** (9 mg, 0.008 mmol, 10 %).

MS: (MALDI⁺) für C₅₀H₇₅N₂₄O₅⁺ (M+H⁺):

ber.: 1090.6 gef.: 1090.8

8.9.6 Synthese des Tren-Trisarginin-Konjugats **87**

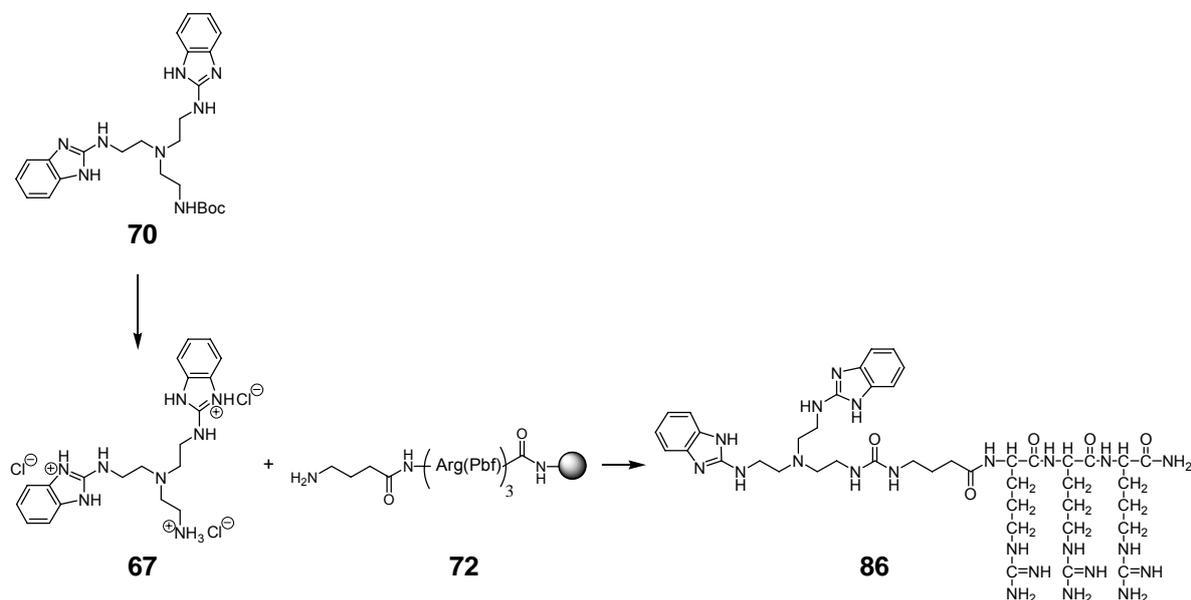


Ein Aliquot des trägergebundenen, Pbf-geschützten Trisarginin-GABA **72** (0.078 mmol) wurde in eine Spritze mit Filtereinsatz gegeben und die Harzkügelchen mit 2 mL DCM zum Quellen gebracht (20 min). Dann wurde eine Lösung von CDI (63 mg, 0.39 mmol) in 2 mL DCM aufgezogen und für 3 h geschüttelt. Nach Spülen mit DCM (je 2 mL, 15, 10, 5 min) zog man eine Kupplungslösung aus Bis-boc-Tren **47** (189 mg, 0.55 mmol) auf die Spritze und schüttelte über Nacht. Einem weiteren Spülschritt mit DCM folgte Trocknung des Trägermaterials im Vakuum.

Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste sowie des konjugierten Trens wurde mit folgender Abspaltlösung durchgeführt: 1650 µL TFA, 100 µL Thioanisol, 50 µL H₂O, 50 µL Ethandithiol, eine Microspatelspitze Phenol. Die Lösung wurde

auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspalllösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit 2 mL TFA gespült, die ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurden. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung (Reprosil AQ-C 18, 250×21 ; 0.1 % TFA : ACN = 100 + 7) erhielt man das Tren-GABA-Trisargininkonjugat **87** (51 mg, 0.044 mmol, 57 %).

MS: (MALDI⁺) für $\text{C}_{29}\text{H}_{63}\text{N}_{18}\text{O}_5^+$ (M+H⁺):
ber.: 743.5 gef.: 744.0

8.9.7 Synthese des Bisbenzimidazol-Tren-Trisarginin-Konjugats **86**

Um das freie Amin des Bisbenzimidazol-Trens zu erhalten, wurde es zunächst Boc-entschützt. Dazu löste man die Boc-geschützte Verbindung **70** (117 mg, 0.24 mmol) in 10 ml Methanol und tropfte bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ SOCl_2 (89 μL , 1.22 mmol) dazu. Anschließend wurde für 4 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 123 mg (quant.) des freien Amins **67** als Trishydrochlorid. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung an das Trisarginin konjugiert.

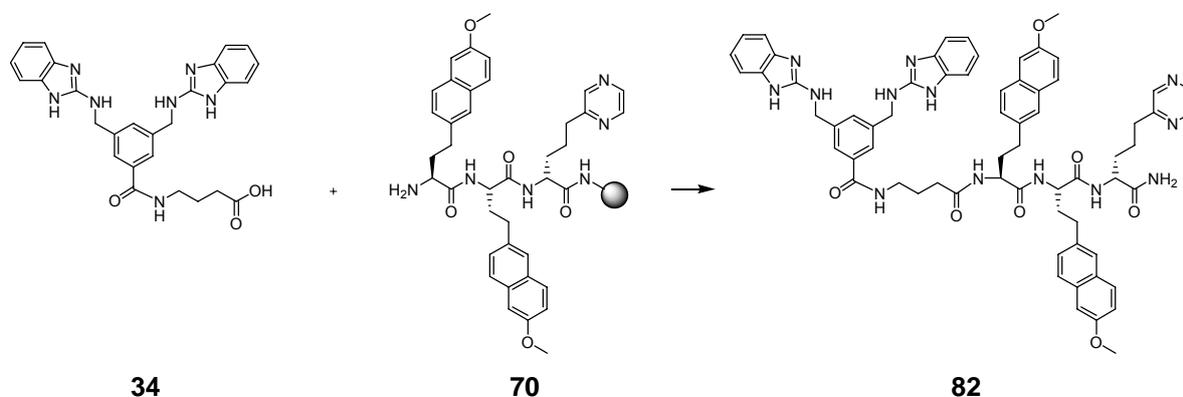
Zur Kupplung wurde ein Aliquot des trägergebundenen, Pbf-geschützten Trisarginin-GABA **72** (0.13 mmol) in eine Spritze mit Filtereinsatz gegeben und das Trägermaterial mit DCM zum Quellen gebracht (4 mL, 20 min). Dann wurde eine Lösung von CDI (208 mg, 1.28 mmol) in 4 mL DCM auf die Spritze gezogen und für 10 h geschüttelt. Es wurde mit DCM gespült (je 4 mL, 15, 10, 5 min). Das Bisbenzimidazol-Tren-Derivat **67** wurde mit 3 mL DCM und 1 mL NEt_3 versetzt und durch tropfenweise Zugabe von NMP in Lösung gebracht (ca. 0.5 mL). Diese Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde über Nacht gekuppelt.

Schließlich wurden die Harzkügelchen mit DCM gespült (s. o.) und nach Sicherstellen der Vollständigkeit der Kupplung mittels eines Kaiser-Tests im Vakuum getrocknet.

Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste wurde mit folgender Abspalllösung durchgeführt: 3300 μL TFA, 300 μL Thioanisol, 100 μL H_2O , 100 μL Ethandithiol, eine Spatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspalllösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 30 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde drei Mal mit je 2 mL TFA gespült, die alle in ein Zentrifugenröhrchen mit 30 mL Ether gespritzt wurden. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Man erhielt 120 mg des Bisbenzimidazol-Tren-Trisargininkonjugats **86** (0.123 mmol, 95 %).

MS: (MALDI⁺) für $\text{C}_{43}\text{H}_{71}\text{N}_{22}\text{O}_5^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 975.6 gef.: 976.2

8.9.8 Synthese des Bisbenzimidazol-Tripeptidkonjugats **82**

Ein Aliquot des trägergebundenen Tripeptids **70** (0.032 mmol) wurde in eine mit Filtereinsatz versehene Spritze gebracht und das Trägermaterial mit DCM zum Quellen gebracht (1 mL, 20 min). Man stellte auf DMF um (je 1 mL, 15, 10, 5 min). Dann zog man eine Kupplungslösung des Bisbenzimidazols **34** (24 mg, 0.048 mmol), HOBt (15 mg, 0.096 mmol) und DIC (15 μ L, 0.096 mmol) in DMF (1 mL) auf die Spritze und schüttelte über Nacht. Es wurde mit DMF gespült und ein Kaiser-Test mit negativem Ergebnis durchgeführt. Nach Umstellung auf DCM (je 1 ml, 15, 10, 5 min) wurde das Trägermaterial im Vakuum getrocknet.

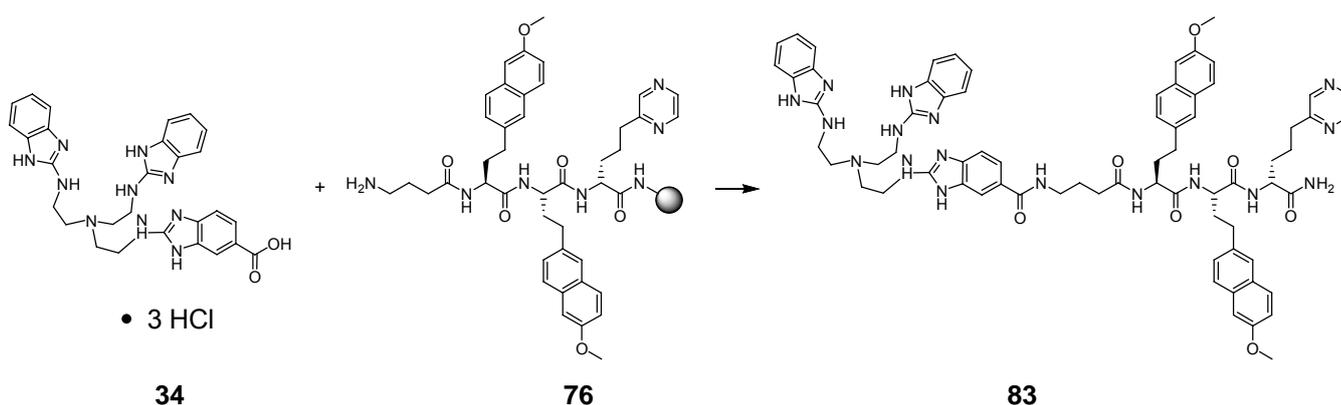
Die Abspaltung vom Träger wurde mit folgender Abspatlösung durchgeführt: 825 μ L TFA, 75 μ L Thioanisol, 25 μ L H₂O, 25 μ L Ethandithiol, eine Microspatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspatlösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit 1 mL TFA gespült, der ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurde. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, 4 °C) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal

in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H₂O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Man erhielt das Bisbenzimidazol-Tripeptidkonjugat **82** (11 mg, 30 %).

MS: (ESI⁺) für C₆₆H₇₀N₁₃O₇⁺ (M+H⁺):

ber.: 1156.5 gef.: 1157.3 (Probe enthielt freies Tripeptid)

8.9.9 Synthese des Trisbenzimidazol-Tripeptidkonjugats **83**



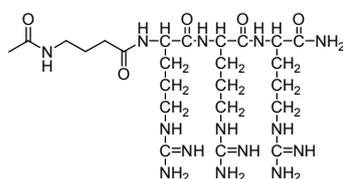
Ein Aliquot des trägergebundenen GABA-Tripeptids **76** (0.032 mmol) wurde in eine mit Filtereinsatz versehene Spritze gebracht und das Trägermaterial mit DCM zum Quellen gebracht (1 mL, 20 min). Man stellte auf DMF um (je 1 mL, 15, 10, 5 min). Dann zog man eine Kupplungslösung des Trisbenzimidazol-Trishydrochlorids **34** (82 mg, 0.128 mmol), HOBT (30 mg, 0.192 mmol) und DIC (30 μ L, 0.192 mmol) in DMF (1 mL, mit NEt₃ alkalisiert) auf die Spritze und schüttelte über Nacht. Es wurde mit DMF gespült und ein Kaiser-Test mit negativem Ergebnis durchgeführt. Nach Umstellung auf DCM (je 1 ml, 15, 10, 5 min) wurde das Trägermaterial im Vakuum getrocknet.

Die Abspaltung vom Träger wurde mit folgender Abspatlösung durchgeführt: 825 μL TFA, 75 μL Thioanisol, 25 μL H_2O , 25 μL Ethandithiol, eine Microspatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des Peptidkonjugats wurde die Abspatlösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit 1 mL TFA gespült, der ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurde. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, 4°C) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Man erhielt das Trisbenzimidazol-Tripeptidkonjugat **83** (25 mg, 61 %).

MS: (ESI⁺) für $\text{C}_{71}\text{H}_{80}\text{N}_{17}\text{O}_7^+$ (M+H⁺):

ber.: 1282.6 gef.: 1283.6

8.9.10 Synthese von acyliertem Trisarginin-GABA **81**



81

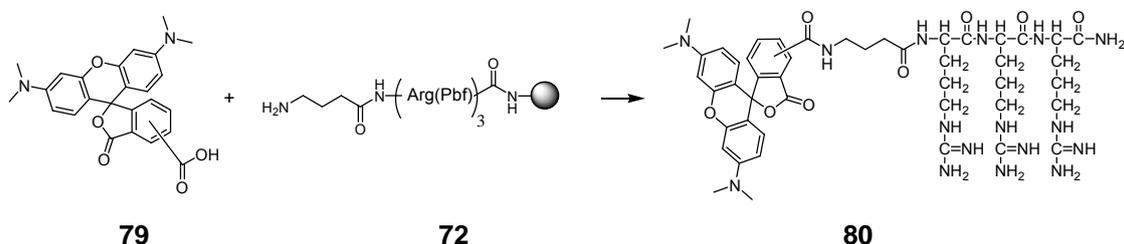
Ein Aliquot trägergebundenen, Pbf-geschützten Trisarginin-GABAs **72** (14 μmol) wurde in eine mit Filtereinsatz versehene Spritze gegeben und das Trägermaterial in DCM zum

Quellen gebracht (1 mL, 20 min). Die Acylierung erfolgte mit einer Lösung (1 mL) aus fünf Teilen DCM und einem Teil Essigsäureanhydrid mit einer katalytischen Menge DMAP. Es wurde 4 h geschüttelt. Nach Spülen mit DCM (je 1 mL, 15, 10, 5 min) wurde ein Kaiser-Test durchgeführt, der negativ ausfiel. Die Harzkügelchen wurden im Vakuum getrocknet.

Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste wurde mit folgender Abspatlösung durchgeführt: 825 μL TFA, 75 μL Thioanisol, 25 μL H_2O , 25 μL Ethandithiol, eine Mikrospatelspitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und es wurde für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des acylierten Peptids wurde die Abspatlösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Trägermaterial wurde mit je 1 mL TFA gespült, der ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gespritzt wurde. Das fest verschlossene Röhrchen wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Peptids zu vervollständigen. Dann wurde die Ethersuspension zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand vom Peptidpellet abdekantiert. Das Pellet wurde drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurde es an der Luft getrocknet, um Etherreste zu verflüchtigen, und in wenig dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und das Peptid wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Man erhielt 8 mg (quant.) des acylierten Oligopeptids **81**.

MS: (ESI⁺) für $\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{N}_{14}\text{O}_5^+$ (M+H⁺):

ber.: 613.4 gef.: 612.0

8.9.11 Synthese von TAMRA-gelabeltem Trisarginin-GABA **80**

Ein Aliquot trägergebundenen, Pbf-geschützten Trisarginin-GABAs **72** (39 μmol) wurde in eine mit Filtereinsatz versehene Spritze gegeben und das Rink-Amid mit DCM zum Quellen gebracht (2 mL, 20 min). Es wurde auf DMF umgestellt (je 2 mL, 15, 10, 5 min) und eine Kupplungslösung aus Carboxytetramethylrhodamin (kommerziell erhältliches 5/6-Carboxy-Isomerengemisch; 43 mg, 98 μmol), HOBT (36 mg, 240 μmol) und DIC (36 μL , 240 μmol) in 2 mL DMF auf die Spritze gezogen. Es wurde über Nacht gekuppelt. Nach Spülen mit DMF (wie oben) wurde ein Kaiser-Test mit negativem Ergebnis durchgeführt. Daraufhin stellte man auf DCM um (je 2 mL, 15, 10, 5 min) und trocknete die Harzkügelchen im Vakuum.

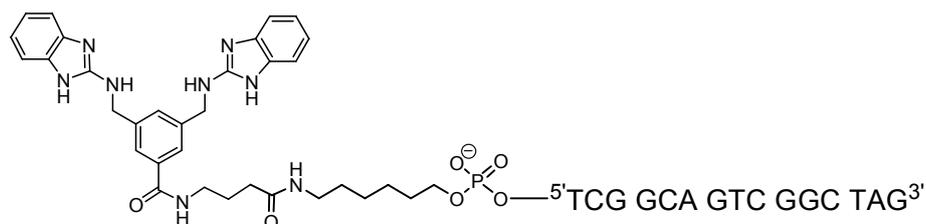
Die Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Entschützung der Argininreste wurde mit folgender Abspalllösung durchgeführt: 1650 μL TFA, 150 μL Thioanisol, 50 μL H₂O, 50 μL Ethandithiol, eine Mikrospatel Spitze Phenol. Die Lösung wurde auf die Spritze gezogen und für 3.5 h geschüttelt. Zur Fällung des gelabelten Peptids wurde die Abspalllösung in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 13 mL Ether gespritzt. Das in der Spritze zurückgebliebene Rink-Amid wurde mit 2 mL TFA gespült, die ebenfalls in 13 mL Ether gespritzt wurden. Die beiden fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um die Fällung des Konjugats zu vervollständigen. Dann wurden die Ethersuspensionen zentrifugiert (6000 min^{-1} , 15 min, 4 °C) und der Überstand von den Konjugatpellets abdekantiert. Die Pellets wurden drei Mal in Ether aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Dann wurden sie an der Luft getrocknet, um Etherreste zu

verflüchtigen, und in wenig dest. H₂O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorfgläser überführt und das Konjugat wurde in der SpeedVac erneut pelletiert. Das so erhaltene Isomerengemisch wurde HPLC-chromatographisch aufgereinigt (Reprosil AQ-RP 18, 250 x 20; 0.1 % TFA : ACN = 77 : 23), wobei drei Fraktionen mit identischer Masse gewonnen wurden, von denen jedoch zwei Minderkomponenten waren. Von diesen wurde nur die Hauptfraktion für die mit TAMRA-gelabeltem Trisarginin durchzuführenden Experimente eingesetzt. Dadurch war sichergestellt, dass das Produkt isomerenrein zum Einsatz kam.

MS: (MALDI) für C₄₇H₆₅N₁₆O₈⁺ (M-H⁺):
ber.: 983.5 gef.: 983.5

8.10 Synthese der Nucleinsäurekonjugate

8.10.1 Synthese des Bisbenzimidazol- Antisense-15mer-Konjugats **89**



Das Oligonucleotid **88** wurde im 1 μmol - Maßstab mit einem Applied Biosystems Model 381A DNA-Synthesizer mit 2-Cyanoethyl-Phosphoramiditen (Proligo) hergestellt. Der MMT-geschützte C_6 -Aminolinker (TriLink) wurde ebenfalls mit dem Synthesizer an das Oligonucleotid gekuppelt und detrityliert.

Das Konjugat **89** wurde wie folgt manuell hergestellt:

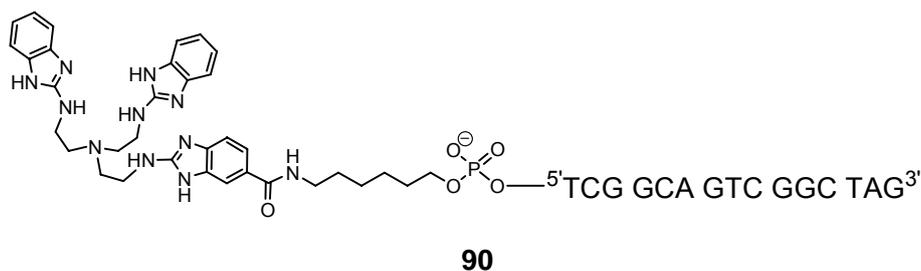
Alle Lösungen wurden mit Hilfe von 1 mL-Spritzen (Luer Fittings), die fest auf die CPG-Säule gesteckt wurden, über die Festphase gespült, indem man die Kolben abwechselnd bewegte (s. Abbildung 87). 10 mg (20 μmol) Bisbenzimidazol-Buttersäureamid **34**, 2.7 mg (20 μmol) HOBt und 3 μL (20 μmol) DIC wurden in 1 mL DMF gelöst. Die Kupplungslösung wurde für 5 h durch die Säule gespült. Daraufhin wurde die Säule drei Mal mit DMF und DCM gewaschen (jeweils für 10, 5, 2 min). Nach Trocknen der Säule im Vakuum über Nacht wurde das Konjugat abgespalten, indem man 1 mL 25 % NH_3 : EtOH (1:3, 30 min) durch die Säule bewegte. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt; die so erhaltenen 4 mL Lösung wurden über Nacht auf 55 $^\circ\text{C}$ erwärmt, um die Abspaltung der DNA-Schutzgruppen zu vervollständigen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum (SpeedVac) wurde das

Konjugat mittels einer NAP-10-Säule entsalzt. Anhand eines silbergefärbten denaturierenden PAGE-Minigels wurde ein 7:3 – Verhältnis von konjugierter zu unkonjugierter DNA abgeschätzt. Das Konjugat **89** wurde daraufhin mit einem präparativen PAGE-Gel aufgereinigt.

MS: (MALDI⁺) für C₁₇₉H₂₂₄N₆₆O₉₃P₁₅⁺ (M+H⁺):

ber.: 5268 gef.: 5267

8.10.2 Synthese des Trisbenzimidazol-Antisense-15mer-Konjugats **90**



Das Oligonucleotid **88** wurde im 1 μmol - Maßstab mit einem Applied Biosystems Model 381A DNA-Synthesizer mit 2-Cyanoethyl-Phosphoramiditen (Proligo) hergestellt. Der MMT-geschützte C₆-Aminolinker (TriLink) wurde ebenfalls mit dem Synthesizer an das Oligonucleotid gekuppelt und detrityliert.

Das Konjugat **90** wurde wie folgt manuell hergestellt:

Alle Lösungen wurden mit Hilfe von 1 mL-Spritzen (Luer Fittings), die fest auf die CPG-Säule gesteckt wurden, über die Festphase gespült, indem man die Kolben abwechselnd bewegte. 13 mg (20 μmol) Trisbenzimidazoltrishydrochlorid **46**, 2.7 mg (20 μmol) HOBt und 3 μL (20 μmol) DIC wurden in 1 mL mit drei Tropfen NEt₃ alkalisiertem DMF gelöst. Die Kupplungslösung wurde für 5 h durch die Säule gespült. Daraufhin wurde die Säule drei Mal mit DMF und DCM gewaschen (jeweils für 10, 5, 2 min). Nach Trocknen der Säule im

Vakuum über Nacht wurde das Konjugat abgespalten, indem man 1 mL 25 % NH_3 : EtOH (1:3, 30 min) durch die Säule bewegte. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt; die so erhaltenen 4 mL Lösung wurden über Nacht auf 55 °C erwärmt, um die Abspaltung der DNA-Schutzgruppen zu vervollständigen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum (SpeedVac) wurde das Konjugat mittels einer NAP-10-Säule entsalzt. Anhand eines silbergefärbten denaturierenden PAGE-Minigels wurde ein 9:1 – Verhältnis von konjugierter zu unkonjugierter DNA abgeschätzt. Das Konjugat **90** wurde daraufhin mit einem präparativen PAGE-Gel aufgereinigt.

MS: (MALDI⁺) für $\text{C}_{180}\text{H}_{227}\text{N}_{69}\text{O}_{93}\text{P}_{15}^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$):

ber.: 5309 gef.: 5309

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
abs.	Absolut
AIBN	Azoisobutyronitril
Arg	Arginin
benzyl.	benzylisch
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc ₂ O	<i>tert</i> -Butoxycarbonylanhydrid
Boc-ON	2-(Boc-oxyimino)-2-phenylacetonitril
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
br.	breit
C	Cytidin
CDI	Carbonyldiimidazol
CPG	Controlled Pore Glass
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
<i>ent</i>	enantio
EtOH	Ethanol
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl

FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanosin
GABA	γ -Aminobuttersäure
gef.	gefunden
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
NMP	N-Methylpyrrolidon
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
OBAN	Oligonucleotidbasierte künstliche Nuclease
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PNA	Peptidnucleinsäure
quant.	quantitativ
R	Rest; Arginin
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tren	Tris(2-aminoethyl)amin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TIS	Triisopropylsilan
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethylrhodamin
UV	Ultraviolett
U	Uracil
vgl.	vergleiche

9.2 Literaturverzeichnis

- ¹ Marina A. Zenkova (Ed.), "Artificial Nucleases", No. 13 in "Nucleic Acids and Molecular Biology"-Series, Springer-Verlag, Berlin **2004**
- ² a) D. M. Perreault, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 432 – 450; b) M. Oivanen, S. Kuusela, H. Lönnberg, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 961 – 990
- ³ F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.*, **1968**, 1, 70 – 78
- ⁴ a) D. A. Usher, A. H. McHale, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1976**, 73, 1149 – 1153 b) U. Kaukinen, L. Bielecky, S. Mikkola, R. W. Adamiak, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 1024 – 1031
- ⁵ U. Kaukinen, T. Venäläinen, H. Lönnberg, M. Peräkylä, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2439 – 2447
- ⁶ a) J. J. Butzow, G. L. Eichhorn, *Biopolymers*, **1965**, 3, 79 – 94; b) J. J. Butzow, G. L. Eichhorn, *Biopolymers*, **1965**, 3, 95 – 107
- ⁷ Röntgenstruktur RNase A-Uridinvanadatkomplex: J. E. Ladner, B. Wladkowski, L. A. Svensson, L. Sjölin, G. L. Gilliland, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1997**, 53, 290 – 301
- ⁸ a) R. T. Raines, "Active Site of Ribonuclease A" in "Artificial Nucleases", No. 13 in "Nucleic Acids and Molecular Biology"-Series, M. A. Zenkova (Ed.), Springer-Verlag, Berlin **2004**, 19 – 32; b) R. T. Raines, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1045 – 1065
- ⁹ Röntgenstruktur Staphylokokkennuclease: F. A. Cotton, E. E. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1979**, 76, 2551 – 2555
- ¹⁰ K. Mastumura, M. Endo, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **1994**, 2019 – 2020
- ¹¹ T. Niittymäki, H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 15 – 25
- ¹² J. Hall, D. Hüsken, U. Pielas, H. E. Moser, R. RNA, *Chem. Biol.*, **1994**, 1, 185 – 190
- ¹³ J. Hall, D. Hüsken, R. RNA, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3522 – 3526
- ¹⁴ R. RNA, J. Hall, A. Pfützer, D. Hüsken, *Pure Appl. Chem.*, **1998**, 70, 111 – 116
- ¹⁵ a) D. Magda, R. A. Miller, J. L. Sessler, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7439 – 7440; b) D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6974 – 6948
- ¹⁶ D. Magda, M. Wright, S. Crofts, A. Lin, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6947 – 6948
- ¹⁷ J. K. Bashkin, E. I. Frovolia, U. Sampath, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5981 – 5982

- ¹⁸ a) A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1998**, 1077 – 1078; b) W. C. Putnam, J. K. Bashkin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **2000**, 767
- ¹⁹ B. N. Trawick, T. A. Osiek, J. K. Bashkin, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 900 - 905
- ²⁰ B. Linkletter, J. Chin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 37, 472
- ²¹ a) H. Inoue, T. Furukawa, M. Shimizu, T. Tamura, M. Matsui, E. Ohtsuka, *Chem. Commun.*, **1999**, 45 – 46; b) H. Inoue, T. Furukawa, T. Tamura, A. Kamada, E. Ohtsuka, *Nucleotides Nucleic Acids*, **2001**, 20, 833 – 835
- ²² S. Sakamoto, T. Tamura, T. Furukawa, Y. Komatsu, E. Ohtsuka, M. Kitamura, H. Inoue, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 1416 - 1425
- ²³ a) H. Åström, N. H. Williams, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 1461 – 1465; b) H. Åström, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1901
- ²⁴ a) T. Niittimäki, U. Kaukinen, P. Virta, S. Mikkola, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 174 – 184; b) T. Niittimäki, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 1275
- ²⁵ a) M. Komiyama, T. Inokawa, *J. Biochem.*, **1994**, 116, 719 – 720; b) M. Komiyama, T. Inokawa, K. Yoshinari, *Chem. Commun.*, **1995**, 77 – 78
- ²⁶ a) P. E. Nielsen, M. Engholm, R. H. Berg, O. Burchardt, *Science*, **1991**, 254, 1497 – 1500; b) H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 494 – 500
- ²⁷ J. C. Verheijen, B. A. L. M. Deiman, E. Yeheskieky, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 369
- ²⁸ a) V. Vlassov, T. Abramova, R. Giege, V. Silnikov, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, 7, 39; b) L. Yurchenko, V. Silnikov, T. Godovikova, G. Shishkin, J.-J. Toulme, V. Vlassov, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, 16, 1721; c) N. G. Beloglazova, A. Yu. Epanchintsev, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, *FEBS Lett.*, **2000**, 481, 277 – 280; d) N. G. Beloglazova, A. Yu. Epanchintsev, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova, V. Vlassov, *Mol. Biol. Engl. Ed.*, **2002**, 36, 731; e) N. G. Beloglazova, M. M. Fabiani, M. A. Zenkova, E. V. Bichenkova, N. N. Polushin, V. V. Silnikov, K. T. Douglas, V. V. Vlassov, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, 3887 – 3897
- ²⁹ B. Verbeure, C. J. Lacey, M. Froeyen, J. Rozenski, P. Herderwijn, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 333 – 350
- ³⁰ 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, L. J. Arnold (Jr.), *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 760 – 765

- ³¹ a) D. Hüsken, G. Goodall, M. J. J. Blommers, W. Jahnke, J. Hall, R. RNA, R. E. Moser, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 16591 – 16600; b) A. Kuzuya, B. Mizoguchi, T. Sasayama, J.-M. Zhou, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6887 – 6849; c) A. Kuzuya, R. Mizoguchi, T. Sasayama, J.-M. Zhou, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1430 – 1436
- ³² RNase S: R. N. Zuckemann, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6592 – 6594;
Staphylokokkennuclease: R. N. Zuckermann, D. R. Corey, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1614 – 1615;
RNase H: a) S. Kanaya, C. Nakai, A. Konishi, H. Inoue, E. Ohtsuka, M. Ikehara, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 8492 – 8498; b) Y. Uchiyama, H. Inoue, E. Ohtsuka, C. Nakai, S. Kanaya, Y. Ueno, M. Ikehara, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 327 – 332; c) W. P. Ma, S. E. Hamilton, J. G. Stowell, S. R. Byrn, V. J. Davisson, *J. Bioorg. Med. Chem.*, **1994**, *2*, 169 – 179
- ³³ a) R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, *Liebigs Ann. Chem*, **1994**, 49 – 58; b) M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 2126 – 2129; c) K. Kurz, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 1967 – 1979 d) U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2211 – 2217
- ³⁴ S. Patai, Z. Rappoport, *"The Chemistry of Amidines and Imidates"*, **1991**, John Wiley & Sons, Chichester
- ³⁵ B. Lenarcik, J. Glowacki, M. Garbyszewski, R. Czopek, *Pol. J. Chem.*, **1990**, *64*, 43 – 52
- ³⁶ a) B. Cesanne, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt am Main, **1993**; b) S. Peter, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt am Main, **2001**
- ³⁷ S. Moon, J. W. Jeon, H. Kim, M. P. Suh, J. Suh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122* (32), 7742 - 7749
- ³⁸ J. J. Perkins, A. E. Zartmann, R. S. Meissner, *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 1103
- ³⁹ A. Peyman, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, J. Knolle, *J. Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 2874
- ⁴⁰ An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei Dr. Verena Ludwig bedanken, die während meiner Abwesenheit aufgrund des Wehrdienstes einen großen Beitrag zur Synthese des Trisbenzimidazols geleistet hat.
- ⁴¹ I. Yildiz-Oren, I. Yalcin, E. Aki-Sener, N. Ucarturk, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **2004**, *39* (3), 291 – 298
- ⁴² A. Strick, *unveröffentlichte Daten*

- ⁴³ A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Beripol, K.-H. Scheunemann, D. Carniato, J.-M. Ruxer, J.-F. Gourvest, Th. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10 (2), 179 - 182
- ⁴⁴ K. Yoshiizumi, S. Ikeda, K. Goto, T. Morita, N. Nishimura, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44 (11), 2042 – 2050
- ⁴⁵ M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30 (35), 4645 - 4648
- ⁴⁶ W. C. Chan, P. D. White (Ed.), *"Fmoc Solid Phase Synthesis – A Practical Approach"*, **2000**, Oxford University Press; Protocol 7, S. 54 ff
- ⁴⁷ V. Ludwig, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main, **2005**
- ⁴⁸ M. Miyashita, T. Matsumoto, H. Matsukubo, F. Inuma, F. Taga, H. Sekiguchi, K. Hamada, K. Okamura, K. Nishino, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2446 – 2451
- ⁴⁹ a) F. Janssens, J. Torremans, M. Janssen, R. A. Stokbroekx, M. Luyckx, P. A. J. Janssen, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 1925 – 1933; b) R. Rastogi, S. Sharma, *Synthesis*, **1983**, 861 – 882
- ⁵⁰ P. Bey, F. N. Bolkenius, N. Seiler, P. Casara, *J. Med. Chem.*, **1986**, 28 (1), 1 – 2
- ⁵¹ B. K. Banik, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2431 – 2444
- ⁵² P. Girard, J. L. Namy, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102 (8), 2693 – 2698
- ⁵³ Y. Zhang, R. Lin, *Synthetic Communications*, **1987**, 17 (3), 329 – 332
- ⁵⁴ M. K. Basu, F. F. Becker, B. K. Banik, *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41, 5603 – 5606
- ⁵⁵ X. Wang, L. Zhang, Y. Xu, D. Krishnamurthy, C. H. Senanayake, *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 7167 – 7170
- ⁵⁶ V. Zuliani, F. Bordini, M. Rivara, C. Silva, V. Ballabeni, S. Bertoni, F. Magnanini, P. V. Plazzi, *II Farmaco*, **2003**, 58, 891 - 899
- ⁵⁷ H. Quast, A. Fuß, U. Nahr, *Chem. Ber.*, **1985**, 118, 2164 – 2185
- ⁵⁸ U. Scheffer, M. W. Göbel, in *"DNA Synthesis, Methods and Protocols"*, *"Methods in Molecular Biology"-Series*, P. Herdewijn (Ed.), Humana Press, Totowa, **2005**
- ⁵⁹ M. A. Podyminogin, V. V. Vlassov, R. Giegé, *Nucleic Acid Res.*, **1993**, 21, 5950 – 5956
- ⁶⁰ S. Pitsch, U. Scheffer, A. Strick, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, 86, 3740 – 3752
- ⁶¹ S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 4262 – 4266
- ⁶² J. Müller, Y. Chen, E. Gratton, *Methods Enzymol.*, **2003**, 361, 69 – 92
- ⁶³ a) J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science*, **1992**, 257, 76 – 81; b) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 253, 313 – 332; c) J. M. Stritzki, S. Xu, N. E.

-
- Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C.-C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trokla, C. A. Stoddart J. P. Moore, G. R. Reyes, B. M. Baroudy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, 12718 – 12723; d) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.*, **1995**, *253*, 313 – 332
- ⁶⁴ B. J. Calman, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science*, **1991**, *252*, 1167 -1171
- ⁶⁵ I. Huq, Y.-H. Ping, N. Tamilarasu, T. M. Rana, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5172 – 5177
- ⁶⁶ C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, a. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2000**, *10* (16), 1857-1867
- ⁶⁷ D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D. H. Turner, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 911-940
- ⁶⁸ C. Gnaccarini, S. Peter, U. Scheffer, S. Vonhoff, S. Klussmann, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128* (24), 8063 -8067
- ⁶⁹ U. Scheffer, C. Roussev, C. Gnaccarini, S. Peter, E. Kalden, N. Tatarovic, M. W. Göbel, *Poster, Nucleinsäuretagung Technische Universität Karlsruhe*, **2004**
- ⁷⁰ Z. Nazir, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main, **2004**
- ⁷¹ in Kooperation mit der Gruppe um J. L. Decout, Grenoble, *unveröffentlichte Daten*
- ⁷² C. Gnaccarini, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main, *in Vorbereitung*
- ⁷³ H. H. Zepik, S. A. Benner, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8080 – 8083

9.3 Lebenslauf

Zur Person: Sascha Sarantis Peter
geboren am 30. Juni 1974 in Lich
verheiratet

Schulische und berufliche Ausbildung:

1980 – 1982	Grundschule Münzenberg-Gambach
1982 – 1984	Kurt Schumacher Grundschule Nidderau-Windecken
1984 – 1993	St. Lioba Schule Bad Nauheim (Allgemeine Hochschulreife)
Okt. 1993	Aufnahme des Studiums der Chemie an der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main
Apr. 1996	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Feb. 2001	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung Diplomarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main mit dem Thema "Zur Synthese RNA-Spaltender Oligonucleotid-Benzimidazol-Derivate"
2002 – 2006	Promotion bei Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main mit dem Thema "Künstliche Ribonucleasen auf Grundlage von 2-Aminobenzimidazolen"

9.4 Publikationsverzeichnis

"Site Specific Cleavage of RNA by a Metal Free Artificial Nuclease Attached to Antisense Oligonucleotides", C. Gnaccarini, S. Peter, U. Scheffer, S. Vonhoff, S. Klusmann, M. W. Göbel, Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128 (24), 8063 -8067

"Metal-Free Catalysts for the Hydrolysis of RNA Derived from Guanidines, 2-Aminopyridines, and 2-Aminobenzimidazoles", U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127(7), 2211-2217

"Guanidin-Analoga als metallfreie künstliche Nukleasen - Erste Anwendungen", Ute Scheffer, Christo D. Roussev, Claudio Gnaccarini, Sascha Peter, Elisabeth Kalden, Nedeljka Tatarovic und Michael W. Göbel, Poster, Nukleinsäuretagung Technische Universität Karlsruhe, 08.09.**2004**"

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation zum Thema "Künstliche Nucleasen auf Grundlage von 2-Aminobenzimidazolen" selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 18. Dezember 2006