

Entwicklung und Synthese von heterocyclischen RNA Liganden für TAR aus HIV-1

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften**

**von
Mirco Zeiger
aus Alzenau i.UFr.**

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

2014

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation:

Für meine Familie

„Je mehr du gedacht, je mehr du getan hast,
desto länger hast du gelebt.“

Immanuel Kant

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2007 bis September 2013 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie (OCCB) der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel möchte ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die sehr interessante Themenstellung, die hervorragenden experimentellen Bedingungen sowie für die ausgezeichnete Betreuung und die zahlreichen Anregungen während dieser Arbeit danken.

Frau Dr. Ute Scheffer und Frau Elisabeth Kalden bin ich für die Durchführung der in vitro assays sowie für die Unterstützung bei biochemischen Fragestellungen sehr dankbar.

Herrn Dr. Gerd Dürner, Frau Madlene Anzmann und Herrn Frank Wurster möchte ich ganz besonders für die Aufreinigungen und analytischen Messungen mittels HPLC danken.

Mein Dank gilt weiter dem NMR Team von Herrn Dr. C. Richter für die Bereitstellung der Infrastruktur zum Messen von NMR Spektren, Frau Marianne Christof, Elisabeth Kalden und Madlene Anzmann für die Anfertigung von Elementaranalysen, Frau Ilona Pries, Frau Hannelore Brill, Herrn Dr. Uwe Hener und Andreas Münch für die Messung von Massenspektren und dem Werkstatt Team um Herrn Klaus Müller für die Anfertigung und Wartung von Laborgeräten.

Dem Team um Herrn Prof. Dr. Christophe Pannecouque (Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgien) bin ich für die Durchführung von Zellkulturexperimenten sehr verbunden. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe und Dr. Jan Ferner für die Koordination und Durchführung von NMR Titrationsexperimenten.

Weiterhin danke ich den Bachelor Studenten Jonathan Daume, Julia Lingnau und Julia Westphal, die mich bei Laborarbeiten unterstützt haben.

Für die angenehme Arbeitskreisatmosphäre und gute Zusammenarbeit möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises herzlich danken. Besonders danke ich hiermit Herrn Dipl.-Chem. Deniz Akalay, Frau Dipl.-Chem. Fatimeh Shoja Bazargani, Frau Dipl.-Chem. Silke

Brüß, Frau Dipl.-Chem. Friederike Danneberg, Frau Dipl.-Chem. Kathrin Dörr, Dipl. Chem. Manuel Fischer, Dipl. Chem. Verena Friehmelt, Herrn Dipl.-Chem. Cristiano Pinto Gomes, M.Sc. Sibel Inan, Frau Dipl.-Chem. Plamena Dogandzhiyski, M.Sc. Frauke Jacob; Frau Margitta Knöß; Herrn Dipl.-Chem. Thomas Meyer, Dipl. Chem. Masaki Nakajima, Dipl. Chem. Turgay Parlar, Frau Theodora Ruppenthal, Herrn Dipl.-Chem. Denis Sartakov, Herrn Dipl. Biochem. Michael Sheremet, Herrn Dipl.-Chem. Ibrahim Seven, Frau Dipl.-Chem. Tina Stark, Herrn Dipl.-Chem. Stefan Ullrich, Herrn Dipl.-Chem. Marko Weimar, Herrn Dipl.-Chem. Timo Weinrich, Frau Dipl.-Chem. Daniela Wirth.

Schließlich möchte ich allen danken, die nicht direkt an dieser Arbeit beteiligt waren, aber dennoch einen sehr großen Anteil an ihrem Gelingen haben: Meinen Freunden und ganz besonders meinen Eltern Ursula und Peter Zeiger, die mir das Studium ermöglicht haben und auf deren andauernde Unterstützung ich stets vertrauen konnte.

Kurzfassung

Entwicklung und Synthese von heterocyclischen RNA Liganden für TAR aus HIV-1

Mirco Zeiger

Nach der Entdeckung und strukturellen Aufklärung des Ribosoms war bekannt, dass neben den Proteinen auch regulatorische RNA Sequenzen für die Steuerung biologischer Prozesse im Organismus verantwortlich sind. Dazu zählt unter anderem das *trans-activation responsive element* (TAR) aus HIV-1, welches am terminalen 5' Bereich (1-59) aller HIV-1 mRNAs eine identische *bulge-loop* Struktur ausbildet. Die basale Transkription des integrierten HIV Promotors ist in Abwesenheit des viralen *trans-activator of transcription* (Tat) sehr gering (und abhängig von zellulären Transkriptionsfaktoren). Sobald Tat exprimiert wird, bindet es zusammen mit dem humanen *positive transcription elongation factor b* (p-TEFb) spezifisch an TAR und aktiviert die Transkriptionsrate des viralen Genoms und die Bildung von volllängen Transkripten drastisch. Die Notwendigkeit der Tat-vermittelten Aktivierung als Grundlage einer funktionierenden HIV Replikation macht dieses System zu einem hoch interessanten Target für eine antivirale HIV Therapie. Basierend auf der Hemmung des Tat/TAR Komplexes wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von Verbindungen identifiziert, die zwar in-vitro eine inhibierende Wirkung zeigten, aber keine von ihnen konnte bis jetzt als Therapeutikum Verwendung finden. So wäre die noch ausstehende Entdeckung eines effizienten Tat Antagonisten, der ohne die zelleigene Transkription zu beeinträchtigen eine Reduzierung der Virusreplikation von 80 - 90 % akut infizierter Zellen bewirkt, ein bedeutender Durchbruch in der HIV Forschung. Durch eine längere Behandlung von chronisch infizierten Zellen könnte so die Transkription des viralen Genoms abgeschaltet und dadurch eine Eliminierung latenter HIV Reservoirs ermöglichen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuartiger TAR Liganden, zunächst auf Grundlage eines nicht auf Strukturmodellen beruhenden Ligandenscreenings, gefolgt von einem strukturbasierten Ligandendesign. Bei der Suche nach potentiellen Wirkstoffen, beschränkte man die Auswahl der untersuchten Verbindungen auf Guanidin- und Amidinanaloga. Dazu zählten einfache Guanidinderivate mit unterschiedlichen aromatischen Resten sowie heterocyclische Verbindungen, wie Isochinoline, Chinazoline, Perimidine und Phenanthridine. Die Bindungsaffinitäten dieser Wirkstoffkandidaten in Bezug zu TAR wurden über einen FRET Assay nach Matsumoto^[1] bestimmt. Eine Auswahl an Verbindungen wurde zudem über eine NMR Titration charakterisiert (AK Schwalbe). Dadurch konnte beobachtet werden, an welcher Position die Liganden mit der TAR RNA in Wechselwirkung treten. Bei diesen Untersuchungen zählten 1,7-

Diaminochinolin ($IC_{50} = 150 \mu\text{M}$), 2,4,6-Triaminochinazolin ($IC_{50} = 40 \mu\text{M}$) sowie 6,8-Diaminophenantridin ($IC_{50} = 15 \mu\text{M}$) zu den aktivsten Verbindungen.

Um eine Aussage über die Bindungsstellen treffen zu können, wurde mittels HF-docking Methoden die Komplexgeometrie energetisch optimiert. Ausgehend von diesen Bindungsmodellen entwickelte man eine Leitstruktur, die als Grundlage eines strukturbasierten Ligandendesigns diente. Im Fokus stand hierbei die Entwicklung einer GC-Basenpaar erkennenden Untereinheit. Mit 3,5-Diamino-9-methyl-3,4,9,10-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]phenanthridin-8(2H)-on ($IC_{50} = 45 \mu\text{M}$) konnte ein Ligand identifiziert werden, der im NMR Titrationsexperiment ausschließlich am Basenpaar G26/C39 von TAR eine Verschiebung der Iminprotonen induzierte. In einem weiteren Projekt versuchte man eine Selektivitätssteigerung durch simultane Adressierung zweier Bindungsstellen zu erreichen. Nachdem im NMR Experiment gezeigt werden konnte, dass 2,4,6-Triaminochinazolin mit hoher Affinität an zwei verschiedenen Bereichen der RNA bindet, wurden eine Reihe dimerer 2,4,6-Triaminochinazolinderivate mit unterschiedlich langen Linkern hergestellt. Mit diesem Ansatz gelang es den hoch affinen Liganden N^6, N^6 -(1,4-phenylenbis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin) ($IC_{50} = 150 \text{nM}$) zu identifizieren.

Abstract

Development and synthesis of heterocyclic RNA ligands for HIV-1 TAR

Mirco Zeiger

After the discovery and structural elucidation of the ribosome, the crucial role of regulatory RNA in biological processes was realized. RNA has emerged as an interesting new type of drug target.^[1] This includes the *trans-activation responsive element* (TAR) from HIV-1, which forms in the terminal 5' region (1-59) of all HIV-1 mRNAs an identical bulge-loop structure. The basal transcription of the integrated HIV promoter in the absence of the viral *trans-activator of transcription* (Tat) is very low. As soon as it is formed, it binds in combination with the human *positive transcription elongation factor b* (p-TEFb) specifically to TAR and activates the transcription rate of the viral genome which promotes the formation of full-length transcripts dramatically. The need for Tat-mediated activation as the basis of an effective HIV replication makes this system a highly interesting target for antiviral HIV therapy. Based on the inhibition of the Tat/TAR complex, a number of compounds have been identified in recent years. Although in vitro inhibitory effects were observed, none of them could currently find use as a

therapeutic agent. The outstanding discovery of an efficient inhibitor of the Tat/TAR system, causing a reduction of viral replication by 80 - 90 % of acutely infected cells, without affecting the cell's own transcription, would be a crucial breakthrough. A longer treatment of chronically infected cells should switch off the transcription of the viral genome and thereby enable the elimination of the latent reservoir of HIV.

This thesis describes the development of novel TAR ligands on the basis of a non-structural model based ligand screening. For the search of potential tat antagonists a limited selection of guanidine and amidine analogs was tested. These included simple guanidine derivatives bearing different aromatic groups and heterocyclic compounds such as isoquinolines, quinazolines, perimidines and phenanthridines. The binding affinities of the ligands to TAR RNA were determined by a FRET assay according to Matsumoto^[2]. A selection of compounds was also characterized by NMR titration (working group Schwalbe) to determine the position at which the ligand interacts with TAR. The most active drug like candidates in this study were 1,7-diaminoquinoline ($IC_{50} = 150 \mu M$) and 2,4,6-triaminochinazolin ($IC_{50} = 40 \mu M$).

In order to make a statement about the binding poses, optimized HF-docking methods were used to determine the energetically favored geometry of the complex. Based on the results, a lead structure was developed, that served as a foundation for structure-based ligand design. The focus here was set on the development of a GC base pair recognizing subunit. With 3,5-diamino-9-methyl-3,4,9,10-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]phenanthridine-8(2H)-one ($IC_{50} = 45 \mu M$), a ligand could be identified, which induced in the NMR titration experiment a shift of imino protons only at the G26/C39 base pair of TAR. In another project an increase of selectivity was attempted by simultaneous addressing of two binding sites. By NMR experiments it was shown that 2,4,6-triaminoquinazoline binds with high affinity at two different regions of the RNA, forming a 2:1 complex. So a series of dimeric 2,4,6-triaminoquinazolines with different linker lengths were synthesized to find the right distance between the subunits. This approach succeeded in the development of the high-affinity ligand $N^6, N^{6'}$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(quinazoline-2,4,6-triamine) ($IC_{50} = 150 nM$).

Inhalt	I
1. Einleitung und Motivation	1
2. RNA - Biomakromoleküle	2
2.1 RNA Funktionen	2
2.2 RNA als drug target	3
2.3 TAR RNA	4
3. Replikation des HI-Virus.....	5
3.1 Verbreitung und Bekämpfung von HIV Infektionen	5
3.2 Organisation des Genoms	6
3.3 Replikationszyklus	7
3.4 Mechanismus der transcriptionalen Aktivierung.....	9
3.4.1 Einleitung und Kurzübersicht.....	9
3.4.2 Die frühe Phase der HIV Genexpression.....	10
3.4.3 Tat aktivierte Transkription	13
3.4.4 Regulation von Tat	14
3.4.5 Aktivierende Modifikationen an Tat	15
3.4.6 Inhibierende Modifikationen an Tat	15
3.4.7 Tat-TAR Wechselwirkung.....	15
3.4.8 Die Struktur des Tat/TAR/p-TEFb Komplexes	17
4. HIV-1 TAR Liganden.....	19
4.1.1 Peptide.....	19
4.1.2 β -Peptide	21
4.1.3 Peptoide.....	21
4.1.4 Cyclische Peptide	23
4.2.1 Aminoglycoside.....	24
4.2.2 cyclische Aminoglycoside	26
4.3 Oligonucleotide ^[118]	26
4.4 Kleine Moleküle	28
4.5 Konjugate	34
4.5.1 Arginin-Interkalator Konjugate.....	34

4.5.2 Neamin-Arginin Konjugate.....	35
4.5.3 Aminoglycosid Dimere ^[157, 158]	36
5. Charakterisierung von RNA-Liganden	37
5.1 FRET Verdrängungs-Assay nach Matsumoto	37
5.1.1 Grundlagen.....	37
5.1.2 „Static“ und „dynamic“ (collisional) Quenchen.....	38
5.1.3 Fluoreszenzenergie-Übertragung (noncollisional, FRET)	38
5.1.4 Kooperativer Bindungsassay	42
5.2 1D-NMR Titrationsen	43
5.3 Anti-HIV Assay mit MT4 Zellen	43
6. Ligandenscreening, das nicht auf Strukturmodellen beruht	45
6.1 Erstellen von Kriterien.....	45
6.2 „Screening“ von Guanidinderivaten.....	45
6.2.1 Aminoperimidine.....	46
6.2.2 Aminochinoline	46
6.2.3 2-Aminochinoline	47
6.2.4 1-Aminoisochinoline	47
6.2.5 Phenanthridine	48
6.2.6 2,4-Diaminochinazoline	50
6.3 Zusammenfassung der TAR Liganden.....	53
7. Strukturbasiertes Ligandendesign	55
7.1 Erstellung eines Bindungsmodells	55
7.2 Bindungsmuster von Guanidinaloga.....	57
7.3 Zusammenfassung der Beobachtungen.....	58
7.4 Anwendung des Bindungsmodell auf Guanidinaloga.....	58
7.5 Strukturbasierte Optimierung der Liganden (CG-Liganden)	67
7.6 Erweitertes Bindungsmodell (elektrostatische hotspots).....	74
7.7 Modeling der G28-Bindungsstelle	76
7.8 Kombination von Liganden mit unterschiedlichen Bindungsstellen.....	81

8. Präparativer Teil.....	84
8.1 6,8-Diaminophenanthridine.....	84
8.1.1 Herstellung von Isoindolinonboronsäuren	84
8.1.2 Miyaura Borylierung	86
8.1.3 Suzuki Kupplung	88
8.2 Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridine	88
8.3 8-Amino-6-hydroxytetrahydrophenanthridin	91
8.4 Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin	92
8.4.1 Synthesestrategie „Suzuki“	92
8.4.2 Synthesestrategie „Michael Addition“	94
8.4.3 Synthesestrategie „Cycloalkenreduktion“	95
8.4.4 Synthesestrategie „Iodlaktonisierung“	98
8.5 2,4-Diaminochinazoline	112
8.6 1-Aminoisochinoline	120
8.7 Arylguanidine.....	124
8.8 Peptidsynthese	131
9. Zusammenfassung	133
10. Ausblick	135
11. Experimenteller Teil	137
11.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen.....	137
11.2 Synthese von 2-Brom-1-(3-nitrophenyl)ethanon 295 : ^[243]	140
11.3 Synthese von 4-(3-Nitrophenyl)-1H-imidazol 296 : ^[240]	141
11.4 Synthese von 1-Methyl-4-(3-nitrophenyl)-1H-imidazol 297 :	142
11.5 Synthese von 3-(1-Methyl-1H-imidazol-4-yl)anilin 298 :.....	143
11.6 Synthese von N,N'-Bis-Boc-1-(3-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidin 299 :	144
11.7 Synthese von 1-(3-(1-Methyl-1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidin Dihydrochlorid 83 :	145
11.8 Synthese von 5-Chlorchinazolin-2,4-diamin 221 : ^[244]	146

11.9 Synthese von 5-Chlor-6-nitrochinazolin-2,4-diamin 222 : ^[244]	147
11.10 Synthese von 7,9-Diamino-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-f]chinazolin-3-oxid 223 :	148
11.11 Synthese von Chinazolin-2,4,5,6-tetraamin Dihydrochlorid 76 :	149
11.12 Synthese von 6-Amino-8-nitrophenanthridin 303 :	150
11.13 Synthese von 6,8-Diaminophenanthridin 63 :	151
11.14 Synthese von 2-Aminochinazolin-4(3H)-on 52 : ^[245]	152
11.15 Synthese von N ⁶ -Benzylchinazolin-2,4,6-triamin Hydrochlorid 72 :	153
11.16 Synthese von 2-Brom-4-nitroanilin 239 : ^[247]	154
11.17 Synthese von 2-Brom-4-nitrobenzotrinitril 240 :	155
11.18 Synthese von 7-Nitrochinazolin-2,4-diamin 241 : ^[249]	156
11.19 Synthese von Chinazolin-2,4,7-triamin Hydrochlorid 70 :	157
11.20 Synthese von 1-Iodoisochinolin 252 : ^[224]	158
11.21 Synthese von 1-Iod-5-nitroisochinolin 253 : ^[212]	159
11.22 Synthese von 1-Amino-5-nitroisochinolin 254 :	160
11.23 Synthese von 1,5-Diaminoisochinolin 61 :	161
11.24 Synthese von 7-Hydroxyisochinolin 248 : ^[223]	162
11.25 Synthese von 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)isochinolin 249 : ^[251]	163
11.26 Synthese von 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-iodoisochinolin 250 :	164
11.27 Synthese von 1-Aminoisochinolin-7-ol 62 :	165
11.28 Synthese von 7-Nitro-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin Hydrochlorid 243 : ^[168]	166
11.29 Synthese von 7-Nitroisochinolin 244 :	167
11.30 Synthese von 1-Chlor-7-nitroisochinolin 245 : ^[168]	168
11.31 Synthese von 7-Nitro-1-aminoisochinolin 247 : ^[168]	169
11.32 Synthese von 1,7-Diaminoisochinolin 60 : ^[168]	170
11.33 Synthese von Isoindolinon 279 :	171
11.34 Synthese von 2,6-Dinitroisindolin-1-on 280 :	172
11.35 Synthese von 6-Aminoisindolin-1-on 281 :	173
11.36 Synthese von N,N'-Bis-Boc-3-(3-oxoisindolin-5-yl)guanidin 282 :	174
11.37 Synthese von 1-(3-Oxoisindolin-5-yl)guanidin Hydrochlorid 86 :	175

11.38 Synthese von 6-Nitroisobenzofuran-1(3H)-on 288 :	176
11.39 Synthese von 6-Aminoisobenzofuran-1(3H)-on 289 :	177
11.40 Synthese von <i>N,N'</i> -Bis-Boc-3-(3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin 290 :	178
11.41 Synthese von 1-(3-Oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin Hydrochlorid 84 :	179
11.42 Synthese von 5-Aminophthalimid 283 :.....	180
11.43 Synthese von (\pm)-5-Amino-3-hydroxyisindolin-1-on 284 :.....	181
11.44 Synthese von 5-Aminoisindolin-1-on Hydrotrifluoacetat 285 :	182
11.45 Synthese von <i>N,N'</i> -Bis-Boc-3-(1-oxoisindolin-5-yl)guanidin 286 :	183
11.46 Synthese von 1-(1-Oxoisindolin-5-yl)guanidin Hydrochlorid 87 :	184
11.47 Synthese von 5-Aminophtalimid 291 : ^[257]	185
11.48 Synthese von 5-Aminophtalid 292 : ^[258]	186
11.49 Synthese von <i>N,N'</i> -Bis-Boc-3-(1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin 293 :	187
11.50 Synthese von 1-(1-Oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin Hydrochlorid 85 :	188
11.51 Synthese von tert-Butyl-(4-hydroxycyclohexylamin)carbammat 111 : ^[259]	189
11.52 Synthese von tert-Butyl-(4-oxocyclohexylamin)carbammat 112 :.....	190
11.53 Synthese von tert-Butyl-(3-cyano-4-oxocyclohexylamin)carbammat 115 :	191
11.54 Synthese von (\pm)-4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yl- trifluormethanesulfonat 116 :	192
11.55 Synthese von 7,8,9,10-Tetrahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrochlorid 64 :	193
11.56 Synthese von 5-Bromphthalsäureanhydrid 59 : ^[189]	194
11.57 Synthese von 5-Brom-2-methylphthalimid 99 :	195
11.58 Synthese von 5-Bromo-2-methyl-6-nitrophthalimid 100 :	196
11.59 Synthese von 6-Amino-5-brom-2-methylisindolin-1-on 101 :.....	197
11.60 Synthese von 6-Trifluoacetamino-5-brom-2-methylisindolin-1-on 102 :.....	199
11.61 Synthese von 5-Trifluoacetamino-6-brom-2-methylisindolin-1-on 105 :.....	204

11.62 Synthese von (6-Trifluoracetamino-2-methyl-1-oxoisindolin-5-yl)boronsäurepinacolester 103 :.....	205
11.63 Synthese von (5-Trifluoracetamino-2-methyl-1-oxoisindolin-6-yl)boronsäurepinacolester 106 :.....	206
11.64 Synthese von (\pm)-3,5-Diamino-9-methyl-3,4,9,10-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]-phenanthridin-8(2H)-on Dihydrochlorid 80 :	207
11.65 Synthese von 3,5-Diamino-9-methyl-9,10-dihydro-8H-pyrrolo[3,4-b]-phenanthridin-8-on Hydrochlorid 78 :	208
11.66 Synthese von 3,5-Diamino-9-methyl-8H-pyrrolo[3,4-b]phenanthridin-10(9H)-on 79 :	209
11.67 Synthese von 4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)cyclohexanon 121 :	210
11.68 Synthese von (\pm)-5-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-oxocyclohexancarbonitril 122 :	211
11.69 Synthese von (\pm)-4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yl Trifluormethansulfonat 123 :	212
11.70 Synthese von (\pm)-8-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-7,8,9,10-tetrahydro-phenanthridin-6-amin 124 :	213
11.71 Synthese von (\pm)-6-Amino-7,8,9,10-tetrahydrophenanthridin-8-ol 81 :	214
11.72 Synthese von 2-Amino-5-bromobenzonitril 226 : ^[260]	215
11.73 Synthese von 6-Bromchinazolin-2,4-diamin 227 :	216
11.74 Synthese von 2-(Chlormethyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan 229 :	217
11.75 Synthese von Kalium ((4-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)trifluorborat 230 :	218
11.76 Synthese von tert-Butyl-4-((2,4-Diaminochinazolin-6-yl)methyl)piperazin-1-carboxylat 309 :	219
11.78 Synthese von 6-(Piperazin-1-ylmethyl)chinazolin-2,4-diamin Trihydrochlorid 231 :	220
11.79 Synthese von 2,2-Dimethyl-5-(2-nitobenzyliden)-1,3-dioxan-4,6-dion 184 :.....	221
11.80 Synthese von (\pm)-3,3-Dimethyl-11-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxaspiro-[5.5]undec-8-en-1,5-dion 185 :.....	222
11.81 Synthese von (\pm)-(1S,2S,4R,5R)-4-Iod-2-(2-nitrophenyl)-7-oxo-6-oxabicyclo[3.2.1]-octan-1-carbonsäure 175 :	224

11.82 Synthese von (±)-(6aR,8S,10aR)-8-Hydroxy-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-phenanthridin-6(5H)-on 197 :.....	226
11.83 Synthese von (±)-(6aS,8R,10aR)-8-Azido-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-phenanthridin-6(5H)-on 198 :.....	235
11.84 Synthese von (±)-tert-Butyl-(6-oxo-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydro-phenanthridin-8-yl)-carbammat 199 :	236
11.85 Synthese von (±)-tert-Butyl-(6-thioxo-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydro-phenanthridin-8-yl)carbammat 311 und 312 :	237
11.86 Synthese von (±)-tert-Butyl-((6aR,8R,10aR)-6-((2,4-dimethoxybenzyl)amino)-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrophenanthridin-8-yl)carbammat 204 :.....	239
11.87 Synthese von (±)-(6aR,8R,10aR)-6a,7,8,9,10,10a-Hexahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrogensulfat 65 :	241
11.88 Synthese von (±)-(6aS,8R,10aR)-6a,7,8,9,10,10a-Hexahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrogensulfat 66 :	247
11.89 Synthese von N ⁶ ,N ^{6'} -(1,4-Phenylenbis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid 213 :	252
11.90 Synthese von N ⁶ ,N ^{6'} -([1,1'-Biphenyl]-4,4'-diylbis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid 215 :.....	253
11.91 Synthese von 4,4'-(Propan-1,3-diylbis(oxy))dibenzaldehyd 218 :.....	255
11.92 Synthese von N ⁶ ,N ^{6'} -(((Propan-1,3-diylbis(oxy))bis(4,1-phenylen))bis(methylen))-bis-(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid 219 :	256
11.93 Synthese von L-22:.....	258
11.94 Synthese von L-22 (R3G):	259
12. Methoden zur biophysikalischen und biologischen Charakterisierung	260
12.1 FRET-Assay ^[262]	260
12.2 Anti-HIV Aktivitätsassay (HIV-1 III _B und HIV-2 ROD) ^[263, 264]	260
12.3 Cytotoxizitätsassay (MT-4) ^[263, 264]	261
13. Anlagen.....	262
13.1 Abkürzungen	262
13.2 Literaturverzeichnis	267
14 Publikationen:	279

15 Lebenslauf.....	279
16 Eidesstattliche Erklärung	281

1. Einleitung und Motivation

Lange war man der Überzeugung, dass die Vielfalt der enzymatischen Aufgaben nur von Proteinen übernommen werden kann, bis Altman und Cech mit der Entdeckung der Ribozyme eine katalytische Funktion von RNA Molekülen aufzeigen konnten. Diese bahnbrechenden Arbeiten wurden im Jahre 1989 mit dem Nobelpreis geehrt. In den folgenden Jahren identifizierte man neben katalytischen Funktionen^[2] auch eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen, die von speziellen RNA Sequenzen gesteuert werden. Besonders bemerkenswert ist dabei die Partizipation an Transkriptions-^[3] und Translationsprozessen.^[4, 5]

Aufgrund dieser großen Beteiligung an elementaren Funktionalitäten, wurde das Konzept der „RNA-Welt“ vorgeschlagen.^[6] Hiernach vermutet man, dass bei der Entstehung des Lebens zunächst selbstreplizierende RNA Strukturen entstanden. Durch evolutionäre Prozesse bildeten sich hieraus eine Vielzahl an funktionellen RNA Strukturen, die unter anderem in der Lage waren Proteine zu bilden, die aufgrund ihrer höheren Stabilität und Variabilität einen Großteil der enzymatischen Aufgaben übernahmen. Die Nachkommen dieses Ribozyms kommen heute noch in Ribosomen aller Organismen vor. Ein weiteres Relikt aus dieser Zeit findet man möglicherweise auch in Retroviren, wie im HI-Virus. Hier liegt die Erbinformation gespeichert in RNA Matrizen vor und nicht wie in höheren Organismen in Form einer DNA Doppelhelix.

Es ist anzunehmen, dass die zukünftige Forschung noch eine Vielzahl unentdeckter RNA Funktionalitäten zu Tage bringt, zumal das humane Genom zu einem Großteil nichtcodierende RNA enthält. Die Erkenntnis dieser enormen funktionellen Diversität gestaltet die RNA Forschung zu einem besonders attraktiven Wissenschaftsbereich mit bislang noch ungenutztem Potenzial, vor allem für Entwicklung pharmazeutischer Produkte.

Ziel meiner Arbeit ist es zu zeigen, dass eine Adressierung spezifischer RNA Regionen mit selektiven Liganden durch einen systematischen Selektions- und Optimierungsprozess zu erreichen ist. Auf diese Weise eröffnet sich ein breites Spektrum an Möglichkeiten, in biologische Systeme einzugreifen. Als Ziel RNA wurde hierfür das TAR Strukturelement gewählt, da bereits wichtige Vorarbeiten auf diesem Gebiet geleistet wurden, und somit die Entwicklung von Liganden auf einem fundierten biologischen Hintergrund beruht.

Bei der Herstellung neuartiger Inhibitoren des Tat/TAR Systems geht man zunächst unvoreingenommen von den literaturbekannten Bindungsmodellen im Rahmen eines „*unbiased approach*“ an das Ligandenscreening heran. Nur mit der Annahme, dass Tat über Argininreste mit TAR interagiert, soll zunächst eine Auswahl an Guanidinanaloga

erstellt und über einen Verdrängungsassay nach Matsumoto einer Affinitätsmessung unterzogen werden. Nach Selektion der interessantesten Verbindungen ist eine Zuordnung des Bindungsbereichs über spektroskopische und biophysikalische Methoden vorgesehen, um im nächsten Schritt eine Optimierung der Liganden durch ein strukturbasiertes Ligandendesign durchführen zu können. Als Grundlage für die weitergehenden Modifikationen dienen minimalistisch angefertigte Bindungsmodelle, die auf Grundlage von Komplexstrukturen anderer Guanidin-haltiger Liganden beruhen. Mit Hilfe von computergestützten *molecular modeling* Methoden werden schließlich die Ergebnisse der Affinitätsmessung diskutiert und eine Validierung und Anpassung des Bindungsmodells vorgenommen, sodass im folgenden Entwicklungsschritt eine zielgerichtete Optimierungsstrategie entworfen und durchgeführt werden kann.

2. RNA - Biomakromoleküle

2.1 RNA Funktionen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Hauptaufgabe der Ribonukleinsäuren (RNA) in dem Transport von Geninformation von der Polymerase zum Ribosom besteht, die dabei als *messenger-RNA* (mRNA) in Erscheinung tritt. Im Jahre 1961 erkannten Heinrich Matthaei und Marshall Warren Nirenberg, dass dabei jeweils drei aufeinander folgende Nukleotide ein Codon bilden, welches einer spezifischen Zuordnung zu einer Aminosäure entspricht. Auf diese Weise ist eine zielgerichtete Expression eines bestimmten Proteins möglich. Zudem konnte schon zu einem frühen Zeitpunkt nicht codierende RNA als Bestandteil des Ribosoms identifiziert werden. Die katalytische Funktion dieser *ribosomalen RNA* (rRNA) bei der Translation wurde erst durch spätere Arbeiten^[7, 8, 9, 10] erkannt.

Nach Entschlüsselung des humanen Genoms, stellte man fest, dass nur ein kleiner Teil des Erbguts aus Protein-codierenden Sequenzen besteht. Zudem beobachtete man eine Korrelation zwischen der Komplexität der Organismen mit der Menge an nicht Peptid codierender RNA (Homo sapiens: 97 %; Prokaryonten: 6-24 %).^[11, 12] Daraus resultierte die zentrale Frage: Welche Funktionen werden von diesen Nukleinsäuren ausgeübt?

Dies führte in den letzten Jahrzehnten dazu, dass die RNA zunehmend in den Fokus von Forschungsarbeiten gerückt wurde, da man ihre immense funktionelle Diversität in Organismen erkannte.^[13] Somit wurden auch die *transfer RNAs* (tRNA) identifiziert, die spezifische Aminosäuren aktivieren und diese für die Proteinsynthese bereitstellen, sowie noch weitere nicht codierende RNA Moleküle. Dazu zählen unter Anderem *small-nuclear RNAs* (snRNA), die als Bestandteil der Spleißosome das Ausschneiden der Introns aus

den prä-mRNAs bewirken. Dadurch gelingt es dem Organismus, aus einer prä-mRNA unterschiedliche mRNA zu bilden, was zu einer Erhöhung der Proteinviefalt führt. Weiterhin entdeckte man, dass aus der prä-mRNA herausgeschnittene Introns auch regulatorische Funktionen übernehmen können, zum Beispiel als *micro RNAs* (miRNA).^[14]

Eine wichtige regulatorische Funktionen der RNA wird auch unter der Bezeichnung *RNA interference* (RNAi) aufgeführt.^[15] Durch das *Dicer* Enzym werden *double-stranded RNAs* (dsRNA) in viele kleinere *small interfering RNA* (siRNA) Fragmenten, mit einer Länge von 20-25 Nukleotiden, zerteilt. Diese können in *RNA induced silencing complex* (RISC) Enzymkomplexe eingebaut werden und spezifisch mRNA Stränge komplexieren und zersetzen. Dadurch kann die Produktion von speziellen Proteinen nach unten geregelt werden. Auch sind Interaktionen von siRNAs bzw. miRNAs mit komplementären DNA Sequenzen im Zellkern bekannt, die auf diese Weise Transkriptionshemmungen einleiten.

Seit Entdeckung der mannigfaltigen Funktion von *riboswitches* im Jahre 2002^[16], traten diese immer mehr in den Blickpunkt der RNA Forschung.^[17, 18, 19] Eine Vielzahl der *riboswitches* fand man als konservierte Sequenzen in der 5'-UTR der mRNA. Wie zum Beispiel die *SAM-I riboswitch*^[20], die *THI-box*^[21], der *FMN riboswitch*^[22] und die *B₁₂-box*^[23]. Die Besonderheit dieser Strukturen liegt in ihrer Funktion als molekularer Schalter. Über die Bindung an spezifischen Botenstoffen wird eine strukturelle Neuordnung der RNA initiiert. Durch Adressierung spezieller Schalter an der mRNA ermöglicht dieses auch eine Liganden-gesteuerte Transkription oder Translation.

Auch im HIV Genom ist eine Vielzahl von nicht codierenden RNA Sequenzen enthalten. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist das *trans-activation response element* (TAR), das über eine Bindung an einen Komplex aus dem *transcriptional transactivator* (Tat) Peptid, der Kinase p-TEFb und weiterer funktioneller Peptide, eine Aktivierung der Transkription vermitteln kann.^[24]

2.2 RNA als drug target

Auf Grund der hohen Anzahl an regulatorischen Funktionen stellt die RNA ein durchaus interessantes *Drug Target* dar. Verschiedene antibiotische Substanzen, die über Interaktionen mit der ribosomalen RNA eine Hemmung der Proteinbiosynthese bewirken, sind bereits seit längerem bekannt. In den letzten Jahren investierte die Pharmaindustrie mehrere Mrd. € in die RNA-Interferenz (RNAi).^[25] Dies zeigte die hohen Erwartungen dieser neuen Technologie als Plattform für die Entwicklung von Medikamenten. Bevasiranib war die erste siRNA, welche die Phase III in klinischen Studien erreichte,

jedoch das Studienziel bisher nicht erreichen konnte. Dieser Rückschlag veranlasste mehrere große Pharmaunternehmen ihre auf siRNA basierenden Entwicklungsprogramme einzustellen.^[26] Dennoch befinden sich weitere RNAi-basierte Therapeutika in den späten Phasen der klinischen Forschung.^[27] Auch sogenannte Antagomire, die durch komplementären Aufbau zu spezifischen zellulären Ziel-miRNAs diese stilllegen können, befinden sich bereits in der präklinischen Phase.^[28]

Eine Adressierung spezifischer RNA Bereiche mit kleinen Molekülen stellt bislang eine größere Herausforderung dar. Dies liegt an der relativ hohen Flexibilität von RNA Strukturen, sodass Konformationsstabilisierungen mit kleinen Liganden nur schwer zu erreichen sind und dadurch mit kristallographischen Methoden die Aufklärung der Komplexstrukturen zum Teil kaum möglich ist. Da Strukturinformationen der Komplexe für den Prozess der Wirkstoffoptimierung unerlässlich sind, muss auf andere strukturaufklärende Methoden zurückgegriffen werden wie NMR Spektroskopie, die zwar durch Messungen im wässrigen Medium die natürliche Umgebung besser widerspiegeln, aber meist zeitaufwendiger und aufgrund der nötigen ¹³C/¹⁵N Markierungen kostspieliger sind. Mit heutigen Mitteln wäre für eine industrielle Wirkstoffentwicklung jahrzehntelange Grundlagenforschung notwendig, sodass es zurzeit für viele Pharmakonzerne nicht rentabel ist, in diese RNA-Forschung einzusteigen.

Ungeachtet dessen ist es Aufgabe von Naturwissenschaften, neue Wege zu beschreiten und geeignete Methoden zu entwickeln, um auch komplexe Problemstellungen zu bewältigen. Gelingt es, funktionelle Bereiche in Organismen gezielt mit Wirkstoffen zu steuern, kann ein großer Beitrag zum Verständnis biologischer Systeme erbracht werden. Besonders geeignete Zielstrukturen für RNA-Liganden sind hoch konservierte mRNA Domänen, da Mutationen und die Ausbildung von resistenten Stämmen unwahrscheinlich sind. Ein derartiges Motiv stellt die TAR RNA aus HIV dar, die als ausgewähltes Ziel der vorliegenden Arbeit dient.

2.3 TAR RNA

Das HIV-1 TAR Element ist eine aus 59-Nucleotiden bestehende RNA-Struktur und findet sich am 5`-Ende aller naszierenden HIV-1 Transkripte. Mutationen in diesem Bereich der RNA sind eher unwahrscheinlich, da schon leichte Veränderungen das System aus dem Gleichgewicht bringen können und dadurch eine effektive virale Replikation nicht mehr möglich ist. Somit ist die Ausbildung von resistenten Virenstämmen gegenüber Liganden, die diese Region adressieren, nicht anzunehmen. Eine molekulare Erkennung durch potenzielle Inhibitoren ist über die charakteristischen Strukturelemente dieser hoch konservierten RNA angedacht. Diese bildet eine stabile stem-loop Struktur mit einem

pyrimidinreichen Trinukleotidbulge (UCU) aus. Dieser bewirkt eine Abwinklung der Helix um einen Winkel von ca. 45° und verursacht eine hohe Flexibilität in diesem Bereich der RNA. Zudem befinden sich noch zwei weitere Mononukleotidbulges im unteren stem Bereich, die vermutlich keinen signifikanten Einfluss auf die Tat Erkennung haben. Durch NMR spektroskopische Untersuchung der *residual dipolar couplings* (RDCs) beobachtete man eine Schwingungsamplitude von 46° , die vom Trinukleotidbulge ausgeht. Es ist anzunehmen, dass während dieses dynamischen Schwingungsprozesses ein Ligand in eine Bindungstasche eindringen kann und dadurch den Komplex stabilisiert.^[29]

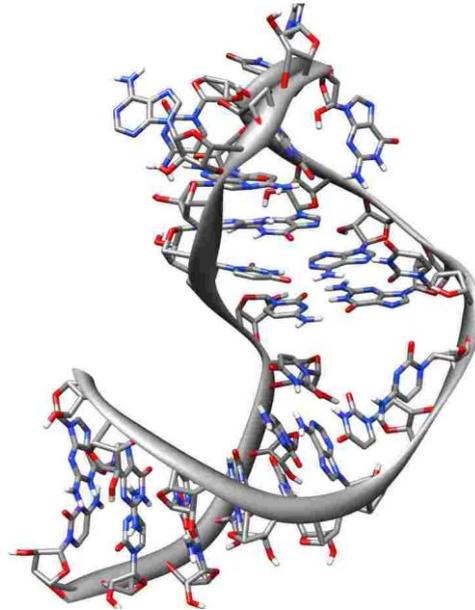


Abbildung 1: NMR Struktur des TAR Fragments (ANR).

Bislang wurde schon eine Vielzahl an TAR Liganden gefunden, die allerdings aufgrund ihrer schlechten Bioverfügbarkeit oder mangelnden Spezifität noch nicht die nötigen Anforderungen eines Wirkstoffs erfüllen konnten (s. Kapitel 4). Immerhin gelang es durch die ausgiebige Forschung auf dem Gebiet bereits sehr viel über die biologischen Mechanismen in Erfahrung zu bringen, sodass eine zielgerichtete Untersuchung möglich ist und damit dieses *drug-traget* besonders attraktiv erscheint.

3. Replikation des HI-Virus

3.1 Verbreitung und Bekämpfung von HIV Infektionen

Das *Humane Immundefizienz Virus* (HIV) ist ein Retrovirus aus der Gattung der Lentiviren. Dieses infiziert menschliche T Zellen (CD4), Macrophagen und dendritische Zellen^[30]. Dadurch kommt es zu einer starken Zunahme zelleigener Abtötungs-

mechanismen (CD8 cytotoxische Lymphozyten) und einer Apoptose der betroffenen CD4 Zellen. Dies führt zum Zusammenbruch des Immunsystems und zum Auftreten des Krankheitsbildes *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS). Seit seiner Entdeckung verbreitete sich dieses Virus pandemieartig aus, sodass bis Ende 2010 nach Schätzungen der Organisation UNAIDS ca. 28 Millionen Menschen infiziert wurden. Durch neuartige Therapien und eine ausgedehnte Aufklärungskampagne konnte jedoch die Zahl der Neuinfektionen und die Sterberate in den letzten Jahren deutlich gesenkt werden.^[31]

Durch Aufklärung der Replikationsmechanismen des HI-Virus gelang es, verschiedene antiretrovirale Chemotheraphien zu entwickeln. Zu den erfolgreichsten Wirkstoffen zählen reverse Transkription (RT) Inhibitoren, und Protease Inhibitoren, die eine effektive Reduzierung der Virenzahl bewirken. Mit neuartigen Kombinationspräparaten einer *hochaktiven antiretroviralen Therapie* (HAART) gelingt es, das Ausbrechen des Krankheitsbildes AIDS über Jahrzehnte hin zu unterdrücken und die Infektion so stark zu drosseln, dass von dem Erkrankten keine Ansteckungsgefahr mehr ausgeht. Allerdings gelingt es dem Erreger, sich in einem inaktivierten Status über viele Jahre unerkant im menschlichen Körper aufzuhalten, sodass eine endgültige Heilung bislang noch nicht möglich ist.

Trotz des enormen Fortschritts auf dem Gebiet der HIV Medikation, ist eine Behandlung sehr kostspielig und kann in den meisten Fällen nur von Patienten aus Industrieländern mit sozialen Gesundheitsstrukturen genutzt werden. Dies stellt zugleich die größte Problematik in der AIDS Bekämpfung dar, zumal 95 % der HIV Infizierten aus Entwicklungsländern stammen.

3.2 Organisation des Genoms

Das HIV-1 Genom besteht aus 9.200 - 9.600 Nukleotiden und beinhaltet neun verschiedene Gene, die eine Vielzahl an Proteinen codieren. Diese übernehmen bei der Produktion neuer Viren mannigfaltige Funktionen (s. Abbildung 2). Um in das relativ kleine Genom eine große Zahl an genetischen Informationen zu verpacken, verwendet das HI-Virus überlappende Leseraster. Bei der posttranskriptionalen Prozessierung der mRNA Stränge werden schließlich die einzelnen Exons durch *splicing* miteinander verbunden.

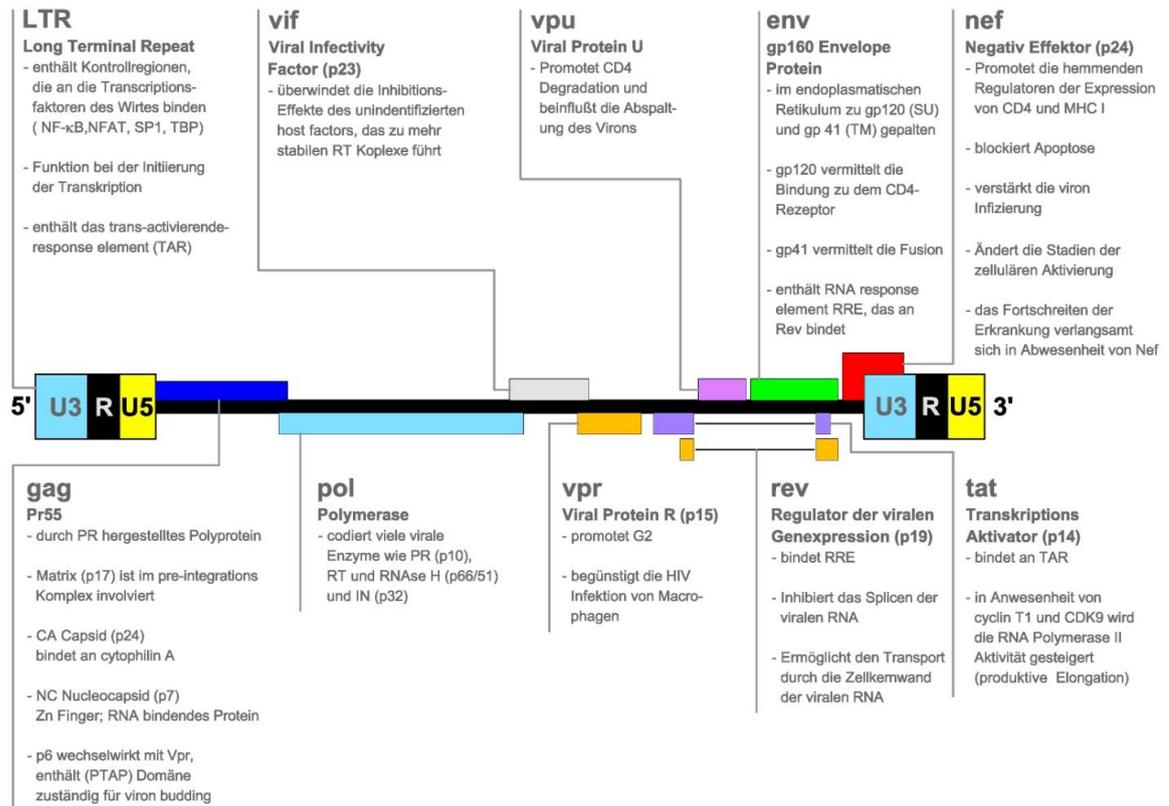


Abbildung 2: Schema des HIV Genoms mit einer Zusammenfassung der Genfunktionen.^[32]

3.3 Replikationszyklus

Nach der Übertragung des HI-Virus kommt es in der frühen Phase der Infektion zu der Integration des viralen Genmaterials in die Wirtszelle, dazu gehören insbesondere Makrophagen und T-Helferzellen. Zunächst bindet das virale Schlüsselprotein gp120 an den CD4-Rezeptor, worauf dieses einer Konformationsänderung unterliegt und die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 stimuliert werden. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung des viralen Transmembranproteins gp41 und die virale RNA gelangt in einem Capsid in die Zelle.^[33] Im Cytoplasma wird das Capsid aufgelöst und die reverse Transkription auf Microfilamenten eingeleitet.^[34] Der dabei synthetisierte dsDNA-Strang gelangt zusammen mit einer Reihe von Proteinen als hochmolekularer Präintegrationskomplex in den Zellkern.^[35] Ein im Komplex enthaltenes Kernlokalisationssignal wird dabei von zelleigenen Importinen erkannt und mit deren Hilfe der Transport in den Zellkern eingeleitet. Die mitgeführte virale Integrase leitet anschließend die Integration des viralen Erbguts in das Wirtszellchromosom ein.^[36, 37]

Daraufhin folgt die Transkription des viralen Genoms durch die Polymerase II (s. Kapitel 3.4). Die dabei produzierten kurzen gespliceten RNA Fragmente gelangen durch die Zellmembran und unterliegen im Zellplasma einer Translation zu verschiedenen

funktionellen Proteinen, wie beispielsweise Tat und Rev. Diese können wieder in den Zellkern eindringen und regulatorische- bzw. Transportfunktionen übernehmen. So gelangen ungesplicete HIV Transkripte, die das gesamte virale Genmaterial beinhalten, mit Hilfe des viralen Rev Proteins durch die Membran des Zellkerns in das Cytoplasma.^[32, 38, 39, 40]

In der späten Phase der Genexpression wird durch die Translation der viralen mRNA Stränge unter anderem Hüllglykoproteine, Gag-Proteine, regulatorischen und akzessorischen viralen Proteine gebildet und an die äußere Zellwand transportiert. Dort erfolgt der Zusammenbau, Budding und Freisetzung unreifer viraler Partikel, die durch Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine schließlich zu infektiösen Viren reifen.^[41, 42, 43, 44]

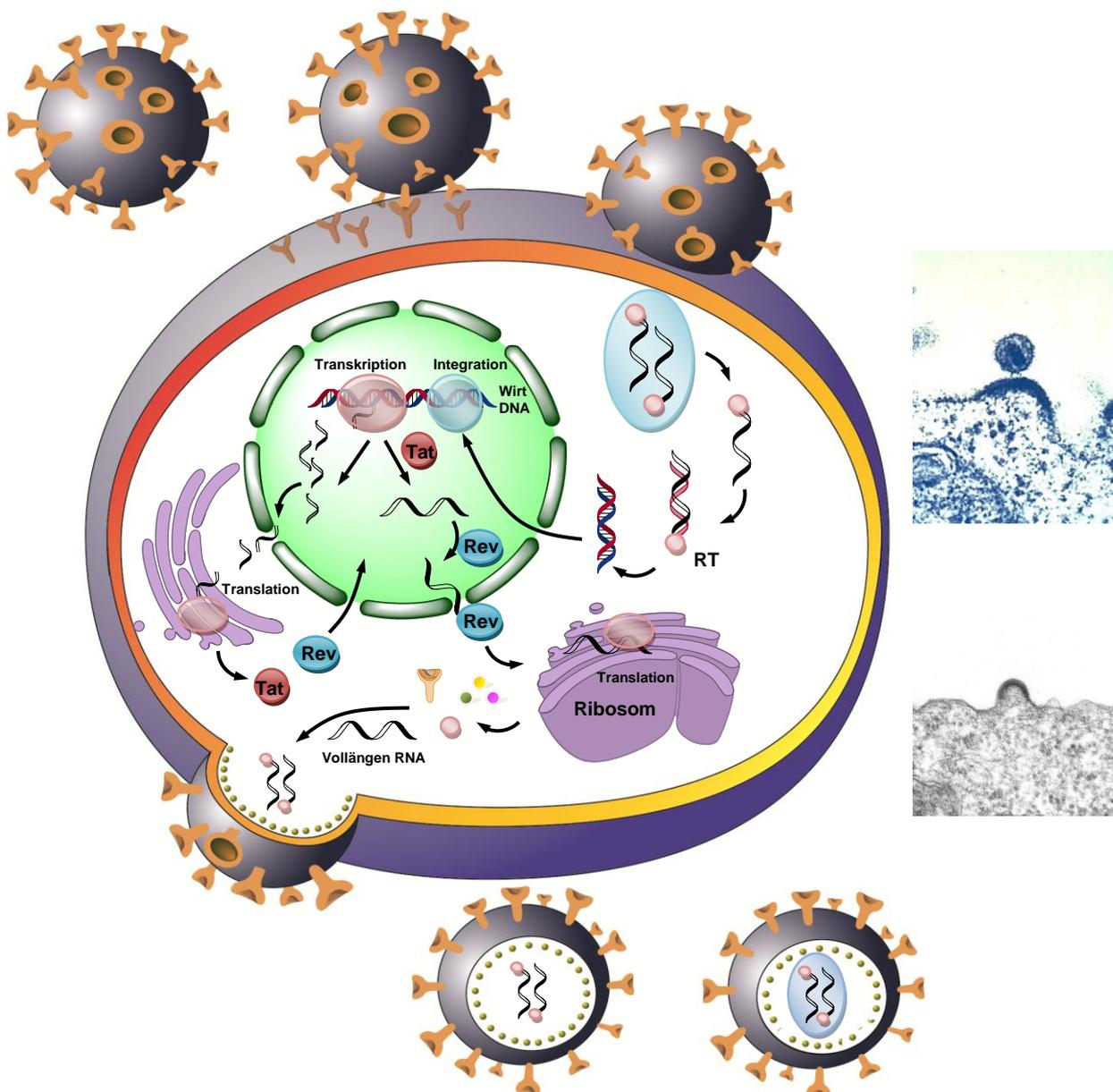


Abbildung 3: HIV Replikationszyklus

3.4 Mechanismus der transcriptionalen Aktivierung

3.4.1 Einleitung und Kurzübersicht

Im viralen Lebenszyklus stellt die Transkription eine kritische Barriere dar. Nachdem die Polymerase II mit der Transkription begonnen hat, gelingt es ihr nicht, den vollständigen viralen Templatstrang abzulesen, da im frühen Stadium der Transkription nur eine geringe Menge der Transkriptionskinase p-TEFb für die Polymerase II zur Verfügung gestellt werden kann. Somit bilden sich zu diesem Zeitpunkt nur kurze gesplicete virale Transkripte, welche die Zellkernmembran durchdringen können, im Zellplasma einer Translation zu den Proteinen Tat und Rev unterliegen und die schließlich wieder in den Zellkern eindringen können. Durch die Bifunktionalität des viralen *transcriptional transactivator* (Tat) Peptids gelingt es, den humanen *positive transcription elongation factor b* (p-TEFb) zu binden und gleichzeitig in der Nähe der Polymerase II zu fixieren. Dabei spielt das hoch konservierte, aus 59 Nukleotiden bestehende *trans-activation response element* TAR, mit einer 6-gliedrigen Hairpinloop Struktur und einer pyrimidinreichen bulge Region (UCU), eine entscheidende Rolle. Dieses befindet sich am 5'-Ende der naszierenden viralen mRNA und fungiert als spezifischer Anker für das Tat-Peptid. Durch die räumliche Nähe der Kinase p-TEFb und der Polymerase II findet eine hoch effiziente Aktivierung durch unterschiedliche Polyphosphorylierungsprozesse statt. So kommt es zu einer Steigerung der Transkription um das 100 bis 1000-fache und zur Produktion von ungekürzten RNA Transkripten, die für die Bildung neuer Viren benötigt werden.^[45]

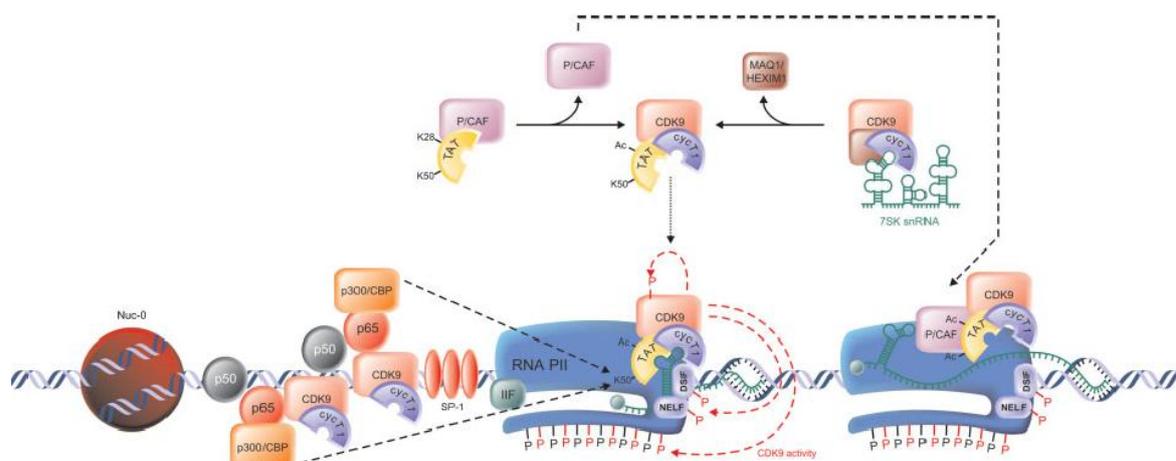


Abbildung 4: Tat aktivierter Transkriptionsmechanismus.^[46]

3.4.2 Die frühe Phase der HIV Genexpression

Während die meisten eukaryotischen Promoter eine TATA box oder eine pyrimidinreiche Region enthalten, besteht die HIV LTR Region aus mehreren redundanten Einheiten dieser beiden Elementen. Am 5`-Ende des viralen Genoms (nach reverser Transkription und Integration) befinden sich mehrere regulatorische DNA Motive, die durch Zinkfinger des humanen Transkriptionsfaktors *specificity protein 1* (Sp1) komplexiert werden.^[46, 47] Dieser ist verantwortlich für die Rekrutierung des an TATA bindenden Proteins (TBP). Der so entstandene Komplex wird durch die Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB und TFIID stabilisiert und zeigt eine hohe Affinität zu der Polymerase II. Nach Anlagerung der Pol II, in Verbindung mit TFIIE, TFIIH und TFIIF, kommt es schließlich zur Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC). Das TFIIH dient dabei unter anderem als DNA-Helikase, die den Doppelstrang am Transkriptionsstart entwindet, so dass die RNA-Polymerase II die Transkription einleiten kann.^[48] Durch dieses Zusammenspiel mehrerer Faktoren gelingt es dem Virus, die Transkription des viralen Genoms zu begünstigen. So stellt das HIV LTR eines der effizientesten Promotorsysteme in der Natur dar.^[49]

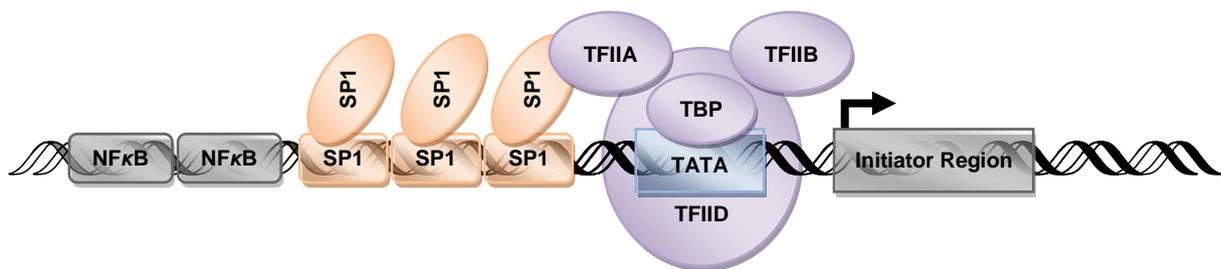


Abbildung 5: Initiator-Faktoren Rekrutierung.

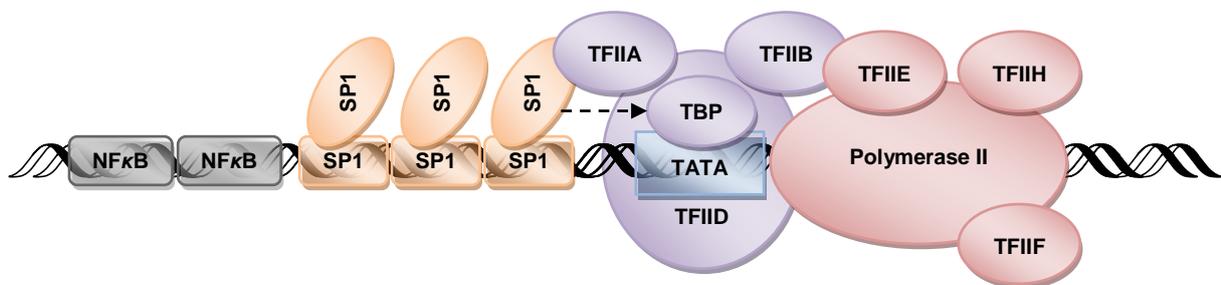


Abbildung 6: Präinitiationskomplex.

Nach der Abspaltung des Promotors beginnt die Polymerase II sofort mit der Transkription der viralen DNA, gerät aber schnell unter den Einfluss der negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF. Daraufhin beendet die Polymerase II ihre Funktion und der Transkriptionsprozess wird unterbrochen.^[50] Es konnten Hinweise gefunden werden, dass NELF dabei mit dem TAR Element im direkten Kontakt steht, und dadurch die Elongation inhibiert.^[51]

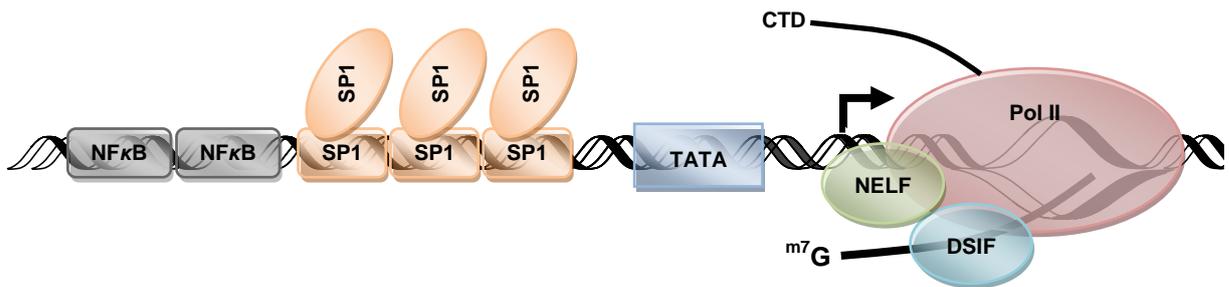


Abbildung 7: Polymerase pausiert.

Die kleine snRNA 7SK findet man in einem nuklearen Ribonukleoproteinkomplex (snRNP) mit einer Anzahl von anderen Proteinen, welche die Stabilität und Funktion des Komplexes regulieren. Ihre Hauptfunktion liegt in der Bereitstellung der für die Transkription essentiellen Kinase p-TEFb. Dabei übernimmt das Protein Brd4 die Transportfunktion von dem p-TEFb Reservoir zur Polymerase II. Dies ist nicht nur bei der generellen zellulären Transkription zu beobachten, sondern auch im frühen Stadium der Tat-unabhängigen viralen Transkription.^[52, 53, 54]

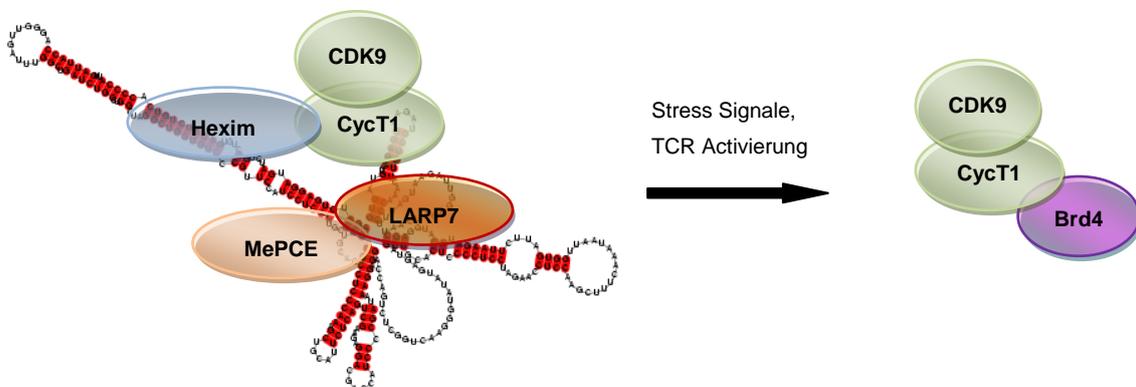


Abbildung 8: Rekrutierung von p-TEFb (Komplex aus CycT1 und CDK9) über Brd4.

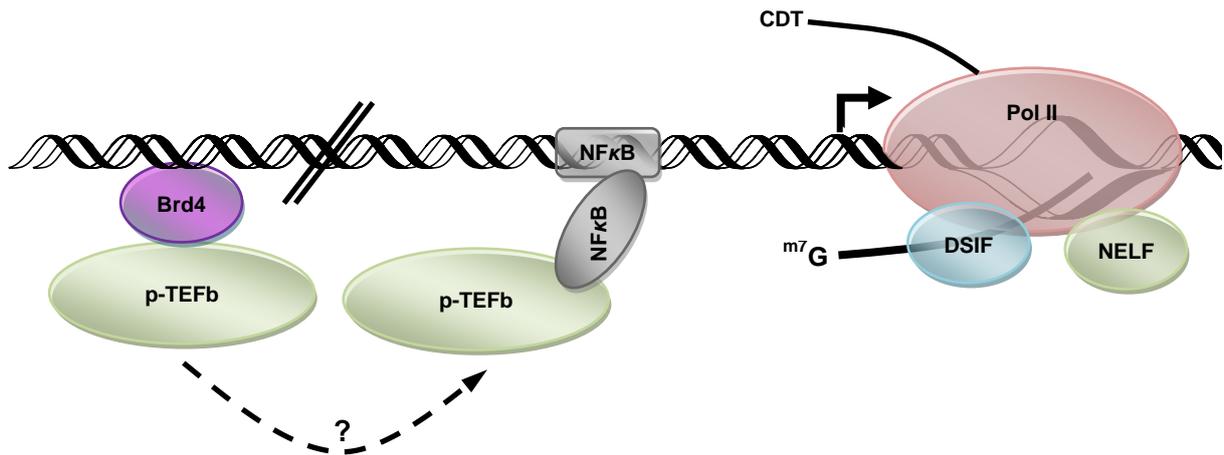


Abbildung 9: Anlagerung von p-TEFb an die DNA.

Am 5`-Ende des viralen Genoms finden sich zwei κ B-Motive, an denen der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) bindet. Diese sind möglicherweise in der Lage, der Brd4 vermittelten Bereitstellung von p-TEFb zu umgehen und die Kinase direkt an die viralen Zielgene zu liefern.^[55] Auf diese Weise kann die Transkriptionshemmung durch Phosphorylierung von DSIF und NELF überwunden werden, und es kann zur produktiven Elongation und damit zur Ausbildung von viralen Transkripten kommen.^[56] Diese codieren unter anderem das Tat Protein, mit dessen Expression die zweite Phase der Transkription des HIV Genoms beginnt.

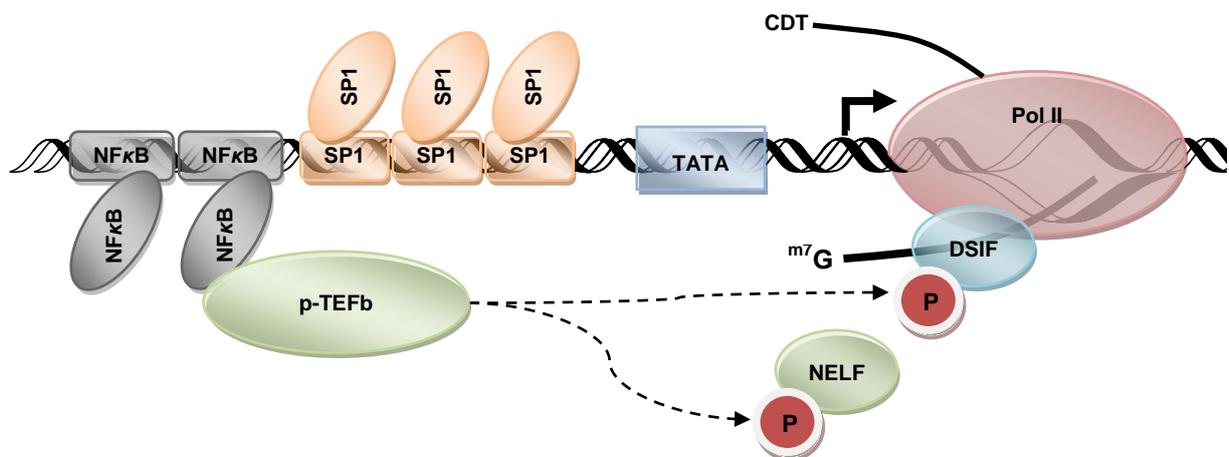


Abbildung 10: Elongation.

3.4.3 Tat aktivierte Transkription

Im nächsten Schritt der HIV Infektion wird eine sehr hohe Transkriptionsrate des viralen Genoms durch Tat eingeleitet. Das Tat Protein besitzt mit seiner *transactivation domain* (1-49) eine spezifische Bindungsstelle, die eine hohe Affinität zu pTEFb aufweist. Über die cysteinreiche Region (22-37) bildet sich ein Zinkfinger aus, der die Bildung eines stabilen Komplexes mit dem CyclinT1 ermöglicht. Aber auch Bindungen zu Cdk9 lassen sich anhand einer Kristallstruktur des Komplexes aus Tat/CyclinT1/Cdk9 erkennen.^[57] Die daraus resultierende hohe Bindungsenthalpie ermöglicht es Tat, die beiden Proteine CyclinT1 und Cdk9 aus dem 7SK snRNP Komplex zu extrahieren. Der exakte Mechanismus konnte allerdings bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

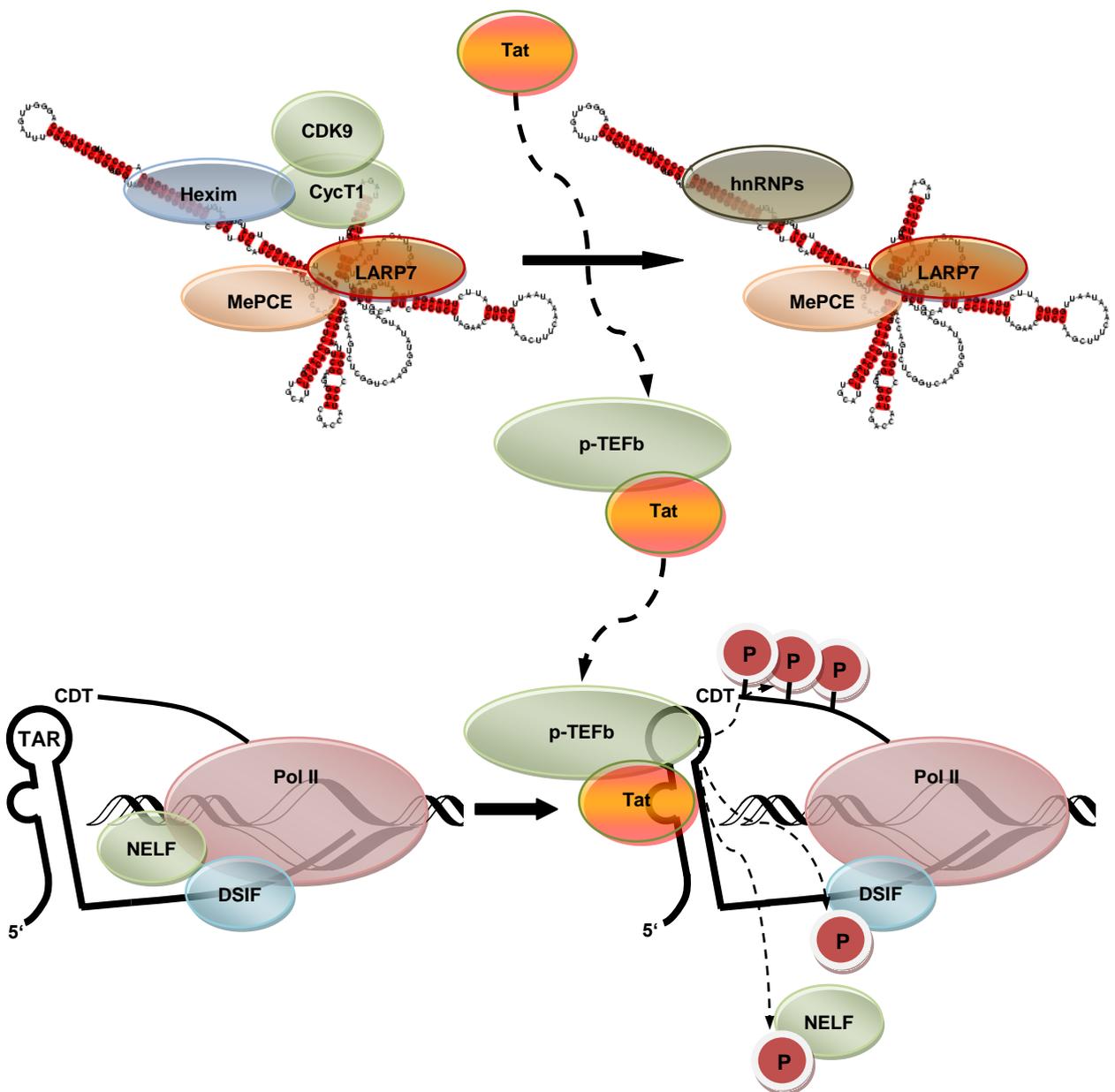


Abbildung 11: a) Rekrutierung von p-TEFb durch Tat von der 7SK snRNP; b) Tat vermittelter Transkriptionsprozess.

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Tat zunächst über die hoch affine cysteinreiche Region an CyclinT1 bindet und dabei HEXIM1 verdrängt und daraufhin der Tat/CyclinT1/Cdk9 Komplex abgespalten wird.^[58, 59] Zudem führt die Abspaltung der HEXIM Proteine zu einer Konformationsänderung des 7SK, so dass eine Rückreaktion zu dem ursprünglichen 7SK/snRNP Komplex verhindert wird.^[60] Ein alternativer Mechanismus bei dem der 7SK/snRNP Komplex am Präinitiationskomplexes (PIC) beteiligt ist, wurde von D'Orso und Frankel diskutiert.^[61]

Durch mehrere Experimente konnte gezeigt werden, dass dieser Extraktionsmechanismus essentiell für die Expression des HI-Virus ist und der 7SK/snRNP Komplex als maßgebliches Reservoir der p-TEFb Kinase fungiert.^[62] Der Komplex aus Tat und p-TEFb bindet mit hoher Affinität an das *transactivation response element* (TAR).^[63] Diese RNA Sequenz liegt codiert im LTR des viralen Genoms vor und wird somit gleich zu Beginn der Transkription freigesetzt, bevor es zu einem Abbruch der Elongation kommt. Aufgrund der so erzwungenen räumlichen Annäherung von p-TEFb zu dem Polymerase II Komplex kann eine hoch effiziente Phosphorylierung an DSIF und NELF und am CTD der Polymerase II stattfinden. Dies führt zu einer Steigerung der Transkriptionsrate um das 100 bis 1000-fache und zur Produktion ungespliceter viraler RNA Transkripte.

Mitverantwortlich für die Aktivierung der Transkription sind vermutlich eine Reihe weiterer Proteine, die als *superelongation complexes* (SECs) bezeichnet werden. Diese steigern die Aktivität der Polymerase II indem sie die 3'-OH Gruppen in der naszierenden mRNA zu der katalytischen Stelle hin ausrichten und ein *backtracking* der Pol II verhindern.^[64, 65]

3.4.4 Regulation von Tat

Posttranslative Modifikationen sind meist reversible Prozesse und dienen der schnellen Regulierung funktioneller Proteine. Auch das Tat Protein ist einer Vielzahl derartiger Derivatisierungsprozesse unterlegen, die vor allem in der ARM region zu finden sind. Generell kann man hierbei zwischen aktivierenden und inhibierenden Modifikationen am Tat Protein unterscheiden.

3.4.5 Aktivierende Modifikationen an Tat

Aktivierende Modifikationen lassen sich im gesamten Bereich des Tat Peptids finden. Dazu zählen Phosphorylierungen, Polyubiquinierungen, Acetylierungen sowie Monomethylierungen. Die Acetyltransferase PCAF/KAT2B ist verantwortlich für die Acetylierung des Lys28 in der cysteinreichen Region von Tat. Hierdurch kommt es zu der Ausbildung der hohen Affinität zu p-TEFb.^[66]

Die genauen Funktionen der Phosphorylierung von Tat sowie der Polyubiquitinierung an Lys71 ist bislang noch unklar. Lediglich Kurosu et al. beschrieb einen Ubiquitin vermittelten Aktivierungsprozess, der durch eine Verstärkung des Tat/CyclinT1 Komplexes erklärt werden konnte.^[67]

3.4.6 Inhibierende Modifikationen an Tat

Eine Inhibierung des Tat Peptids regelt das HI-Virus durch Methylierungen an Argininresten durch die Methyltransferase PRMT6^[68] und Di- bzw. Trimethylierungen an Lysinresten durch die Methyltransferase KMT1E^[69]. Betroffen sind hierbei die Aminosäuren Arg52 und Arg53 sowie Lys50 und Lys51 in der TAR bindenden Domäne. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass diese Derivatisierungen keinen Einfluss auf die positive Ladung der Aminosäurereste haben und somit vermutlich sterische Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes einen inhibierenden Effekt ausüben. Ungeklärt ist hingegen, ob die Methylierungen reversibel sind, oder ob das desaktivierte Tat andere Funktionen im HIV Replikationszyklus übernimmt. So könnte diese stabile Tat Modifikation als langlebiges Tat Reservoir in einer latenten Wirtszelle dienen.^[70]

3.4.7 Tat-TAR Wechselwirkung

Der *Trans-Activator of Transcription* (Tat) ist ein regulatorisches Protein, das die virale Transkriptionsrate um ein Vielfaches steigern kann. Je nach Subtyp ist es aus 86 bis 101 Aminosäuren aufgebaut und enthält verschiedene funktionelle Bereiche. Diese lassen sich in die Transaktivationsdomäne (1-48), die insbesondere bei der Wechselwirkung mit p-TEFb beteiligt ist, und in die RNA Bindungsdomäne (49-60) einteilen.

Betrachtet man zunächst das HIV-1 Tat, so findet man eine cysteinreiche Region (22-37) mit 7 Cysteinbausteinen. Diese zeigt mit anderen Subtypen die größte Überein-

stimmung. Es wird vermutet, dass diese zur Bildung eines Zinkfingers dienen, der die Tat Konformation stabilisiert und die Affinität zu p-TEFb steigert.^[71]

Die Kernsequenz (38-48) beinhaltet eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren, die mit CyclinT1 in Kontakt treten.

Über die basische Region (49-60), mit sechs Arginin- und zwei Lysin Bausteinen, gelingt es dem Tat Peptid die TAR RNA zu erkennen und mit hoher Affinität zu binden. An dieser Stelle finden sich zudem die meisten posttranskriptionellen Modifikationen, die zur Regelung des Tat Peptids dienen. Am C-Terminus befindet sich schließlich noch eine glutaminreiche Region, die ebenfalls für regulatorische Prozesse vorgesehen ist.^[72, 73]

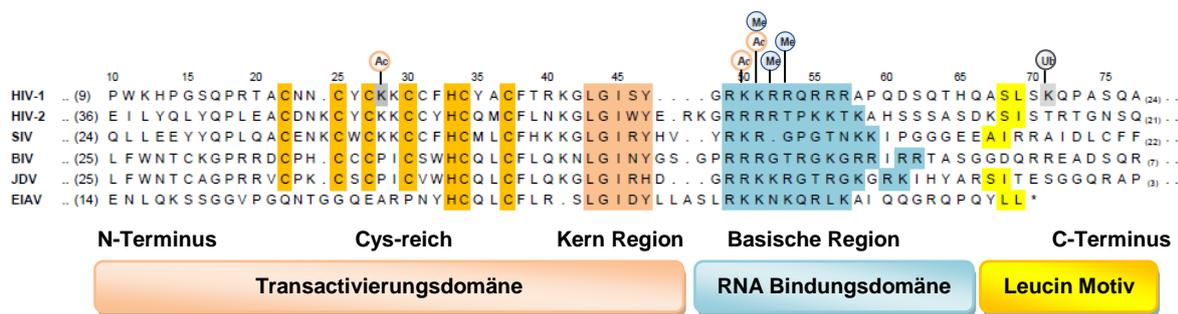


Abbildung 12: Abgleich der Tat Sequenz verschiedener Lentiviren. Posttranslative Modifikationen an dem HIV-1 Tat Peptid. Ac: acetyl; Me: Methyl; Ub: ubiquinyl.^[74]

Die basische Region des Tat Peptids bindet direkt an das HIV-1 *Trans-activation response element* (TAR). Die für die TAR Erkennung essentiellen Nukleinbausteine wurden bereits in den frühen 90er Jahren durch eine Reihe von Untersuchungen an Tat Mutanten identifiziert.^[75, 76, 77, 78, 79] Dabei erkannte man, dass Tat mit U23 in Wechselwirkung tritt und die benachbarten Basen C24 und U25 nur als Platzhalter fungieren und durch andere Nukleinbasen oder Linker ersetzbar sind.^[78, 80] Zudem beobachtete man durch Derivatisierungen an den Phosphaten, dass diese an Position P22, P23 sowie P40 entscheidende Kontaktpunkte zu Tat darstellen.^[77, 78, 81]

Eine Vielzahl von Experimenten darunter *chemical crosslinking*^[82] und *photo-crosslinking*^[83, 84] geben starke Hinweise dafür, dass die bulge Region eine Schlüsselstelle bei der Tat/TAR Erkennung darstellt. Schließlich konnten Bayer et al. durch photo-crosslinking Experimente zeigen, dass das Lys41 mit U42 und das Arg57 mit U31 in Wechselwirkung treten. Somit gelang es erstmals eine grobe Struktur des Tat/TAR Komplexes zu beschreiben. Es zeigte sich, dass das Tat Peptid in der major groove der TAR RNA eingelagert wird und die basische Region dabei in den Trinukleotidbulge ragt (siehe Abbildung 14).^[85]

Nachdem erste Strukturen von TAR im Komplex mit Argininderivaten durch NMR spektroskopische Methoden erstellt werden konnten, wurde die Vermutung weiter bekräftigt, dass die Bindungsstelle um G26 entscheidend für die Tat/TAR Wechselwirkung ist. Da die Affinität zwischen Argininamid und TAR nur sehr schwach ist, vermutete man bei der Komplexierung mit dem Tat Peptid einen mehrstufigen Prozess.^[86] Im ersten Schritt erfolgt eine Erkennung eines Arginin-Rests an G26 in der bulge Region, das im zweiten Schritt zu einer Konformationsänderung von TAR führt. Diese strukturelle Umformung ermöglicht dem Tat Peptid, weitere Kontakte aufzubauen. Dazu zählen vermutlich die Phosphate P22, P23 und P40 aber auch eine Adressierung eines elektrostatischen hotspots bei G28 ist denkbar.^[87] So gelingt es dem Tat Peptid, im letzten Schritt weitere Bindungen zur RNA aufzubauen, die in ihrer Gesamtheit einen starken synergetischen Effekt ausüben und daher für die hohe Affinität von Tat zu TAR verantwortlich sind.

3.4.8 Die Struktur des Tat/TAR/p-TEFb Komplexes

Obwohl noch keine Kristallstrukturen von HIV-1 TAR/Tat/p-TEFb existieren, gelang es im Jahre 2008 Baumli et al., durch Röntgenkristallographie die erste Struktur des Komplexes aus HIV-1 Tat₍₁₋₄₈₎/p-TEFb zu lösen.^[88] Obwohl die Strukturen der p-TEFb Untereinheiten große Ähnlichkeiten zu der räumlichen Gestalt von CDK/Cyclin vorweisen, wie es im humanen Zellcyclus vorkommt, unterscheiden sie sich im Komplex in der relativen Orientierung zueinander. Zudem lässt sich eine um 40% geringere Kontaktfläche als zwischen CDK2/CyclinA beobachten, was zu einer erhöhten Flexibilität des Komplexes führt.

Ausgehend von den Strukturdaten konnte Baumli et al. einen Autophosphorylierungsmechanismus von CDK9 am katalytisch aktiven Thr186 im T-loop, sowie an drei weiteren Stellen am C-Terminus, beobachten und interpretieren.^[88] An der cysteinreiche Region des Tat Peptids (Cys22, Cys34, Cys37 und His33) bildet sich ein Zinkfinger aus. Dieses führt zu einer konformationellen Fixierung der Proteinstruktur. Man findet in dem Kristall noch ein weiteres Zinkkation an Tat komplexiert, dies beruht vermutlich nur auf Kristallpackungseffekte.

Ergänzend dazu wurde von der Gruppe um Price die Kristallstruktur eines Komplexes aus CyclinT1/EIAV Tat₍₄₁₋₆₉₎/EIAV TAR aufgeklärt.^[57] Hier kann man beobachten, dass die Konformation von CyclinT1 nahezu unverändert auch in dem Komplex HIV-1 Tat₍₁₋₄₈₎/p-TEFb zu finden ist. Auch das Tat₍₄₁₋₆₉₎ Fragment ist so positioniert, wie man es in dem

HIV-1 Tat₍₁₋₄₈₎/p-TEFb Komplex bei einer Extrapolation am C-Terminus erwarten würde. Der basische Bereich der beiden Tat Peptide unterscheidet sich im Wesentlichen nur durch Vertauschen von Arginin und Lysineinheiten, so dass in beiden Fällen eine alpha-helikale Struktur sich ausbildet.

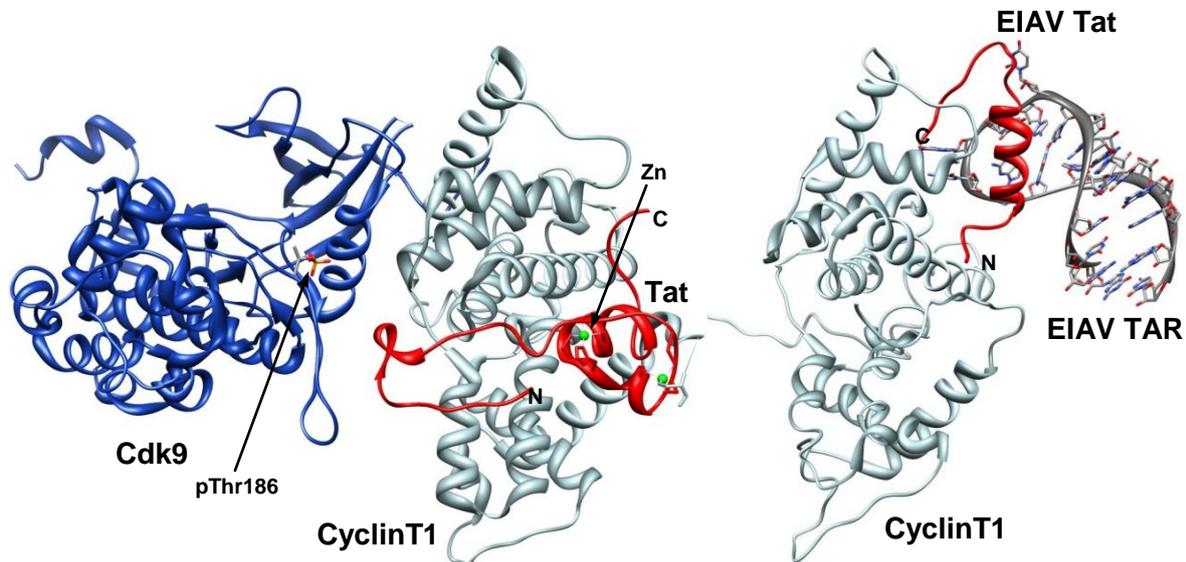


Abbildung 13: a) Kristallstruktur des HIV-1 Tat/CDK9/CyclinT1 Komplexes (3MI9)^[57]; b) Kristallstruktur des Komplexes aus EIAV Tat/CDK9/CyclinT1 (2W2H)^[71].

EIAV TAR besteht aus einem 6-mer Hairpin loop und besitzt im Gegensatz zu HIV-1 TAR keinen Trinukleotidbulge. Dieses Strukturelement wird über die positiv geladenen Aminosäurereste gebunden, sodass es zu einer Stabilisierung der EIAV RNA kommt. Im Fall von HIV-1 konnte durch zahlreiche Experimente die UCU Bulgeregion als Tat Bindungsstelle ausgemacht werden. Durch *modeling* lässt sich HIV-1 TAR über den Trinukleotidbulge an den CyclinT1/EIAV Tat₍₄₁₋₆₉₎ Komplex anlagern. Hierbei kann eine Annäherung von TAR an den Bereich von CyclinT1 beobachtet werden, der vermutlich für eine spezifische Erkennung der RNA vorgesehen ist.

4. HIV-1 TAR Liganden

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über literaturbekannte TAR Liganden verschaffen. Dabei wurden die Verbindungen in vier Gruppen eingeteilt: Peptide und Peptoide, Oligonukleotide, kleine Moleküle und Konjugate.

4.1.1 Peptide

Bereits in den frühen 90er Jahren konnten durch photo-crosslinking Experimente erste Hinweise auf die Orientierung des Tat Peptids im Komplex mit TAR gefunden werden.^[89] Man beobachtete eine Wechselwirkung des Lys41 mit U42 und Arg57 mit U31, sodass hieraus eine erste Komplexstruktur postuliert wurde.^[85]

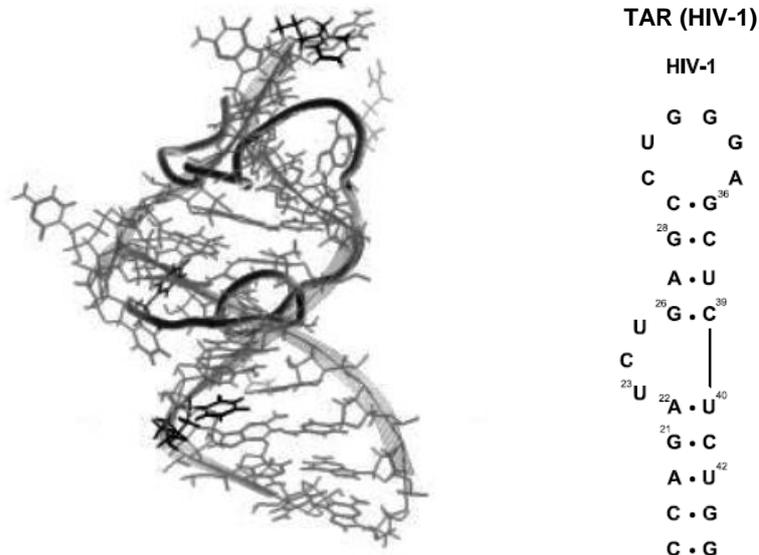


Abbildung 14: Postulierte Struktur des Komplexes aus Tat und TAR.^[85]

Ausgehend von diesen Resultaten ist anzunehmen, dass die basische Region des Tat Peptids (YGRKKRRQRRRP) mit dem Trinukleotidbulge von TAR in Wechselwirkung tritt. Man untersuchte zunächst zu dieser Tat Sequenz analoge Peptide und konnte eine vergleichbare Affinität zu dem Volllängen Tat Peptid feststellen.^[90, 91, 92, 93, 94]

Mittels Festphasen REDOR ¹³C/¹⁵N-¹⁹F NMR Spektroskopie gelang es Huang et al. einen direkten Beweis zu finden, dass das Tat-Fragment (⁴⁷YGRKKRRQRRR⁵⁷) über Arg52 mit U23 in direkten Kontakt gerät. Dazu wurde eine U23 Fluor-gelabelte TAR RNA hergestellt und mit dem 11-mer Peptid komplexiert. Auf diese Weise konnten 6 Distanzmessungen zwischen der Aminosäure Arg52 und dem 5-Fluorouracil erhalten werden.^[95]

Weitergeführt wurde die Entwicklung peptidbasierender Liganden durch kombinatorische Synthesestrategien. Mittels Festphasensynthese konnten Rana et al. mit relativ geringem Aufwand eine große Auswahl an Tripeptiden aus dem Repertoire natürlicher Aminosäuren in (D)- und (L)-Form herstellen. Als affinster Ligand stellte sich das NH_2 -(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn-OH mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 0,42 \mu\text{M}$ heraus.^[96]

Molekulardynamische Untersuchungen zeigten, dass das Tripeptid NH_2 -(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn-OH nur an der minor groove stabile Bindungsmoden einnehmen kann und dabei zwischen den Basenpaaren G26-C39 und A22-U40 zu finden ist. Die Bindungsenergie stammt hauptsächlich von van der Waals Wechselwirkungen (23 - 40 kcal/mol) mit der RNA, elektrostatische Effekte und die Solvatisierungsenthalpie spielen nur eine untergeordnete Rolle (3 kcal/mol). Es wird vermutet, dass der Ligand mehrere Bindungsmodi eingehen kann, die im einzelnen nur schwach ausgeprägt sind, aber in der Summe die interhelicale Bewegung der TAR RNA einschränken, so dass der dynamische Mechanismus, der für die Tat-TAR Bindung notwendig ist, gehemmt wird.^[97]

Die Gruppe um J. Yu untersuchte 16mer Peptide hinsichtlich ihrer TAR Affinität, wobei die Aminosäuren Leucin, Lysin sowie Glycin verwendet wurden. Über eine partielle Substitution der Lysinbausteine durch N^ϵ -Acridinyl-Lysin konnte eine erhebliche Aktivitätssteigerung gemessen werden. Mittels dieser Kombination von basischen und aromatischen Resten gelang es, einen hoch affinen Tat Antagonisten zu entwickeln ($K_d = 370 \text{ pM}$).^[98, 99]

In der Gruppe von M. Göbel wurden verschiedene Tripeptide mit unnatürlichen und peptidomimetischen Bausteinen entwickelt. Von besonderem Interesse war es, eine umfangreichere Auswahl an heteroaromatischen Aminosäuren zu schaffen, da aus natürlichem Ausgangsmaterial nur vier aromatische Aminosäuren zugänglich sind (His, Phe, Trp und Tyr). Lysin und Arginin wurden sowohl in L- als auch in D-Form als terminale Aminosäuren um den künstlichen Baustein herum eingebaut, um über elektrostatische Wechselwirkungen zu dem Phosphatrückgrat eine Affinitätssteigerung zu erzielen.

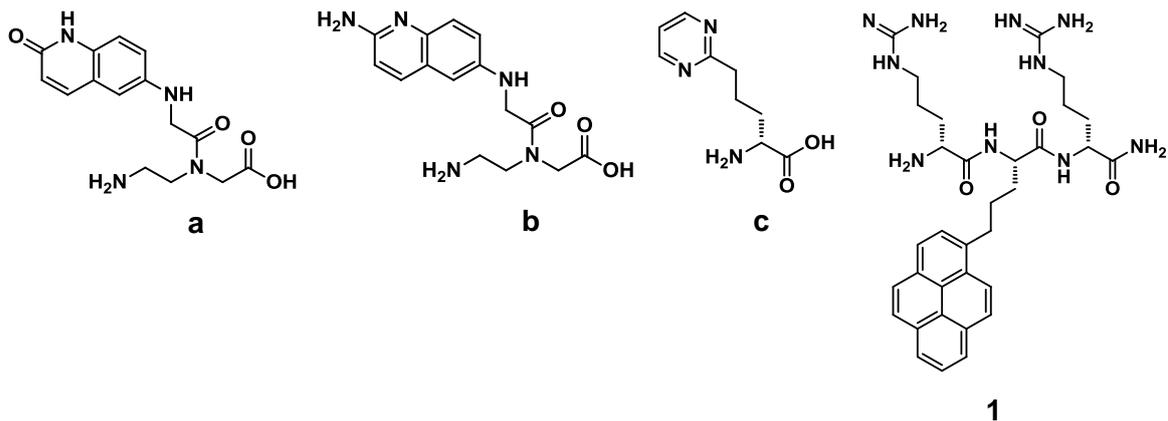


Abbildung 15: a-c: Monomere für die Tripeptidsynthese; 1: TAR Ligand Arg-Pyrenyl(C3)-Arg.

Die zu Peptid **1** analogen Tripeptide mit den Chinolonen **a** oder Aminochinolinen **b** in zweiter Position zeigten im Fluoreszenzassay IC_{50} -Werte im Bereich von 2-3 μM ^[100], das Tripeptid mit Pyrimidinbaustein **c** einem IC_{50} -Wert von 5-6 μM . Die höchste Affinität konnte bei dem Tripeptid Arg-Pyrenyl(C3)-Arg **1** mit einem IC_{50} von 0,8 μM ($K_d = 40$ nM) gefunden werden.^[101]

4.1.2 β -Peptide

Ein grundlegendes Problem bei peptidischen Wirkstoffen ist die enzymatische Zersetzung bei oraler Aufnahme. Daher ist es bis heute von besonderem Interesse, Peptidomimetika zu entwickeln, die eine höhere Halbwertszeit im menschlichen Organismus aufweisen. Die bekanntesten Vertreter sind neben retro-enantio Peptiden unter anderem auch β -Peptide, die auch als Tat Mimetikum erfolgreich eingesetzt wurden. Durch die Übertragung der Aminosäuresequenz des Tat Peptids (47-57) auf das β -Peptid, erhielt man einen TAR Liganden mit einer Bindungskonstante K_d von 29 nM.^[102]

4.1.3 Peptoide

Ebenfalls resistent gegenüber dem enzymatischen Abbau sind Wirkstoffe mit peptoidischer Struktur. Dieses Motiv konnte auch erfolgreich von Hamy et al. bei der Entwicklung von TAR Antagonisten verwendet werden. Mittels kombinatorischer Synthesestrategie wurde das neungliedrige Peptoid CGP 64222 **5**, mit 8 basischen Gruppen, entwickelt. Diese hochaffine Verbindung, mit einem IC_{50} Wert von 12 nM, zeigte

auch im Zellassay einen signifikanten Effekt ($IC_{50} = 10\text{-}30\ \mu\text{M}$). NMR Untersuchungen deuten auf eine Bindung im bulge Bereich hin.^[103]

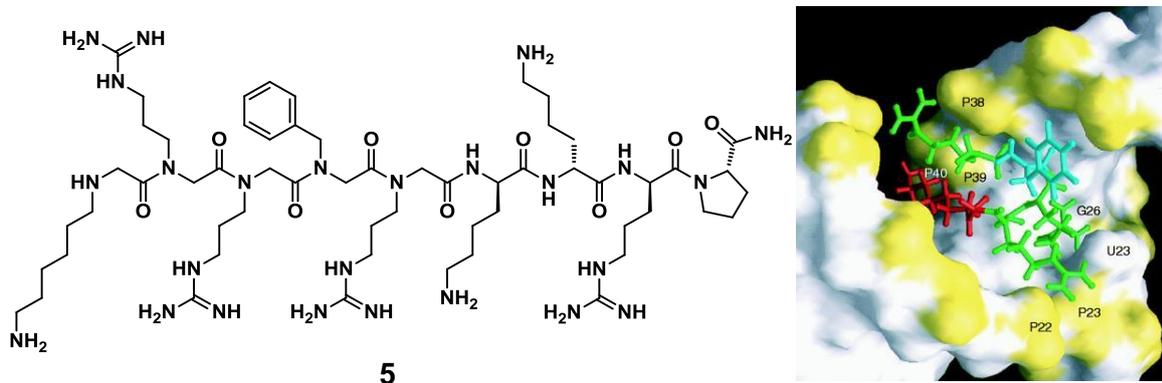


Abbildung 16: a) Struktur des neungliedrigen Peptoids CGP 64222; b) Modell des Komplexes aus dem Peptidoid CGP 64222 mit TAR^[103].

Durch eine Einführung von polaren Strukturelementen (Methoxycarbonyl, Carboxamid) an den Seitenketten von Peptoiden konnte eine bessere Bioverfügbarkeit sowie eine Steigerung der Proteaseresistenz erreicht werden. Ein derartiges Peptoid mit der Tat Sequenz (47-57) zeigte ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zur TAR RNA ($K_d = 68\ \text{nM}$).^[104]

Weiterhin wurden Tat analoge Peptidomimetika aus Harnstoff- sowie Carbamatbrücken verknüpfte Aminosäuren aufgebaut, mit Bindungskonstanten im Bereich von $0,11\text{-}1,11\ \mu\text{M}$.^[105]

Multivalent bindende Oligomere (MBOs) sind Moleküle, bei denen mehrere Seitenketten sich von einer Polyaminhauptkette aus erstrecken. Auf diese Weise versucht man die Eigenschaften von Peptiden nachzubilden. Wang et al. zeigten anhand in-vitro-Bindungsassays in Kombination mit modellbasierenden Zellassays, dass MBOs bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen in der Lage sind, die Tat-TAR Bindung zu hemmen. Dazu wurden mehrere MBO-Bausteine mit 4-Hydroxybenzylresten und einer Lysinseinheit kombiniert, um somit aromatische als auch basische Funktionalität in dem Liganden zu vereinen.^[106]

4.1.4 Cyclische Peptide

Um eine verbesserte Pharmakokinetik zu erreichen, wurden von verschiedenen Forschergruppen cyclische Peptide entwickelt. Die Cyclisierung von Aminosäuresequenzen erhöht die metabolische Stabilität, Potenz, Rezeptor-Selektivität sowie Bioverfügbarkeit der Verbindungen. Weiterhin erhöht die starre Geometrie der zyklischen Peptide die Bindungsaffinität gegenüber dem ausgewählten Zielmolekül, da die Freiheitsgrade eingeschränkt werden und so die Entropie des ungebundenen Liganden gesenkt werden kann. So ist ein von Tamarasu et al. entwickeltes cyclisches 5mer in der Lage, den Tat-TAR Komplex in menschlichen Zellen mit einem IC_{50} von 40 nM zu inhibieren.^[107]

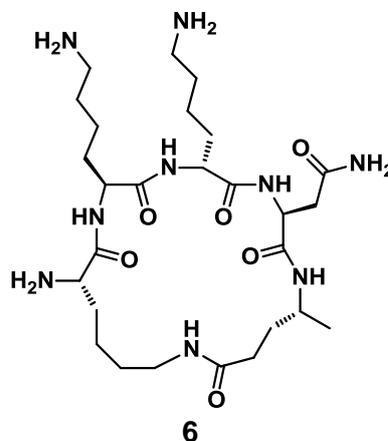


Abbildung 17: Ein von Tamarasu et al. entwickeltes cyclisches 5-mer Peptid als potentieller Tat Inhibitor.

Robinson et al. beschäftigten sich mit der Entwicklung von diversen cyclischen Peptiden als β -hairpin Mimetika. Durch das grundlegende D-Pro L-Pro Motiv wird die Konformation fixiert und eine erhöhte Starrheit erreicht, was eine wichtige Voraussetzung für einen selektiven Liganden darstellt. Insbesondere konnten die beiden Peptide L-22 ($_1$ RVRTRKGRRIRIPP $_{14}$) mit einem K_d von 30 nM und KP-Z-41 ($_1$ RVRRCRQRKGRRICIRIPP $_{18}$) mit einem K_d von 1 nM erfolgreich als TAR Liganden eingesetzt werden. Trotz eines 10000-fachen Überschusses an tRNA konnte durch *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) die Affinität sowie Selektivität zur TAR RNA belegt werden.

Durch die Kooperation mit Varani gelang eine Strukturaufklärung der Komplexe mittels NMR spektroskopischer Methoden. Man beobachtete, dass sich das Peptid mit hoher Selektivität in die major groove einlagert und dabei, neben mehreren markanten Stellen zwischen der loop und der bulge Region, besonders zwei Bindungsstellen im bulge Bereich (G26, G28) durch basische Gruppen adressiert. Durch eine kooperative Bindung

an diesen beiden Bindungsstellen lässt sich die hohe Stabilisierung dieses Komplexes erklären.^[108]

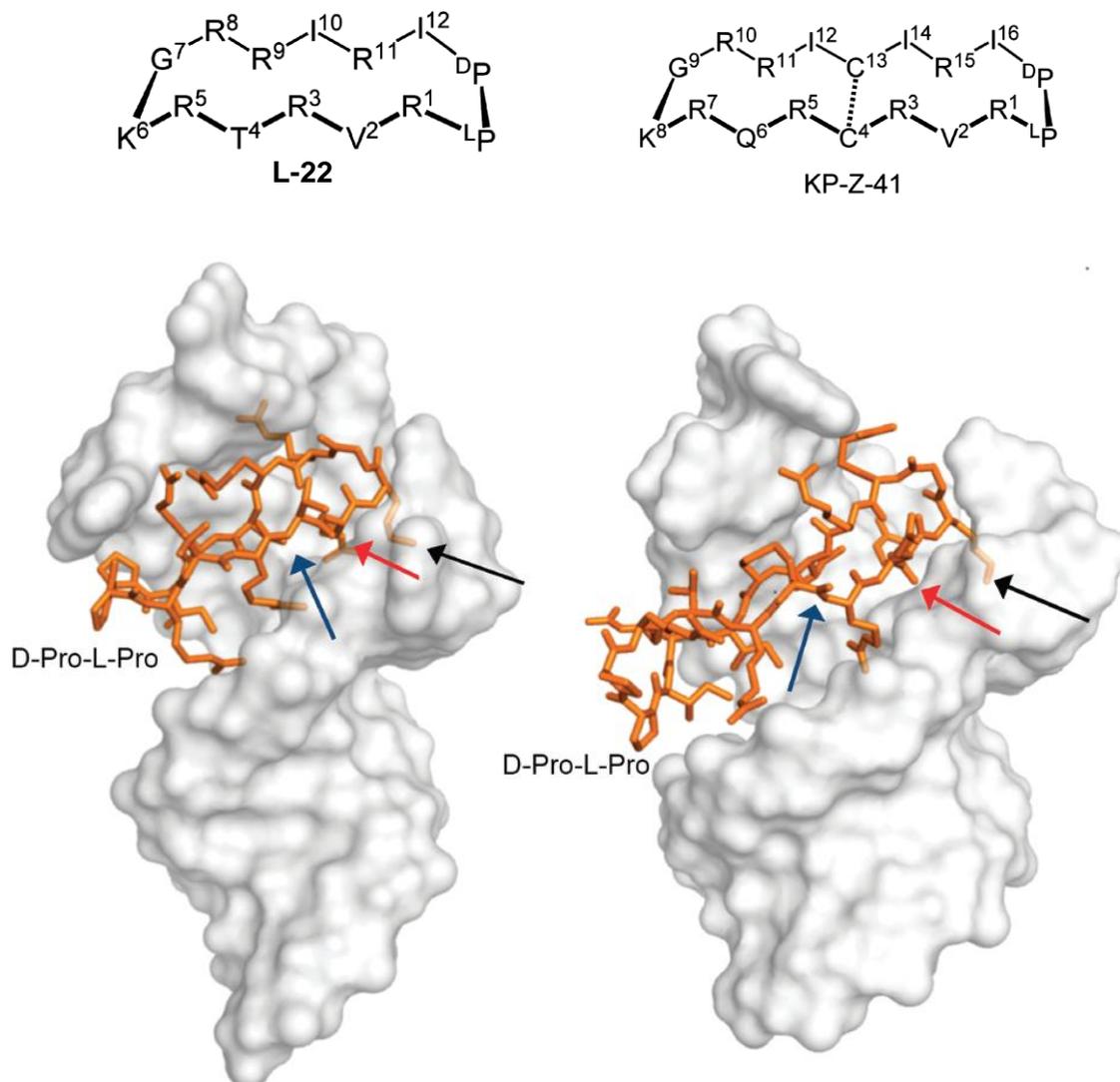


Abbildung 18: Cyclische Peptide L-22 ($_1$ RVTRKGRIRIPP $_{14}$) und KP-Z-41 ($_1$ RVRCRQRKGRICIRIPP $_{18}$) mit den zugehörigen NMR Strukturen (2KDQ)^[109] und (2KX5)^[110].

4.2.1 Aminoglycoside

Aminoglycoside zeigen, auf Grund ihrer positiven Ladungen im physiologischen Milieu, eine hohe Affinität zu einer Vielzahl von RNA Strukturen.^[111] Als bekannteste Vertreter dieser Substanzklasse sind Tobramycin, Neamin, Neomycin B und Kanamycin A zu nennen. Unter diesen Verbindungen zeigt das Neomycin den stärksten Tat-TAR inhibierenden Effekt ($K_d = 0,92 \mu\text{M}$).^[112] ESI-MS^[113] und *ribonuclease-protection* Experimente^[114] gaben Hinweise einer möglichen Bindungsstelle im stem Bereich

unterhalb des Trinukleotidbulges. Doch zeigten weitere ESI-MS Untersuchungen und *gel-shift* Experimente zwei weitere mögliche Bindungsstellen zur TAR RNA.^[113]

Mittels SPR-Untersuchungen (*surface plasmon resonance*) von Aminoglycosiden (darunter auch Neomycin) ließen sich zudem keine signifikanten Unterschiede in Ihrem Bindungsmuster zu unterschiedlichen hairpin-RNAs (TAR, RRE, A-site) erkennen, sodass man von einer erhöhten Selektivität nicht ausgehen kann.^[115]

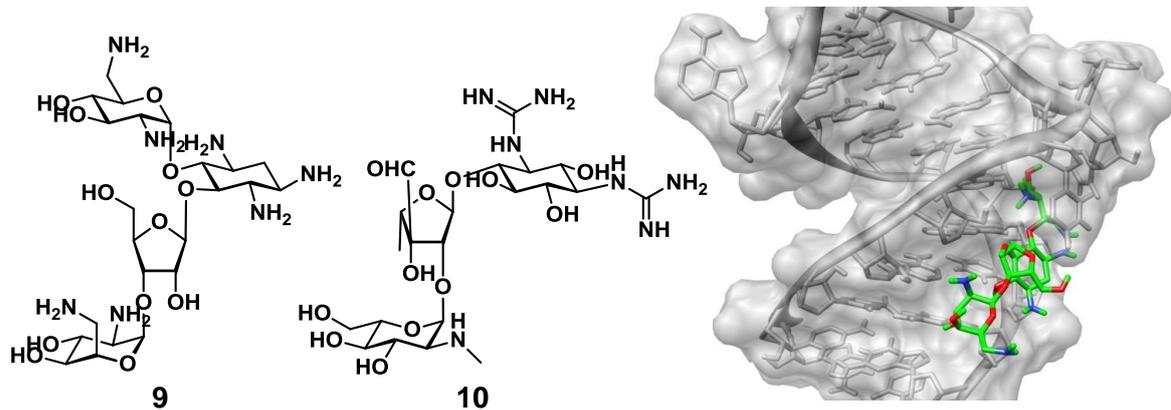


Abbildung 19: a) Neomycin; b) Streptomycin; c) NMR Komplexstruktur Neomycin-TAR (1Q3D)^[116].

4.2.2 cyclische Aminoglycoside

Eine konformationelle Fixierung des Rückgrats konnte bereits bei Peptidketten durch eine Cyclisierung erreicht werden. Diese starren bzw. β -hairpin-artigen Strukturen zeigten eine deutlich höhere Affinität zu TAR im Gegensatz zu ihren linearen Analoga. Raghunathan et al. übertrugen dieses Prinzip auf Aminoglycoside und entwickelten 8-gliedrige Aminoglycosidanaloga, die über Butylengruppen miteinander verknüpft wurden.

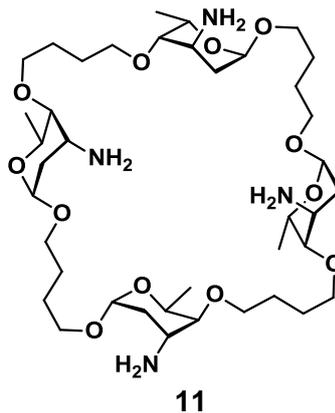


Abbildung 20: Struktur des von Raghunathan et al. hergestellten cyclischen Aminoglycosids.

Über NMR Untersuchungen konnten Hinweise auf eine Bindung in der major groove im oberen stem Bereich und in der minor groove an der unteren stem Region gefunden werden, mit einem K_d im mikromolaren Bereich.^[117]

4.3 Oligonucleotide^[118]

Synthetische Oligonukleotide und ihre Analogen, die komplementär zur stem-loop Region der TAR RNA sind, stellen eine weitere Klasse von Transaktivierungsinhibitoren dar, allerdings nur mit moderaten Ergebnissen.^[48]

Es wurden auch antisense Oligonukleotide, die über einen Linker mit RNAsen oder Ribozymen verbunden wurden, als antivirale Wirkstoffe eingesetzt.^[119, 120]

Nach Entdeckung der RNA Interference (RNAi), gelang auch die Anwendung auf TAR RNA. So entwickelte Jacques et al. siRNA, die zur Inhibierung des Tat-TAR Systems geeignet schien.^[121] Durch Arbeiten von Yoshinari et al. wurden allerdings die Erfolgsaussichten dieser Strategie relativiert.^[122]

Im Gegensatz zu den natürlichen Oligonukleotiden, sind *locked nucleic acids* (LNA)-, Phosphoramidate, *polyamide nucleic acids* (PNA)-, cyclische PNA^[123, 124], 2'-O-Me RNA, *hexitol nucleic acids* (HNA)- und Tricyclo-DNA^[118]-Aptamere nukleaseresistent und lassen sich dadurch universeller einsetzen.

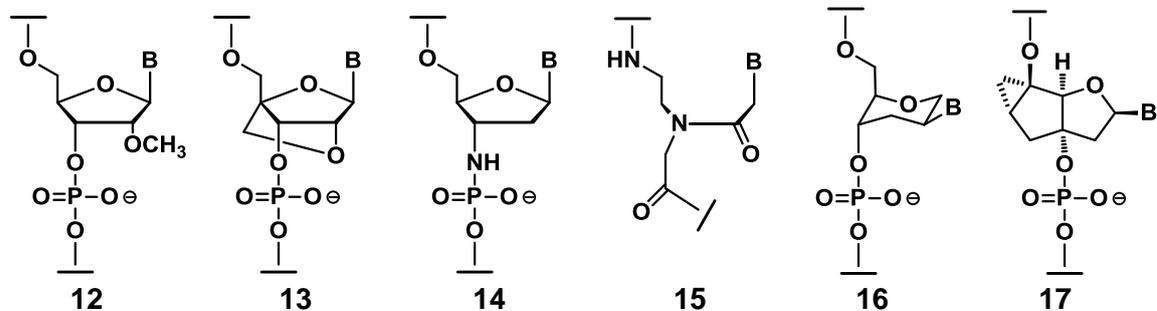


Abbildung 21: Monomere Bausteine für künstliche Oligonukleotide: 2'-O-Me RNA **12**; locked nucleic acid (LNA) **13**; Phosphoramidate **14**, polyamide nucleic acids (PNA) **15**; hexitol nucleic acid (HNA) **16**; Tricyclo-DNA **17**.

Neben zahlreichen weiteren Forschungsergebnissen auf diesem Gebiet, gelang es Arzumanov et al. mit 16-mer tricyclo-DNA Aptamere (K_d 4,5-23,2 nM)^[118] und einem 12-mer 7xOMe/5xLNA (K_d 1,1 nM)^[125] TAR zu adressieren. Die antivirale Wirkung konnte darüber hinaus in Zellassays bestätigt werden.

Da Oligonukleotide unter physiologischen Bedingungen negative Ladungen aufweisen, entsteht die Problematik ihrer Zellgängigkeit. Diese lässt sich jedoch durch Ligation mit kationischen Lipiden oder *cell-penetrating peptides* (CCP), die als Transporter fungieren, deutlich erhöhen.^[126] So zeigen auch TFO- und PNA-Aminoglycosid Konjugate gute pharmakokinetische Eigenschaften.^[127, 128, 129, 130]

4.4 Kleine Moleküle

Unter dem Begriff "small molecules" fasst man Moleküle mit einer Molmasse kleiner als 500 g/mol zusammen. Dies beinhaltet einen Aspekt der Lipinski Regeln, nachdem kleinere Moleküle eine bessere Bioverfügbarkeit aufweisen.

Erste Untersuchungen auf dem Gebiet der TAR Liganden wurden mit dem nur schwach bindenden Argininamid durchgeführt, da man davon ausging, dass der Argininrest eine ähnliche Konformationsänderung der RNA induziert, wie das Tat Protein.^[87] (s. Kapitel 7.1)

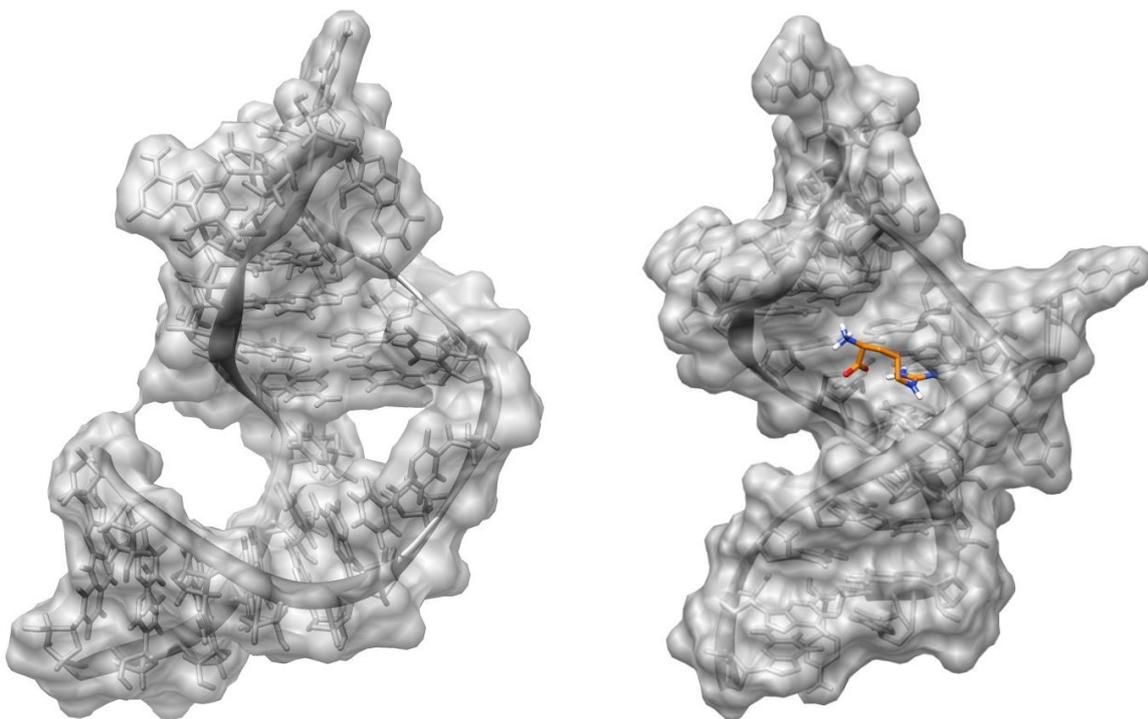


Abbildung 22: Konformation der TAR in freier Form (1ANR)^[131] und im Komplex mit Argininamid (1ARJ)^[132].

1996 entdeckte die Gruppe um Bailly bei einem drugscreening den Liganden „Hoechst 33258“, der eine hohe Affinität zu TAR zeigte. Zudem konnte über footprint Verfahren die GC-reiche Region (G36-U40) als bevorzugte Bindungsstelle ermittelt werden.^[133, 134]

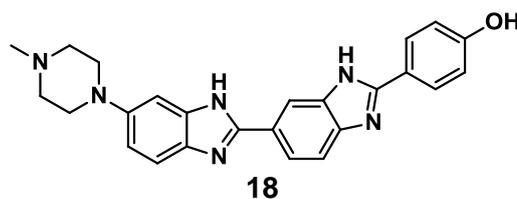


Abbildung 23: Strukturbild des Liganden „Hoechst 33258“.

Durch „highthroughput Screening“ einer Substanzbibliothek aus 150000 Verbindungen, gelang es Mei et al. das Chinoxalinderivat **19** und das Tetraaminochinazolin **20** mit ebenfalls guten Bindungsaffinitäten zu identifizieren.^[112] ESI-MS Methoden gaben Hinweise, dass das Chinoxalin **19** zwar bevorzugt im bulge Bereich bindet, allerdings nahm die Komplexbildung mit TAR in Gegenwart von tRNA stark ab. Das Tetraaminochinazolin **20** zeigte hingegen erhöhte Affinitäten zu dem loop Bereich der TAR RNA, worauf Resultate einer Serie von footprinting Experimenten und ESI-MS Untersuchungen von TAR Mutanten hindeuten.^[135]

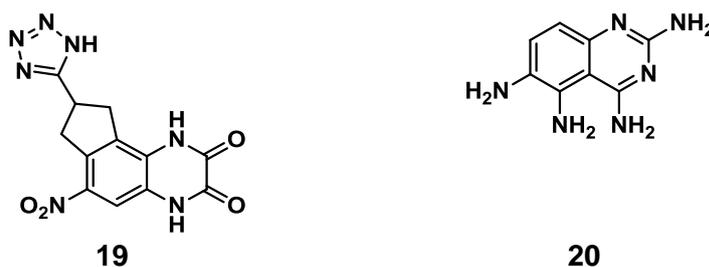


Abbildung 24: Strukturbilder der besten Treffer des „highthroughput screening“ von Mei et al.

Um eine neuartige Klasse von TAR-Liganden zu entwickeln, kombinierten Hamy et al. zwei essentielle Strukturmerkmale über einen Linker miteinander. Dazu gehörte zum einen ein aromatischer oder heteroaromatischer Rest mit der Möglichkeit zur Interkalation zwischen den Nukleobasen. Darunter zählten Purine, Naphthalinimidderivate sowie Mitonafide und Acridine, mit denen beste Ergebnisse erzielt werden konnten. Zum anderen wurde ein „polykationischer Anker“ wie das Spermidin eingesetzt, da dieses Oligokation bekannt dafür war, an Nucleinsäuren zu binden.^[136, 137] Die aktivste Verbindung aus dieser Serie war CGP 40336A **21** mit einem in vitro gemessenen CD₅₀ von 22 nM (gel-shift) und einem IC₅₀ von 1,5 µM im Zellassay. Durch footprinting- und NOE NMR Experimente konnten Wechselwirkungen mit dem Trinukleotidbulge detektiert werden. Mittels dieser Ergebnisse wurden Wasserstoffbrücken zwischen der NH-Gruppe des Acridins und N7 der G26 Base sowie zwischen der Methoxygruppe des Acridins und der Aminogruppe der C39 Base postuliert und ein Bindungsmodell vorgeschlagen.^[138]

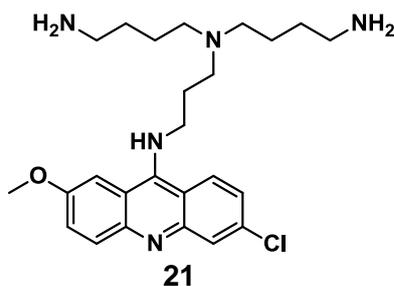


Abbildung 25: Struktur des acridinhaltigen TAR Liganden CGP 40336A.

Weiterhin wurden von Mischiati et al. die aromatischen Polyamidine TAPP **22** und TAPB **23** als Inhibitoren des Tat-TAR Systems in HL3T1 Zelllinien eingesetzt. Bei diesem Modellassay System konnte in IC_{50} von 18 bzw. 22 μM bestimmt werden. Allerdings kann man hierbei von keiner hohen Selektivität ausgehen.^[139]

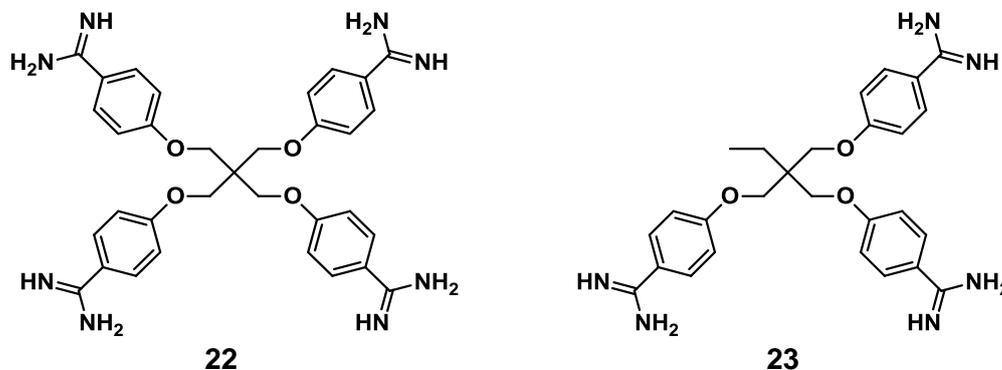


Abbildung 26: Strukturen der amidinhaltiger TAR Liganden TAPP und TAPB.

Virtuelles screening

Um aus der Vielzahl von Verbindungen geeignete Moleküle mit spezieller Struktur und Funktionalität zu selektieren, hat sich mit gesteigerter Rechenleistung das „virtuelle Screening“ etabliert. Im Jahre 2000 gelang es James et al., diese Methode für die Suche nach neuen TAR-Liganden anzuwenden. Er verwendete dazu die Dockingmethoden (DOCK, ICM) und konnte aus einer Datenbank mit 153000 Verbindungen 350 potentielle Moleküle selektieren. Darunter waren die bereits bekannten Aminoglycoside, ein Trisaminderivat **24** und das Anthrachinonderivat **25** mit IC_{50} -Werten im Bereich von 1 μM vertreten.^[140] Durch Anwendung dieser Methode auf eine weitere Datenbank mit 181000 Verbindungen konnte diese Arbeitsgruppe Acetylpromacin **26** als möglichen TAR Liganden identifizieren. Dieses zeigte einen K_d von 270 μM in Bezug zu TAR-RNA. Mittels NMR spektroskopische Strukturaufklärungsmethoden gelang es schließlich die Bindungsstelle zu bestimmen, wonach der Heteroaromat unterhalb des Trinukleotidbulges zwischen den Basenpaaren G26-C39 und A22-U40 interkaliert.^[141]

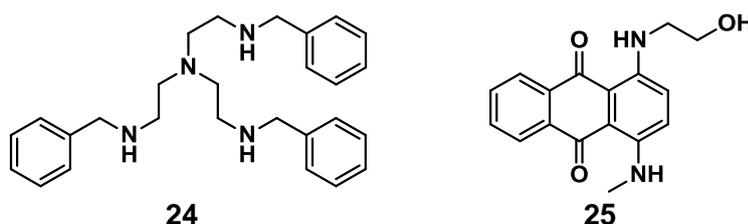


Abbildung 27: Resultate eines virtuellen screenings von James et al. aus dem Jahr 2000: Trisaminderivat **24**; Anthrachinonderivat **25**.

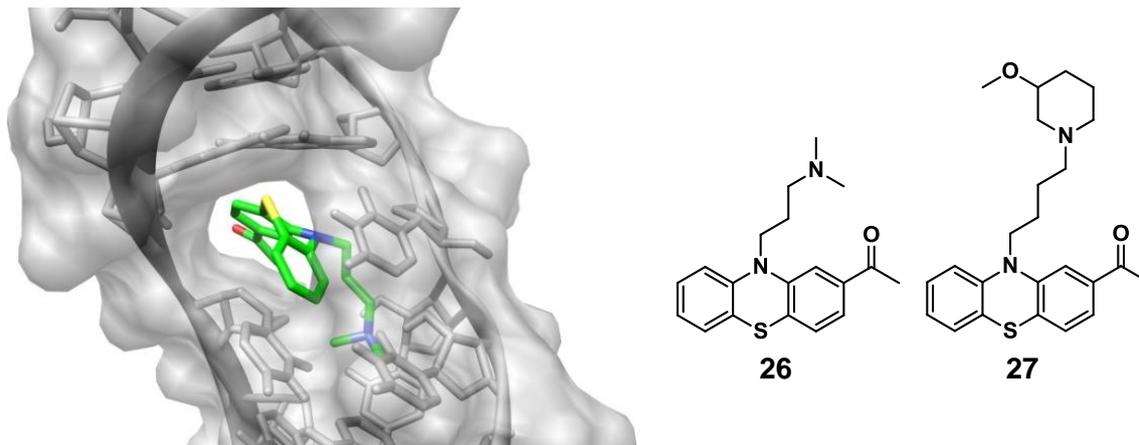


Abbildung 28: a) NMR Struktur eines Komplexes aus TAT/Acetylpromacin (1LVJ)^[142]; b) Acetylpromacin **26** als bester Treffer eines *virtuellen screenings* von James et al. aus dem Jahr 2002; c) Phenothiazinderivat **27**.

Es zeigte sich bei Untersuchungen mit anderen RNA Strukturen, dass auch hier das Acetylpromacin mit vergleichbarer Affinität bindet. Zudem stellte Al-Hashimi et al. die Vermutung auf, dass Acetylpromacin **26** nicht in der Lage ist, die Flexibilität der RNA so zu behindern, dass eine Komplexierung mit dem Tat Peptid inhibiert wird.^[143]

Ausgehend von den Ergebnissen früherer Untersuchungen versuchte die Arbeitsgruppe um T. L. James durch Derivatisierung des Phenothiazinbausteins ähnliche TAR Liganden mit höherer Affinität zu finden. Allerdings konnte hierbei nur eine marginal bessere Verbindung **27** mit einem K_d von 140 μM hergestellt werden.^[144]

Die Chinolin-4(1*H*)onderivate WM5 **28** und WC12 **29** zeigen als Magnesiumsalze eine hohe Affinität zu dem bulge Bereich der TAR RNA. Dies konnte durch *electrophoretic mobility shift* Experimente mit RNA Mutanten (bulgeless, loopless) sowie durch Hemmversuche mittels tRNA, nachgewiesen werden.^[145]

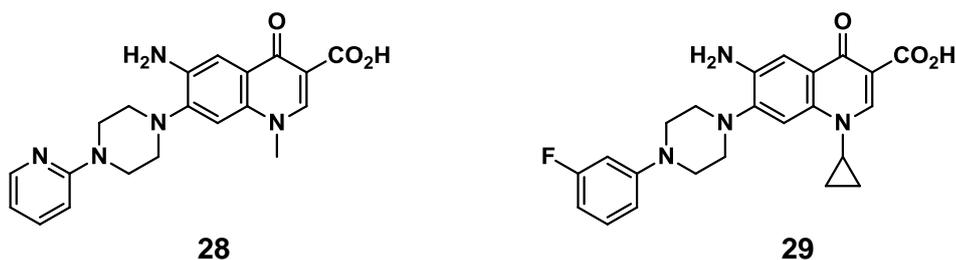


Abbildung 29: *Small molecules* als potentielle TAR Liganden.

Nachdem man neben der Region um G26 einen weiteren elektrostatischen hotspot im Bereich um G28, identifizieren konnte, hatte man die Vermutung, dass die Konformation des TAR-Komplexes durch simultane Adressierung der beiden Bindungstaschen stabilisiert werden kann. Daher stellten Davis et al. bivalente Verbindungen her, wobei die beiden kationischen Gruppen über flexible Alkylketten mit einem aromatischen Grundkörper verbunden wurden. Die Bindungsaffinität des Bisguanidins (rbt203) **30**

zeigte bei in-vitro Messungen einen K_i von $1.3 \mu\text{M}$ und das (rbt158) **31** einen K_i von $350 \mu\text{M}$. Von diesen Verbindungen gelang es über NMR Experimente die Strukturen zu ermitteln. So konnte die Vermutung bestätigt werden, dass durch kooperative Bindung an den beiden RNA Regionen eine Stabilisierung der TAR Struktur möglich ist.^[87]

Um die Bindungsaffinität durch zusätzliche stacking Effekte zu steigern, derivatisierte man den Grundkörper mit unterschiedlichen aromatischen Resten. Die Verbindung rbt550 **32**, die mit einem Indolbaustein verknüpft wurde, zeigte mit einem K_i von $0,051 \mu\text{M}$ ein 25-fach höheres Bindungspotential als rbt203 **30**. Durch NMR Strukturbestimmungen fand man allerdings heraus, dass auf Grund der starken interkalativen Wechselwirkungen dieser Ligand ein völlig anderes Bindungsmuster zeigt. Der Indolrest lagert sich im stem Bereich unterhalb des bulges zwischen den Basenpaaren A22-U40 und G26-C39 ein, während die Alkylammoniumreste mit dem Phosphatrückgrat in Wechselwirkung treten.^[146]

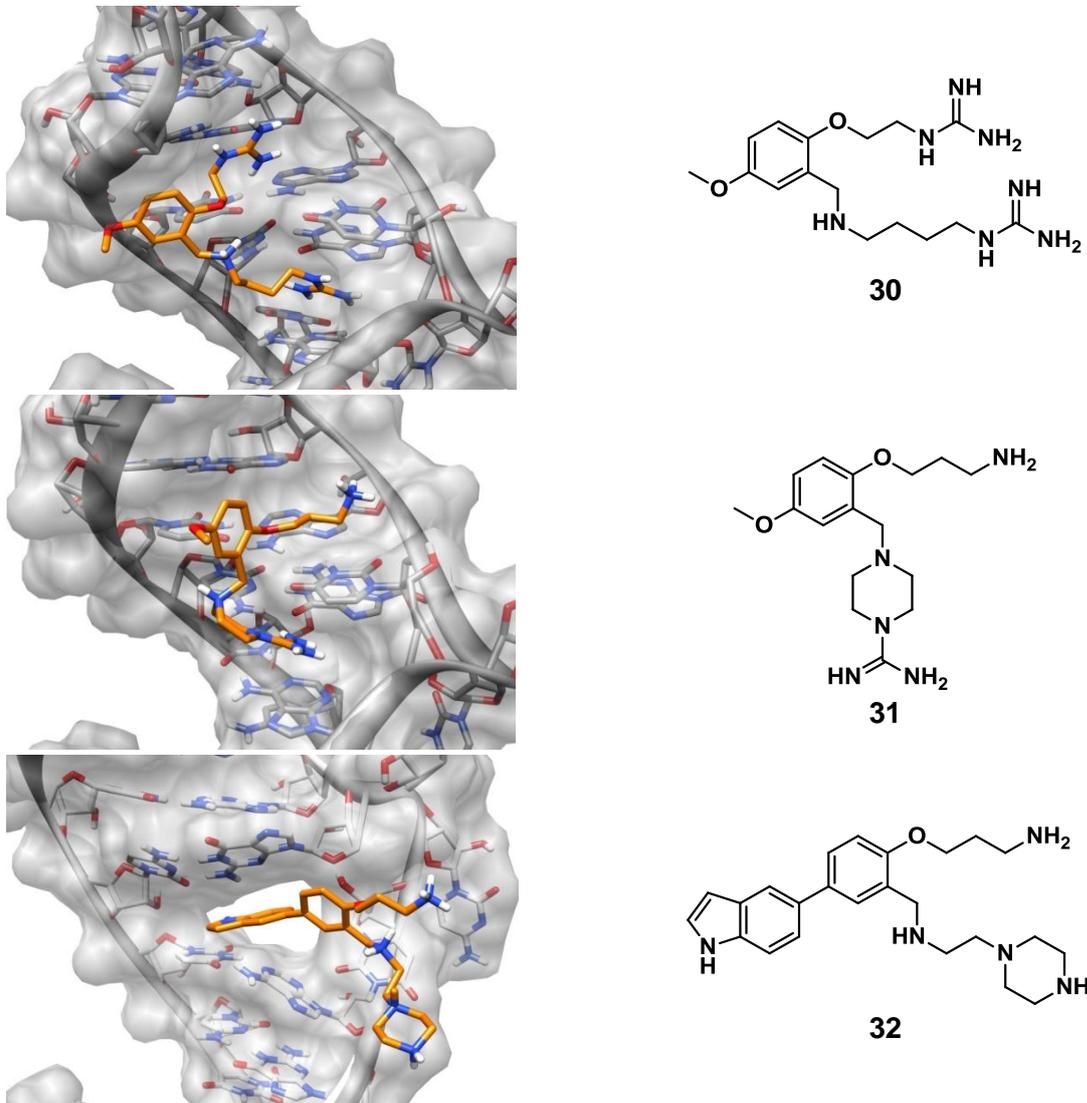


Abbildung 30: NMR Strukturen und Formelbilder der Liganden von RiboTargets: a) rbt203 (1UUD)^[87]; b) rbt158 (1UUI)^[87]; c) rbt550 (1UTS)^[146].

AT erkennende Liganden

Nach der Entdeckung AT-selektiver Liganden für doppelsträngige DNA^[147, 148, 149] versuchten Duca et al. eine ähnlichen Verbindung zu entwickeln, die in der Lage ist, Hoogsteen-artige Wechselwirkungen mit einem AU-Basenpaar der TAR RNA aufzubauen. Über fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen konnte ein K_d Wert im Bereich von 8-30 μM für diese Verbindungsklasse **33** gemessen werden. Vergleichsmessungen mit bulgeless TAR ergaben für den Liganden 3b β (R1, R2=Lysin) eine um den Faktor 6 niedrigere Affinität als zu (wt)-TAR. Daher wurde vermutet, dass das Basenpaar A22-U40 als eine geeignete Bindungsstelle in Frage kommen könnte.^[150]

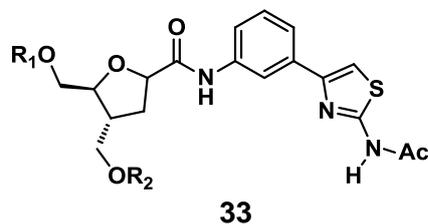


Abbildung 31: Formelbild des AT-selektiven TAR Liganden von Duca et. al.

Im Jahre 2011 unternahmen Amy Davidson et al. einen Versuch, über kooperative Bindungseffekte einen selektiven TAR Liganden zu identifizieren. Dazu sollte die RNA Konformation zunächst durch einen Liganden fixiert werden, der starke STD Signaturen und NOE cross-peaks aufweist. Als geeignet erwies sich Arginine 4-methoxy- β -naphthylamid **34**, dessen aromatischer Bereich unterhalb des loop Bereichs zwischen die Basen A35 und G36 interkaliert. Der positiv geladene Guanidiniumrest tritt vermutlich mit den Phosphaten P36, P21 und P37 in Wechselwirkung.

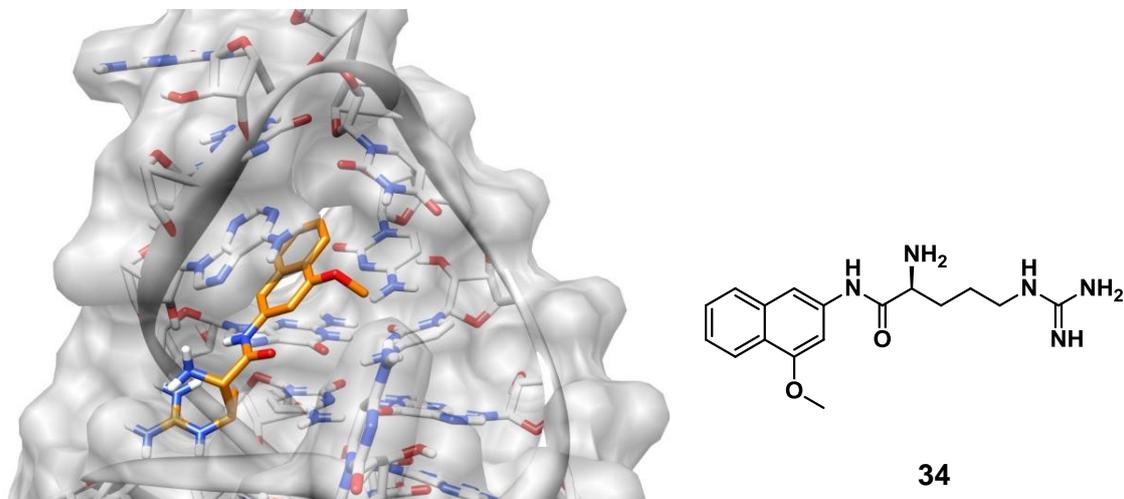


Abbildung 32: a) NMR Struktur von Arginine 4-methoxy- β -naphthylamid (2L8H)^[151]; b) Formelbild des Liganden.

Mit der so generierten starren Bindungstasche wurden eine Auswahl von Verbindungen komplexiert und über NOE Messungen die Lage der Liganden bestimmt. Obwohl in dieser Versuchsreihe nur schwache Liganden gefunden wurden, konnte die NMR Struktur von Arginine 4-methoxy- β -naphthylamide **34** gelöst werden, die neue Einblicke in die Diversität von TAR Komplexen ermöglicht. ^[152]

Ähnliche Argininderivate mit aromatischen Bestandteilen wurden auch von anderen Arbeitskreisen untersucht. Sie zählen zu den ersten Vertretern aus der Gruppe der bifunktionellen Liganden, deren Bausteine simultan an zwei unterschiedliche RNA Regionen binden (siehe Kapitel 4.5)

4.5 Konjugate

Auf Grund der großen Kontaktfläche zwischen Tat/CycT1 und TAR kann die Ausbildung dieses Komplexes durch kleine Moleküle nur schwer inhibiert werden. Eine simultane Adressierung mehrerer Bindungsstellen unter Ausnutzung kooperativer Effekte, könnte ein vielversprechender Ansatz zur Problemlösung sein. Die stärkste kooperative Wirkung lässt sich durch eine Konjugation von Liganden erreichen, die in der Lage sind, an unterschiedlichen Regionen der RNA selektiv zu binden. Aufgrund kooperativer Effekte potenzieren sich die Affinitäten der einzelnen Bausteine, sodass auf diese Weise nicht nur hoch affine sondern auch deutlich selektivere Liganden aufgebaut werden können. Nachteilig bei diesem Ansatz sind vor allem die hohe Molekülmasse dieser Wirkstoffe und die Zunahme der Flexibilität.

4.5.1 Arginin-Interkalator Konjugate

Bereits 1999 entwickelten Peytou et al. Ethidium-Arginin Konjugate **35**. Dabei wurde der starke Interkalator über einen flexiblen Linker unterschiedlicher Länge mit einer Arginineinheit verknüpft, von der man wusste, dass sie im bulge Bereich der TAR RNA bindet. In-vitro konnte eine anti-HIV-1 Aktivität bei mikromolaren Konzentrationen beobachtet werden, wobei die Toxizität oberhalb von 100 μ M lag. Über RNase footprinting Experimente konnte gezeigt werden, dass die Ethidium Einheit in der Nähe von A17 interkaliert und der Argininrest am Trinukleotidbulge bindet. ^[153]

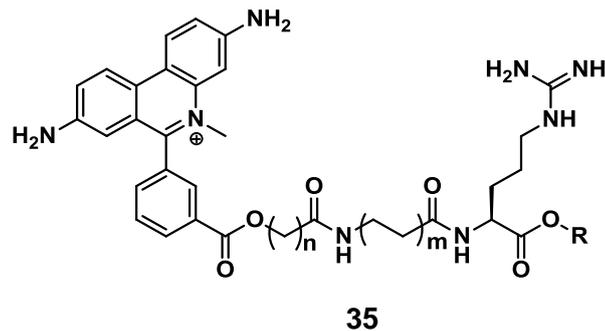


Abbildung 33: Konjugat mit einem Arginin- und Ethidiumbaustein, verbunden über variablen Linker.

Eine chinesische Forschergruppe um Ming Yang verknüpfte Guanidinbausteine mit Purinen **36**^[154], Triazolopyrimidinen **37**^[154] und einem Isochinolinrest **38**^[155]. Diese Konjugate konnten ebenfalls erfolgreich als HIV-1 Tat-TAR Inhibitoren eingesetzt werden. Es gelang, bei einer Ligandenkonzentration von 30 μM , die TAR Transaktivierung in menschlichen 293T Zellen über einen CAT Genexpressionsassay im Bereich von 30 % bis 65 % zu unterdrücken, wobei nur geringe cytotoxische Eigenschaften der Verbindungen beobachtet wurden. Bei den Versuchsreihen konnte ein Einfluss der Linkerlängen auf die Inhibitionsraten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Liganden mit kürzeren Linkern einen stärkeren antiviralen Effekt hervorrufen.

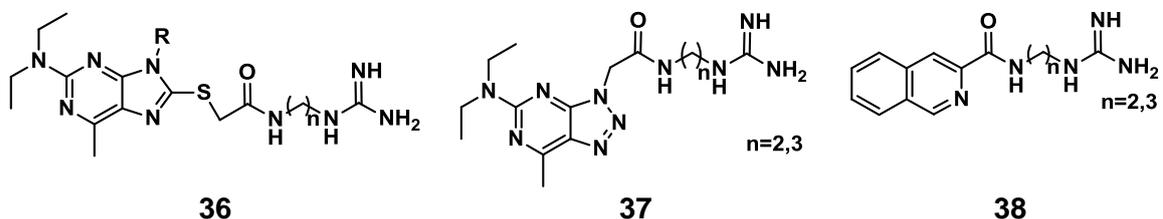


Abbildung 34: Argininkonjugate von Yang et al.

4.5.2 Neamin-Arginin Konjugate

Da bekannt war, dass Neomycin eine hohe Affinität zu RNA besitzt, allerdings eine schlechte Selektivität aufweist, versuchten Xu et al., durch Konjugation eines Argininbausteins zusätzlich den bulge Bereich der TAR RNA zu adressieren. Auf diese Weise sollte sich nicht nur die Affinität, sondern auch die Selektivität deutlich steigern lassen. Beobachtet werden konnte eine Verbesserung des K_d -Wertes um den Faktor 10, doch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Bindungskonstanten im Komplex mit der hairpin-Struktur der A-site 18S RNA.^[156] Problematisch scheint bei diesem Ansatz, dass die bevorzugte Bindungsstelle des Neamins in der minor groove des stem Bereiches zu finden ist und die Andockstelle des Arginins in der major groove

des bulge Bereichs liegt, so dass die beiden Einheiten über einen sehr langen Linker miteinander verbunden werden müssten.

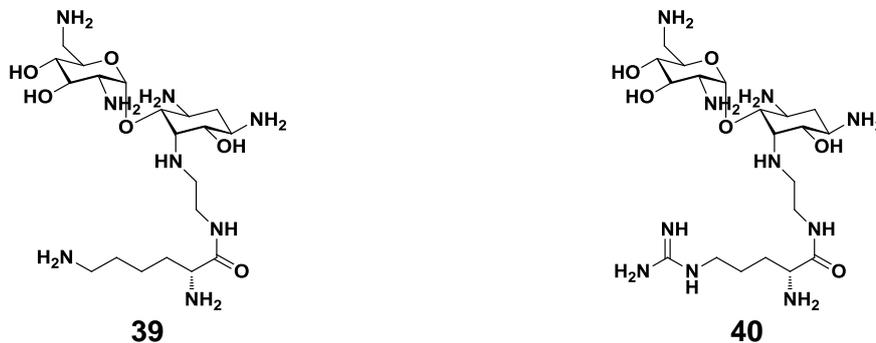


Abbildung 35: a) Lysin/Neamin Konjugat $K_d = 1\mu\text{M}$ (NEL); b) Arginin/Neamin Konjugat $2\mu\text{M}$ (NEA).

4.5.3 Aminoglycosid Dimere^[157, 158]

Erste Versuche wurden von Wang et al. und Michael et al. durchgeführt, um Aminoglycoside über eine Reihe von Linkern unterschiedlicher Länge zu verknüpfen, um mehrere vorhandene Bindungsstellen zu adressieren und dadurch die RNA-Bindungsaffinität weiter zu steigern.^[159, 160] Später entwickelten Kumar et al. ein Klick-Chemie Verfahren zur Herstellung von Triazol-Neomycin Dimeren mit variabler Linkerlänge (8-20 Å). Untersuchungen dieser Verbindungen mit TAR RNA ergaben im FRET Verdrängungsassay einen IC_{50} im Bereich von 50-80 nM. Weiterhin zeigten auch UV thermische Denaturierungsexperimente und CD-Titrations eine leicht erhöhte Bindungsaffinität bei kürzeren Linkerlängen in dieser Versuchsreihe.^[129, 158] Eindeutige Hinweise auf eine TAR spezifische Selektivität konnten allerdings nicht erbracht werden, zumal Wang und Michael et al.^[159, 160] mit einem ähnlichen Dimer mit hoher Affinität ribosomale RNA adressieren konnten.

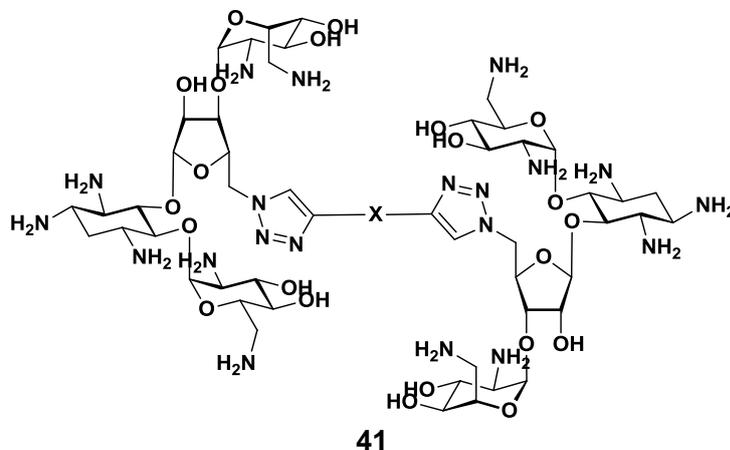


Abbildung 36: Neomycin Dimere mit Bis-Triazol-Linker.

5. Charakterisierung von RNA-Liganden

5.1 FRET Verdrängungs-Assay nach Matsumoto

In der Gruppe von M. Göbel hat sich die Verwendung eines FRET Verdrängungsassays für das Ligandenscreening als effizienteste Methode etabliert. Es gelingt mit diesem Verfahren in kurzer Zeit, reproduzierbare Aussagen über TAR-Affinitäten von Verbindungen zu treffen. Da Fluoreszenzspektroskopie ein sehr empfindliches Verfahren darstellt, werden nur geringe Mengen an fluoreszenzgelabeltem Tat Mimetikum und TAR RNA benötigt, sodass man relativ kostengünstig auch eine hohe Zahl an Verbindungen vermessen kann. Allerdings ist das eingesetzte Tat₄₉₋₅₇-Fragment in Bezug auf TAR nicht sehr spezifisch^[100], sodass keine Information über die Bindungsstelle und Selektivität des Liganden möglich sind.

5.1.1 Grundlagen

Bei einem spinierlaubten ($\Delta S = 0$) Übergang eines elektronisch angeregten in einen energetisch tiefer gelegenen Zustand, kommt es zur spontanen Emission von Licht. Diesen Prozess bezeichnet man als Fluoreszenz. Die Fluoreszenzlebensdauer bezieht sich dabei auf die Zeit, in der das Molekül in seinem angeregten Zustand vor Aussenden eines Photons bleibt. Dieser Vorgang folgt einer Kinetik erster Ordnung. Die Abklingzeiten der am häufigsten verwendeten Fluoreszenz Farbstoffe, mit Emissionen vom UV bis zum nahen Infrarot Bereich, liegen bei 0,5 bis 20 Nanosekunden. In diesem Zeitintervall kann das angeregte Farbstoffmolekül mit seiner Umgebung auf vielfältiger Weise in Wechselwirkungen treten. Diese Interaktionen haben einen Einfluss auf die Fluoreszenz, wodurch auch Eigenschaften von biologischen Systemen beschrieben werden können.

Zunächst kann ein angeregtes fluoreszierendes Molekül seine Anregungsenergie ohne Wechselwirkung mit seiner Umgebung abgeben. Entweder durch Emission eines Lichtquants (Fluoreszenz) oder durch strahlungslose Übergänge. Die Energie kann aber auch auf andere Moleküle übertragen werden. Hierbei wird die Fluoreszenz des angeregten Moleküls gelöscht (gequencht). Man unterscheidet zwischen collisionale und noncollisionale Quenchprozesse, je nachdem ob der Energietransfer durch direkten Kontakt oder über eine räumliche Distanz stattfindet.

5.1.2 „Static“ und „dynamic“ (collisional) Quenchen

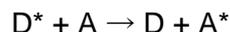
Kommt es bei dem Zusammenstoß eines nicht angeregten Fluorophores mit einem Quenchemolekül zur Bildung eines Komplexes, so kann dabei das Absorptionsspektrum sowie die fluoreszierende Eigenschaft des Farbstoffes verändert oder aufgehoben werden. Eine derartige Fluoreszenzlöschung bezeichnet man als statisches „static“ Quenchen. Diese Art von Aggregation wird häufig durch hydrophobe Effekte, die zu Stapelung der Farbstoffmoleküle führen, hervorgerufen. Besonders planare aromatische Farbstoffe neigen zu derartigen Komplexierungen.

Bleibt bei dem Zusammenstoß eines angeregten Fluorophores mit einem Quenchemolekül die Komplexierung aus, so bezeichnet man dies als dynamisches „dynamic“ Quenchen. Die Energie wird letztlich in Form von Wärme freigesetzt. Diese Art des Quenchens wird auch als *Stoßlöschung* bezeichnet. Dabei muss allerdings der Stoß während der Lebensdauer des angeregten Zustands erfolgen, sodass der Quencher zum Zeitpunkt der Anregung die Diffusionsstrecke in etwa 0,5-20 ns zurücklegen muss.

Da in dem hier beschriebenen Fall der Quencher über das Tat Peptid Mimetikum mit dem angeregten Fluoreszenzfarbstoff verbunden ist, sind Stoßprozesse sowie Komplexbildungen um ein Vielfaches wahrscheinlicher als bei intermolekularen Prozessen.^[161]

5.1.3 Fluoreszenzenergie-Übertragung (noncollisional, FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine spezielle Art des stoßfreien (noncollisional) Quenchens, bei dem es zu einer strahlungsfreien Energieübertragung über eine long-range Dipol-Dipol Kupplung zwischen zwei Fluorophoren kommt. Das angeregte Fluorophor (Donor D) tritt dabei in Wechselwirkung mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor A), regt diesen an und fällt selbst in den Grundzustand zurück:



Nach der Energieübertragung auf den Akzeptor A*, kann dieser durch Fluoreszenz in den Grundzustand übergehen, wobei die charakteristische Fluoreszenzstrahlung von A ausgestrahlt wird. Die Wahrscheinlichkeit für den FRET Effekt hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen ist die Größe der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors entscheidend für Stärke des Effekts. Zum anderen sind die relative Orientierung der beiden Dipole zueinander und die

Distanz des Donors zum Akzeptor entscheidende Größen, welche die Effizienz des Energietransfers beeinflussen. Dabei geht die Distanz r in der 6. Potenz ein.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Abbildung 37: E = Energietransfer im FRET-System; r = Abstand der Farbstoffe zueinander; R_0 = Abstand bei dem 50 % der Energie übertragen werden (Förster-Radius).

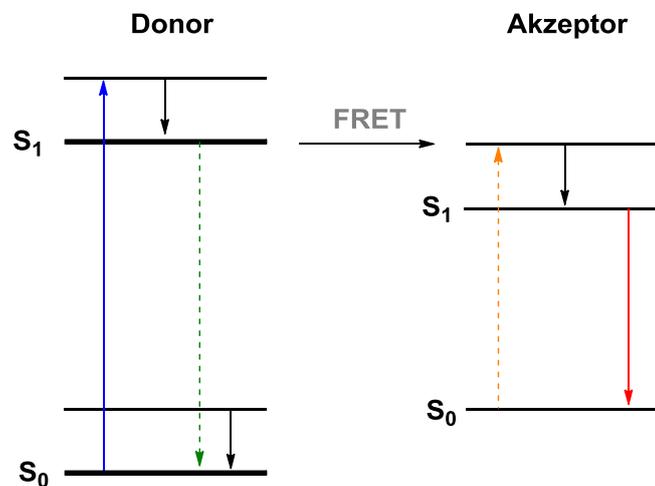
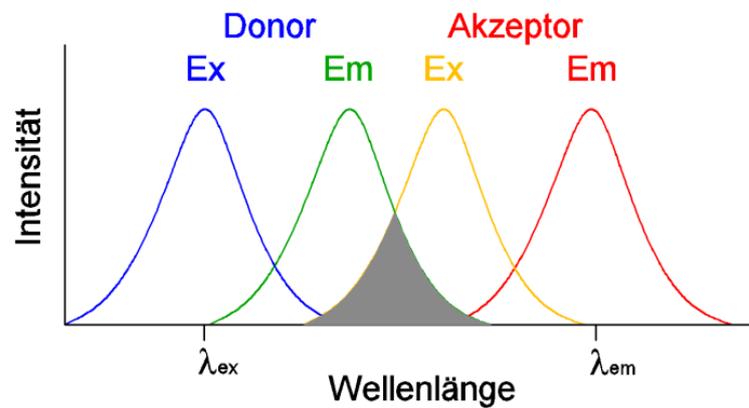


Abbildung 38: a) Extinktions- und Emissionsspektren bei einem FERT Effekt; b) Schematische Darstellung der Übergänge bei dem FRET Effekt.

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen, die auf den FRET Effekt beruhen, ermöglichen eine schnelle und effiziente Abstandsmessung zwischen den Fluorophoren A und D beziehungsweise eine nahezu störungsfreie Detektion von Komplexbildungen zwischen Molekülen. Diese Methoden haben sich für Messungen von Abständen in Bereichen von 10 bis 100 Å bewährt.^[162, 163]

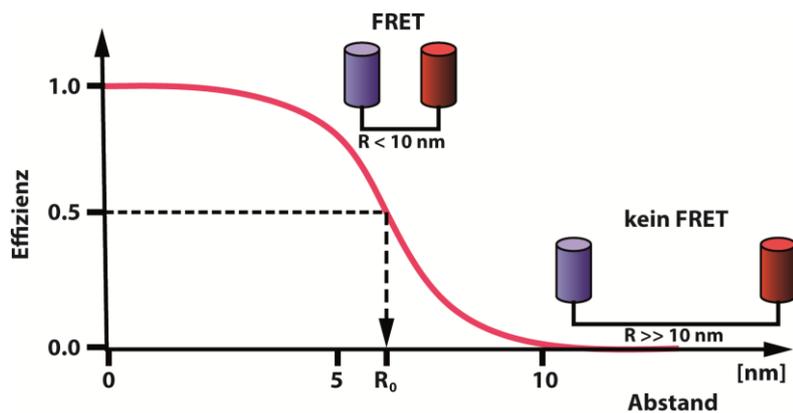


Abbildung 39: Abhängigkeit der Distanz von der Stärke des FRET Effekts.

Der für diese Arbeit eingesetzte Assay wurde von Matsumoto et al. entwickelt und besteht aus einem mit Fluoreszein und Tetramethylrhodamin gelabelten Ausschnitt des Tat Proteins (Aminosäure 49-57), der für die Bindung an die RNA entscheidend ist. Dabei wurde jeweils ein „spacer“ aus drei Alanineinheiten bzw. drei Alanin und einer Cysteineinheit zwischen der Proteinsequenz und den Farbstoffmolekülen eingefügt, um mögliche Wechselwirkungen mit der RNA zu vermeiden.^[1]

Titriert man zu dem gelabelten Tat₄₉₋₅₇ Fragment (FTatRhd) eine Lösung aus HIV-1 wtTAR RNA, beobachtet man bei einer Anregungswellenlänge von 489 nm eine Zunahme der Emission bei 590 nm bis sich ein 1:1 Komplex gebildet hat. Aufgrund dieser Beobachtung kann man annehmen, dass das gelabelte Tat Mimetikum in freier Form in einer random-coiled Struktur vorliegt. Hierbei kommt es zu einem Kontakt zwischen den beiden Fluorophoren und damit zu den oben beschriebenen collisional Quench Prozessen. Ist allerdings das Peptid an die TAR RNA komplexiert, werden die beiden Farbstoffmoleküle räumlich voneinander getrennt, sodass ein Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer vom Fluoreszein auf das Rhodamin auftritt und eine Emission bei 590 nm gemessen werden kann.

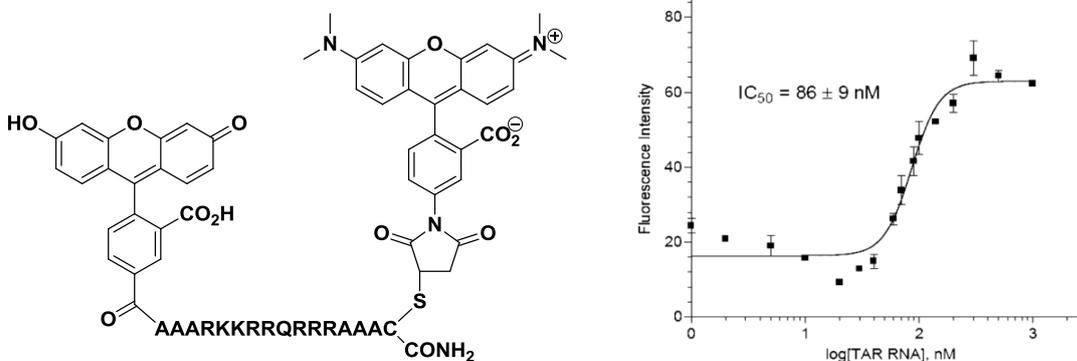


Abbildung 40: a) Farbstoff-gelabeltes Tat-Fragment (FTatRhd); b) Titrationskurve Tat₄₉₋₅₇ Fragment (FTatRhd) zu wtTAR^[164].

Zu diesem 1:1 Komplex titriert man eine Lösung eines TAR Liganden. Dabei kommt es zu einer Verdrängung des Tat Mimetikums, das folglich wieder die random-coiled Konformation einnimmt. Man beobachtet hierbei eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz bei 590 nm. Aufgetragen gegen die zugesetzte Menge des Kompetitors ergibt sich eine Kurve, aus der ein IC_{50} -Wert ermittelt werden kann. Dieser gibt an, bei welcher Ligandenkonzentration eine 50 %ige Inhibierung des 10 nM Tat/TAR Komplexes stattfindet.

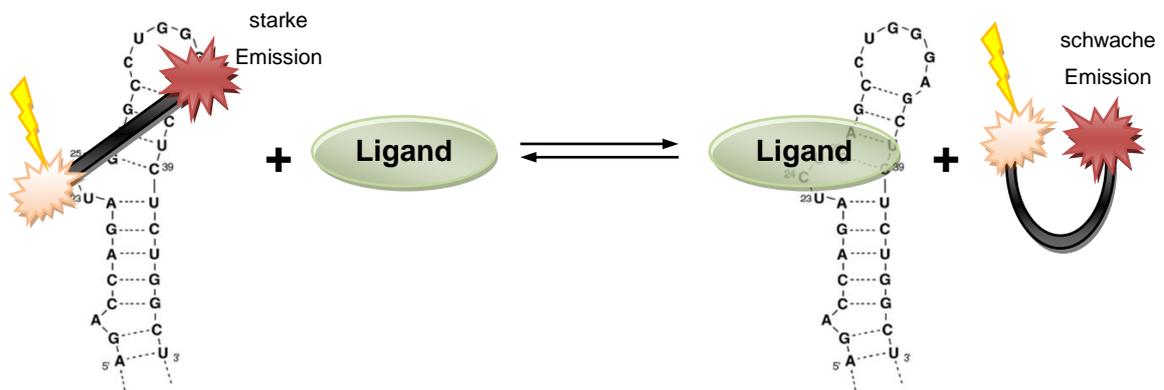


Abbildung 41: Schema der Verdrängung des FTatRhd von der TAR RNA durch einen Liganden.

5.1.4 Kooperativer Bindungsassay

Da man davon ausging, dass das cyclische Peptid L-22 einer der selektivsten TAR Liganden ist, und mit dieser RNA einen stabilen Komplex ausbildet, versuchte man das Konzept der kooperativen Bindung zweier Liganden umzusetzen. Die hier entwickelten guanidinhaltigen Liganden sind besonders für eine Bindung im bulge Bereich prädestiniert, daher musste in dieser Region um G26 des TAR/L-22 Komplexes ein Freiraum geschaffen werden, in den die zu untersuchenden Liganden sich einlagern können. In der NMR Struktur 2KDQ erkennt man, dass L-22 über den Argininrest R3 im Bereich von G26 im bulge Bereich bindet. Diese Aminosäure wurde somit durch ein Glycin ersetzt. Über den Fluoreszenzassay nach Matsumoto bestimmte man den IC_{50} des L-22(R3) Peptids und beobachtete eine Zunahme von 45 nM (L-22) auf 1,0 μ M (L-22(R3)). Die Überlegung war nun, eine Titration der zu untersuchenden Liganden zu der Mischung aus 10 nM FTatRhd, 10 nM TAR und 1 μ M L-22(R3), bei der 50 % des FTatRhd Peptids durch L-22(R3) verdrängt sind, durchzuführen. Auf Grund der Konformationsänderung von TAR, die durch Zugabe eines Bulgebinders induziert wird, sollte sich L-22(R3) optimal an die RNA anlagern können und dadurch den ternären Komplex derart stabilisieren, dass die Austauschgeschwindigkeit des zu untersuchenden Ligandes stark herabgesetzt wird. Zu beobachten wäre ein Abfallen der IC_{50} Werte des Liganden in Anwesenheit von L-22(R3). Auf diese Weise sollten sich eindeutig Bulgebinder identifizieren lassen. Allerdings ergaben erste Messungen mit 2,4,6-Triaminochinazolin noch kein signifikant positives Ergebnis. Ursache könnte eine unerwartete Komplexierung zwischen L-22(R3) und TAR sein oder eine zu schwache Affinität des Liganden zum bulge Bereich der RNA.

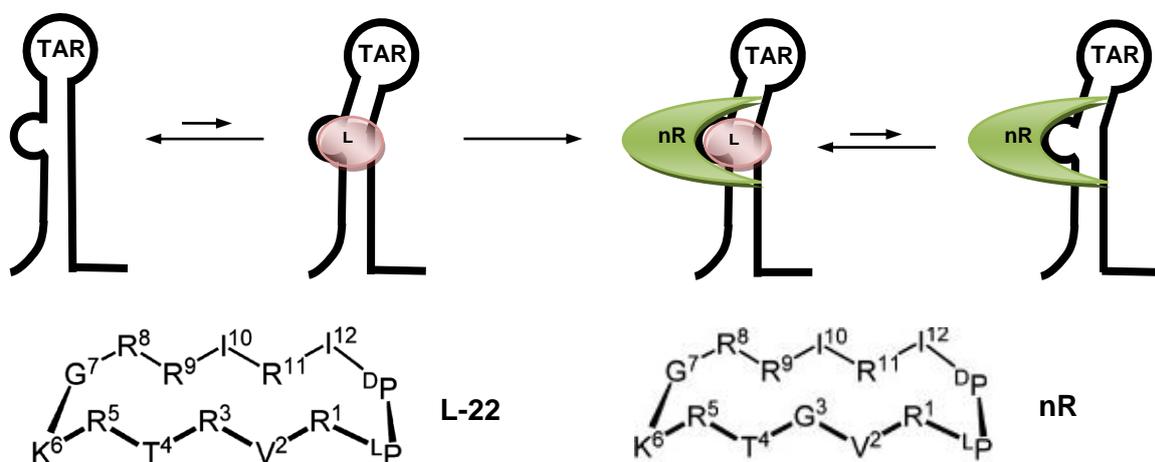


Abbildung 42: Assay zum Nachweis kooperativer Bindungseffekte. In der Mutante „nR“ des Cyclopeptids L-22 wurde durch Austausch des bulge-bindenden Arginins R3 gegen Glycin eine Lücke in der Komplexstruktur geschaffen, in die sich kleine zum Trinukleotidbulge komplementäre Moleküle einlagern könnten. Durgeführt von E. Kalden.

5.2 1D-NMR Titrationsen

In Zusammenarbeit mit J. Ferner (AK Schwalbe) wurden eine Reihe von Verbindungen, die für eine Weiterentwicklung aussichtsreich erschienen, mittels NMR Experimente untersucht. Hierbei war von besonderem Interesse, eine Aussage über die Bindungsstelle des Liganden an TAR und seine Stöchiometrie treffen zu können. Die 1D-NMR Titrationsen eignet sich sehr gut, um erste strukturelle Einblicke zu erhalten. Dabei betrachtet man die Verschiebung der RNA-Iminoprotonen bei zunehmender Ligandenkonzentration und ordnet Regionen mit starker spektralen Änderungen einer speziellen Bindungsstelle des entsprechenden Liganden zu. Zudem lassen sich die Aussagen über die durchschnittliche Lebensdauer des Komplexes an den jeweiligen Regionen treffen und in drei Kategorien einteilen: langsamer, intermediärer und schneller Austausch.

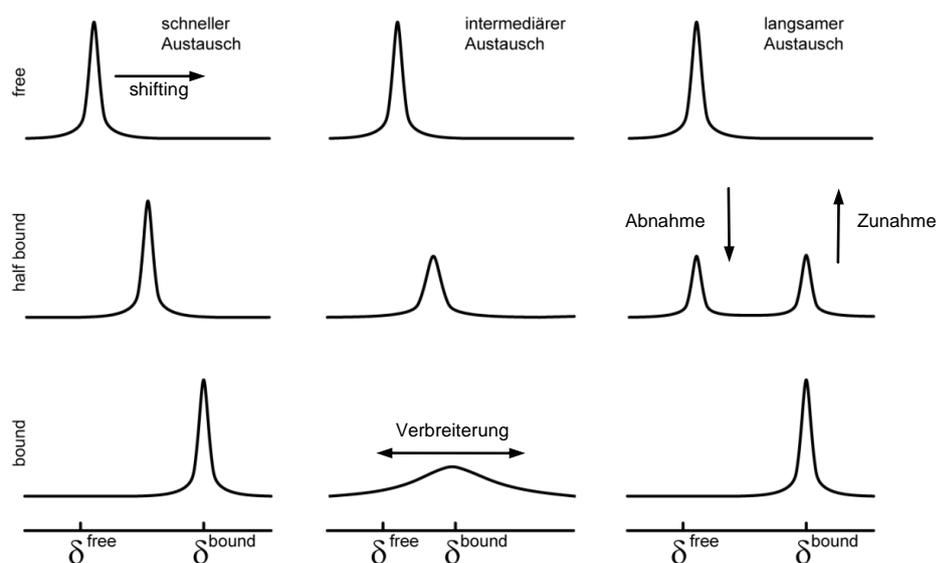


Abbildung 43: Verschiebungsmuster bei der 1D-NMR Titration.

5.3 Anti-HIV Assay mit MT4 Zellen

In Kooperation mit C. Pannecouque (Rega Institute for Medical Research) wurden die HIV inhibierenden Eigenschaften einer Auswahl an Verbindungen untersucht. Dazu wurden humane T-Zellen (MT4) mit HIV-1 (III_B) und HIV-2 (ROD) infiziert und mit einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Liganden behandelt. Daraus ergeben sich die *half maximum effective concentrations* EC_{50} , die Wirkstoffkonzentration, bei denen 50 % der Zellen überleben. Um toxische Effekte auszuschließen, bestimmt man an nicht infizierten

T-Zellen den *cytotoxic concentration* CC_{50} -Wert. Dieser gibt an, bei welcher Wirkstoffkonzentration 50 % der Zellen abgetötet werden. ($CC_{50} < 1$ $\mu\text{g/ml}$ hoch toxisch; 1-10 $\mu\text{g/ml}$ moderat; 10-20 $\mu\text{g/ml}$ schwach; > 20 $\mu\text{g/ml}$ nicht toxisch)

Bildet man den Quotienten CC_{50}/EC_{50} dieser Beiden Werte, erhält man den Selektivitätsindex SI, je niedriger dieser ist desto besser fällt somit die therapeutische Breite aus.^[165]

6. Ligandenscreening, das nicht auf Strukturmodellen beruht

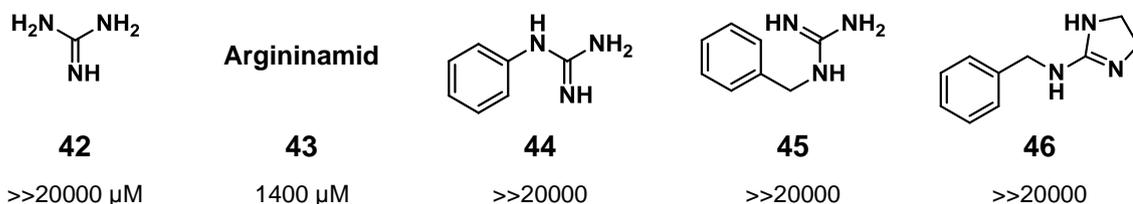
6.1 Erstellen von Kriterien

Berücksichtigt man, dass Tat mit einer Arginin Einheit an TAR bindet, haben wir uns entschlossen, eine Guanidineinheit als Grundbaustein für das screening zu nutzen. Die positive Ladung in der Guanidiniumgruppe ist delokalisiert und bildet daher nur eine schwache Hydrathülle (1/4 der Solvatationsenergie in Bezug zu einem Amin). Somit wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt, was zu einer erhöhten Selektivität des Liganden führt.

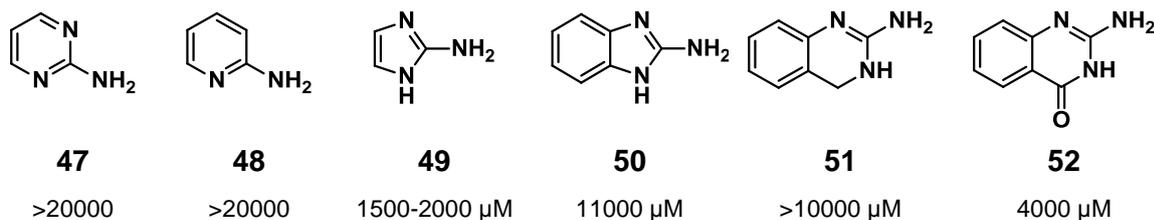
Ein weiteres Grundstrukturelement ist eine aromatische Komponente, da *stacking* an Basenpaaren zu einer erhöhten Bindungsaffinität und zu einer höheren Selektivität für Nucleinsäuren führen sollte.

Ohne Kenntnis der exakten Bindungsstelle an der TAR RNA und mit dieser beschränkten Auswahl an Kriterien für den Liganden, wurden mittels Fluoreszenzassay (s. Kapitel 5.1) die relativen Bindungsaffinitäten einer Reihe von Substanzen gemessen und durch gezielte Derivatisierungen nach essentiellen Grundstrukturen gesucht. *Relative Affinitäten* deshalb, weil der verwendete Kompetitionsassay keine direkte Bestimmung von K_d -Werten erlaubt. Zunächst stand vor allem die systematische Erhöhung der Affinitäten im Vordergrund der Ligandenentwicklung, da die Ausbildungen stabiler Komplexe entscheidend für weitere Untersuchungen sind, die zu einem besseren Verständnis der Bindungsmodi führen sollen. Eine Auswahl besonders vielversprechender Inhibitoren wurde im Anschluss mittels 1D-NMR Titration vermessen, um präzisere Informationen über die Bindungsregion zu erhalten.

6.2 „Screening“ von Guanidinderivaten

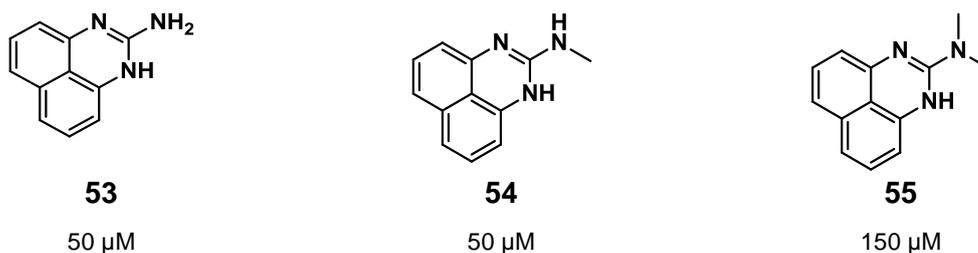


Erste Ergebnisse^[166] zeigten, dass die Guanidine, Phenyl- und Benzylguanidin keine signifikante Affinität besitzen. Um die Planarität des Moleküls zu erzwingen, wurden im nächsten Schritt cyclische Guanidinanaloge in Betracht gezogen.



Wie man an Verbindung **51** und **52** sehen kann, trägt die Planarisierung von Phenylguanidin mittels einer zusätzlichen Methylen- bzw. Carbonylgruppe zur Verbesserung der Bindungseigenschaften bei, wobei die Bindungsaffinität um das 2 bis 5-fache steigt. Aufbauend auf den diesen Erkenntnissen richtete man den Fokus auf Verbindungen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den erfolgsversprechenden TAR-Liganden **51** und **52** aufweisen.

6.2.1 Aminoperimidine



Ein weiterer interessanter Ligand ist das Aminoperimidin **53**. Um abzuschätzen, in welchem Maße Wasserstoffbrücken an der Bindung beteiligt sind, wurde die Aminogruppe schrittweise methyliert. Das Dimethylaminoperimidin zeigt lediglich eine um den Faktor 3 geringere Affinität zu der unmethylierten Spezies. Dies lässt darauf zurückschließen, dass es sich bei dieser Substanzklasse, aufgrund des ausgeprägten π -Systems, um unspezifische Interkalatoren handelt, sodass weitere Arbeiten auf diesem Gebiet nicht fortgeführt wurden.

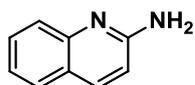
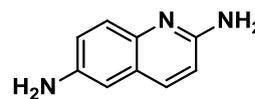
6.2.2 Aminochinoline

Weitere untersuchte Strukturklassen sind 2-Aminochinolin und 1-Aminoisochinolin-derivate. Der pKa Wert liegt bei diesen Verbindungen im Bereich von 7 bis 8. Somit liegen sie unter physiologischen Bedingungen (pKa 7,35 - 7,45) etwa zu 50 % im protonierten Zustand vor.

Speziell das 1-Aminoisochinolin findet sich als Grundbaustein in einer Reihe von pharmazeutischen Wirkstoffen wieder und sollte daher eine gute Bioverfügbarkeit haben, sowie toxikologisch unbedenklich sein.^[167, 168] Durch die Einführung einer Aminogruppe an Position 7 zeigt diese aromatische Aminoverbindung allerdings leicht cytostatische Eigenschaften (1,7-Diaminoisochinolin: CC_{50} : 52 $\mu\text{g/ml}$). Doch in dieser Phase des Wirkstoffscreenings lag der Schwerpunkt eher auf der Suche nach geeigneten strukturellen Motiven mit hoher Affinität. Toxikologische Gesichtspunkte konnten durch Einsatz eines in-vitro assays vorerst vernachlässigt werden.

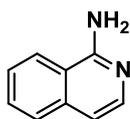
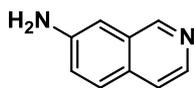
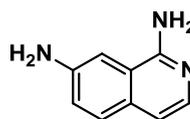
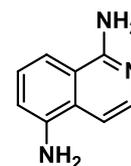
6.2.3 2-Aminochinoline

2-Aminochinoline wurden im Rahmen einer früheren Dissertation^[169] untersucht. Hier konnte beobachtet werden, dass durch Einführung einer zusätzlichen Aminogruppe das inaktive 2-Aminochinolin zu einem aktiven TAR Liganden mit einem IC_{50} von 500 μM überführt werden konnte.

**56**>>20000 μM **57**500 μM

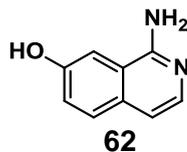
6.2.4 1-Aminoisochinoline

Kombiniert man die Strukturelemente der beiden mäßig aktiven Isochinoline **58** und **59**, gelangt man zu 1,7-Diaminoisochinolin **60** und erzielt eine deutlich höhere Affinität. Sie steigt um den Faktor 13 im Vergleich zu 7-Aminoisochinolin und um den Faktor 53 verglichen mit 1-Aminoisochinolin an. Diese Struktureinheit erscheint besonders erfolgversprechend und wurde als vorläufige Leitstruktur für die Suche nach weiteren Liganden angenommen.

**58**8000 μM **59**2000 μM **60**150 μM **61**700 μM

Um zu überprüfen, ob schlichtweg die höhere Basizität des Liganden Grund für den Anstieg der Bindungsstärke ist, wurde die Aminogruppe von Position 7 durch eine Aminogruppe an Position 5 ersetzt. Man beobachtet hierbei einen Affinitätsverlust von **61** um den Faktor 5. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aminogruppen an Positionen 1 und 7 essentiell für die Stabilität des Komplexes mit der TAR RNA sind.

Um weitere Einblicke in den Bindungsmodus zu erlangen, substituierte man die Aminogruppe an Position 7 durch eine Hydroxygruppe. Die Basizität des Heteroaromaten bleibt hierbei nahezu unverändert, jedoch ist die Option der Protonierung an Position 7 nicht mehr vorhanden. Über die Hydroxygruppe können jedoch Wasserstoffbrücken zu benachbarten H-Brückenakzeptoren der Bindungstasche ausgebildet werden. Handelt es sich also um eine elektrostatische Wechselwirkung, die von dieser Stelle ausgeht, so sollte die Bindungsaffinität bei 1-Amino-7-hydroxyisochinolin geringer sein. Genau dieses Phänomen konnte schließlich beobachtet werden. Man vermutete, dass an dieser Stelle ungerichtete van der Waals-Wechselwirkungen notwendig sind, die möglicherweise mit dem Phosphatrückgrat interagieren.

**62**750 μ M

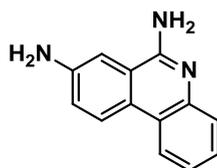
Um strukturelle Einblicke in den Bindungsmodus von 1,7-Diaminoisochinolin zu erlangen, wurden 1D-NMR Titrations (J. Ferner) durchgeführt. Man beobachtete dabei besonders im Bulgebereich die stärksten spektralen Veränderungen G26/U38, aber auch an den Stellen G21 und G28 waren mittelstarke *chemical shift perturbations* (CSPs) zu beobachten.

Aufgrund der signifikanten Affinitätssteigerung bei der Einführung von Aminogruppen an Position 1 und 7 wurden ausgehend von 1,7-Diaminochinolin strukturell ähnliche Moleküle für die weitere Arbeit in Betracht gezogen.

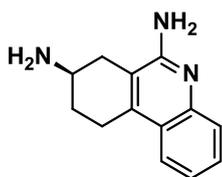
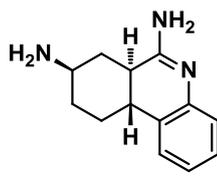
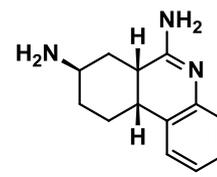
6.2.5 Phenanthridine

Durch Anellierung eines weiteren cyclischen π -Systems an 1,7-Diaminoisochinolin gelangt man zu der Verbindungsklasse der Phenanthridine. Das Aminophenanthridin **63** zeigte bis zu diesem Zeitpunkt die höchste Bindungsaffinität aller untersuchten Moleküle. Angesichts der strukturellen Ähnlichkeit mit Ethidiumbromid muss davon ausgegangen

werden, dass es sich hierbei um einen nichtselektiven Interkalator handelt. Dies konnte zudem durch NMR Titrationsexperimente (J. Ferner) bestätigt werden, die keine signifikante Wechselwirkung mit einer spezifischen TAR Region auftritt. Untersuchungen im Zellassay (C. Pannecouque) haben gezeigt, dass diese Verbindung starke cyto-statische Eigenschaften besitzt. Schließlich sind aromatische Aminoverbindungen bekannter weise problematisch als strukturelles Motiv für Pharmazeutika zu sehen.

**63**15 μ M

Auf Grund der hohen Toxizität entschied man sich, Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin **64** bzw. die Hexahydro-6,8-diaminophenanthridine **65** und **66** herzustellen. Auf diese Weise wollte man nicht nur die cyto-statischen Eigenschaften herabsetzen, sondern auch die große Interkalationsfläche minimieren, die zur unselektiven Einlagerung zwischen Nucleobasen führt. Darüber hinaus zeigen diese Verbindungen deutlich basischere Eigenschaften. So liegt der Ligand zu 50 % bei Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin und fast vollständig bei Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin bei pH = 7 in der dikationischen Form vor, was die Affinität zur negativ geladenen Bindungstasche erhöhen sollte.

**64**pH7: 300 μ M für rac-**64**pH6: 150 μ M für rac-**64****65**1400 μ M für rac-**65****66**500 μ M für rac-**66**

Durch die schrittweise Verringerung der Interkalationsfläche ist eine deutliche Abnahme der Bindungsaffinität im Fluoreszenzassay zu beobachten. Bei Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin konnte ein IC_{50} von 300 μ M bei pH=7 bzw. 150 μ M bei pH=6 bestimmt werden, und bei Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin lag der IC_{50} Wert bei 1400 μ M (trans) bzw. 500 μ M (cis). Bemerkenswert ist, dass das gewinkelte (cis)-Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin im Vergleich zu dem planaren (trans)-Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin, trotz seines sterisch größeren Anspruchs, eine höhere Aktivität aufweist.

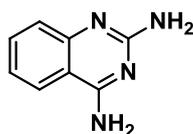
Allerdings gelang es durch sukzessive Verkleinerung des π -Systems, die toxische Wirkung von 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Aminophenanthridin **63** über 9,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin **64** auf 53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei den Hexahydro-6,8-diaminophenanthridinen **65** und **66** zu senken.

6.2.6 2,4-Diaminochinazoline

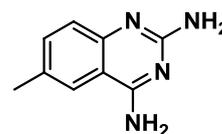
Eine weitere hier bearbeitete Verbindungsklasse sind 2,4-Diaminochinazoline, die durch ihren lipophilen Charakter und gute Bioverfügbarkeit als Pharmakophor für verschiedene Anwendungen eingesetzt werden. Man findet diese Grundstruktur in einer Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen wie zum Beispiel Prazosin und seinen pharmakologischen Verwandten Terazosin und Doxazosin, die als selektive Antagonisten an α_1 -Adrenozeptoren wirken. Weiterhin werden sie als Dihydrofolate Reductase Inhibitoren eingesetzt, wie Methotrexate, Trimetrexate und Piritrexim und dienen der Krebstherapie.^[170]



67
40-50 μM



68
400 μM



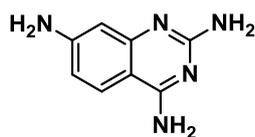
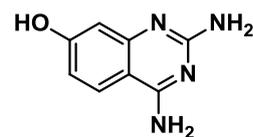
69
2000 μM

Das 2,4,6-Triaminochinazolin wurde bereits in einer Patentarbeit^[171] als potentieller TAR Ligand beschrieben. Mit einem IC_{50} von 40-50 μM konnten wir dies in unserem Arbeitskreis bestätigen. Erstaunlicherweise zeigte der Ligand, als bisher einzige Verbindung dieser Testreihe, einen langsamen Austausch bei 1D-NMR Titrationsexperimenten. Die betreffenden Iminoprotonen konnten den Basen G36 und G28 unterhalb der loop Region und U42 und G21 im unteren stem Bereich zugeordnet werden. Zudem findet auch im Bulgebereich G26 ein langsamer bis intermediärer Austausch des Liganden statt.

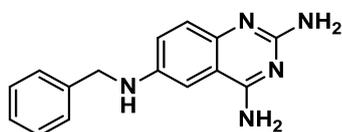
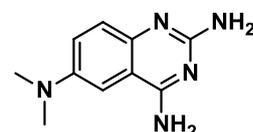
Betrachtet man den strukturellen Aufbau des 2,4,6-Triaminochinazolins, so kann auch hier das Strukturelement des 1,7-Diaminochinazolins gefunden werden, das eventuell für die Bindung im Bulgebereich von Bedeutung ist. Entfernt man die Aminogruppe an Position 6, fällt die Affinität um das 10-fache. Substitution durch eine Methylgruppe führt zu einem signifikanten Affinitätsverlust um das 40-fache. Ändert man die Position der Aminogruppe kann man ebenfalls eine Abnahme der Bindungsbereitschaft beobachten. Der IC_{50} -Wert des isomeren 2,4,7-Triaminochinazolins **70** liegt um den Faktor zwei höher,

zudem zersetzt es sich in Lösung unter Bildung von hoch affinen polykationischen Verbindungen.

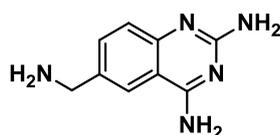
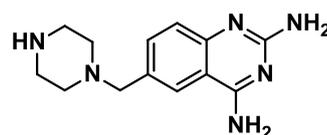
Das Phenolderivat **71** ist vergleichbar mit dem unsubstituierten 2,4-Diaminochinazolin. Offensichtlich bildet die Hydroxygruppe keine Wasserstoffbrückenbindung an die umgebende Bindungstasche aus. Somit scheint die positive Ladung an Position-6 essentiell für eine hohe Affinität zu sein.

**70**110 μM **71**300 μM

Substitution an der 6-Aminogruppe führt zu keinem Verlust der Bindungsstärke. Auch konnte eine höhere Stabilität für N^6, N^6 -Dimethylchinazolin-2,4,6-triamin **73** in Lösung beobachtet werden, so dass die IC_{50} -Werte über einen Zeitraum von 24 h konstant geblieben sind. Allerdings zeigten 1D-NMR Titrationsexperimente (durchgeführt von J. Ferner) eine Zunahme der Austauschgeschwindigkeit des Liganden an den signifikanten Bindungsstellen und damit auch eine Abnahme der Selektivität des Liganden.

**72**30 μM **73**45 μM

Es wurde angenommen, dass die positive Ladung an der 6-Aminogruppe von entscheidender Bedeutung ist. Um an dieser Stelle ein permanentes Kation zu erzeugen wurden Methylamino- und ein Methylpiperidin- Substituenten eingeführt, die bei $\text{pH}=7$ nahezu vollständig protoniert vorliegen:

**74**70 μM **75**60 μM

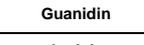
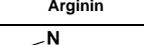
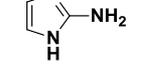
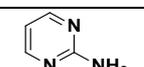
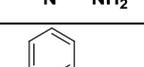
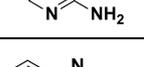
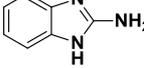
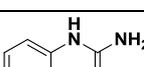
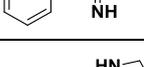
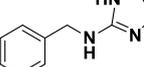
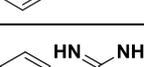
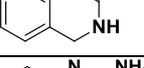
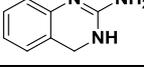
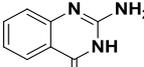
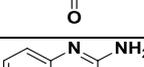
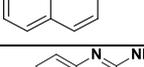
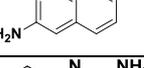
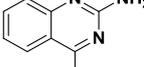
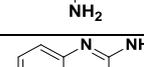
Die Stabilität von Aminomethyldiaminochinazolin **74** gegenüber den elektronenreichen Triaminochinazolinen ist deutlich höher. Allerdings liegt auch bei dieser Substanzklasse die Toxizität über dem antiviralen Wirkungsbereich (C. Pannecouque), was mit der

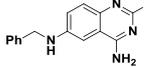
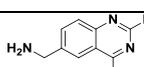
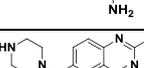
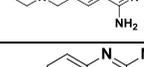
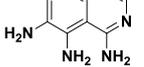
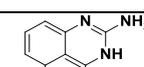
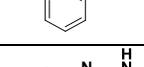
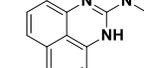
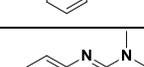
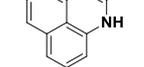
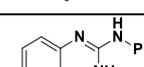
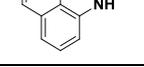
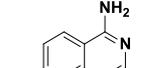
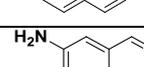
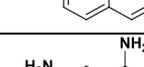
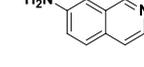
strukturellen Ähnlichkeit zu bekannten Folsäure Antagonisten erklärt werden kann. Zudem weisen 1D-NMR Titrationsexperimente (J. Ferner) darauf hin, dass Aminomethyldiaminochinazolin **74** einen weniger stabilen Komplex mit TAR RNA als das 2,4,6-Triaminochinazolin ausbildet.

Das 2,4,5,6-Tetraaminochinazolin **20**, das als loop Binder von Parke Davis^[135] gefunden wurde, hat eine vergleichbare Bindungsaffinität von 50 μM wie 2,4,6-Triminochinazolin. Es ist jedoch empfindlich gegen Oxidation und bildet in wässriger Lösung Zersetzungsprodukte (Oligomere) mit hoher aber unspezifischer Affinität zu Nukleobasen.



6.3 Zusammenfassung der TAR Liganden

Struktur	IC ₅₀ [μM] ^{a)}	EC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	CC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	Bindungs- stelle ^{c)}	Bez
	> 20000	-	-	-	42
	1200	-	-	bulge	43
	2500 Gealtert: 250	-	-	-	49
	inaktiv	-	-	-	47
	inaktiv	-	-	-	48
	11000	-	-	-	50
	>20000	-	-	-	44
	inaktiv	-	-	-	46
	inaktiv	-	-	-	45
	>10000	-	-	-	51
	4000	-	-	-	52
	inaktiv	-	-	-	56
	500	-	-	-	57
	400	>47,75	47,75	-	68
	2000	-	-	-	69
	40 Gealtert: 80	>14,2	14,2	G36,G28(l) U42,G21(l) G26 (s-m)	67
	85	-	-	-	70
	300-600	-	-	-	71
	45	>1,9	1,9	-	73

Struktur	IC ₅₀ [μM] ^{a)}	EC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	CC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	Bindungs- stelle ^{c)}	Bez
	30	-	-	-	72
	70	>48,6	48,6	bulge	74
	60	-	-	-	75
	50 gealtert: 17	-	-	loop	76
	50	-	-	-	53
	50	-	-	-	54
	150	-	-	-	55
	inaktiv	-	-	-	77
	8000	-	-	-	58
	2000	-	-	-	59
	150	>52,2	52,2	G26(m) U38(m) G21(s) G28(s)	60
	700	-	-	-	61
	750	-	-	-	62
	15	>1,5	1,5	unselektiv	63
	10	-	-	-	78
	10	-	-	-	79

Struktur	IC ₅₀ [μM] ^{a)}	EC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	CC ₅₀ [μg/ml] ^{b)}	Bindungs- stelle ^{c)}	Bez
	pH=7: 300 pH=6: 150	III _B : 2,6 ROD: >9,1	9,1	Unselektiv	rac 64
	1200	III _B /ROD >49,3	>49,3	-	rac 65
	500	III _B /ROD >59,5	59,5	-	rac 66
	pH=7: 45 pH=6: 20	-	-	G26(m) U38(m)	rac 80
	pH=7: 3000 pH=6: 1500	-	-	-	rac 81
	pH=7: 500 pH=6: 150	-	-	G26(m) U38(m)	82
	pH=7: 2000 pH=6: 1000	-	-	-	83
	2500	-	-	-	84
	2500	-	-	-	85
	1500	-	-	-	86
	1250	-	-	-	87

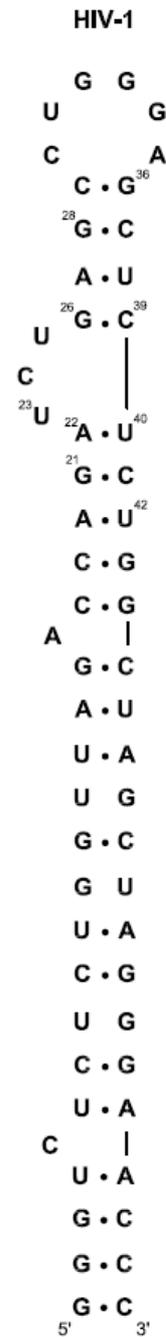


Tabelle 1: Zusammenfassung der Tar Liganden. ^{a)} Die fluorimetrischen Bindungsassays (IC₅₀) wurden durchgeführt von U. Scheffer und E. Kalden. ^{b)} Antivirale Assays und Toxizitätsmessungen: C. Pannecouque, Rega Institut, Universität Leuven, Belgien. ^{c)} NMR Titrations (J. Ferner): s: schneller Austausch; m: intermediärer Austausch; l: langsamer Austausch.

7. Strukturbasiertes Ligandendesign

7.1 Erstellung eines Bindungsmodells

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie das Tat Peptid an TAR bindet, betrachtet man zunächst, auf welche Weise ein einzelnes Arginin bzw. Argininamid mit der RNA interagiert und welche Konformation die flexible Bindungsdomäne der TAR RNA dabei einnimmt. Basierend auf Gelshift Experimenten mit Komplexen aus TAR RNA und Argininderivaten konnten Frankel et al. zeigen, dass die Guanidiniumgruppe nicht nur van der Waals Wechselwirkungen zu der TAR RNA aufbaut, sondern auch über Wasserstoffbrücken mit der Bindungsstelle in Kontakt tritt. Durch Affinitätschromatographie mit ^{32}P gelabelten TAR Mutanten wurde der bulge Bereich der RNA als selektive Bindungsstelle ausmacht und zudem gezeigt, dass die Phosphate P(22) und P(23) zwischen G21 und A22 sowie zwischen A22 und U23 an der Bindung beteiligt zu sein scheinen. Ausgehend von diesen Beobachtungen entwickelten Frankel et al. das „Arginin-fork-Modell“, nach dem ein einzelnes Arginin für die selektive Bindung an die TAR RNA verantwortlich sein soll.^[172, 173]

Genauere Einblicke lieferten daraufhin NMR Strukturdaten. Williamson et al. konnte mit NMR spektroskopischen Methoden zeigen, dass eine Konformationsänderung der TAR RNA durch Komplexierung mit Arginin induziert wird. Erste Indizien sprachen für eine Ausbildung eines Basentriplets zwischen U23, A27 und U38. Man postulierte, dass sich die Guanidiniumgruppe in die entstehende Bindungstasche optimal einlagern kann. Dabei wurde die Beteiligung von Kation- π -stacking Wechselwirkungen zwischen A22 und G26, die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu G26 und elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphaten P(22) und P(23) angenommen.^[174, 175]

Varani et al. gelang es, durch NMR Experimente eine erste Struktur der TAR im Komplex mit Argininamid zu erstellen (1ARJ). Hieraus ergaben sich Hinweise, die das bisher gültige „Arginin-fork-Modell“ in Frage stellten. So scheint eine Bindung zu G26 und gleichzeitig zu den Phosphaten P(22) und P(23) nicht möglich zu sein. Auch die Ausbildung des Basentriplets zwischen U23, A27 und U38 konnte nicht beobachtet werden. Allerdings lässt sich die exakte Struktur im Komplex nur durch hohen Aufwand ermitteln, und es ist zu bedenken, dass die RNA mit jedem neuen Liganden eine im Detail andere Konformation annimmt.

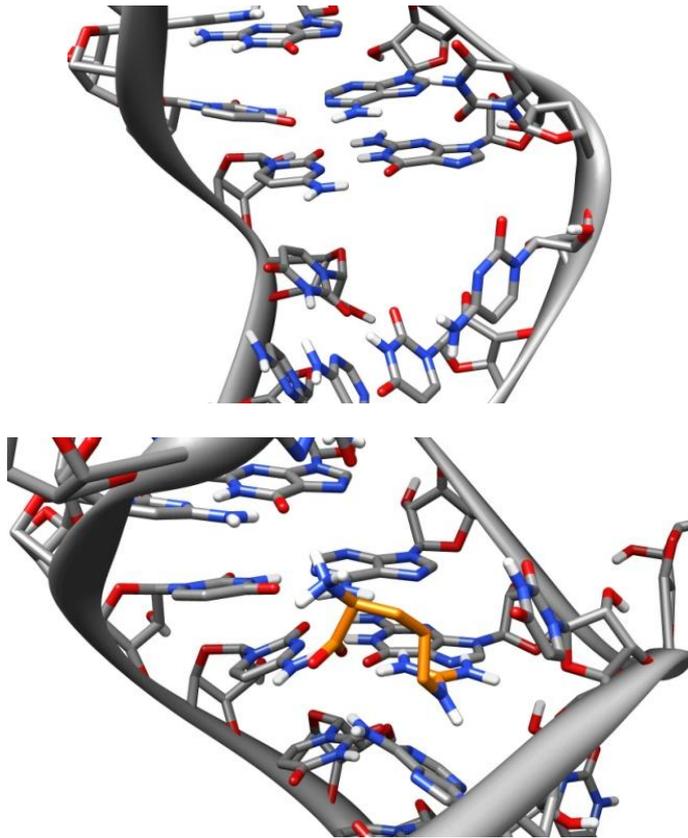


Abbildung 44: Konformationsänderung im Bulgebereich, TAR free (1ANR)^[131], TAR + Argininamid (1ARJ)^[132]

Durch molekulardynamische Berechnungen, ausgehend von den NMR Strukturdaten, konnte allerdings gezeigt werden, dass sich das U23 an das U38-A27 Watson-Crick Basenpaar annähert und ein Basentriplett ausgebildet wird. Die Guanidiniumgruppe interkaliert dabei zwischen A22 und U23 unter Ausbildung einer Kation- π Wechselwirkung. Zudem lassen sich auch Wasserstoffbrücken zu G26 beobachten, was zudem für die Selektivität dieser Bindungstasche verantwortlich sein könnte.^[176]

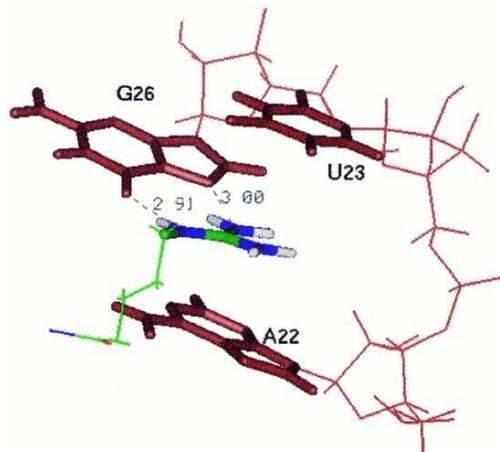


Abbildung 45: Konformation des Komplexes aus Argininamid und TAR anhand von molekular dynamischen Simulationen.^[176]

7.2 Bindungsmuster von Guanidinanaloga

In den letzten Jahren konnten, über NMR Verfahren, mehrere Strukturen von Komplexen aus TAR RNA und affinen Liganden aufgeklärt werden. Betrachtet man zunächst speziell die Bindungsmodi guanidinhaltiger Liganden, dann fällt auf, dass die Konformation der Bindungstasche in den verschiedenen Komplexen eine große strukturelle Übereinstimmung aufweist.

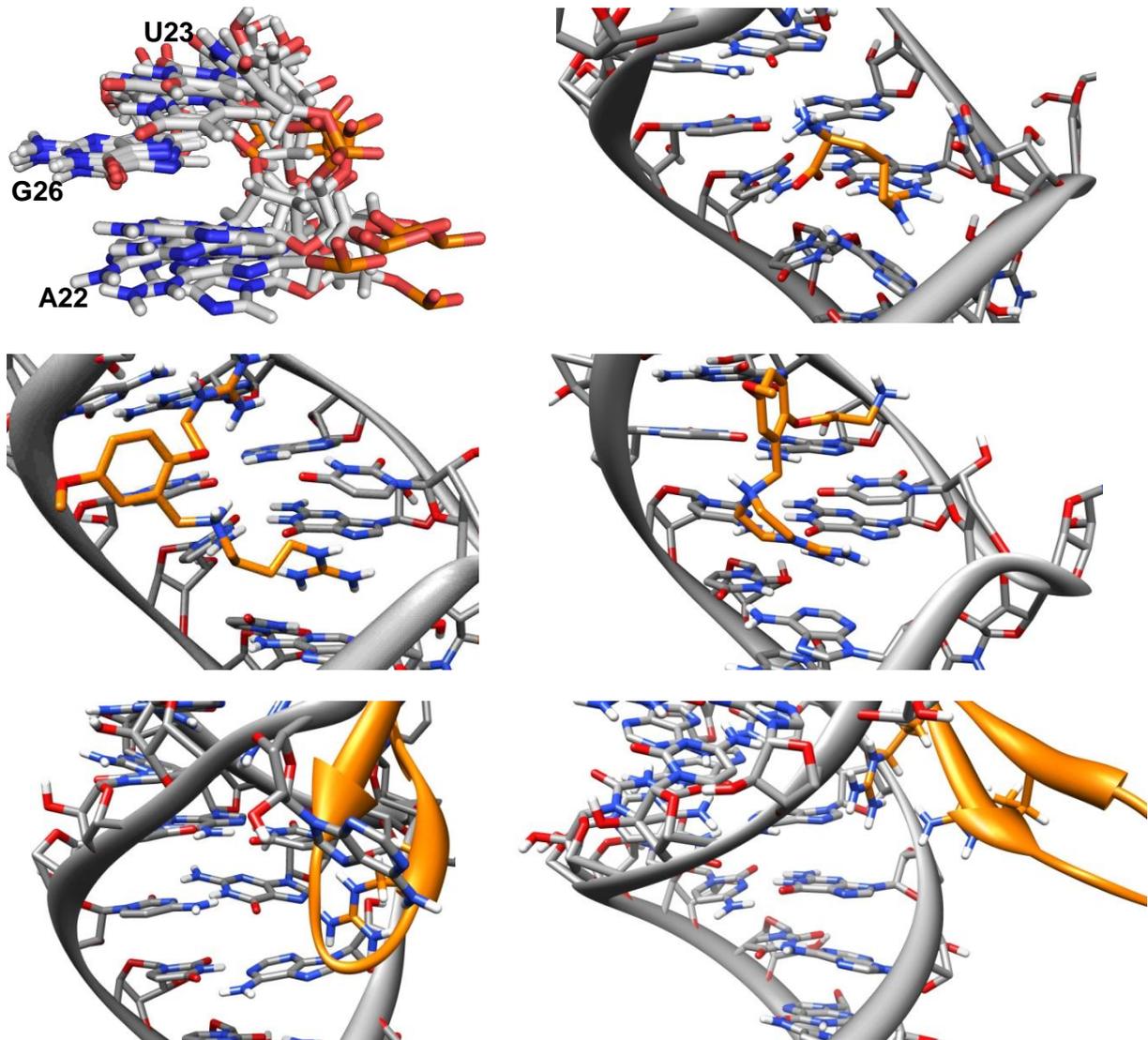


Abbildung 46: a) Überlagerung des TAR-bulge in Anwesenheit guanidinhaltiger Liganden; b,c,d,e,f) Konformation im bulge Bereich in Anwesenheit von Guanidinanaloga 1ARJ, 1UUD, 1UUI, 1KDQ und 1KX5.

7.3 Zusammenfassung der Beobachtungen

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse und verbindet sie mit literaturbekannten Strukturmodellen, so lassen sich folgende Annahmen für die Erstellung eines Bindungsmodells zusammenfassen:

- Guanidiniumeinheiten liegen bevorzugt im bulge Bereich.
- Eine Interaktion mit dem Phosphatrückgrat führt zu starken elektrostatischen Wechselwirkungen.
- Wasserstoffbrücken zu G26 führen zu erhöhter Affinität und Selektivität.
- Interkalation zwischen A22 und U23 trägt zur molekularen Erkennung eines Guanidins bei.
- Guanidinhaltige Liganden induzieren eine übereinstimmende Konformationsänderung unter Ausbildung eines Basentriplets aus U23, A27 und U38.
- Bindung in den bulge Bereich führt zur Stabilisierung der dynamischen TAR RNA.

7.4 Anwendung des Bindungsmodell auf Guanidinanaloge

Um die bisherigen Ergebnisse zu interpretieren, wurde schließlich der Versuch unternommen, die guanidin- bzw. amidinhaltigen Liganden in dieses Bindungsmodell einzubringen. Folgende Probleme sind dabei zu berücksichtigen: TAR besitzt keine starre Struktur. Bei allen bisher bekannten Komplexen treten selbst bei ähnlichen Liganden signifikante Unterschiede der RNA Konformation auf. Die Auswahl spezifischer Koordinatensätze individueller Komplexe als Grundlage für ein allgemeines Modeling ist daher in hohem Maße willkürlich. Da in den protonierten heteroaromatischen Liganden die exakte Ladungsverteilung durch Kraftfelder nur schlecht zu beschreiben ist, wählte man einen ab-initio Ansatz. Um den Rechenaufwand in akzeptablen Grenzen zu halten, mussten dabei jedoch ebenfalls weitreichende Kompromisse eingegangen werden. Die einfache HF 3-21G Methode ist im Grunde zur quantitativen Beschreibung von H-Brücken nicht ideal. Weiterhin musste die RNA-Konformation als weitgehend starr angenommen werden. Daher sollte man die numerischen Ergebnisse nicht ohne die nötige Vorsicht betrachten. Der heuristische Wert der Rechnungen könnte wohl am ehesten darin bestehen, eine Aussage über die plausible Bindungsmodi der Liganden treffen zu können.

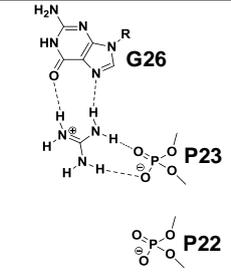
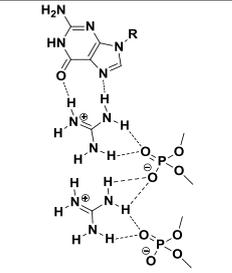
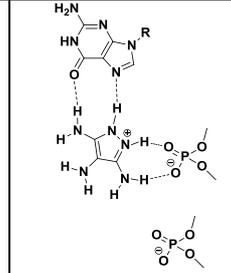
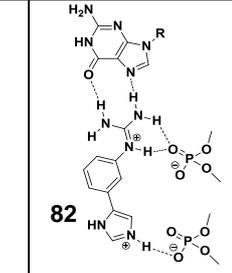
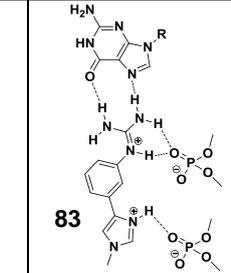
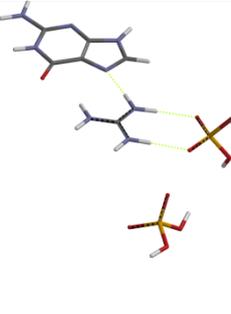
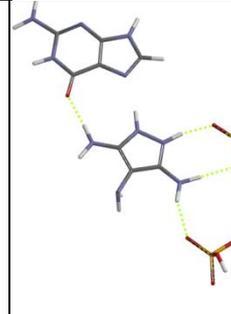
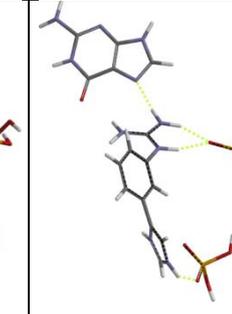
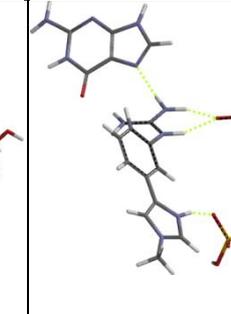
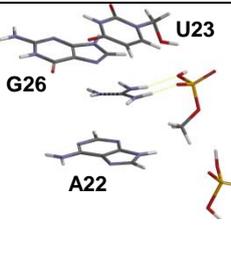
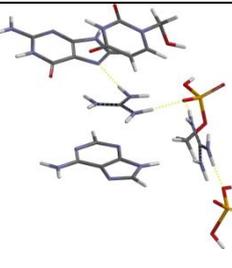
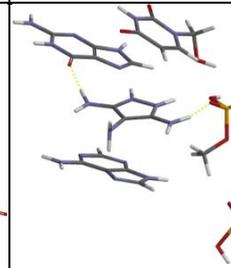
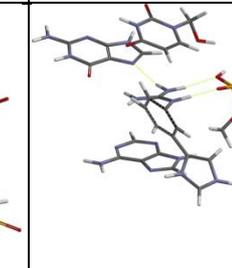
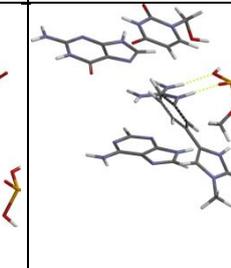
Als Ausgangspunkt verwendete man die Strukturdaten aus 1ARJ und reduzierte die Bindungstasche zunächst auf drei funktionelle Gruppen, die nach unserem Modell

entscheidend für die Selektivität der Bindung sind. Dazu gehört das G-26 sowie die Phosphate P(22) und P(23). Auf die Interkalationsflächen A22 und U23, die einen signifikanten Beitrag zur Bindungsaffinität leisten, aber auch den Guanidinbaustein in eine zu den Basen parallele Anordnung zwingen, wurde zunächst verzichtet, um den Rechenzeit zu minimieren. Um die Flexibilität des Systems zu simulieren, wurden nur die Positionen der Phosphoratome fixiert und auf die Lage der Phosphatsauerstoffatome keine Restriktionen gesetzt. In diese Bindungstasche wurden anschließend die Liganden gelegt und mit Hartree-Fock SCF Kalkulationen Geometrie-optimiert. Dazu verwendete man den (HF 3-21G) Basissatz im Vakuum und in einer simulierten wässrigen Umgebung (SM8), um die Konformation des Komplexes im globalen Minimums zu bestimmen. Als Plattform für diese Rechnungen diente die Software Spartan 08 (Version 1.2.0).

Um die die so erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Berechnungen mit den Daten aus einem weiteren Strukturmodell abgeglichen. Diesmal sollten zusätzlich repulsive Wechselwirkungen mit den Interkalationsflächen A22 und U23 in die Berechnung einfließen. Bei der angewendeten Methode wurden allerdings Kation- π stacking sowie hydrophobe Effekte nicht berücksichtigt. Als geeignet schienen hierfür die NMR Strukturdaten von 1UUD. In diesem Komplex interagiert der guanidinhaltige Ligand rbt203 mit TAR unter Ausbildung eines Basentriplets, das zu einer parallelen Anordnung der Basen A22 und U23 führt. In diese starre Bindungstasche wurden die Liganden hineingelegt und das Konformationsminimum (HF 3-21G) im Vakuum sowie in Wasser [SM8] berechnet.

Um die Komplexierungsenergie des jeweiligen Liganden abzuschätzen, wurden in weiteren Rechnungen die Gesamtenergien des RNA Fragments sowie des Liganden bestimmt und addiert. Dieser Energiewert entspricht dem dissoziierten Komplex, ohne die Konformationsänderung der RNA zu berücksichtigen. Subtrahiert man die Energie des ungebundenen Systems von der Energie des Komplexes, so erhält man die Komplexierungsenergie in Vakuum sowie in simulierter wässriger Umgebung.

Die erhaltenen Zahlenwerte berücksichtigen allerdings nicht die Konformationsänderung der RNA, so dass vor allem die relativen Bindungsenergien der einzelnen Komplexe Aussagen über die Bindungsstärke liefern. Als erster Bezugspunkt diente dabei der Komplex des unsubstituierten Guanidiniumions.

 <p>G26 P23 P22</p>			 <p>82</p>	 <p>83</p>
				
HF 3-21G vakuum (1ARJ):^{a)} -764 kJ/mol	-1417 kJ/mol	-920 kJ/mol	-1525 kJ/mol (Im-Ar 145°) -1540 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-1452 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{b)} 0 kJ/mol	-653 kJ/mol	-156 kJ/mol	-761 kJ/mol (Im-Ar 145°) -776 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-688 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{c)} -94 kJ/mol;	-214 kJ/mol	-190 kJ/mol	-184 kJ/mol (Im-Ar 145°) -202 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-173 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{d)} 0 kJ/mol	-120 kJ/mol	-96 kJ/mol	-90 kJ/mol (Im-Ar 145°) -108 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-79 kJ/mol
H-Brücken [Å]:^{e)} 2,68; 1,99; 2,00; 1,95	2,80; 2,12; 2,04; 1,92 1,93; 1,99; 1,87; 2,17	1,88; 2,13; 1,73; 1,89; 2,13	2,63; 1,91; 1,97; 1,98; 1,28/ 2,40; 2,23; 1,72; 1,59; 1,63	2,39; 2,23; 1,72; 1,59; 1,64
 <p>G26 U23 A22</p>				
HF 3-21G vakuum (1UUD):^{a)} -716 kJ/mol	-1326 kJ/mol	-711 kJ/mol	-1372 kJ/mol (Im-Ar 145°) -1341 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-1325 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{b)} 0 kJ/mol	-610 kJ/mol	+5 kJ/mol	-656 kJ/mol (Im-Ar 145°) -625 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-609 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{c)} -79 kJ/mol	-174 kJ/mol	-103 kJ/mol	-122 kJ/mol (Im-Ar 145°) -110 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-116 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{d)} 0 kJ/mol	-95 kJ/mol	-24 kJ/mol	-43 kJ/mol (Im-Ar 145°) -31 kJ/mol (Im-Ar 30°)	-38 kJ/mol
H-Brücken [Å]:^{e)} 2,51; 2,12; 2,00; 1,67	2,31; 1,95; 2,16; 1,88 1,86; 2,19; 1,85; 1,60	1,83; 2,33; 2,20; 1,72; 4,97	2,40; 2,07; 1,99; 1,72; 1,25/ 2,51; 2,11; 2,00; 1,64; 2,34	2,51; 2,12; 2,00; 1,64; 2,37
$E_{\text{Solv}} \text{ Ligand [SM8]}:$^{f)} -285,6 kJ/mol	2 x -285,6 kJ/mol	-243,5 kJ/mol	-719,98 kJ/mol	-690,3 kJ/mol
IC₅₀: >20000 μM	>20000 μM	2000-3000 μM	150 μM (pH = 6)	1000 μM (pH=6)

HF 3-21G vakuu (1ARJ): ³⁾ -839 kJ/mol	-841 kJ/mol	-1628 kJ/mol	-864 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$: ⁵⁾ -75 kJ/mol	-77 kJ/mol	-864 kJ/mol	-100 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]: ⁶⁾ -174 kJ/mol	-204 kJ/mol	-217 kJ/mol	-204 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$: ⁵⁾ -80 kJ/mol	-110 kJ/mol	-123 kJ/mol	-110 kJ/mol
H-Brücken [A]: ⁹⁾ 2,10; 1,93; 1,90; 1,88; 1,86	2,02; 2,04; 1,90; 2,05; 2,00; 1,91	2,06; 1,90; 1,97; 2,47; 1,83; 1,67	2,50; 2,25; 1,62; 1,85; 1,82
HF 3-21G vakuu (1UUD): ³⁾ -694 kJ/mol	715 kJ/mol	-1393 kJ/mol	-703 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$: ⁵⁾ +22 kJ/mol	-1 kJ/mol	-677 kJ/mol	-13 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]: ⁶⁾ -119 kJ/mol	-142 kJ/mol	-123 kJ/mol	-129 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$: ⁵⁾ -40 kJ/mol	-63 kJ/mol	-42 kJ/mol	-50 kJ/mol
H-Brücken [A]: ⁹⁾ 1,83; 2,08; 3,09; 1,87; 3,35	2,20; 1,85; 2,01; 2,89; 2,06; 3,20	2,02; 2,00; 2,25; 2,73; 1,72; 2,97	1,85; 2,11; 3,06; 1,88; 3,28
$E_{\text{Solv}} \text{ Ligand [SM8]}^{\text{1)}$ -226.2 kJ/mol	-243.8 kJ/mol	-807.8 kJ/mol	-219.5 kJ/mol
IC_{50} : 150 μM	40 μM	70 μM	15 μM

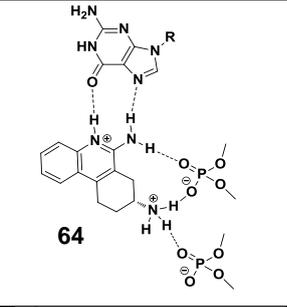
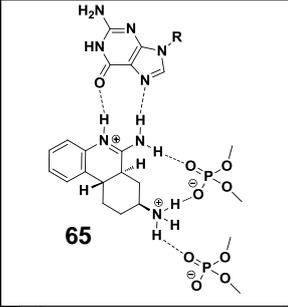
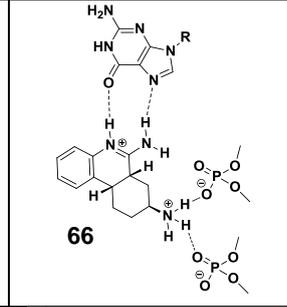
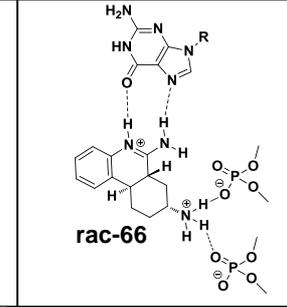
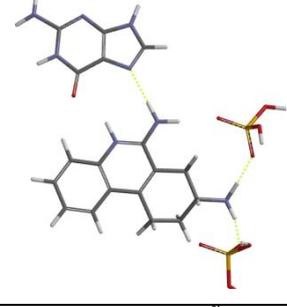
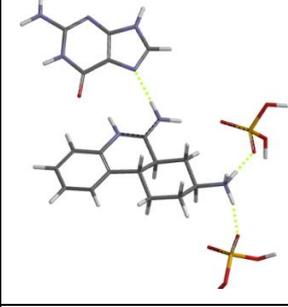
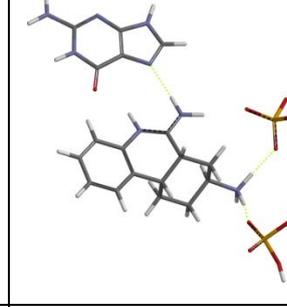
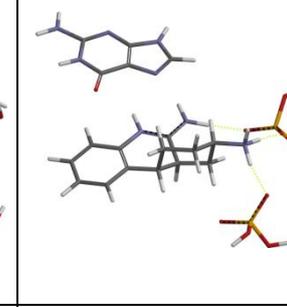
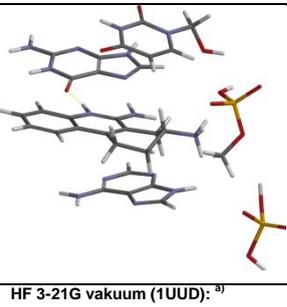
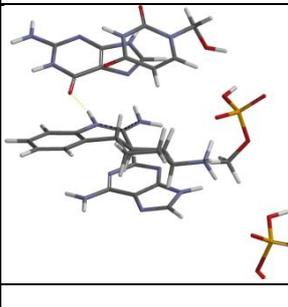
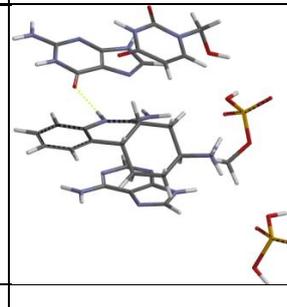
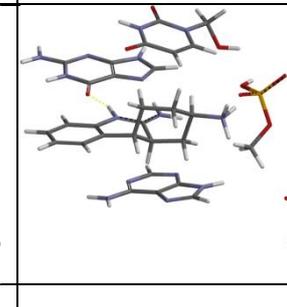
			
			
HF 3-21G vakuum (1ARJ):^{a)} -1652 kJ/mol	-1663 kJ/mol	-1663 kJ/mol	-1677 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{b)} -888 kJ/mol	-899 kJ/mol	-899 kJ/mol	-913 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{c)} -223 kJ/mol	-211 kJ/mol	-223 kJ/mol	-222 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{d)} -129 kJ/mol	-117 kJ/mol	-129 kJ/mol	-128 kJ/mol
H-Brücken [Å]:^{e)} 2,16; 198; 2,12; 1,68; 1,71	2,43; 2,22; 1,64; 1,58; 1,47	2,10; 2,09; 2,15; 1,71; 1,73	2,13; 2,11; 2,11; 1,71; 1,74
			
HF 3-21G vakuum (1UUD):^{a)} -1294 kJ/mol	-1338 kJ/mol	-1357 kJ/mol	-1367 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$:^{b)} -578 kJ/mol	-622 kJ/mol	-641 kJ/mol	-651 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{c)} -100 kJ/mol	-108 kJ/mol	-130 kJ/mol	-147 kJ/mol
$\Delta E(E_{\text{Ligand}}-E_{\text{Guanidin}})$ [SM8]:^{d)} -21 kJ/mol	-29 kJ/mol	-51 kJ/mol	-58 kJ/mol
H-Brücken [Å]:^{e)} 1,70; 2,10; 3,36; 1,37; 3,65	1,72; 2,11; 3,21; 1,46; 3,39	2,00; 2,55; 3,00; 1,54; 3,31	1,76; 2,35; 3,45; 1,28; 4,12
$E_{\text{Solv}} \text{ Ligand}$ [SM8]:^{f)} -787 kJ/mol	-810 kJ/mol	-816 kJ/mol	-816 kJ/mol
IC₅₀: 150 (pH=6)	1200 μM	500 μM (rac)	500 μM (rac)

Tabelle 2: Ergebnisse der computergestützten Berechnung der Bindungsenergie von Komplexen aus Ligand und TAR Fragment aus dem bulge Bereich. Modell aus 1ARJ: (G26, P22 und P23); Modell aus 1UUD: (G26, A22, U23, P22 und P23).^[177] a) Komplexierungsenergie im Vakuum: $E_{\text{Ligand}}+E_{\text{RNA}}-E_{\text{Ligand-RNA}}$; b) Komplexierungsenergien in Bezug auf den RNA-Guanidin Komplex; c) Komplexierungsenergie in Wasser: $E_{\text{Ligand}}+E_{\text{RNA}}-E_{\text{Ligand-RNA}}$; d) Komplexierungsenergien in Wasser bezüglich eines RNA-Guanidin Komplexes; e) Berechnete H-Brückenlängen entsprechen den gestrichelten Bindungen im Formelbild, angegeben von links nach rechts. IC₅₀ Werte aus dem FRET Assay; f) Berechnete Solvatationsenergie des Liganden mit der in HF 3-21G implementierten [SM8]-Methode.

Mit Hilfe der Rechnungen konnte gezeigt werden, dass sich das freie Guanidin nicht optimal in diese Bindungstasche einlagern kann und eine simultane Ausbildung von zwei H-Brücken zum G26 und eine Koordination an das Phosphat P(23) unwahrscheinlich ist. Die starken elektrostatischen Anziehungskräfte des Phosphats bewirken vielmehr eine Komplexierung an die beiden negativ geladenen Sauerstoffatome des P(23), so dass nur eine H-Brücke zu G26 möglich ist.

Mit einem IC_{50} Wert von $>20000 \mu\text{M}$ zeigt das Guanidin auch im Fluoreszenzassay nur geringe Affinität. Hierbei ist zu beachten, dass bei Guanidin der hydrophobe Effekt keine Rolle spielt und somit die Wasserstoffbrückenbindungen sowie van der Waals-Wechselwirkungen zum Phosphat alleine nicht stark genug sind, einen stabilen Komplex auszubilden.

Betrachtet man hingegen zwei Guanidineinheiten in der Bindungstasche, so kann man einen energetischen Zugewinn von 610 kJ/mol im Vakuum und 95 kJ/mol in Wasser beobachten. Diese Werte sind vergleichbar mit denen der aktivsten hier vorgestellten Liganden. Durch ihre geringe Größe sind sie einem schnellen Austausch mit Wassermolekülen unterzogen, so dass es statistisch unwahrscheinlich ist, dass beide Guanidine sich gleichzeitig in der bulge Region befinden. Verbindet man hingegen die beiden Einheiten miteinander, sollte sich die Bindungsaffinität potenzieren und man einen IC_{50} von etwa $400 \mu\text{M}$ erhalten. Derartige Strukturen finden sich auch in den cyclischen Peptiden (2KDQ) von Robinson et al. wieder, die mit zwei konsekutiven Argininen in den bulge binden. Es ist anzunehmen, dass ein Tat Peptid ebenso mit zwei Arginineinheiten mit der TAR RNA interagiert.

Ein im Arbeitskreis Göbel entwickeltes Strukturmotiv, das in der Lage sein sollte, sich besser in den bulge einzupassen, war das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin. In der Simulation konnte bei dem Einsatz des flexibleren Bindungsmodells (aus 1ARJ) eine verbesserte Koordinationsfähigkeit an das G-26 und dem Phosphat P(23) bestätigt werden. Betrachtet man den Ligand allerdings in dem starren Modell (aus 1UUD), zeigt sich, dass die Verbindung nicht optimal an die räumliche Umgebung anpassen kann, so dass nur zwei effektive Wasserstoffbrücken möglich sind. Dieses Ergebnis würde eher die mäßige Affinität des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin im Verdrängungsassay widerspiegeln (IC_{50} : $2000\text{-}3000 \mu\text{M}$), aber es kann nicht als eindeutiger Hinweis gewertet werden.

Das im Vergleich zu 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin größere 1,7-Diaminoisochinolin zeigte in silico bessere strukturelle Eigenschaften für eine Komplexierung mit dem TAR Fragment. Dies ließ sich mit den beiden hier vorgestellten Modellen veranschaulichen. Die Aminogruppe an Position-6 ist zudem in der Lage, eine Bindung zu dem zweiten Phosphat P(22) auszubilden, so dass insgesamt vier Wasserstoffbrücken entstehen.

Diese berechneten Ergebnisse decken sich auch mit den relativ guten Resultaten aus dem Bindungsassay ($IC_{50} = 150 \mu M$).

Weiterhin wurden Verbindungen aus der Klasse der Imidazolyphenylguanidin Verbindungen **82** und **83** in die Kalkulationsreihe mit einbezogen. Im Vordergrund stand dabei eine Erklärung zu finden, warum bei der N-methylierten Spezies ein dramatisch schlechter IC_{50} -Wert gemessen wurde (pH = 6: $150 \mu M$ unsubstituiert; $1000 \mu M$ methyliert). Das vereinfachte Modell ohne die Interkalationsflächen scheint für die Simulation des Imidazolyphenylguanidinium ungeeignet zu sein, da die Sterik des Phenylbausteins nicht berücksichtigt wird. Dieses ragt allerdings stark aus der Ebene, die das G26 und das P(23) bilden, heraus und kann so in Wechselwirkung mit den coplanar liegenden Basen U23 und A22 treten.

Im detaillierteren Modell ausgehend von 1UUD erkennt man eine höhere Bindungsaffinität wenn der Torsionswinkel zwischen Imidazol und dem Phenylrest bei 145° und nicht bei 30° liegt. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Phosphat scheint bei einer größeren Distanz zum Guanidiniumrest einen höheren Energiebeitrag zu liefern (s. Abbildung 47). Diese Beobachtung könnte mitunter eine Erklärung dafür sein, dass die N-methylierte Spezies **83** schlechter bindet als die unsubstituierte Verbindung **82**, da nur die ungünstigere Konformation mit einem Torsionswinkel von 30° eine Wechselwirkung mit dem Phosphat ermöglicht. Allerdings ist die hier berechnete Energiedifferenz zwischen **82** und **83** von 6 kJ/mol nur marginal, sodass in der weiteren Abhandlung eine zweite Bindungsstelle oberhalb des Basentriplets für diesen Effekt in Betracht gezogen wurde (s. Abschnitt 7.6).



Abbildung 47: Ausschnitte aus den berechneten Komplexstrukturen aus 1UUD Ligand; Komplexierungsenergien berechnet mit HF 3-21G [SM8]; a) **82**: -110 kJ/mol (Im-Ar 30°); b) **82**: -122 kJ/mol (Im-Ar 145°); c) **83**: -116 kJ/mol (Im-Ar 30°).

Das 2,4,6-Triaminochinazolin **67** zeigt im Fluoreszenzassay eine dreifach höhere Bindungsaffinität (IC_{50} : $40 \mu M$) als das 1,7-Diaminoisochinolin. Trotz des höheren pKa-Wertes der Verbindung lässt sich diese Beobachtung nicht durch das hier verwendete Bindungsmodell erklären. Vielmehr fand man durch NMR Titrationsexperimente

(durchgeführt von J. Ferner) eine stärkere Bindungsstelle im loop-Bereich, an der ein langsamer Austausch mit dem Liganden zu beobachten war.

Das 6-Methylaminochinazolin-2,4-diamin **74** besitzt durch die stark basische Benzylamino-Gruppe eine hohe Hydratationsenergie (-808 kJ/mol) die den starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Phosphaten entgegensteht. Dennoch scheint diese Verbindung, auf Grund der höheren positiven Ladung, ein etwas besserer Bulgebinder zu sein als das 2,4,6-Triaminochinazolin, obwohl sie sich augenscheinlich nicht ganz so ideal in die Bindungstasche einlagern lässt wie Verbindungen mit der 1,7-Diaminoisochinolin Grundstruktur.

Betrachtet man das 6,8-Diaminophenanthridin **67** im Bulgebereich, ist mit einer sterischen Wechselwirkung mit C39 zu rechnen, was für eine optimale Einlagerung in die Bindungstasche hinderlich ist. Der im Fluoreszenzassay gemessene IC_{50} Wert von 15 μM kann vielmehr damit erklärt werden, dass es sich bei dieser Verbindung um einen starken Interkalator handelt, der sich unselektiv zwischen den Nukleinbasen einlagern kann, vergleichbar mit dem strukturell verwandten Ethidiumbromid. In einem Zellassay (C. Pannecouque) wurde eine hohe Toxizität von 1,5 $\mu g/ml$ gemessen. Somit ist das hier vorhandene aromatische Amin zusammen mit dem ausgedehnten planaren π -System eine ungeeignete Leitstruktur für einen selektiven RNA Liganden.

Um unselektive Interkalationen und die damit verbundene hohe Cytotoxizität zu reduzieren, wurde der Aminoaromat partiell hydriert, und so der polycyclische aromatische Charakter aufgehoben. Zudem erhält man auf diese Weise einen zweifach positiv geladenen Liganden, der sich ähnlich dem Bisargininbaustein aus 2KDO oder vergleichbar mit zwei untereinander verbundenen Guanidineinheiten (siehe Berechnung in Tabelle 2) in den Bulge einlagern kann.

Das Tetrahydrophenanthridindiamin rac-**64** zeigt im Fluoreszenzassay einen IC_{50} von 300 μM (pH = 7) und 150 μM (pH = 6) und im Zellassay (C. Pannecouque) einen EC_{50} von 2,6 $\mu g/ml$ (III_B). Allerdings ist immer noch eine hohe Cytotoxizität CC_{50} von 9,1 $\mu g/ml$ vorhanden. Betrachtet man die NMR Titrationsexperimente (B. K. Ackermann), die keine eindeutigen Signalverschiebungen im Bulge Bereich der TAR RNA zeigten und zudem die niedrigen berechneten Bindungsenergien, so geben diese Beobachtungen keine Anhaltspunkte für die im Fluoreszenzassay gemessene relativ hohe Bindungsaffinität, verglichen mit den Hexahydrophenanthridindiaminen rac-**65** und rac-**66**. Man muss wohl davon ausgehen, dass die Verbindung rac-**64** ebenfalls zur Interkalation neigt.

Bei der Herstellung von Hexahydrophenanthridindiamin erhielt man vier isomere Verbindungen (rac-**65** und rac-**66**), die nur schwache cytotoxische Eigenschaften

aufweisen ($CC_{50} = \sim 50 \mu\text{g/ml}$). Da man zunächst auf eine Racemattrennung verzichtete, untersuchte man im Fluoreszenz- sowie Zellassay jeweils das racemische Gemisch bei dem die Wasserstoffatome an Position 6a und 10a cis und trans Stellung aufweisen. Dabei konnte bei cis Stellung (rac-**66**, $IC_{50} = 500 \mu\text{M}$) eine doppelt so hohe Affinität gemessen werden als bei den trans Isomeren (rac-**65**, $IC_{50} = 1200 \mu\text{M}$). Die hier angefertigten Berechnungen zeigen ein vergleichbares Ergebnis. Die cis ständigen Enantiomere erzielten beide eine etwa doppelt so hohe Bindungsaffinität im Bezug auf Guanidin (1UUD; HF 3-21G [SM8]). Ohne die Berücksichtigung der sterischen Einflüsse, die von den beiden Interkalationsflächen A22 und U23 ausgehen (1ARJ; HF 3-21G [SM8]), fällt dieser Effekt nur gering aus.

7.5 Strukturbasierte Optimierung der Liganden (CG-Liganden)

Um die Selektivität der Liganden zu erhöhen, sind zusätzliche Wechselwirkungen mit der RNA notwendig. Es schien naheliegend, weitere Wasserstoffbrücken zu dem benachbarten Cytosin-39 aufzubauen. Auf diese Weise sollte eine künstliche GC selektive Hoogsteen Base entwickelt werden, die in der Lage, ist drei Bindungen zur RNA zu auszubilden.^[178]

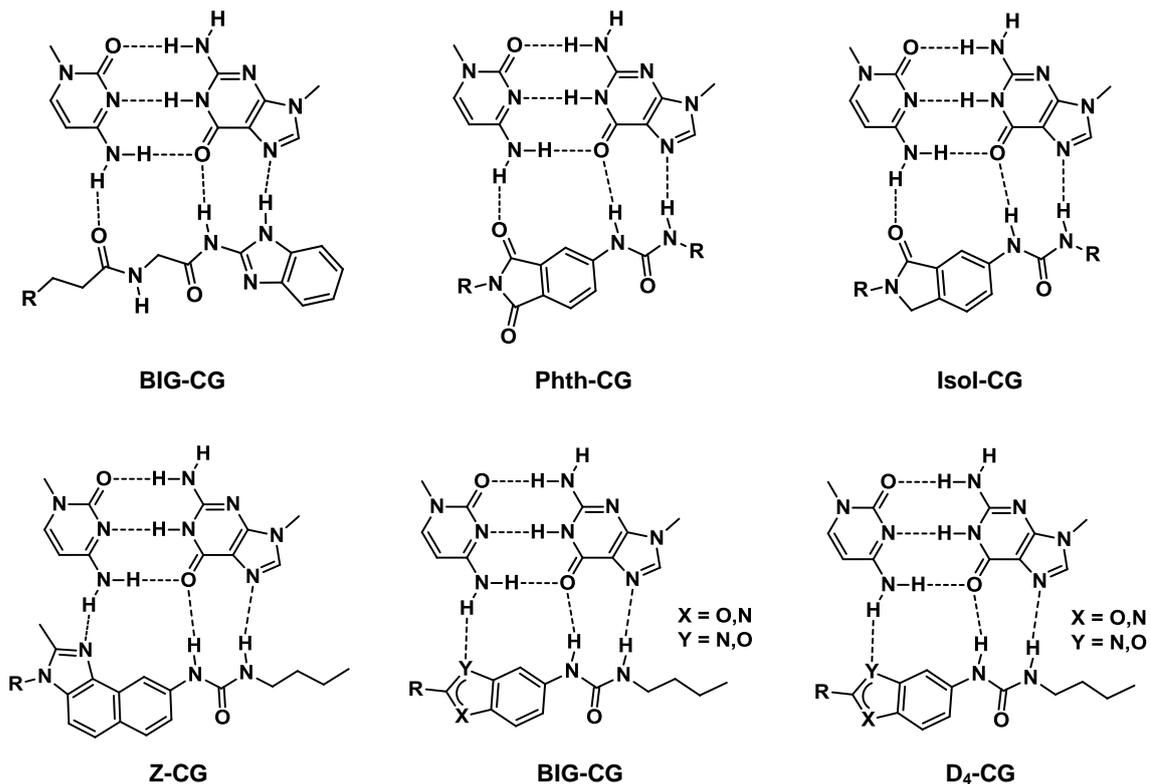


Abbildung 48: Literaturbekannte Konzepte für GC-Basenpaarererkennung.

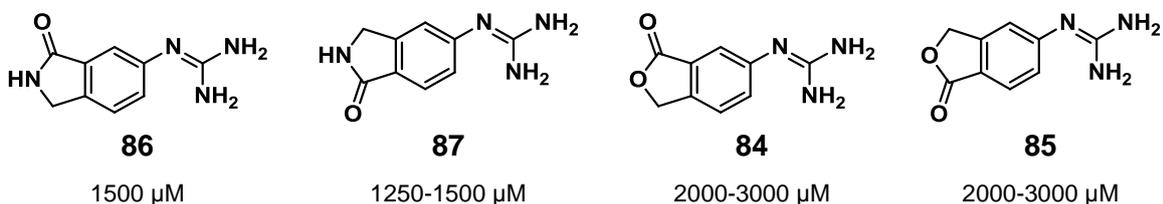
Ein Beispiel der Umsetzung dieser Strategie wurde von Sasaki et al. 1995 berichtet. Unter Einsatz einer neu synthetisierten Benzaminoimidazolglycyl- (BIG-CG) Nucleobase konnten die Autoren über 1D und 2D NMR Experimente nachweisen, dass diese modifizierte Spezies selektiv ein CG Basenpaar durch die Bildung drei Hoogsteen Wasserstoffbrücken erkennen kann.^[179] Weisz et al. entwickelten Phthalimidderivate (Phth-CG), die in NMR Experimenten, allerdings nur unter Verwendung von CD_2Cl_2 als Lösemittel, eine Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken zu einem CG Basenpaar zeigten.^[180, 181] Zimmerman et al. konnten mittels NMR Experimenten die Bildung eines Basentriplets aus Methylnaphthimidazol Harnstoff (Z-CG) und dem CG-Basenpaar nachweisen, doch auch hier bildete sich der Komplex nur in aprotischen Solventien wie CDCl_3 und die Verwendung als *triplex forming oligonucleotide* (TFO) führte zu keiner effektiven CG Erkennung.^[182] Eine Weiterentwicklung der Phthalimidderivate (Phth-CG)

wurde in der Gruppe von Zimmerman vorgenommen. Durch Entfernen einer nicht benötigten Carbonylgruppe gelangte man zu Isoindolin-1-on Harnstoffen (Isol-CG), die allerdings auch nur eine geringe Tendenz zur Bildung des Basentriplets aufweisen.^[183, 184] Im Jahre 2004 gelang es Weisz et al. ein Phenylimidazol Harnstoff (D₄-CG) zu entwickeln, der in der Lage ist CG Basenpaare zu erkennen und auch als TFO erfolgreich eingesetzt werden konnte.^[185, 186]

Ausgehend von diesen Forschungsergebnissen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit versucht, durch eine zusätzliche GC Erkennung die bisherigen Liganden zu erweitern, um so ihre Selektivität für den bulge Bereich der TAR RNA zu erhöhen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen, GC-Basenpaare erkennenden Harnstoff-haltigen Verbindungen, wurden entsprechende Guanidinderivate untersucht, da man davon ausging, dass ein Guanidiniumion im bulge Bereich bindet und das G26 mit zwei Wasserstoffbrücken adressiert.

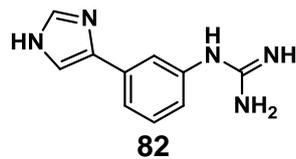
Zunächst wurden Guanidinoisindolin-1-on **86** und Guanidinoisobenzofuran-1(3H)-on **84** hergestellt und auf ihre Bindungsaffinitäten hin untersucht. Dabei wurde im FRET Assay eine um den Faktor 10 höhere Affinität bei 6-Guanidinoisobenzofuran-1(3H)-on und eine 13-fach höhere Affinität bei dem 6-Guanidinoisindolin-1-on Liganden, im Bezug zu Phenylguanidin, gemessen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Effekt tatsächlich um eine Adressierung des C39 handelt, wurden die isomeren Verbindungen **87** und **85** hergestellt, bei denen es konstitutionell bedingt nicht zu einer Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu G26 und gleichzeitig zu C39 kommen kann. Bei der Bestimmung der Bindungsaffinitäten, dieser Liganden, stellte man allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Isomeren fest. Die erhöhte Affinität, in Bezug auf Phenylguanidin, lässt sich vermutlich mit der größeren Interkalationsfläche der Liganden erklären.

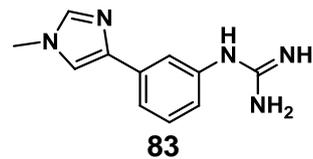


Ein weiterer guanidinhaltiger Ligand, der hinsichtlich einer GC-Basenpaarerkennung untersucht wurde ist das 3-Guanidinophenyl-1*H*-imidazol **82**. Auch hier konnte eine deutliche Zunahme der Bindungsaffinität in Vergleich zu Phenylguanidin gemessen werden (pH=7: Faktor 40). Substituiert man am Stickstoff des Imidazols mit einer Methylgruppe steigt der gemessene IC₅₀ Wert um das 4-fache an. Die zusätzliche CH₃ Gruppe sollte bei einer Anlagerung an das GC Basenpaar allerdings keinen

nennenswerten Einfluss auf die Bindungsenergie aufweisen, da dem Rest in der major groove der RNA genügend Raum zur Verfügung steht und somit keine sterischen Wechselwirkungen mit der Umgebung zu erwarten sind. Betrachtet man den Liganden bei pH=6, so kann man eine Affinitätssteigerung um das 3,3-fache bei 3-Guanidinophenyl-1*H*-imidazol beobachten. Dies spricht ebenfalls nicht für einen selektiven CG Liganden, da in protonierter Form das Imidazol nicht mehr als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren kann.



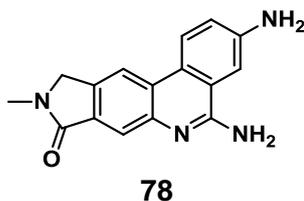
pH=7: 500 μ M, pH=6: 150 μ M



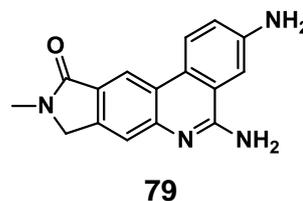
pH=7: 2000 μ M, pH=6: 1000 μ M

Die Annelierung eines Laktams an ein 6,8-Diaminophenantridin **63** führt ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung von um 50 % (**78** IC₅₀: 10 μ M). Allerdings zeigt die isomere Verbindung **79** im Negativkontrollexperiment auch hier wieder die gleiche Affinität. Wie bereits diskutiert, handelt es sich bei den Phenanthridinen vermutlich um unselektive Interkalatoren mit stark cytotoxischen Eigenschaften, die für den Einsatz im pharmazeutischen Bereich weniger geeignet scheinen.

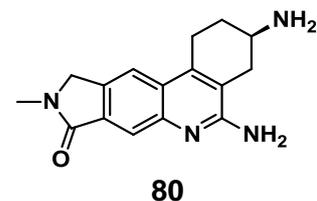
Das Tetrahydro-6,8-diaminophenantridinderivat *rac*-**80** erzielte eine 7-fach höhere Bindungsaffinität (IC₅₀: 45 μ M bei pH=7 und 20 μ M pH=6) als das Tetrahydro-6,8-diaminophenantridin *rac*-**64** (IC₅₀: 150 μ M bei pH=7 und 300 μ M pH=6). Auch zeigen NMR Titrationsexperimente einen intermediären Austausch des Liganden an G26. An anderen möglichen Bindungsstellen ist hingegen nur eine geringe Signalverschiebungen zu erkennen. Somit ist diese Verbindung der selektivste bulge Binder von den hier untersuchten Liganden.



10 μ M



10 μ M



pH=7: 45 μ M, pH=6: 20 μ M

Um diese Ergebnisse weitergehend zu interpretieren, wurden wie bereits beschrieben computergestützte Simulationen durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden die Strukturdaten der Bindungsumgebung aus den pdb-Strukturen 1ARJ und 1UUD herangezogen. In dem Modell, das auf den Daten aus 1ARJ beruht, wurden nur die Strukturelemente berücksichtigt, die entscheidend zu der Bindung im bulge Bereich beitragen. Dazu gehören die Basen G26 und C39 sowie ein Ausschnitt aus dem Phosphatrückgrat. Die spezifischen Elemente des zweiten Modells, welche für die

Wechselwirkung mit dem Ligand als signifikant erachtet wurden, sind zum einen das G26/C39 Basenpaar, die Interkalationsflächen A22 und U23 sowie das Phosphat P23, wobei die Strukturdaten dieser Elemente aus 1UUD stammen. Für diese Simulationen verwandte man den Basissatz (HF 3-21G) im Vakuum und in simuliert wässriger Umgebung.

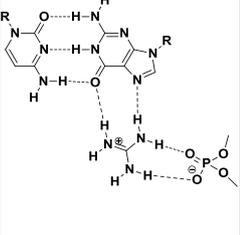
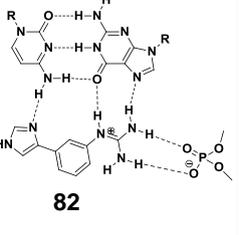
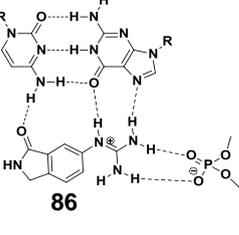
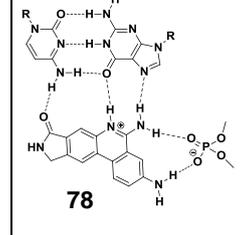
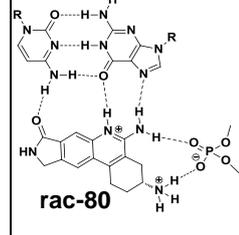
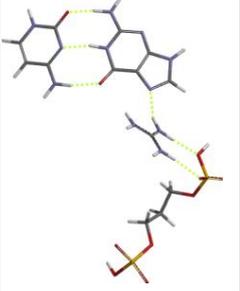
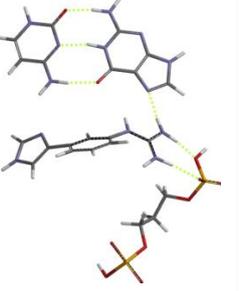
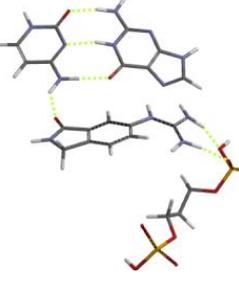
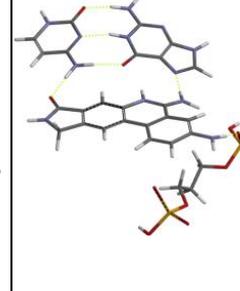
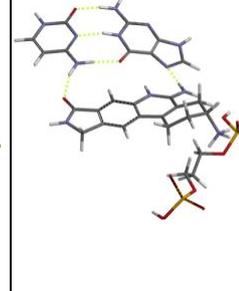
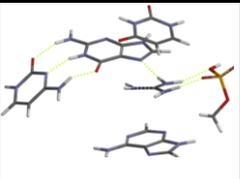
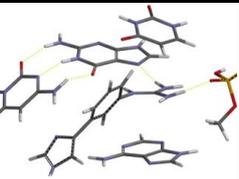
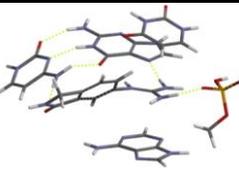
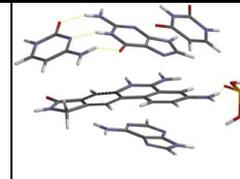
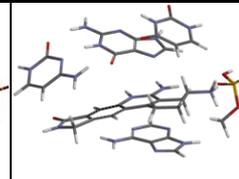
				
82	86	86	78	rac-80
				
HF 3-21G vacuum (1ARJ):^{a)} -735 kJ/mol	-685 kJ/mol (local. Minimum) -835 kJ/mol (glob. Minimum)	-732 kJ/mol (local. Minimum) -731 kJ/mol (glob. Minimum)	-835 kJ/mol	-1464 kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{b)} -90 kJ/mol	-55 kJ/mol (local. Minimum) -110 kJ/mol (glob. Minimum)	-61 kJ/mol (local. Minimum) -71 kJ/mol (glob. Minimum)	-158 kJ/mol	-106 kJ/mol
[A]:^{c)} 3,52; 2,06; 1,93; 2,08	2,73; 3,29; 2,08; 1,64; 1,94	2,06; 3,38; 2,23; 1,69; 1,76	1,78; 2,48; 2,00; 2,26; 1,70	1,97; 2,65; 2,02; 2,15; 1,40
				
HF 3-21G vacuum (1UUD):^{a)} -543 kJ/mol	-538 kJ/mol $\Delta E = +5$ kJ/mol	-563 kJ/mol $\Delta E = -20$ kJ/mol	-519 kJ/mol $\Delta E = +24$ kJ/mol	-872 kJ/mol $\Delta E = -329$ kJ/mol
HF 3-21G water [SM8]:^{b)} -79 kJ/mol	-95 kJ/mol $\Delta E = -16$ kJ/mol	-103 kJ/mol $\Delta E = -24$ kJ/mol	-97 kJ/mol $\Delta E = -18$ kJ/mol	-77 kJ/mol $\Delta E = +2$ kJ/mol
H-Brücken [A]:^{c)} 2,42; 2,07; 2,06; 1,70	2,32; 2,43; 2,05; 2,18; 1,77	1,98; 2,44; 2,00; 2,17; 1,73	2,96; 2,39; 2,38; 3,37; 1,64	2,82; 2,61; 2,56; 3,42; 1,22
IC₅₀: >20000 μ M	500 μ M (pH=7)	1500 μ M	10 μ M (pH=7)	45 μ M (pH=7); 20 μ M (pH=6)
E_{Solv} Ligand [SM8]:^{d)} -286 kJ/mol	-720 kJ/mol	-282 kJ/mol	-259 kJ/mol	-833 kJ/mol

Tabelle 3: Ergebnisse der computergestützten Berechnung der Bindungsenergie von Komplexen aus Ligand und TAR Fragment aus dem bulge Bereich. Modell aus 1ARJ: (G26, C39 und P22); Modell aus 1UUD: (G26, C39, A22, U23 und P22).^[177] Berechnete H-Brückenlängen entsprechen den gestrichelten Bindungen im Formelbild, angegeben von links nach rechts. IC₅₀ Werte aus dem FRET Assay. a) Komplexierungsenergie im Vakuum: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; b) Komplexierungsenergie in Wasser: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; c) Berechnete H-Brückenlängen entsprechen den gestrichelten Bindungen im Formelbild, angegeben von links nach rechts. IC₅₀ Werte aus dem FRET Assay; d) Berechnete Solvatationsenergie des Liganden mit der in HF 3-21G implementierten [SM8]-Methode.

Anhand der der angefertigten Berechnungen konnte gezeigt werden, dass die Versuche, C39 mit den guanidinhaltigen Liganden **86** und **82** über eine Wasserstoffbrücke zu adressieren, kritisch betrachtet werden müssen.

Im Falle des Imidazolylphenylguanidins **82** ist die freiwerdende Bindungsenergie im Vakuum (HF 3-21G) geringer als die des Guanidins, was durch ungünstige sterische Interaktionen mit der RNA zu erklären ist. Nur unter Berücksichtigung der Hydratationsenergie [SM8] kann eine Freisetzung der Bindungsenergie von -16 kJ/mol berechnet werden. Somit ist anzunehmen, dass der Imidazolrest des Imidazolylphenylguanidin sich eher an ein benachbartes Phosphat koordiniert ($\Delta E_{\text{Ligand-Guanidin}} = -43$ kJ/mol; HF 3-21G [SM8]; Struktur aus 1UUD) oder sogar an einer anderen Stelle bindet (s. Kapitel 7.6). Anhand des 1ARJ-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass im globalen Minimum der Imidazolrest auch im nicht-protonierten Zustand an das P22 koordiniert und so in der Lage ist, eine Wasserstoffbrücke über das NH zu dem Phosphatsauerstoff auszubilden (Abbildung 49).

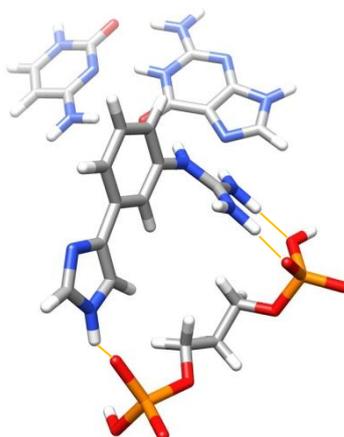


Abbildung 49: Globales Minimum der einfach positiv geladenen Spezies **82**.

Betrachtet man die Ergebnisse der Berechnungen des Komplexes aus dem TAR Fragment und 6-Guanidinoisoindolinon **86** unter Verwendung der Strukturdaten aus 1UUD, so beobachtete man etwas bessere Ergebnisse, mit einem Energiezugewinn von ca. 24 kJ/mol (HF 3-21G [SM8]) im Vergleich zu einem Guanidin. Durch sterische Interaktionen ist der Arylrest um 45° zu der π -Ebene des Guanidins verdreht, so dass die Carbonylgruppe in einem ungünstigen Winkel zu der Aminogruppe des C39 steht und nur eine schwache Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet wird. Verwendet man für die Kalkulationen die Strukturdaten aus 1ARJ an, dann beobachtet man bei einer Anordnung des Liganden parallel zu dem GC Basenpaar (lokales Minimum) sogar eine niedrigere Bindungsenergie im Vergleich mit einem Guanidin, da sich die Guanidingruppe nicht optimal in der Bindungstasche zwischen G26 und P23 einlagern kann. Im globalen

Minimum ragt der Arylrest der Liganden senkrecht aus der Basenebene heraus. Dies würde zu starken sterischen Wechselwirkungen mit der darüber liegenden Nukleinbase U23 führen, so dass diese Konformation nicht weiter berücksichtigt wurde.

Das planare 6,8-Diaminophenanthridinderivat **78** lässt sich nicht optimal in die Bindungstasche aus 1UUD einpassen, so dass die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu C39 nicht beobachtet werden kann. Versucht man, den Liganden parallel zu dem Basenpaar anzuordnen, so kommt es zu starken Wechselwirkungen der Aminogruppe mit dem Phosphat (s. Abbildung 50).

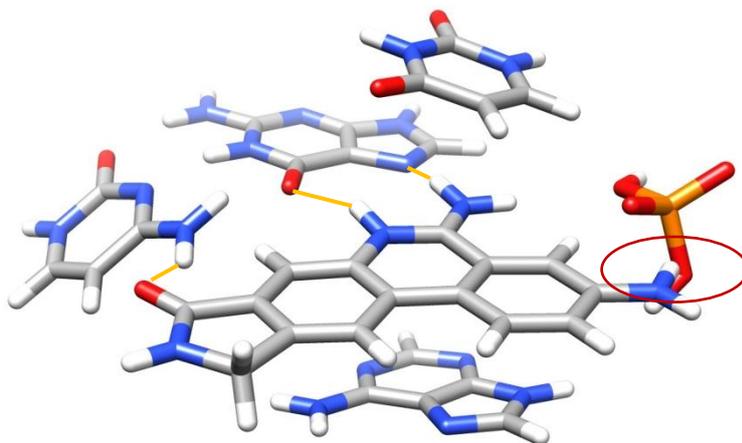


Abbildung 50: Kollision des Liganden **78** mit dem Phosphatrückgrat bei Verwendung des Modells auf Grundlage von 1UUD.

Zu beachten ist, dass der Abstand zwischen dem Phosphat P23 und der Base G26 im dem Modell ausgehend von den Strukturdaten aus 1ARJ größer ist als bei dem Modell aus 1UUD. Da die RNA in diesem Bereich allerdings relativ flexibel ist, eignet sich daher vermutlich das Modell, das auf Strukturdaten von 1ARJ beruht, eher für Berechnungen mit den raumerfüllenden 6,8-Diaminophenanthrederivaten **78** und **rac-80**.

unter Verwendung der Strukturdaten aus 1ARJ ergibt sich somit eine Bindungsenergie von -835 kJ/mol (Vakuum) und -158 kJ/mol (Wasser) für Verbindung **78**. Vergleicht man diese Werte mit dem unsubstituierten 6,8-Diaminophenanthren **63**, so kann man einen Energiegewinn von 86 kJ/mol (-749 kJ/mol Bindungsenergie) im Vakuum und 45 kJ/mol (-113 kJ/mol Bindungsenergie) in Wasser beobachten. Eine Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu C39 ist bei dieser Betrachtung plausibel.

Die zu **78** isomere Verbindung **79** zeigte, wie bereits erwähnt, im Fluoreszenzassay keine signifikante Differenz in ihrer Bindungsaffinität. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hiermit um deutlich stärkere Interkalatoren als bulge Binder handelt.

Bei der Simulation des Komplexes aus Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridinderivat **rac-80** und dem RNA Fragment erscheint auch hier das Modell mit den Strukturdaten aus 1UUD ungeeignet zu sein. Wendet man hingegen das Bindungsmodell ausgehend von den 1ARJ Daten an, so kann man beobachten, dass der Ligand in der Lage ist, drei Wasserstoffbrücken zu dem CG Basenpaar aufzubauen. Die Bindungsenergie liegt bei -1464 kJ/mol im Vakuum und -106 kJ/mol in Wasser. Damit ist sie um 50 kJ/mol (Vakuum) bzw. 18 kJ/mol (Wasser) höher als bei Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin **rac-64**.

Im Vergleich zu dem 6,8-Diaminophenanthridinderivat **79** konnte im Vakuum eine um 629 kJ/mol höhere Bindungsenergie berechnet werden. Ursache hierfür ist die starke elektrostatische Anziehung zwischen dem Amin und dem Phosphat. Durch die hohe Hydratationsenergie von -833 kJ/mol [SM8] des Liganden **rac-80** ergibt sich in einer wässrigen Umgebung eine um 52 kJ/mol niedrigere Bindungsenergie als bei **79**.

Um die Hydratationsenergie des Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridinlaktams **rac-80** zu senken und damit die Bindungsenergie zu erhöhen, wäre eine Methylierung des Alkylamins denkbar. Dabei ist zu beobachten, dass bei Zunahme der Substituenten am Stickstoff die Bindungsstärke im Vakuum abnimmt, aber gleichzeitig auch die Hydratationsenergie des Liganden geringer wird. Im Fall der einfach methylierten Spezies erhält man somit ein Maximum der Bindungsenergie von -135 kJ/mol im wässrigen Medium.

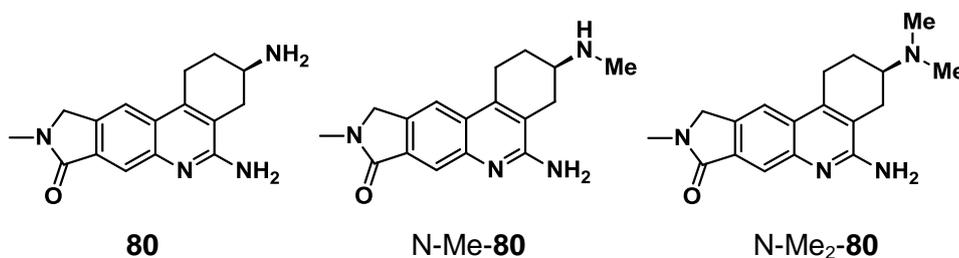


Tabelle 4: Berechnete Bindungsenergien des N-methylierten Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridinlaktams. (HF 3-21G water [SM8]; Bindungsmodell aus 1ARJ).^[177] a) Komplexierungsenergie im Vakuum; b) Solvationsenergie berechnet mit [SM8]; c) Komplexierungsenergie unter Berücksichtigung der Solvatisierung.

Verbindung	$E_{\text{Komplex}} (\text{vacuum})^{\text{a)}}$	$E_{\text{Solv}} [\text{SM8}]^{\text{b)}}$	$E_{\text{Komplex}} [\text{SM8}]^{\text{c)}}$
80	-1464 kJ/mol	-106 kJ/mol	-833 kJ/mol
N-Me-80	-1440 kJ/mol	-135 kJ/mol	-772 kJ/mol
N-Me₂-80	-1407 kJ/mol	-109 kJ/mol	-739 kJ/mol

7.6 Erweitertes Bindungsmodell (elektrostatische hotspots)

Betrachtet man die Komplexstrukturen von TAR mit den cyclischen Peptiden 2KDQ und 2KX5 (Robinson, Varani), so fällt auf, dass oberhalb des Basentriplets eine zweite Bindungsstelle für positiv geladene funktionelle Gruppen zu finden ist. In räumlicher Nähe zu G28 komplexiert jeweils die Guanidiniumgruppe eines Argininrestes, und an den Phosphaten P27 und P28 werden Ammoniumgruppen der Lysineinheiten eingelagert.

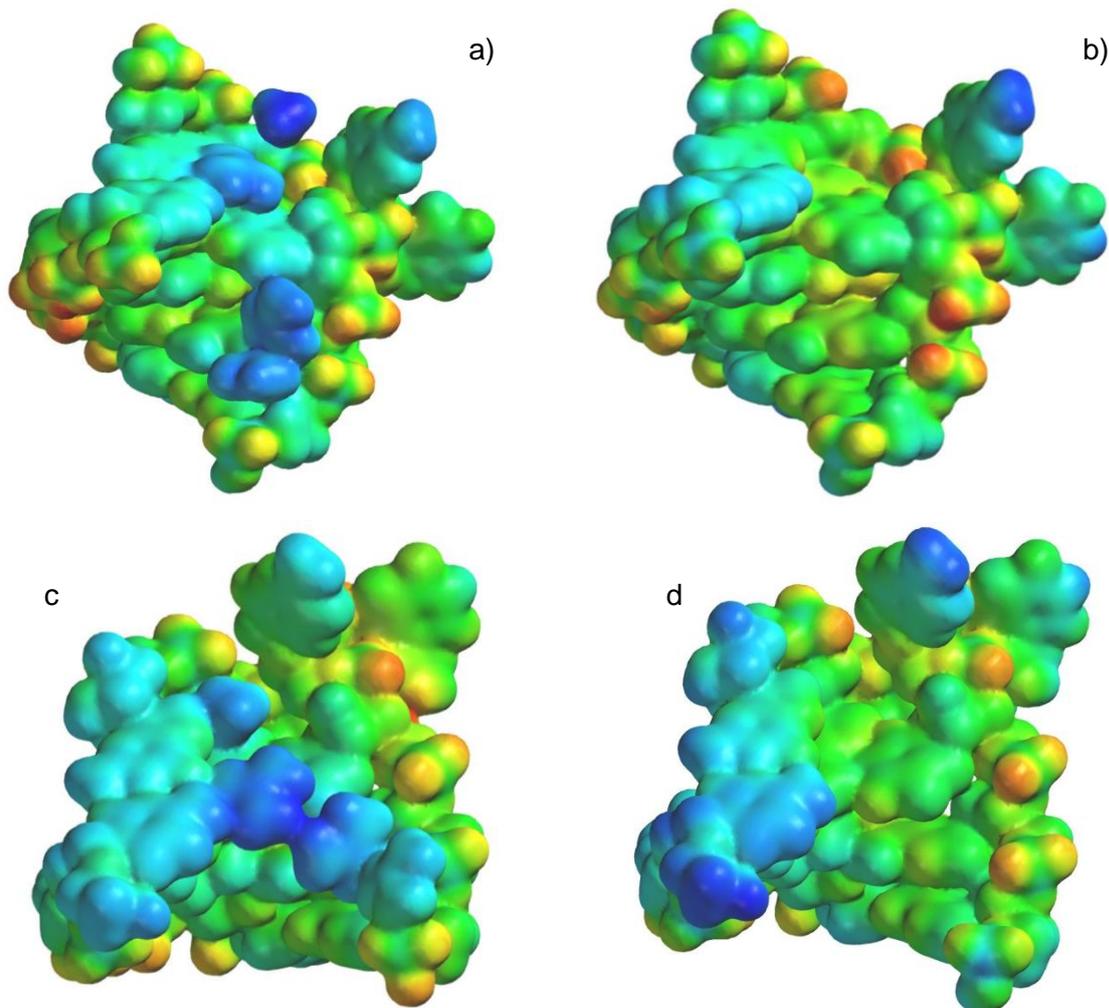


Abbildung 51: Ladungsdichte (potential density) im bulge-Bereich. Berechnet mit AM1 unter Verwendung der graphischen Oberfläche von Spartan 08. Positiv geladene Bereiche: blau, negativ geladene Bereiche rot; a) 2KDQ mit Guanidin und Aminogruppen der basischen Aminosäuren; b) 2KDQ ohne Ligand; c) 2KX5 mit Guanidin und Aminogruppen der basischen Aminosäuren; d) 2KX5 ohne Ligand.

Wie im Kapitel 3.4 bereits beschrieben, dient der bulge Bereich der TAR RNA als Anker für die argininreiche Region des Tat Proteins. Es ist anzunehmen, dass im Komplex aus Tat und TAR eine Guanidingruppe in der Region um G26 eingebaut wird und weitere kationische Aminosäurereste, oberhalb des Basentriplets aus U23, A27 und U38, in den zweiten negativ geladenen Bereich binden.

Diese beiden Bindungstaschen mit stark elektronegativem Potential unterhalb und oberhalb von U23, auch als „Elektrostatische hotspots“ bezeichnet^[87], waren Ausgangspunkt für das strukturbasierte Design der potenten Inhibitoren RBT203 (1UUD) und RBT158 (1UUI). Hier lagert sich ein Guanidin bzw. Amidin in die G26 Bindungstasche ein, das zu einer Konformationsänderung und zu der damit verbundenen Ausbildung des Basentriplets führt. Das zweite positiv geladene Guanidinium bindet im Fall von RBT203 in der Nähe von G28 und der Ammoniumrest bei RBT158 am Phosphatrückgrat. Durch diesen Klammereffekt lässt sich die hohe Stabilität dieser Komplexe erklären.

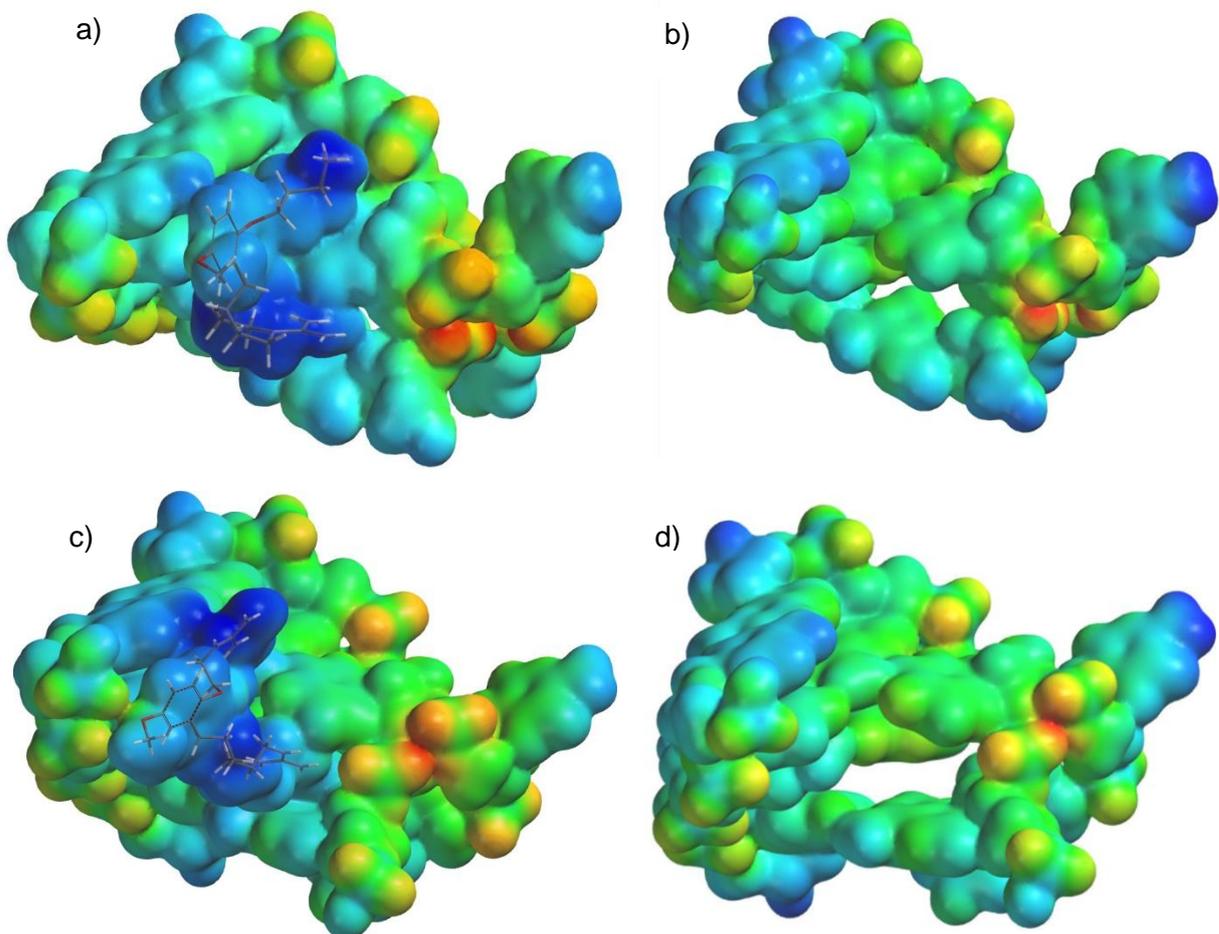


Abbildung 52: Ladungsdichte (potential density) im bulge Bereich. Berechnet mit AM1 unter Verwendung der graphischen Oberfläche von Spartan 08. Positiv geladene Bereiche: blau, negativ geladene Bereiche rot; a) Komplex mit Ligand (1UUI); b) Komplex ohne Ligand (1UUI); c) Komplex mit Ligand (1UUD); d) Komplex ohne Ligand (1UUD).

Überlagert man die Strukturen aus 2KDQ, 2KX5, 1UUI, 1UUD dieser zweiten Bindungsstelle, so erkennt man eine strukturelle Übereinstimmung. Die annähernd gleichbleibende konformelle Beschaffenheit dieser TAR Region ist Voraussetzung für computergestützte Simulationen von Komplexen mit den hier untersuchten Liganden.

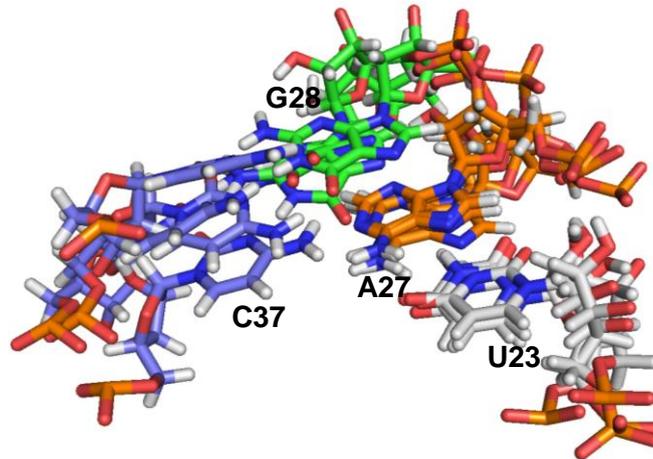


Abbildung 53: Überlagerung des TAR Bereichs G28,C37, A27 und U23 von 2KDQ, 2KX5, 1UUI und 1UUD.

7.7 Modeling der G28-Bindungsstelle

Durch NMR Titrationsexperimente konnten Liganden ausgemacht werden, die eine Verschiebung der Iminoprotonen an U38 sowie an G28 und G36 verursachen. Dazu gehören die zweifach positiv geladenen Liganden, wie das Imidazolylphenylguanidin aber auch das 2,4,6-Triaminochinazolin, welches bei pH=7 nur zur Hälfte im protonierten Zustand vorliegt. Um die spezifischen Bindungsmodi dieser Verbindungen mit der RNA besser zu verstehen, berechnete man die Komplexierungsenergie mit der RNA Region oberhalb des Basentriplets. Dazu wurden für zweifach geladene Liganden die RNA Daten aus 2KX5 herangezogen, da bei dieser Komplexstruktur der elektrostatische hotspot durch ein Arginin und ein Lysin optimal adressiert wird und somit der Einsatz dieser Bindungstasche geeignet schien.

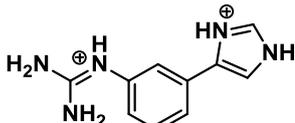
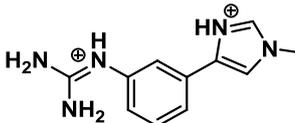
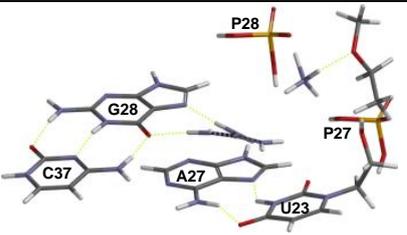
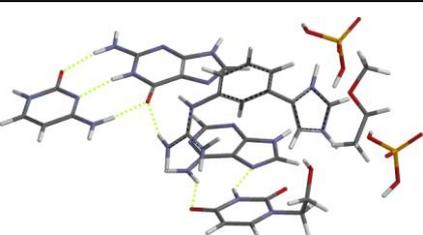
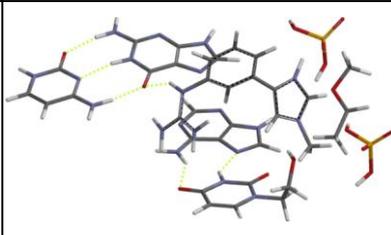
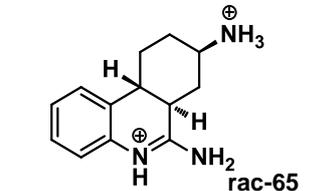
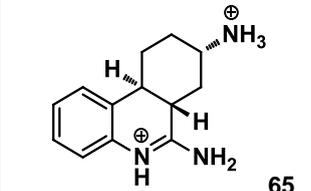
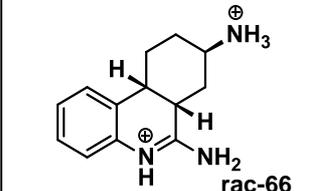
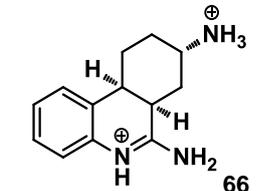
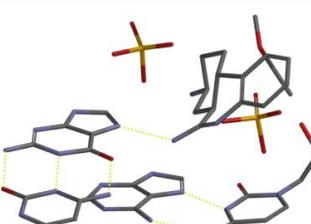
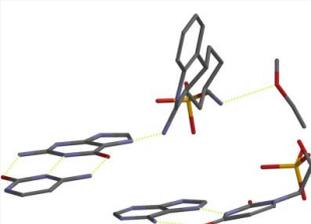
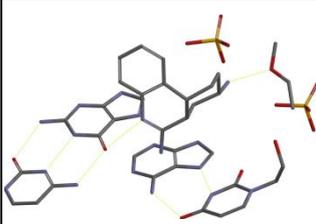
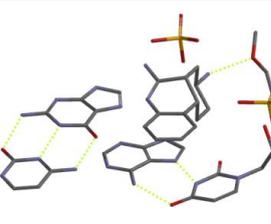
Guanidinium + Ammonium	 82	 83	
			
HF 3-21G vakuum (2KX5): ^{a)} -1346 kJ/mol	-1268 kJ/mol	-1129 kJ/mol	
HF 3-21G [SM8] (2KX5): ^{b)} -72 kJ/mol	-52 kJ/mol	-28 kJ/mol	
 rac-65	 65	 rac-66	 66
			
HF 3-21G vakuum (2KX5): ^{a)} -1357 kJ/mol	-1355 kJ/mol	-1388 kJ/mol	-1374 kJ/mol
HF 3-21G [SM8] (2KX5): ^{b)} 40 kJ/mol	-10 kJ/mol	-54 kJ/mol	-43 kJ/mol

Abbildung 54: Ergebnisse der computergestützten Berechnung der Bindungsenergie von Komplexen aus Ligand und TAR Fragment oberhalb des bulge Bereichs. Modell aus 2KX5: (C37, G28, A27, U23, P27 und P28).^[177] a) Komplexierungsenergie im Vakuum: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; b) Komplexierungsenergie in Wasser: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; c) IC_{50} Werte aus dem FRET Assay.

Bei den angefertigten Berechnungen ist zu erkennen, dass der elektrostatische hotspot in der Nähe von G28 ebenfalls eine attraktive Bindungsstelle für positiv geladene Liganden darstellt. Es ist somit anzunehmen, dass diese Bindungsstelle vermutlich simultan zu der Bindungstasche bei G26 besetzt wird, unter Ausbildung von 2:1 Komplexen.

Legt man ein Guanidinium- zusammen mit einem Ammoniumion in diese Bindungstasche, ähnlich wie das cyclische Peptid KP-Z-41 diesen Bereich mit einer Arginin- und Lysineinheit adressiert, so stimmt das errechnete Bindungsmuster mit den Strukturdaten aus 2KX5 überein. Man beobachtet eine Anlagerung des Guanidins an G28 über zwei Wasserstoffbrücken, und das Ammoniumion ist in der Nähe des elektronegativen Phosphatrückgrats positioniert.

Bei der 1D-NMR Titration mit Imidazolylphenylguanidin **82** konnte neben einer Verschiebung der G26 Iminoprotonen, ein intermediärer Austausch des Liganden bei U38 beobachtet werden. Es scheint somit, dass beide elektrostatische hotspots adressiert werden. Die berechnete Bindungsenergie ist im Vakuum mit -1268 kJ/mol um 100 kJ/mol und in solvatisierter Form mit -52 kJ/mol um 70 kJ/mol geringer als komplexiert in der Bindungstasche bei G26 (Strukturdaten aus 1UUD). Durch N-Methylierung der Imidazoliumgruppe kommt es zu sterischen Wechselwirkungen mit dem Phosphat P27, sodass die Bindungsenergie deutlich abnimmt (**82**: -52 kJ/mol, **83**: -28 kJ/mol; HF 3-21G [SM8]). Dies wäre eine Erklärung für die Ergebnisse des Fluoreszenzassays, bei dem der IC₅₀ Wert von 150 µM bei **82** auf 1000 µM bei N-methylierten Spezies **83** ansteigt.

Betrachtet man die berechneten Komplexe mit den vier isomeren Hexahydrophenanthridinen **65** und **66**, so erkennt man ähnliches Bindungsmuster, wie es bei der Adressierung durch ein Guanidinium- zusammen mit einer Ammoniumeinheit in diesem Bereich auftritt: Die Amidgruppe ist im konformationellen Minimum bei G28 positioniert und das Cyclohexylammoniumion koordiniert an das Phosphatrückgrat. Energetisch sind die Komplexe der cis (Wasser: ~50 kJ/mol) und der trans Isomere (Wasser: 25 kJ/mol) vergleichbar mit den Bindungsenergien, die in der Bindungstasche bei G26 errechnet wurden. Somit ist eine Bindung der Hexahydrophenanthridinen an beiden elektrostatischen hotspots der TAR RNA zu vermuten. Auch hier zeigt sich, dass das cis Isomer eine höhere Bindungsenergie als das trans Isomer aufweist. Dies lässt sich mit einer geringeren sterischen Repulsionen des Aromaten mit der RNA erklären.

Im *stem* Bereich unterhalb des *loops* beobachtete man in NMR Experimenten eine starke Wechselwirkung mit 2,4,6-Triaminochinazolin **67**. Man vermutete, dass dies durch eine Bindung in der Region von G28 hervorgerufen wird, so dass auch die Ausbildung eines derartigen Komplexes mittels der hier aufgezeigten *modeling* Methoden untersucht wurde. Das 2,4,6-Triaminochinazolin liegt unter physiologischen Bedingungen nur zu einem Teil einfach protoniert vor. Somit ist vermutlich das Modell, das aus Strukturdaten zweifach geladener Liganden stammt (2KX5), nicht ideal für Berechnungen von Komplexen mit diesem Heteroaromaten geeignet, da aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung hochgeladener Liganden eine starke Kontraktion der Bindungstasche auftritt. Das Triaminochinazolin, welches eine coplanare Anordnung oberhalb der Base U23 annehmen sollte, scheint sich besser in die räumlich etwas größere Bindungstasche, welche aus den Strukturdaten von 1UUD entnommenen wurde, einlagern zu können.

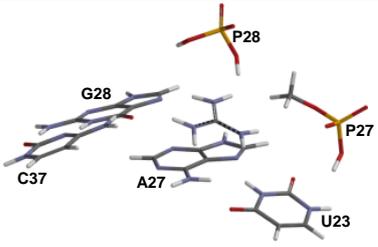
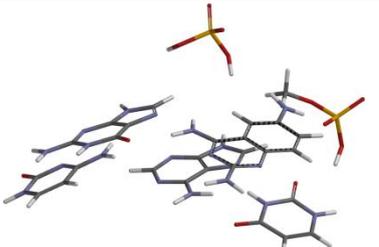
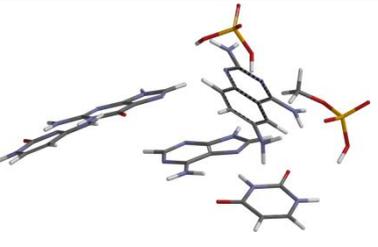
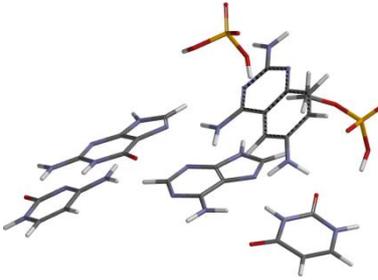
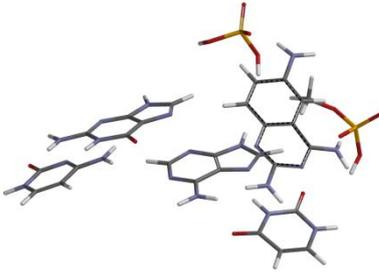
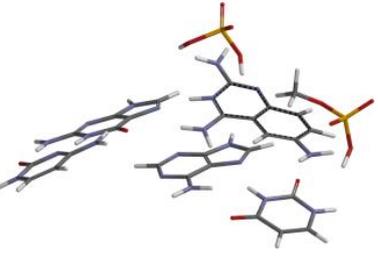
Guanidin	67-(a)	67-(b)
		
HF 3-21G vakuum (1UUD): ³⁾ -579 kJ/mol	-162 kJ/mol	-138 kJ/mol
HF 3-21G [SM8] (1UUD): ³⁾ -65 kJ/mol	-56 kJ/mol	-19 kJ/mol
67-(c)	67-(d)	67+H ⁺
		
HF 3-21G vakuum (1UUD): ³⁾ -104 kJ/mol	-208 kJ/mol	-694 kJ/mol
HF 3-21G [SM8] (1UUD): ³⁾ -30 kJ/mol	-65 kJ/mol	-71 kJ/mol

Abbildung 55: Ergebnisse der computergestützten Berechnung der Bindungsenergie von Komplexen aus Ligand und TAR Fragment oberhalb des bulge Bereichs. Modell aus 1UUD: (C37, G28, A27, U23, P27 und P28),^[177] a) Komplexierungsenergie im Vakuum: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; b) Komplexierungsenergie in Wasser: $E_{\text{Ligand}} + E_{\text{RNA}} - E_{\text{Ligand-RNA}}$; c) IC_{50} Werte aus dem FRET Assay.

Das Triaminochinazolin **67** wurde in vier unterschiedlichen Posen in die Bindungstasche gelegt und die lokalen Minima berechnet. Dabei waren die Komplexe, bei denen die N⁶-Aminogruppen in räumlicher Nähe zu den Phosphaten P27 und P28 positioniert vorliegen, energetisch begünstigt. Der neutrale Ligand erreichte im globalen Minimum **67-(d)** eine Bindungsenergie von -65 kJ/mol (Wasser) und ist somit vergleichbar mit einem positiv geladenen Guanidiniumion. Im protonierten Zustand **67+H⁺** konnte mit -71 kJ/mol (Wasser) nur eine marginale Steigerung der Komplexierungsenergie berechnet werden.

Da der Basissatz HF 3-31G aufgrund des fehlenden Dispersions Term keine π - π stacking Wechselwirkungen berücksichtigt, eignet sich diese Methode nur bedingt zur Berechnung der Bindungsverhältnisse zwischen der Bindungstasche im Bereich von G28 und Triaminochinazolin, da sich dieses mit seinem π -System oberhalb der Nukleinbase U23 anlagern könnte. Zudem spielt der hydrophobe Effekt bei Komplexen mit aromatischen Verbindungen eine wichtige Rolle, der allerdings nur schwer simulierbar ist. Die so

berechneten Bindungsenergie von lediglich -65 kJ/mol (Wasser) im basischen und -71 kJ/mol (Wasser) im protonierten Zustand geben keine Erklärung für die hohe Stabilität des Komplexes mit TAR, die bei NMR Experimenten beobachtet wurde.

Da bei **67** im Vergleich zu Imidazolylphenylguanidin **82** ein anderes Verschiebungsmuster im NMR Spektrum beobachtet wurde, scheint eine Interkalation von **67** zwischen den Basenpaaren G28/C37 und C29/G36 eine weitere mögliche Alternative. Auf gleiche Weise ist eine Stapelung von Triaminochinazolin an der Bindungsstelle denkbar, die im stem Bereich der TAR RNA zu finden ist. Zumal hier ebenfalls ein langsamer Austausch der Iminiumprotonen der benachbarten Basenpaaren A20/U42 und G21/C41 zu beobachten ist.

Durch Einführung von Methylgruppen an Position N^2 und N^4 konnte gezeigt werden, dass eine planare Konformation an den Aminogruppen zu einer erhöhten Affinität führt. Insbesondere kommt es bei Mehrfachmethylierung der N^4 -Aminogruppe zu sterischen Wechselwirkungen mit dem Wasserstoffatom an Position-5. Dadurch ragen die Alkylreste aus der Ebene des aromatischen Systems heraus und verhindern auf diese Weise eine Interkalation zwischen Nukleobasen. Diese Beobachtungen können daher ein weiteres Indiz für eine Stapelwechselwirkung des Triaminochinazolins mit der RNA sein. Um die exakten Bindungsmodi dieses Liganden zu bestimmen, wäre es von besonderem Interesse mittels kristallographischer Methoden oder NMR Experimenten die räumliche Struktur dieses Komplexes aufzuklären.

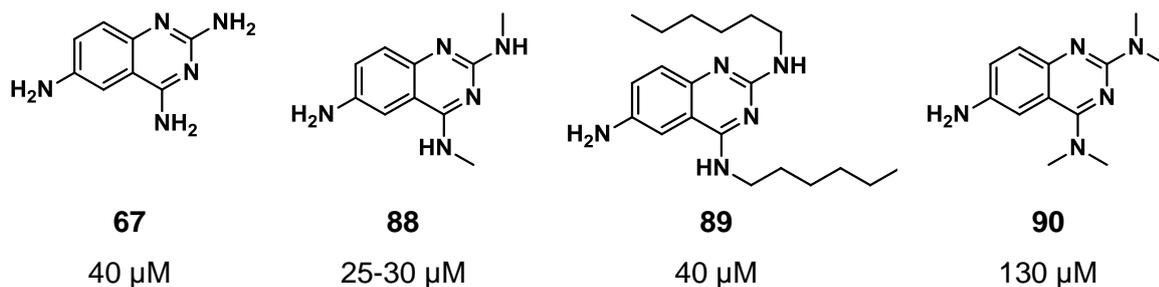


Abbildung 56: IC₅₀-Werte von N^2/N^4 -substituierten 2,4,6-Triaminochinazolinen. Hergestellt im Rahmen von Bachelorarbeiten von C. K. Pau, V. Ertel.

7.8 Kombination von Liganden mit unterschiedlichen Bindungsstellen

Eine weitere Möglichkeit, die Affinität sowie die Selektivität eines Liganden zu steigern, kann durch simultane Adressierung unterschiedlicher Bindungsstellen erreicht werden. Durch kooperative Effekte potenziert sich dadurch die Bindungsstärke eines multivalenten Liganden gegenüber seinen monomeren Untereinheiten.

Dieses Konzept wurde bereits von verschiedenen Forschergruppen für TAR Liganden aufgegriffen, wodurch die zurzeit besten Tat Antagonisten hervorgingen. Dazu zählen die Liganden, die von Aboul-ela in Kooperation mit RiboTargets entwickelt wurden^[87, 146], die von Arya et al. hergestellten Neomycindimere^[187] sowie die von Varani et al. untersuchten bifunktionellen, wirkstoffähnlichen Fragmente^[151]. Auch mit den von Ming Yang entwickelten Purin-Guanidin Konjugaten^[154] wurde das Konzept der bifunktionellen Liganden erfolgreich weitergeführt (siehe Kapitel 4.5).

In der Gruppe von M. Göbel ist man daran interessiert kleine TAR spezifische Moleküle zu entwickeln, mit möglichst klar definierten Bindungsstellen, die vor allem über spektroskopische sowie biophysikalische Methoden (NMR, in-line probing, SHAPE, Affinitätsspaltung) ermittelt werden. Da das 2,4,6-Triaminochinazolin **67** als einzige der hier untersuchten Substanzen im NMR Experiment einen langsamen Austausch zugleich an zwei Bindungsstellen, unter Bildung eines 2:1 Komplexes, vorweisen kann, stellte man zunächst dimere Verbindung mit diesen monomeren Einheiten her.

Obwohl NMR Titrations mit Verbindung **67** für Interaktionen im Bereich von G26 und G28 sprechen, ist der genaue Bindungsort nicht sicher bekannt. Ligandbindung an TAR wurde sowohl für den loop als auch für die Umgebung von G26 und G28 beschrieben. Aber auch im unteren stem Bereich wurde eine Veränderung der chemischen Umgebung beobachtet. Sollte Verbindung **67** sowohl im stem als auch im loop Bereich binden, müsste der Linker eine Distanz von 15 - 20 Å überbrücken. Lagen die Bindungsstellen bei G26 und im loop wäre bereits eine kürzere Kette ausreichend. Sollte hingegen **67** bei G26 und G28 binden, müsste man optimale Bindung bei kurzen Linkern (6 - 8 Å) erwarten.

N⁶-Benzyl- sowie N⁶-Dimethyl Derivatisierungen des 2,4,6-Triminochinazolins ergaben keinen signifikanten Affinitätsverlust im Fluoreszenzassay, und die Substitution an Position 6 erschien über reduktive Aminierung als präparativ unproblematisch, so dass drei dieser Dimere mit Linkerlängen im Bereich von 7 Å - 16,5 Å synthetisiert wurden.

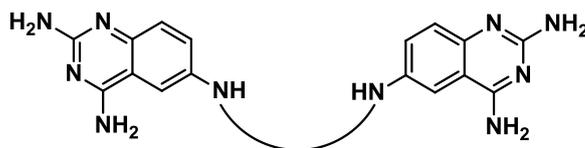


Abbildung 57: N⁶-verknüpfte Triaminochinazolindimere.

Tabelle 5: IC₅₀-Werte dimerer Triaminochinazolinderivate bei unterschiedlichen Linkerlängen.

Linker	Linkerlänge	IC ₅₀ -Wert	CC ₅₀
	~7 Å	150 nM	2.0 µg/ml
	~11,5 Å	750 nM	23.8 µg/ml
	~11,6 - 16,5 Å	1,5 µM	8.6 µg/ml

Das bereits früher als TAR Ligand beschriebene N⁶,N^{6'}-(1,4-phenylenbis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin)^[112] zeigte in dieser Versuchsreihe die höchste Affinität. Im Vergleich zu dem monomeren Baustein bindet dieser Ligand um den Faktor 330 besser an TAR. Dieser signifikante Effekt beruht nicht allein auf der Erhöhung der Zahl basischer Gruppen, da bei veränderter Linkerlänge die Affinität deutlich abnimmt. In einen Gel shift Assay von Mei et al. zeigte dieser Ligand allerdings nur eine Affinitätssteigerung um den Faktor 50 in Bezug zu 2,4,6-Triaminochinazolin.^[171]

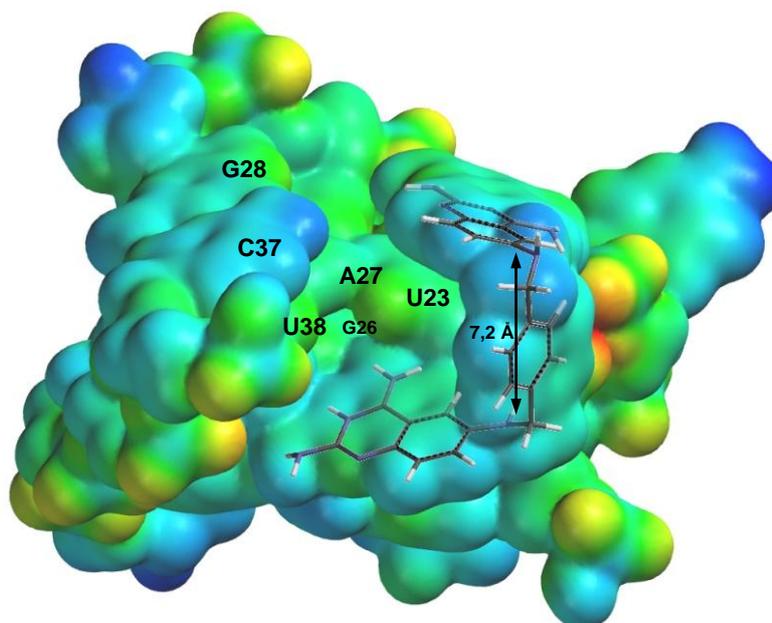


Abbildung 58: Komplex der TAR RNA (1UUD) mit Verbindung **213**, berechnet über Energieminimierung auf Grundlage des AM1 Basissatzes. Ladungsdichte (potential density) im bulge-Bereich der TAR RNA berechnet mit AM1 unter Verwendung der graphischen Oberfläche von Spartan 08. Positiv geladene Bereiche: blau, negativ geladene Bereiche rot.

Fügt man einen relativ starren Linker mit einer Länge von 11,5 Å ein, steigt der IC_{50} auf 750 nM. Der im Bereich von 11,6 - 16,5 Å flexible Linker zeigt in dieser Reihe die schlechtesten Bindungseigenschaften. Das deutliche Optimum bei kurzer Linkerlänge weist darauf hin, dass die Bindungsstellen der beiden Chinazoline nicht weiter als zwei Basenpaare voneinander entfernt sein können, da der vertikale Abstand coplanar gestapelter Heteroaromaten 3,4 Å beträgt. Somit ist eine simultane Adressierung des unteren loop Bereiches mit der bulge Region denkbar, wie es auch bei dimeren Liganden, wie rbt203, zu finden ist. Dabei würde ein protoniertes 2,4,6-Triaminochinazolinmonomer, wie in Kapitel 7.4 berechnet, in der Bindungstasche im Bereich von G26 liegen, und der zweite Heteroaromat sich oberhalb von U38 einlagern (s. Abbildung 58).

8. Präparativer Teil

8.1 6,8-Diaminophenanthridine

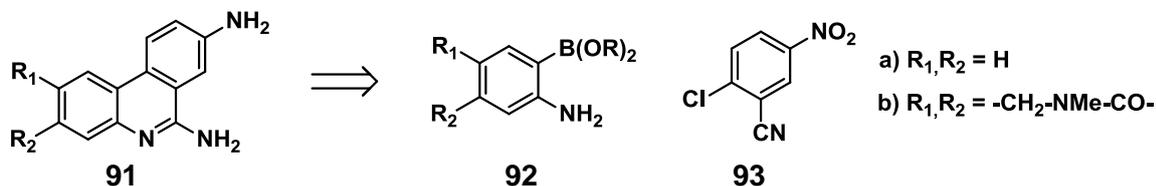


Abbildung 59: Retrosynthetische Zerlegung des 6,8-Diaminophenanthridins.

Ein direkter und universeller Weg zu 6-Aminophenanthridinderivaten **91** erfolgt über eine Dominoreaktion von einer Suzuki-Miyaura Kupplung und intramolekularen 6-exo-dig verlaufenden Amidinbildung, die bereits von Hervé Galons et al. für das unsubstituierte Molekül beschrieben wurde, wobei eine Ausbeute von 81 % erzielt werden konnte ($Pd(OAc)_2$ (0.05 eq.), Cs_2CO_3 (2.2 eq.), Adamantanaminhydrochlorid (0.2 eq.), 100 °C, 16 h Dioxan).^[188]

Aufgrund der hier eingesetzten Nitrogruppe paraständig zu dem Halogen, gelingt die Kreuzkupplung auch mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (0,05 eq.) in guten Ausbeuten (89 %, $R_1, R_2 = H$).

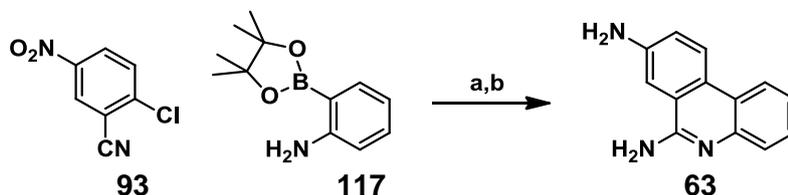
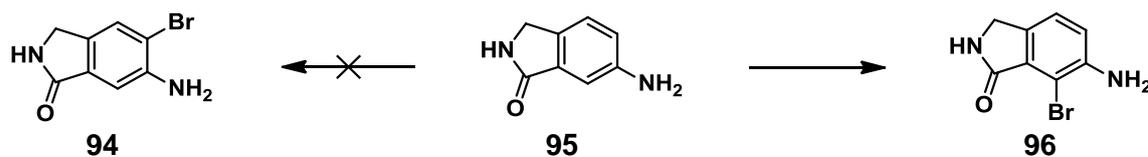


Abbildung 60: a) $Pd(PPh_3)_4$, Cs_2CO_3 , Dioxan/ H_2O 10:1, 100 °C, 18 h, 89 %; b) Pd/C , H_2 , rt., 18 h, 64 %.

Die milden und chemoselektiven Reaktionsbedingungen erlauben den Einsatz vielfältiger Derivate beider Reaktionspartner. So konnte auch N-Methylisindolin-1-on Aminoboronsäure eingesetzt werden um einen Wasserstoffbrückenakzeptor an das Phenanthridingerüst anzubringen.

8.1.1 Herstellung von Isoindolinonboronsäuren

Zunächst wurde versucht, über eine Bromierung von 6-Aminoisoindolin-1-on **95** und anschließende palladiumkatalysierte Miyaura Borylierung diesen Baustein herzustellen. Allerdings führte die Bromierung zu einer Substitution an der 7-Position. Auch die an der Aminogruppe pivaloylierte Spezies führte zu dem falschen Isomer.



Um das gewünschte Bromisindolinon **94** zu erhalten, wurde zunächst Phthalsäureanhydrid in wässriger alkalischer Lösung bromiert, wobei man als Zwischenprodukt das Natrium 4-Bromphthalat erhielt, das mit Thionylchlorid wieder in das Anhydrid überführt werden konnte. Nach Umkristallisation aus Ethylacetat erhielt man das isomerenreine Produkt **98**.^[189]

Im nächsten Schritt wurde mit Methylamin substituiert und man erhielt das N-Methyl-Phthalimid **99**. An dieser Stelle könnten auch andere Reste eingeführt werden, die eventuell über elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat interagieren können. Die Nitrierung an Position-6 gelang mit einer Ausbeute von 84 %, und Verbindung **100** konnte durch Umkristallisation aufgereinigt werden.

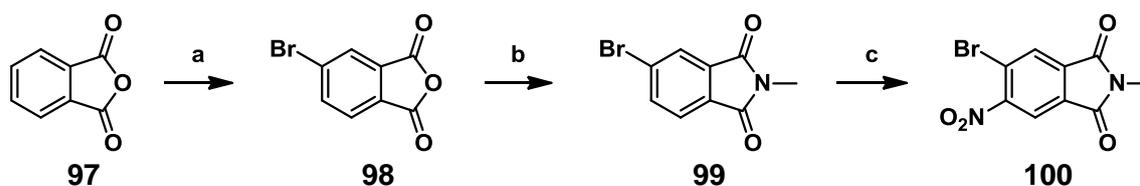


Abbildung 61: a) i) Br_2 , NaOH , H_2O , 6 h, 90°C ; ii) SOCl_2 , 2 h, reflux, 41 %; b) CH_3NH_2 , py, 2 h, rt., 74 %; c) HNO_3 , H_2SO_4 , 84 %.

Auf Grund der elektronenziehenden Nitrogruppe wird die Elektronendichte der paraständigen Carbonylgruppe verringert, wodurch die Elektrophilie am Kohlenstoff erhöht wird. Somit lässt sich an dieser Position eine regioselektive Reduktion mit Borhydriden durchführen, wobei man das racemische N,O-Acetal erhält. Im Anschluss wurde das Isomerengemisch mit Zinn in HCl/HOAc zu dem Isoindolinon weiterreduziert. Das gebildete Lakton ist bei diesen Reaktionsbedingungen stabil und reagiert nicht weiter. Gleichzeitig wurde auch die Nitrogruppe zum Amin überführt. Doch konnte das hierbei anfallende Gemisch aus 6-Amino-5-brom-2-methylisindolinon und 5-Amino-6-brom-2-methylisindolinon chromatographisch nicht getrennt werden. Eine Umkristallisation führte nur bei Verhältnissen von mindestens 3:1 zu akzeptablen Ergebnissen. Durch eine Trifluoracetylierung der Aminogruppe konnte dieses Trennproblem umgangen werden. Durch die geringeren Polaritäten ließen sich die Isomere durch Säulenchromatographie auftrennen und zudem besser im Laufmittel eluieren.

Tabelle 6: Optimierung der Reduktionsbedingungen.

Reagenz	Temperatur	Ausbeute	Isomerenverhältnis
LiBH ₄	-30 °C	39 %	3:1
NaBH ₄	-10 °C	56 %	2:1
NaBH ₄	10 °C	68 %	1:1

Eine andere Methode um das N,O-Acetal chemoselektiv, unter Erhalt der Nitrogruppe, zu reduzieren, stellt die ionische Hydrierung mit Triethylsilan (2 eq.) in TFA dar. Allerdings konnte auch das hierbei anfallende Isomerengemisch weder durch Kristallisation, noch durch Chromatographie, getrennt werden.

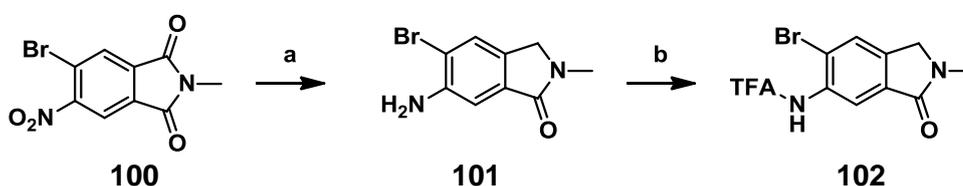


Abbildung 62: a) i) LiBH₄, THF, -30 °C; ii) Sn, HCl, HOAc, 4 h, 80 °C; b) TFAA, DIPEA, DMAP, DCM, 2 h, 40 °C, 88 %.

8.1.2 Miyaura Borylierung

Die Einführung der Boronsäure gelang über eine Miyaura Borylierung. Die besten Ergebnisse konnten durch den Einsatz von Pd₂dba₃ (0,05 eq.), PCy₃ (0,15 eq.), KOAc (1,5 eq.) in Dioxan erhalten werden. Das PCy₃:Pd Verhältnis ist ein wichtiger Parameter: Während bei der Verwendung eines 1:1 Verhältnisses ein sehr reaktiver aber thermolabiler Katalysator gebildet wird, führt die Verwendung eines 2:1 Verhältnisses zu einem stabilen Katalysatorsystem mit meist extrem langsamen Umsatzraten. Bei dem Einsatz eines 1,5:1 Gemisches erhält man einen temperaturstabilen Palladiumkomplex, der bei Temperaturen über 80 °C eine hohe Reaktivität aufweist.^[190] Die TFA-Schutzgruppe hat sich auch hier als vorteilhaft herausgestellt. Versuche einer Borylierung mit dem freien Amin zeigten nur sehr geringen Umsatz, sodass weitere Optimierungen nicht notwendig waren.

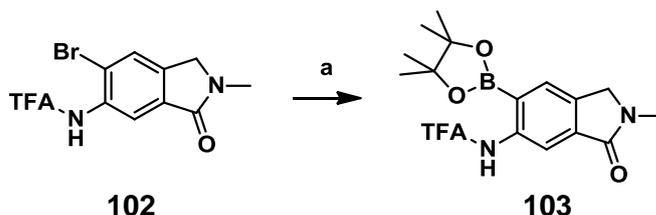


Abbildung 63: a) Bispinacolatodibor, Pd₂dba₃, PCy₃, KOAc, Dioxan, 18 h, 110 °C, 68 %.

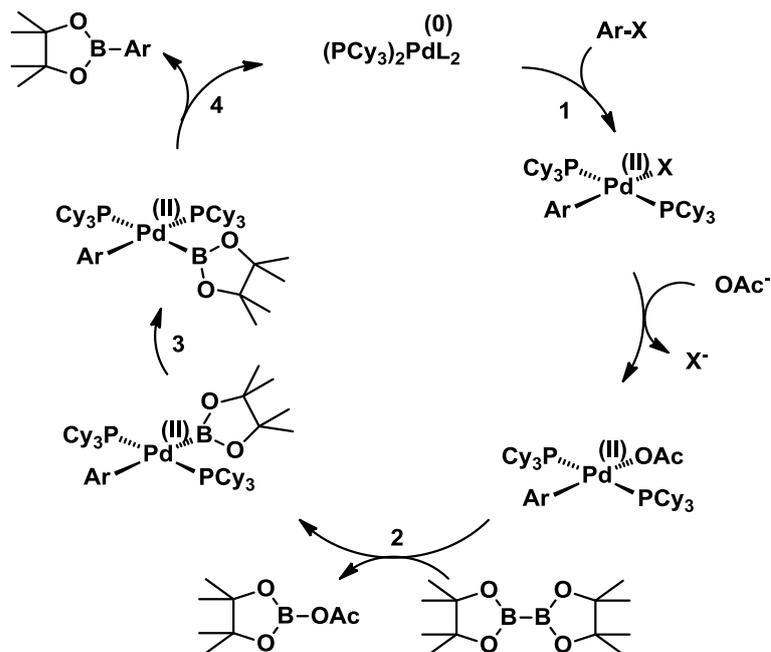


Abbildung 64: Mechanismus der Miyaura-Borylierung.

Der Katalysezyklus beginnt mit der oxidativen Addition **1**. Dabei inseriert das Palladium in die Aryl-Halogen σ -Bindung und bildet dabei einen quadratisch-planaren Komplex. Im nächsten Schritt findet eine Transmetallierung **2** statt. Dabei ist die Wahl der Base entscheidend für den Erfolg der Reaktion. Nach einer Testserie unterschiedlicher Reaktionsbedingungen von Miyaura haben sich $KOAc^{[191]}$ und $KOPh^{[192]}$ als geeignete Basen erwiesen. In einer ^{11}B -NMR Untersuchungen von Ishiyama et al.^[191] konnte keine Aktivierung des Bisboronsäureesters durch ein Acetat festgestellt werden, vielmehr hat die Bildung eines Acetat-Palladiumkomplex Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Transmetallierung. Zu beobachten ist eine erhöhte Reaktivität einer $Pd-OAc$ gegenüber einer $Pd-X$ Bindung, da nach dem HASB-Prinzip das weiche Palladium eine höhere Affinität zu weichen Halogeniden aufweist als zum harten Sauerstoff. So wird bei der Transmetallierung das Acetat auf das oxophile Bor übertragen, was für die thermodynamische Triebkraft in dieser Reaktion entscheidend ist, und ein Pinacolboran an das Palladiumorganyl gebunden. Nach einer trans/cis Isomerisierung **3** kommt es zur reductiven Eliminierung **4**. Abgespalten wird die Pinacolboronsäure und der Palladium(0) Katalysator wird zurückgewonnen.

8.1.3 Suzuki Kupplung

Unter den Reaktionsbedingungen der folgenden Suzuki-Miyaura Reaktion, wird die TFA Schutzgruppe abgespalten, und es kommt zu einer Dominoreaktion. Das Kupplungsprodukt bildet einen schwer löslichen roten Feststoff, der ohne weitere Aufarbeitung zu der Zielverbindung hydriert werden konnte.

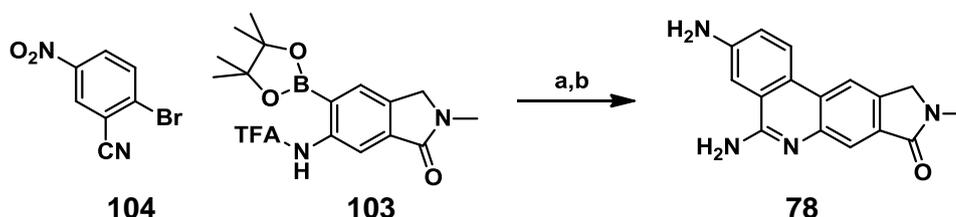


Abbildung 65: a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Cs_2CO_3 , Dioxan/ H_2O 10:1, 100 °C, 16 h, 51 %; b) Pd/C , H_2 , rt., 18 h, 81 %.

Die isomere Verbindung **79** konnte auf gleichem Weg hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial wurde das als Nebenprodukt bei der Synthese von **101** anfallende Isomer eingesetzt. Um von diesem höhere Ausbeuten zu erhalten, wurde die Reduktion mit Natriumborhydrid bei 10 °C durchgeführt, sodass eine 1:1 Mischung der beiden Komponenten entstand. Die anschließende Kupplung und Hydrierung verliefen analog der isomeren Spezies, allerdings mit etwas schlechteren Ausbeuten.

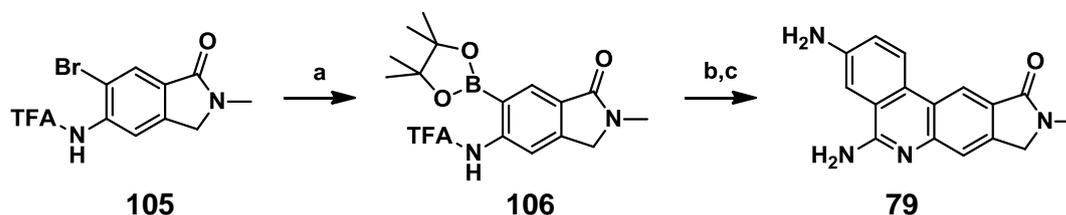


Abbildung 66: a) $[\text{BPin}]_2$, Pd_2dba_3 , PCy_3 , KOAc , Dioxan, 18 h, 110 °C, 53 %; b) **104**, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Cs_2CO_3 , Dioxan/ H_2O 10:1, 90 °C, 16 h 53 %; c) Pd/C , H_2 , rt., 18 h, 62 %.

8.2 Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridine

Das Tetrahydrophenanthridingerüst **rac-107** lässt sich analog der oben beschriebenen Phenanthridinsynthese aufbauen. Auch hier bietet sich eine Kupplungsreaktion und anschließende Cyclisierung unter Ausbildung eines Amidins an.^[193]

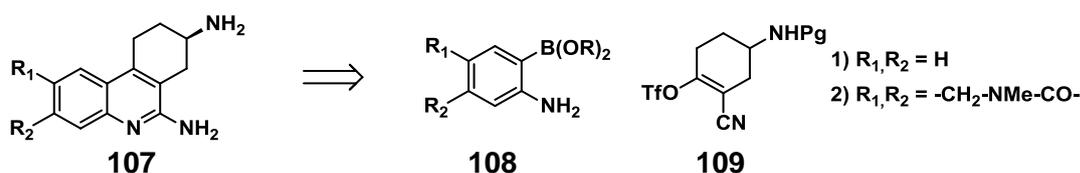


Abbildung 67: Retrosynthetische Zerlegung von 6,8-Diaminotetrahydrophenanthridin.

Die Synthese des Triflats wurde auf nicht stereoselektiven Weg realisiert. Zunächst wurde das Boc geschützte 4-Aminocyclohexanol über eine Swern Oxidation in guten Ausbeuten zum Keton oxidiert.

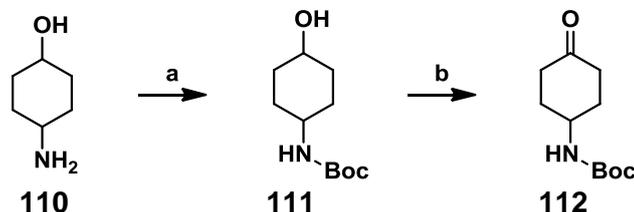


Abbildung 68: a) Boc_2O , NEt_3 , THF, rt., 3 h, 40 °C, 86 %; b) i) DMSO, $(\text{COCl})_2$, DCM, -70 °C, 45 min; ii) DIPEA, DCM, -70 °C, 10 min, 76 %.

Anfänglich wurde versucht, über eine Bromierung in der alpha-Position gefolgt von einer Substitution durch ein Cyanid das 2-Cyano-4-(Boc)-aminocyclohexanon herzustellen. Die anfängliche Bromierung mit elementarem Brom gelang bei 0 °C in guten Ausbeuten. Trotz der aciden Bedingungen wurde unter Eiskühlung die Boc-Schutzgruppe nicht abgespalten. Bei dem Versuch, das Bromid mit 1 eq. KCN zu substituieren entstand zunächst ein Cyanhydrin. Die Hydroxygruppe wurde unter den vorliegenden basischen Bedingungen deprotoniert und griff unter Bildung eines Epoxids an dem Kohlenstoff der C-Br Bindung an. Erst durch den Einsatz von mindestens 2 eq. KCN und einer Lewisäure wie LiClO_4 konnte das gewünschte Produkt **115** als Isomerengemisch erhalten werden. Durchgeführt wurde diese Reaktion unter fest-flüssig Phasentransferbedingungen mit Kronenether als Katalysator in wasserfreiem Dichlormethan. Dabei koordiniert das Lithiumion an den Epoxidsauerstoff und ein Cyanidion greift unter Ringöffnung und Bildung eines Cyanhydrins an. Nach Abspaltung von HCN erhält man das α -Cyanoketon.

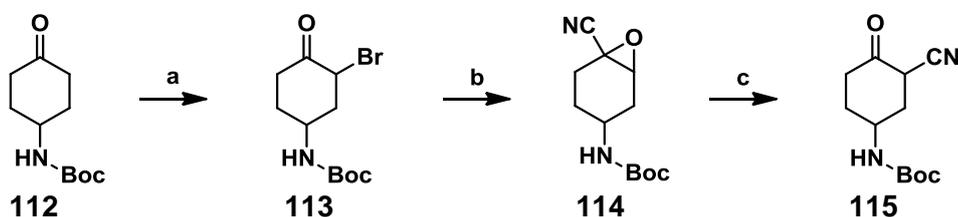


Abbildung 69: a) Br_2 , AlCl_3 , DCM, 0 °C, 2 h; b,c) KCN, LiClO_4 , 18-Krone-6, CH_3CN , reflux, 18 h, 38 %.

Eine elegantere Methode zur Herstellung von α -Cyanoketonen wurde von Kahne et al. entwickelt.^[194] Dabei stellt man zunächst ein Lithiumenolat her, das bei tiefer Temperatur mit Tosylnitril umgesetzt wird. In dem hier vorliegenden Fall sind mindestens

2 Äquivalente Base nötig, da zuerst das acide NH des Boc-geschützten Amins deprotoniert wird.

Zur Herstellung des Triflats wurde das α -Cyanoketon mit DIPEA und Triflylanhydrid in Dichlormethan versetzt. Die Reaktion mit N,N-Bis(trifluoromethylsulfonyl)anilin als Triflierungsreagenz verlief deutlich langsamer und ergab niedrigere Ausbeuten.

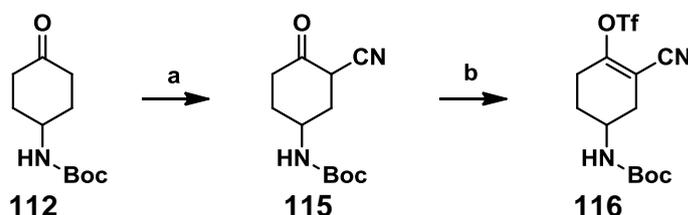


Abbildung 70: a) LDA (2.3 eq.), TosCN (1.5 eq.), THF, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h, 62 %; b) Tf₂O, DIPEA, DCM, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, 84 %.

Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen für die Kupplung mit den 2-Aminoboronsäuren wählte man die zuvor erfolgreich eingesetzten Katalysatorsysteme bestehend aus Pd(PPh₃)₄ und Cs₂CO₃ als Base und konnte auch in moderaten Ausbeuten die Zielmoleküle rac-**118** und rac-**63** erhalten.

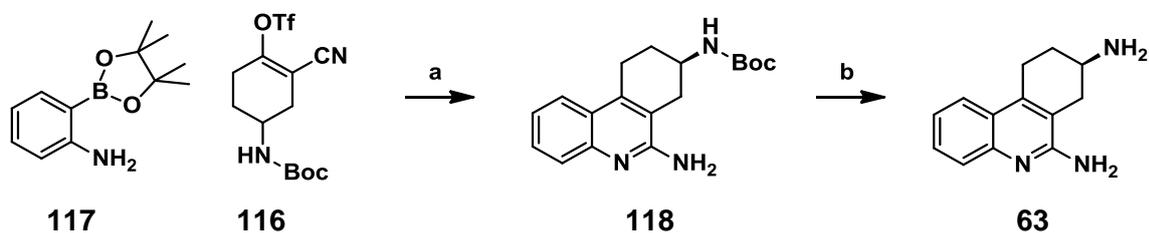


Abbildung 71: a) Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, Dioxan/H₂O 10:1, 2 h, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$; b) HCl, Dioxan (64 % über 2 Schritte).

In analoger Weise wurden auch die Analoga rac-**119** und rac-**78** mit ankondensiertem Laktamring erhalten.

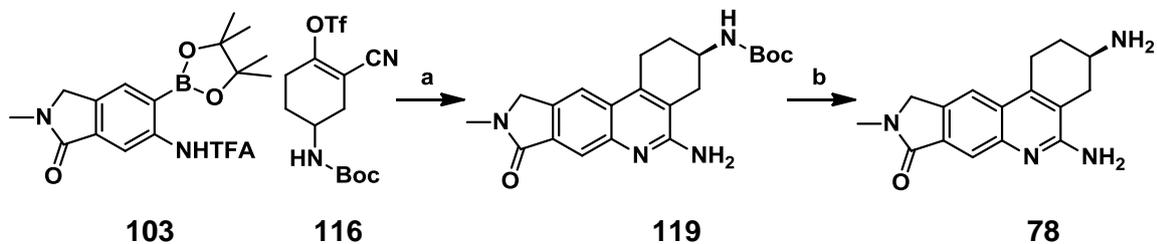


Abbildung 72: a) Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, Dioxan/H₂O 10:1, 5 h, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$; b) HCl, Dioxan (47 % über 2 Schritte).

8.3 8-Amino-6-hydroxytetrahydrophenanthridin

Analog zur Herstellung von Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridin erfolgte die Synthese von 8-Amino-6-hydroxytetrahydrophenanthridin. Als Schutzgruppe für den Alkohol wurde das relativ hydrolysestabile TBDPS gewählt, um nicht bei den Reaktionsbedingungen der Suzuki-Kupplung abgespalten zu werden. Dadurch kann man das Kupplungsprodukt besser chromatographisch aufarbeiten.

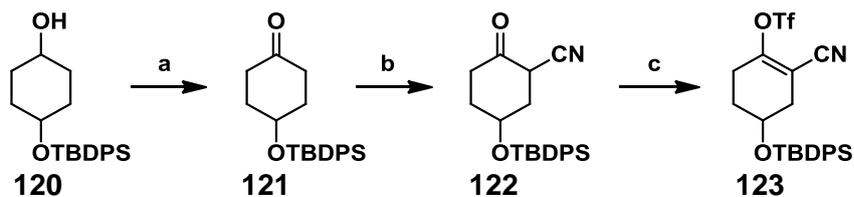


Abbildung 73: a) i) DMSO, (COCl)₂, DCM, -70 °C, 45 min; ii) DIPEA, DCM, -70 °C, 10 min, 72 %; b) LDA (1.5 eq.), TosCN (1.5 eq.), THF, -70 °C, 3 h, 65 %; c) Tf₂O, DIPEA, DCM, -80 °C, 1 h, 97 %.

Die Kupplungsreaktion lieferte bei dieser Reaktion nur Ausbeuten von 37 %. Vermutlich zersetzt sich die Silylschutzgruppe zum Teil unter den Reaktionsbedingungen. Auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen mit reaktiveren Katalysatoren, die bei tieferen Temperaturen eingesetzt werden können, wurde verzichtet, da auch so für einen Bindungsassay ausreichende Mengen von rac-**81** erhalten wurden.

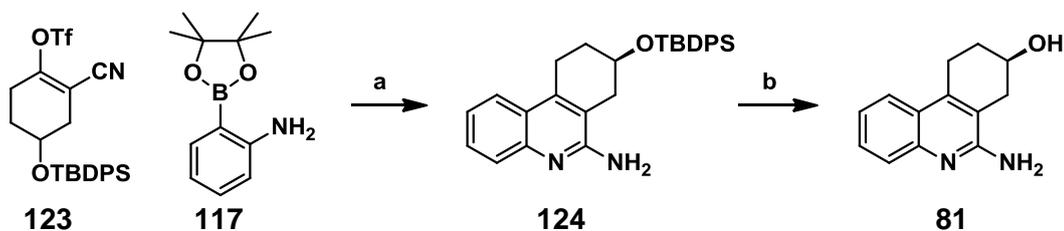


Abbildung 74: a) Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, Dioxan/H₂O 10:1, 2 h, 90 °C, 37 %; b) TBAF, THF, 18 h, 89 %.

8.4 Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin

8.4.1 Synthesestrategie „Suzuki“

Die Synthese von Hexahydro-6,8-diaminophenanthridinen lässt sich formell ebenfalls über eine Suzuki-Reaktion realisieren. Allerdings müssen in diesem Fall die funktionellen Gruppen der Kupplungspartner vertauscht werden, da 2-Cyanoalkyltriflate stark zur Elimination von Trifluormethansulfonsäure neigen, besonders in Anwesenheit von Basen, die für Suzuki-Reaktionen essentiell sind. Der Vorteil dieser Strategie wäre, dass eine Vielzahl unterschiedlich substituierter Kupplungspartner einsetzbar ist, und somit in wenigen Schritten zusätzliche Funktionalitäten eingeführt werden könnten.

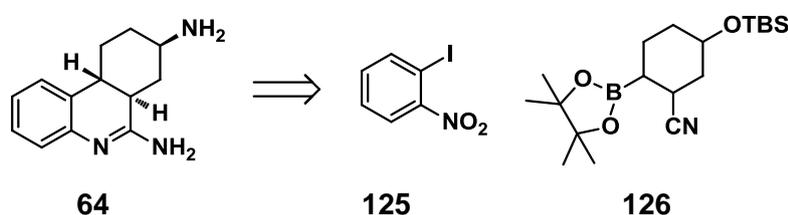


Abbildung 75: Retrosynthetische Zerlegung von 6,8-Hexahydrophenanthridin mit einer Suzuki-Kupplung.

Zur Herstellung des Boronsäureesters stellt man zunächst über eine lewissäure-katalysierte Diels-Alder Reaktion das 2-Cyano-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en **129** her. Nach Palladium-katalysierter Hydrierung der Doppelbindung lässt sich durch sterisch anspruchsvolle starke Basen das acide Proton an der α -Position des Nitrils entfernen, wodurch es zu einer Ringöffnung und zur Bildung von 3-Cyanocyclohex-3-enolat kommt, das instantan zu **131** silyliert wurde. Über eine kupferkatalysierte Addition eines Pinacolborans an das Vinylnitril erhält man ein racemisches Gemisch der 4 diastereomeren Boronsäureester **126**.

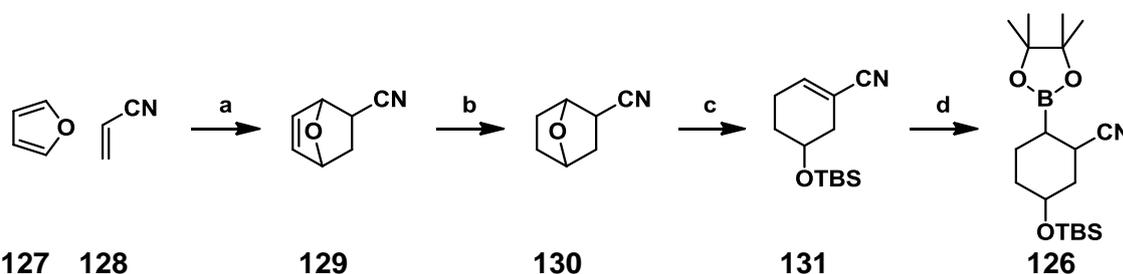


Abbildung 76: a) ZnBr_2 , rt., 18 h; b) H_2 , Pd/C, MeOH, rt., 50 bar, quant.; c) i) LDA, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}^{[195]}$; ii) TBS-Cl, DMAP, 18 h, 54 %; d) $[\text{BPin}]_2$, CuCl, PCy_3 , NaOtBu, MeOH, THF, rt., 18 h, 64 %.

Bei der Reaktion entsteht ein Isomergemisch mit der Zusammensetzung rac-**133** (2 eq.), rac-**132** (1 eq.), rac-**134** (1 eq.) und rac-**135** (0,5 eq.). Dies ergibt sich aus dem

axialen Angriff des Kupfer(I)-borats an das Michaelsystem, wie in Abbildung 77 dargestellt. Durch die basischen Bedingungen equilibriert die Cyanogruppe, sodass rac-**133** als Hauptprodukt erhalten werden kann. Durch Säulenchromatographie lässt sich im Anschluss rac-**133** von dem Isomergemisch abtrennen.

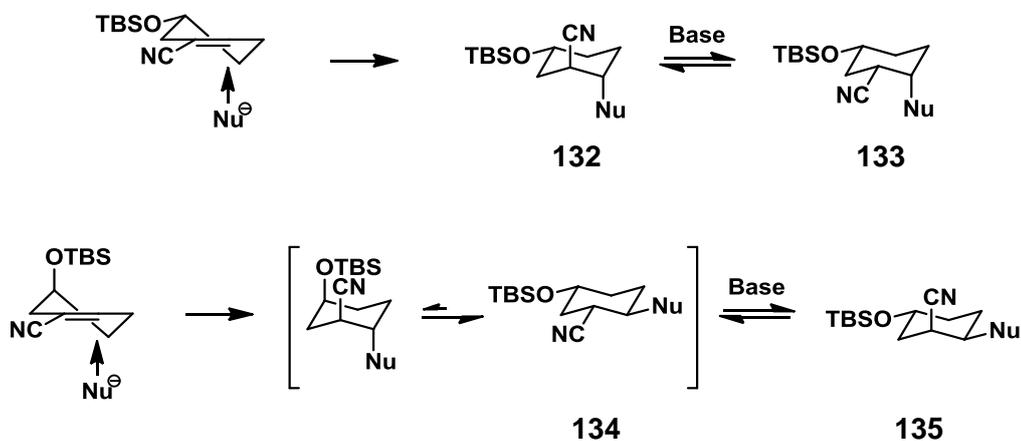


Abbildung 77: Michaeladdition an das Cyclohexenderivat und Equilibrierung.

Da in der Literatur diverse Kupplungsreaktionen von Cyclopentylboronsäuren beschrieben waren^[196], war man zunächst relativ optimistisch, durch Einsatz geeigneter Katalysatorsysteme die hier beschriebene Kreuzkupplung zu bewerkstelligen. Versucht wurden die Katalysatorsysteme Pd[(PPh₃)₄], Pd/P(tBu)₃ und Pd/P(Cy)₃ in Kombination mit unterschiedlichen Lösemitteln und Basen wie CsF, Cs₂CO₃ und TIOEt. Allerdings konnte kein Umsatz festgestellt werden. Auch eine Versuchsreihe mit dem Tetrafluoroborat **137** blieb erfolglos. Anzunehmen ist, dass Kohlenstoffe von 6-gliedrigen Ringsystemen keinen sp²-Hybrid Charakter haben im Gegensatz zu leicht gespannten 5-gliedrigen Cycloalkanen.

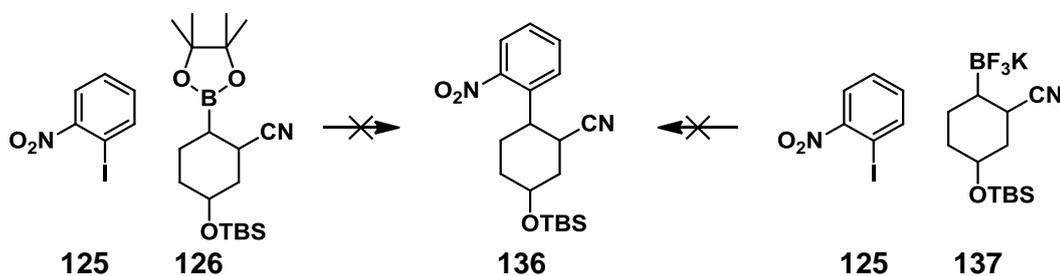


Abbildung 78: Versuche der Suzuki-Kupplung einer Cyclohexyl-Borverbindung mit o-Nitroiodbenzol.

8.4.2 Synthesestrategie „Michael Addition“

In einem weiteren Syntheseweg wurde eine Michael Addition am vinylichen Nitril bzw. an α,β -ungesättigten Carbonsäureestern der Cyclohexenderivate mit Organometallverbindungen versucht. Bei einem axialen Angriff auf das Michaelsystem sollte dies zur Bildung des gewünschten trans-Produktes führen und ähnlich dem ungesättigten System aus dem vorherigen Kapitel (Abbildung 77) stereoselektiv verlaufen.

Man verwendete hierfür *o*-Nitrophenylgrignard und stellte zudem verschiedene Cyanocuprate her, die allerdings weder mit dem Cyclohexennitril noch mit dem Cyclohexencarboxylat zu den gewünschten Produkten abreagierten. Zu bemerken ist, dass *o*-Nitrophenyllithium nur unterhalb $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil ist und die entsprechende Grignardverbindung sich bereits ab $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ zersetzt.^[197] Bei diesen Temperaturen fand allerdings keine Reaktion mit dem Michael Akzeptor statt. Bei einem Versuch mit unsubstituiertem Phenylgrignard bei Raumtemperatur beobachtete man eine Reaktion an der Nitrilgruppe bzw. den Carbonsäureestern. Folglich setzte man das Nitrogrignardreagenz mit CuCN (1 eq.) und LiCl (2 eq.) zu einem Cuprat um, das als weiches Nucleophil am Michaelsystem angreifen sollte. Allerdings beobachtete man auch hier keinerlei Umsatz zum gewünschten Produkt. Zudem war das Kupferorganyl nur wenige Stunden bei Raumtemperatur stabil und zersetzte sich beim Erwärmen.

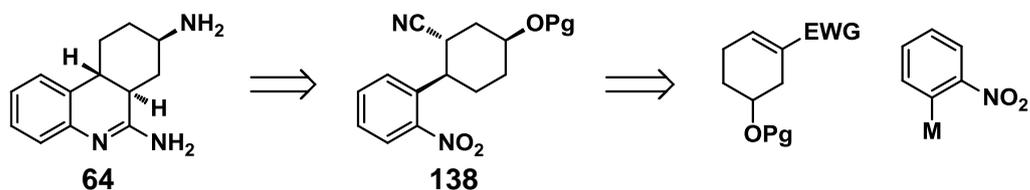


Abbildung 79: Retrosynthetische Zerlegung von 6,8-Hexahydrophenanthridin über eine Michael Addition.

Der Versuch über eine reduktive Heckreaktion^[198, 199], das 2-Iodonitrobenzol an das Cyanocyclohexenderivat zu koppeln, führte nicht zu dem gewünschten Produkt. Hier scheint die sterische Abschirmung des Cyclohexengerüsts zu groß für die Ausbildung eines π -Komplexes und anschließender Insertion zu sein. Auch eine Heck-Reaktion ohne reduktive Bedingungen scheiterte mit diesen Reaktionspartnern.

8.4.3 Synthesestrategie „Cycloalkanreduktion“

Eine weitere Option, stereokontrolliert Hexahydrophenanthridine zu synthetisieren verläuft zunächst über eine Suzuki Reaktion eines 2-Cyanocyclohex-1-en-1-yltrifats **116** mit einem geschützten 2-Iodanilinderivat **141**. Im Anschluss muss die Doppelbindung des Cyclohexenrings reduziert werden, wobei die Position der elektronenziehenden Gruppe weniger entscheidend ist, als die Stereokontrolle bezüglich der paraständigen Aminogruppe. Durch basenkatalysierte Equilibrierung sollte sich nachträglich ein cis/trans Gleichgewicht einstellen lassen, das aufgrund sterischer Wechselwirkungen wahrscheinlich auf der all-equatorialen Seite und somit dem trans-Produkt zu finden ist.

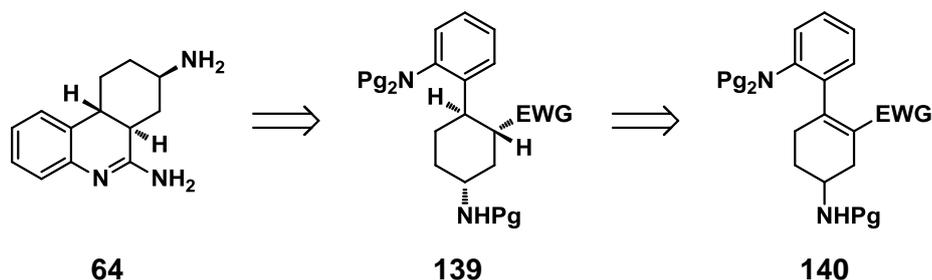


Abbildung 80: Retrosynthetische Zerlegung von 6,8-Hexahydrophenanthridin. Reduktion des Cyclohexens.

Die Herstellung von rac-**142** gelingt über eine Suzuki Kupplung nur unter schwach basischen Bedingungen. Dazu hat sich die Verwendung von CsF als Base als geeignet erwiesen.

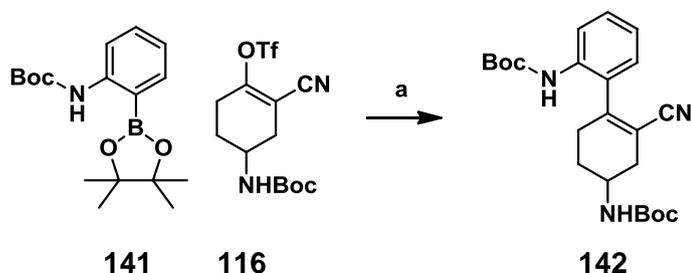


Abbildung 81: a) Pd(PPh₃)₄, CsF, Dioxan/H₂O 10:1, 2 h, 90 °C.

Bei der Wahl der geeigneten Schutzgruppe ist zu beachten, dass sie den reduktiven Bedingungen standhalten muss. Weiterhin führt die Anwesenheit eines aciden Protons an dem Amin zu einer Cyclisierung unter basischen Bedingungen zu rac-**118**.

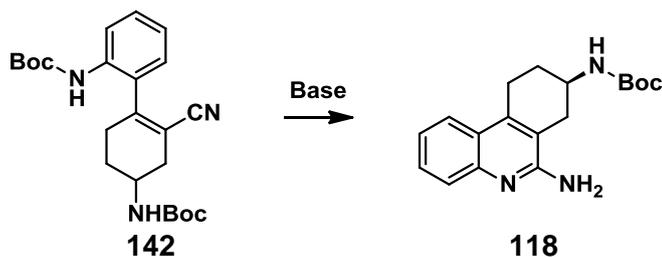


Abbildung 82: Unerwünschte Cyclisierungsreaktion in Anwesenheit eines aciden anilinschen Protons.

Anders bei den Cyclohexencarboxyaten rac-**144**, die eine deutlich höhere Reaktivität aufweisen. Hier entsteht das Intermediat rac-**145**, das weiter mit einer Magnesium/MeOH Mischung zum 6-Aminohexahydrophenanthridin reduziert werden kann. Durch den Aufbau von drei stereogenen Zentren erhält man bei dieser unspezifischen Reaktion ein Stereoisomergemisch rac-**146**, das chromatographisch nicht trennbar ist.

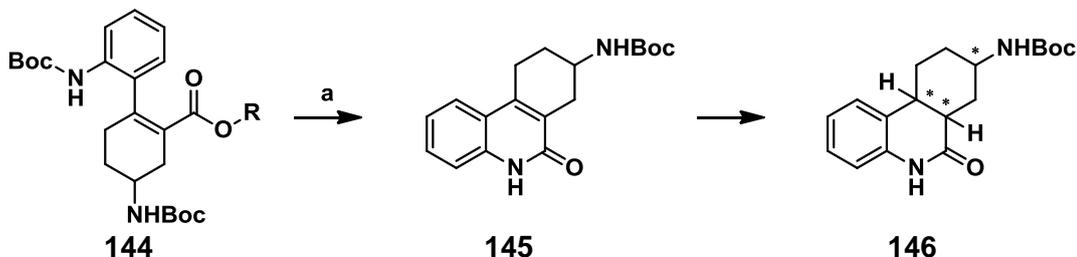


Abbildung 84: Reduktion des Chinolinons mit Magnesium in Methanol; a) Mg, MeOH, rt.

Möglicherweise lässt sich über Transferhydrierung mit dem Crabtree Katalysator unter Ausnutzung des Henbest Effekts eine relative Stereokontrolle erreichen.^[201, 202]

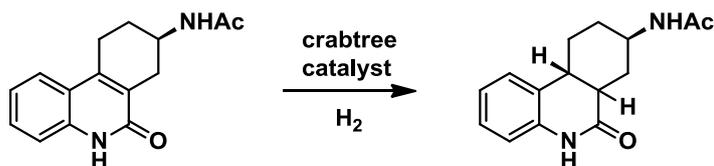


Abbildung 85: Option einer regioselektiven Hydrierung mittels Crabtree Katalysator.

Um die Cyclisierung zu 6,8-Diaminotetrahydrophenanthridinen zu verhindern, änderte man die Schutzgruppenstrategie für die anilinisische Aminogruppe. Es wurden zunächst bivalente Silane wie Stabase und Benzostabase als Schutzgruppe eingesetzt. Diese erwiesen sich beide als zu stark hydrolyseempfindlich für die Suzuki-Kupplung, sodass man plante, das Halogen durch Tributylzinn zu substituieren, um im Anschluss eine Stille Kupplung durchführen zu können. Allerdings war die Schutzgruppe sterisch zu anspruchsvoll, dass bei dem Versuch der Stannylierung kein Umsatz zu beobachten war.

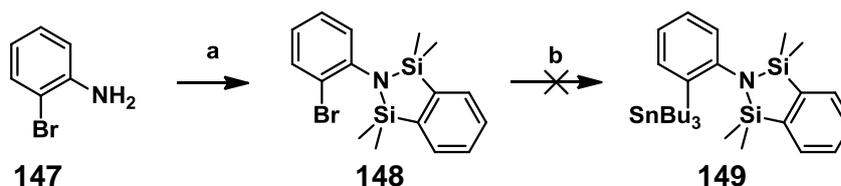


Abbildung 86: a) 1,2-Bis(dimethylsilyl)benzol, Rh(PPh₃)₃Cl, Toluol, reflux; b) n-BuLi, SnBu₃Cl, kein Umsatz.

Eine deutlich stabilere Aminoschutzgruppe ist Dimethylpyrrol, die sich durch Behandeln mit Hydroxylamin abspalten lassen sollte. Nachdem mit Natriumborhydrid und Mg/MeOH keine Reduktion des Cyclohexens zu erreichen war, setzte man rac-**151** unter Birch Bedingungen um. Dabei beobachtete man allerdings die Eliminierung des Nitrils und Reduktion zu dem Cyclohexanderivat **152**.

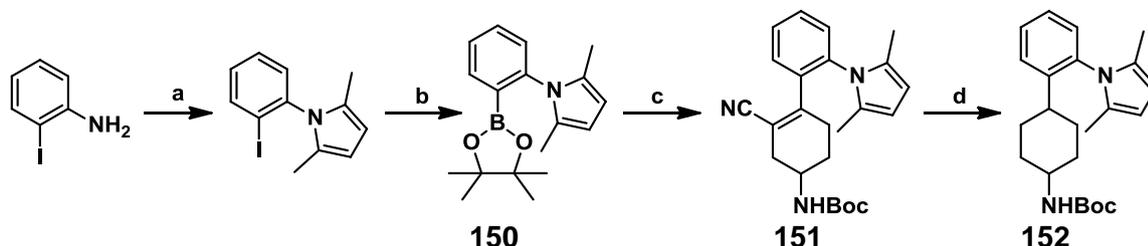


Abbildung 87: a) $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$, TosOH, Toluol, Dean Stark, 18 h; b) i) BuLi, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$; ii) *i*PrO-Bpin, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ - rt.; c) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Cs_2CO_3 , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 80 %; d) i) Li, NH_3 , THF, $-70\text{ }^\circ\text{C}$; ii) EtOH.

Im Falle des Carboxylats gelang schließlich die Reduktion der Doppelbindung mit Mg/MeOH. Dabei entstand das Isomerenmisch rac-**154**. Der Versuch, die Schutzgruppe mit Hydroxylamin zu entfernen, schlug schließlich fehl. Es kam dabei zu einer Reihe von ungewünschten Nebenreaktionen, die diese Schutzgruppenstrategie aussichtslos erscheinen ließen.

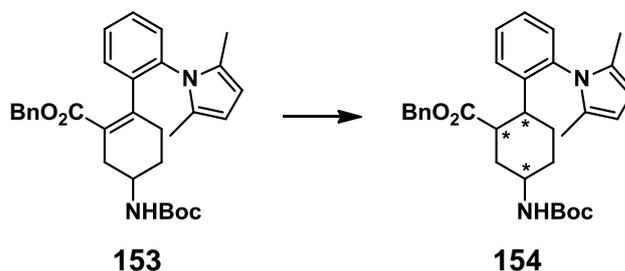


Abbildung 88: Mg, Methanol, rt., 6 h.

8.4.4 Synthesestrategie „Iodlaktonisierung“

Die erste retrosynthetische Transformation ist an der N^{β} -Aminogruppe, hin zu einer Hydroxygruppe, durchzuführen. Dabei bleibt die Stereokonfiguration der beiden equatorial stehenden funktionellen Gruppen beibehalten. Ein derartiger Syntheseschritt ist stereospezifisch in einer einstufigen Reaktion nicht möglich. Deshalb bietet sich zunächst die Herstellung eines Halogenids über eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion (Inversion) an, und anschließend die Substitution (Inversion) mit einem Amin oder Azids.

In der weiteren retrosynthetische Betrachtung lässt sich eine Spaltung der C-N Bindung des Amidins vornehmen. Diese entsteht bei einer intramolekularen Reaktion des Arylamins mit dem Cyclohexylnitril. Die Aminogruppe am Aromaten lässt sich reaktiv

aus der Nitroverbindung herstellen. Geeignete Methoden für diese Transformation sind unter anderem Hydrierungen oder Reduktionen mit Zinn oder Eisen in salzsaurer Lösung. Nitrile lassen sich aus Säureamiden unter Verwendung von dehydratisierenden Reagenzien wie POCl_3 , SOCl_2 oder TFAA herstellen. Jedoch besteht die Gefahr, dass bei basischen Bedingungen eine Equilibrierung stattfindet und der Verlust der Stereokontrolle droht. Die dazu benötigten Amide erhält man unter anderem aus aktivierten Carbonsäurederivaten durch Aminolyse. In diesem Fall wird ein fünfgliedriges Laktam durch Behandlung mit Ammoniak unter Ringöffnung in das Säureamid überführt, so dass die beiden Stereozentren erhalten bleiben.

Schließlich war eine radikalische Dehalogenierung mit Tributylzinnhydrid geplant, um das Iodid zu entfernen.

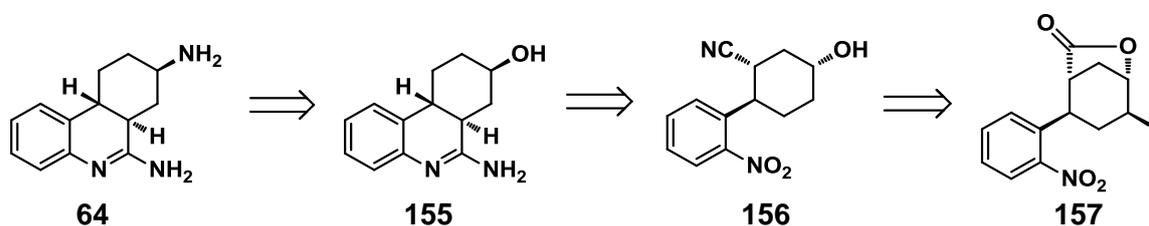


Abbildung 89: Retrosynthetische Zerlegung zu einem Iodlaktam.

Betrachtet man die beiden Stereozentren (siehe *rac*-**156**), welche die Hydroxygruppe und das Nitril am Cyclohexangerüst bilden, so ergibt sich ein eleganter Zugang dieser 1,3-Verknüpfung über eine Iodlaktonisierung. Durch den stereospezifischen Verlauf lässt sich die relative Konfiguration der beiden Positionen hiermit festlegen.

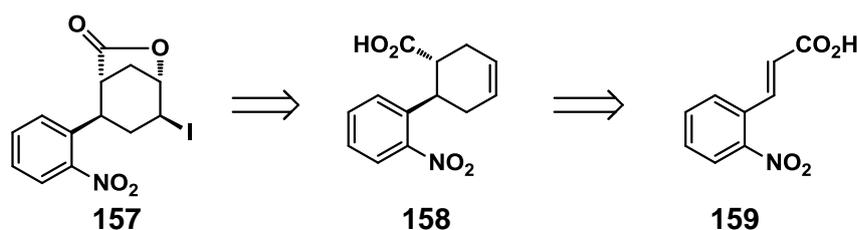


Abbildung 90: Retrosynthetische Zerlegung des Iodlaktams unter Beachtung der richtigen relativen Konfiguration.

Das benötigte *trans*-Isomer *rac*-**158** lässt sich wiederum stereokontrolliert durch eine Diels-Alder Reaktion herstellen. Als Ausgangsmaterial dient hierbei (*E*)-Zimtsäure, die mit Butadien umgesetzt wird.

Um das zu Beginn genannte Problem der Stereochemie der N^6 -Aminogruppe zu umgehen, wäre auch eine Iodlaktamisierung denkbar, wie in Arbeiten von Yeung et al. gezeigt. Allerdings stellte sich die Synthese des benötigten Amids *rac*-**162** als problematisch heraus, so dass dieser Weg nicht weiter verfolgt wurde.^[203]

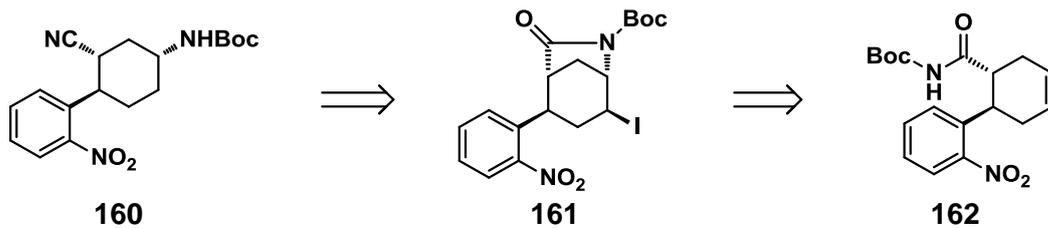


Abbildung 91: Iodlaktamisierung als alternative Option.

8.4.4.1 Diels-Alder Reaktion mit Zimtsäureester

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Reaktionsschritte soll zunächst ein Augenmerk auf die Synthese des Cyclohexengerüsts gerichtet werden. Das trans-ständige **165** lässt sich aus (E)-Zimtsäuremethylester und Butadien bei Temperaturen von 140 °C herstellen. Dabei eignet sich 3-Sulfolen als ideale Butadienquelle, da hier eine einfache Handhabung gegeben ist. Bei Raumtemperatur beobachtete man allerdings mit Butadien keinen Umsatz. Auch der Zusatz von Lewisäuren wie TiCl_4 und Et_2AlCl führte zu keiner messbaren Produktbildung.

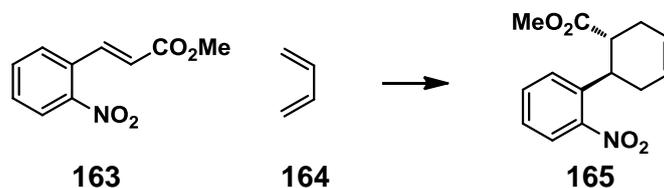


Tabelle 7: Optimierung der Diels-Alder Reaktionsbedingungen.

Edukte	Kat.	T	P	Lsm.	Ausbeute
163 , 3-Sulfolen (5 eq)	-	140°C, 18h	10 bar	Mesitylen	35 %
163 , 3-Sulfolen (5 eq)	-	140°C, 18h	10 bar	1,2-Dichlorbenzol	74 %
163 , Butadien (5 eq)	Et_2AlCl	rt., 18h	-	DCM	kein Umsatz
163 , Butadien (5 eq)	TiCl_4	rt., 18h	-	DCM	kein Umsatz

8.4.4.2 Stereokontrolle über Iodlaktonisierung

Das grundlegende Problem bei dieser Synthese stellt die Stereokontrolle der gegenüberliegenden Aryl- und Hydroxygruppe am Cyclohexylgerüst dar. Eine geeignete

Methode, eine trans-diequatoriale Verknüpfung zu erhalten, ist die stereospezifische Iodlaktonisierung einer arylsubstituierten Cyclohexencarbonsäure. Dabei erhält man eine 1,3-diaxiale Laktonbrücke mit einem axialständigen Iodsubstituenten. Allerdings induziert dieser eine starke sterische Wechselwirkung zu dem axialen Arylrest, sodass keine Iodlaktonisierung bei der Verwendung von transverknüpften Phenylcyclohexencarbonsäure **rac-158** zu beobachtet war.

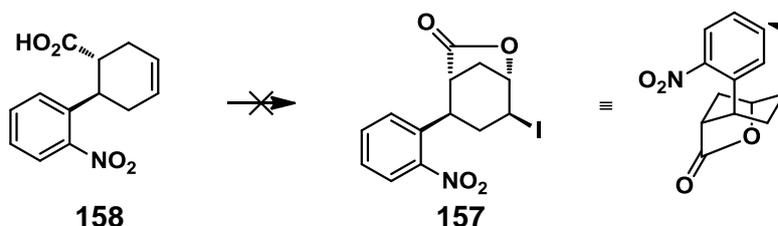


Abbildung 92: Sterische Wechselwirkungen zwischen Iod und Arylrest verhindern die Iodlaktonisierung.

Anders hingegen stellt sich die Reaktivität der cis-verknüpften Phenylcyclohexencarbonsäure dar. Man erhält das Iodlaktone innerhalb von 3 h in 74 %iger Ausbeute. Dieses trägt den Arylrest in äquatorialer Position und bildet somit keine 1,3-diaxialen, repulsiven Wechselwirkungen mit dem Iodsubstituenten aus. Auf diese Weise lassen sich zwei weitere Stereozentren gezielt aufbauen. Vor allem ist die 1,4-Verknüpfung zwischen Aromat und Alkohol am Cyclohexylgerüst von großer Bedeutung, da im weiteren Syntheseverlauf eine Trennung der Epimeren kaum möglich ist. Dagegen ist die Stellung der Carbonsäure weniger entscheidend, da nach der Überführung in ein Nitril eine Equilibrierung im Basischen durchgeführt werden kann.

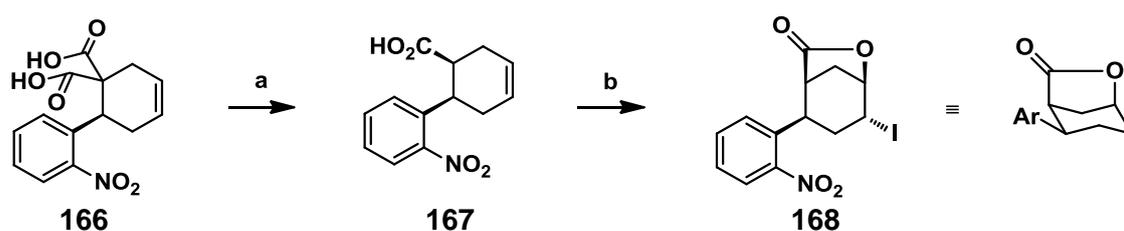


Abbildung 93: a) Cu_2O , CH_3CN , 18 h, reflux, 49 %; b) $\text{I}_2/\text{KI}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2:6), NaHCO_3 , rt. 18 h, 74 %.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese von **167** dient die Dicarbonsäure **166** (detaillierte Darstellungsmethode in Kapitel 8.3.4.5). Bei der Decarboxylierung entsteht in relativ guter Ausbeute (49 %) hauptsächlich das cis-ständige Isomer, da die Protonierung der intermediär gebildeten enolisierten Carbonsäure von der sterisch ungehinderten Seite erfolgt (bei dem oben abgebildeten Isomer: von unten). Da Decarboxylierungen bei Cyclohexan-1,1-dicarbonsäure nur langsam verlaufen, wurde die Reaktion $\text{Cu}(\text{I})$ -

katalysiert durchgeführt. Der vorgeschlagene Mechanismus ist in Abbildung 94 dargestellt.^[204]

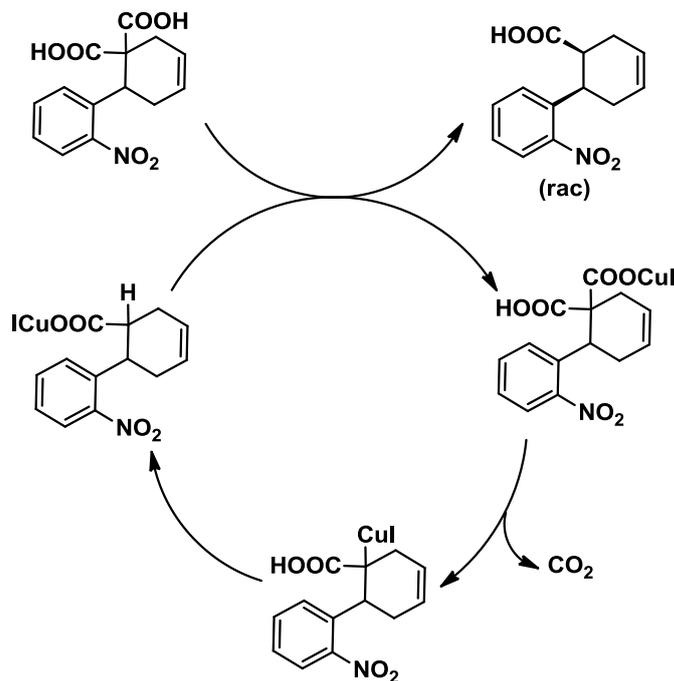


Abbildung 94: Kupfer(I)-katalysierte Decarboxylierung.

8.4.4.3 Synthesestrategie „Dehalogenierung“

Wie sich in der späteren Abhandlung herausgestellt hat, ist die Stellung der Carbonsäure am Cyclohexylgerüst vorerst belanglos. Da Diels-Alder Reaktionen mit Butadien nur sehr langsam verlaufen, bietet sich eine energetische Absenkung des LUMOs durch Einführung zweier elektronenziehender Gruppen am Dienophil an, um die Reaktivität zu steigern. Man verwendete für diesen Zweck Carbonsäurediester, die im späteren Reaktionsverlauf durch Decarboxylierung in die entsprechende Monocarbonsäure überführt werden können.

Im nächsten Syntheseschritt müssen die Carbonsäureester hydrolysiert werden, was zur Bildung eines Malonsäurederivats führt. Daraufhin folgt die Iodlaktonisierung, wobei **175** in Form eines racemischen Gemisches entsteht, bei dem die relative Stereokontrolle durch die 1,3-diaxiale Repulsion zwischen dem Iod- und Arylrest gesteuert ist.

Im Folgenden plante man, zunächst eine Dehalogenierung und daraufhin eine Decarboxylierung durchzuführen. Diese würde bei geschlossenem Laktone zu einem anti-Bredt-Enol führen. Die Decarboxylierung setzt daher die Öffnung des Laktone voraus, wobei auch eine Epimerisierung der Carbonylgruppe möglich ist. Nach Aminolyse des dehalogenierten Laktone zum Amid **rac-172** (bzw. **rac-176**) sollte dieses durch eine

Dehydratisierung in das Nitril **rac-171** überführt werden, wobei ein Epimerengemisch erhalten wird, das im Basischen equilibrieren sollte. Als nächstes war eine Reduktion der Nitrogruppe vorgesehen, wobei das entstandene Amin mit dem Nitril zu einem cyclischen Amidin **rac-170** abreagiert. Schließlich sollte die Hydroxygruppe unter Inversion des Stereozentrums durch eine Aminogruppe substituiert werden, das zur erwünschten equatorialen Konformation von **rac-169** führt.

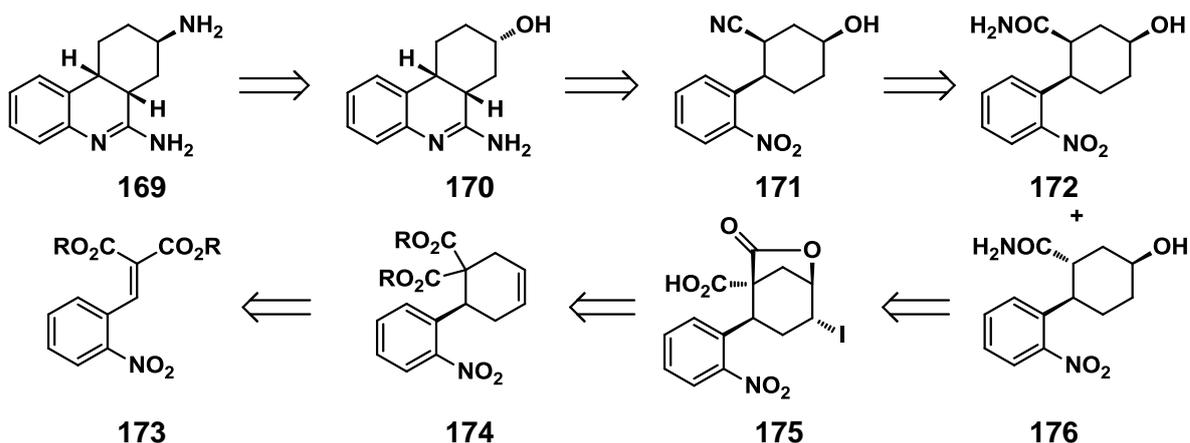


Abbildung 95: Retrosynthetischer Weg über eine Dehalogenierung des Iodlaktons.

8.4.4.4 Diels-Alder Reaktion mit Benzylidenmalonsäureester

Als Ausgangsmaterial für die Diels-Alder Reaktion wurde zunächst der Dimethylester **178** eingesetzt, der über eine Knoevenagel Reaktion im großen Maßstab und in guten Ausbeuten zugänglich ist.

Die erwartete Reaktivitätssteigerung bei der Cycloaddition blieb allerdings aus. So konnte selbst bei Temperaturen von 160 °C kein Umsatz mit Butadien beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass aufgrund sterischer Repulsion diese Reaktion nur schleppend verläuft. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass durch Anwendung von Lewisäure Katalyse die Cycloaddition mit Butadien schon bei Raumtemperatur möglich ist. Dazu wurde das Dien **164** zunächst durch Pyrolyse von 3-Sulfolen dargestellt und in das benötigte Lösemittel einkondensiert.

Die besten Ergebnisse bei der Diels-Alder Reaktion wurden mit AlCl_3 in DCM erreicht (54 %). Allerdings war die Reaktionszeit von 48 Stunden recht hoch und die Entschützung der beiden Carbonsäuren gestaltete sich problematisch. Die Verseifung der Dicarbonsäure mit LiOH verlief nur langsam und lieferte nur geringe Ausbeuten.

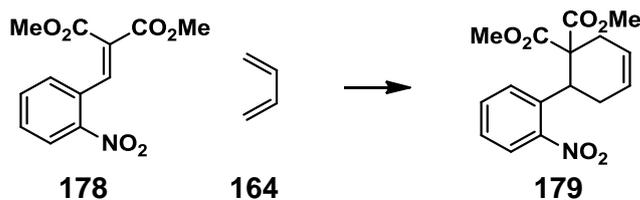


Tabelle 8: Optimierung der Diels-Alder Reaktionsbedingungen.

Edukte	Kat (1eq)	T	P	Lsm	Ausbeute
178, 3-Sulfolen (5 eq)	-	160 °C	5 bar	Mesitylen	kein Umsatz
178, 3-Sulfolen (5 eq)	AlCl ₃	160 °C	5 bar	Mesitylen	Zers.
178, Butadien (5 eq)	BF ₃ *Et ₂ O	rt.	-	Mesitylen	Zers.
178, Butadien (5 eq)	AlCl ₃	-7 °C/48h	-	Toluol	17%
178, Butadien (5 eq)	AlCl ₃	20 °C/48h	-	DCM	54%
178, Butadien (5 eq)	BF ₃ *Et ₂ O	0 °C	-	DCM	Zers.
178, Butadien (5 eq)	TiCl ₄	0 °C	-	DCM	kein Umsatz
178, Butadien (5 eq)	ZnBr ₂	rt.	-	DCM	kein Umsatz

Für den Fall, dass von dieser Verbindung nicht das Racemat, sondern nur ein bestimmtes Enantiomer benötigt wird, besteht die Option, durch chirale Lewissäurekatalyse eine stereoselektive Synthese zu realisieren, wie in der unteren Abbildung dargestellt.

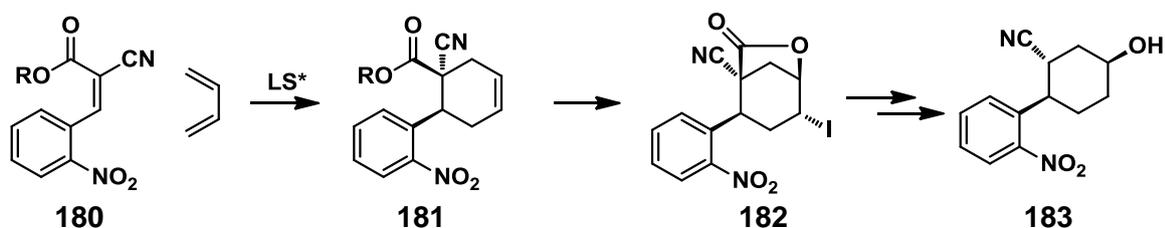


Abbildung 96: Vorgeschlagene stereoselektiver Syntheseweg.

Auf der Suche nach der passenden Schutzgruppe für die Dicarbonsäure, stieß man auf die Propan-2,2-diol Ester, die sich sehr einfach unter basischen Bedingungen entfernen lassen. Im Gegensatz zu der Dimethylester Spezies reagiert dieses Dienophil nur sehr schlecht unter Lewissäure Katalyse mit Butadien und neigt eher zur Zersetzung unter den nötigen harten Reaktionsbedingungen.

Beste Ergebnisse konnten bei der Umsetzung mit 3-Sulfolen in Nitromethan bei 110 °C und 10 bar erzielt werden. Für dieses Verfahren war zwar ein Autoklav notwendig, doch war die Handhabung mit 3-Sulfolen anstelle von flüchtigem und karzinogenem Butadien

recht problemlos. Um eine radikalische Polymerisation des Butadiens zu unterbinden, kann eine katalytische Menge von Hydrochinon zugegeben werden.

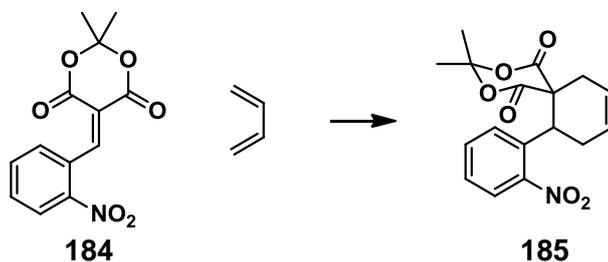


Tabelle 9: Optimierung der Diels-Alder Reaktionsbedingungen.

Edukte	Kat (1eq)	T	P	Lsm	Ausbeute
184 , 3-Sulfolen (5 eq)	-	110°C, 18h	10 bar	CH ₃ NO ₂	48 %
184 , 3-Sulfolen (5 eq)	-	110°C, 18h	10 bar	CHCl ₃	kein Umsatz
184 , Butadien (5 eq)	AlCl ₃	- 10°C, 18h	-	DCM	Spuren
184 , Butadien (5 eq)	Et ₂ AlCl	rt., 18h	-	DCM	kein Umsatz

8.4.4.5 Iodlaktonisierung der Cyclohexendicarbonsäure

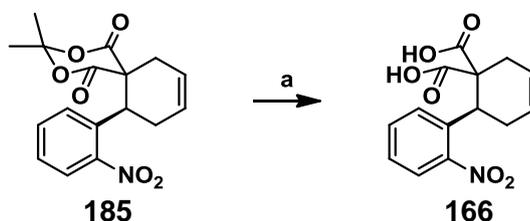


Abbildung 97: a) NaOH, H₂O/THF, 30 min, quant.

Es hat sich für die weitere Synthese als effektiver erwiesen, die Cyclohexen-1,2-dicarbonsäure *rac*-**166** für die Iodlaktonisierung einzusetzen. Auch hier reagiert nur die zum Arylrest *cis*-ständige Carbonsäure mit dem Iodiranium. Man erhält *rac*-**175** in 83 % Ausbeute ohne aufwendige Aufarbeitung.

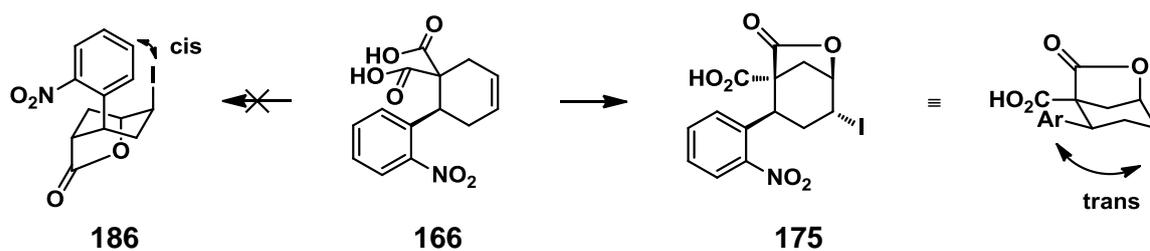


Abbildung 98: Relative Stereokontrolle bei der Iodlaktonisierung der Dicarbonsäure *rac*-**166**.

Das erhaltene Iodlaktone ist stabil gegenüber Decarboxylierung und kann gekühlt und unter Lichtausschluss monatelang gelagert werden. Grund für die Unempfindlichkeit dieses 1,3-Dicarboxylats liegt an der Stabilität des Laktone rings. Nur nach einer Ringöffnung kann sich das intermediäre Enol der Carbonsäure bilden (Bredt'sche Regel), wenn CO_2 abgespalten wird.

8.4.4.6 Versuche der Dehalogenierung

Die klassische Methode, ein Halogenid durch ein Hydrid zu substituieren, ist die radikalische Dehalogenierung mit Tributylzinnhydrid und AIBN. Allerdings erwiesen sich die Carbonsäure sowie die Nitrogruppe als störend für diese Reaktion.

Eine Bestrahlung mit UV-Licht führte zur Bildung einer Vielzahl von Zersetzungsprodukten, und stärkere Reduktionsmittel führten unweigerlich zur Reduktion der Nitrogruppe und damit zur Bildung eines Laktams.

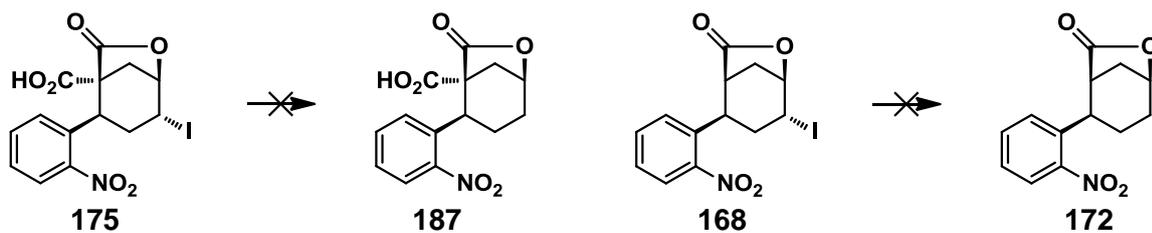


Abbildung 99: Erfolgreiche Dehalogenierungsversuche.

Ein alternativer Weg um das Iod zu entfernen wäre eine Eliminierung von HI aus dem Iodlaktone **rac-168** und anschließende Hydrierung des entstandenen Cycloalkens **rac-188**. Hierzu behandelte man das Edukt mit DBU in Toluol und beobachtete, selbst nach mehreren Stunden refluxieren, keinen Umsatz. Vermutlich ist das β -Wasserstoffatom durch den Arylrest sowie die Laktonebrücke sterisch abgeschirmt, sodass die Base keine Möglichkeit hat hier anzugreifen.

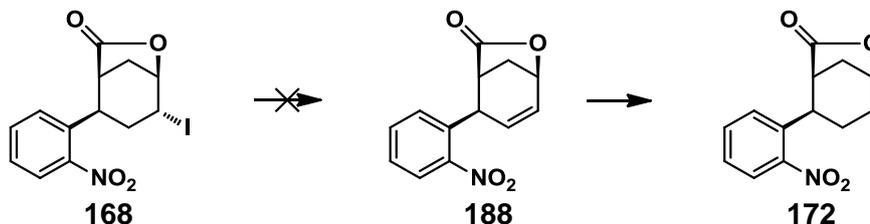


Abbildung 100: erfolgloser Eliminierungsversuch.

Behandlung mit starken Basen in wässriger Lösung führt zur Bildung des Diols **rac-190**. Aus diesem Grund lassen sich Dehalogenierungs- oder Eliminierungsversuche nur mit

nicht-nucleophilen Basen in wasserfreiem Milieu durchführen. Andernfalls bildet sich zunächst ein Epoxid, das vermutlich intramolekular über das Carboxylat geöffnet wird. Schließlich kommt es durch den Angriff einer weiteren Hydroxygruppe zur Öffnung des Laktons und Bildung des Diols rac-**190**.

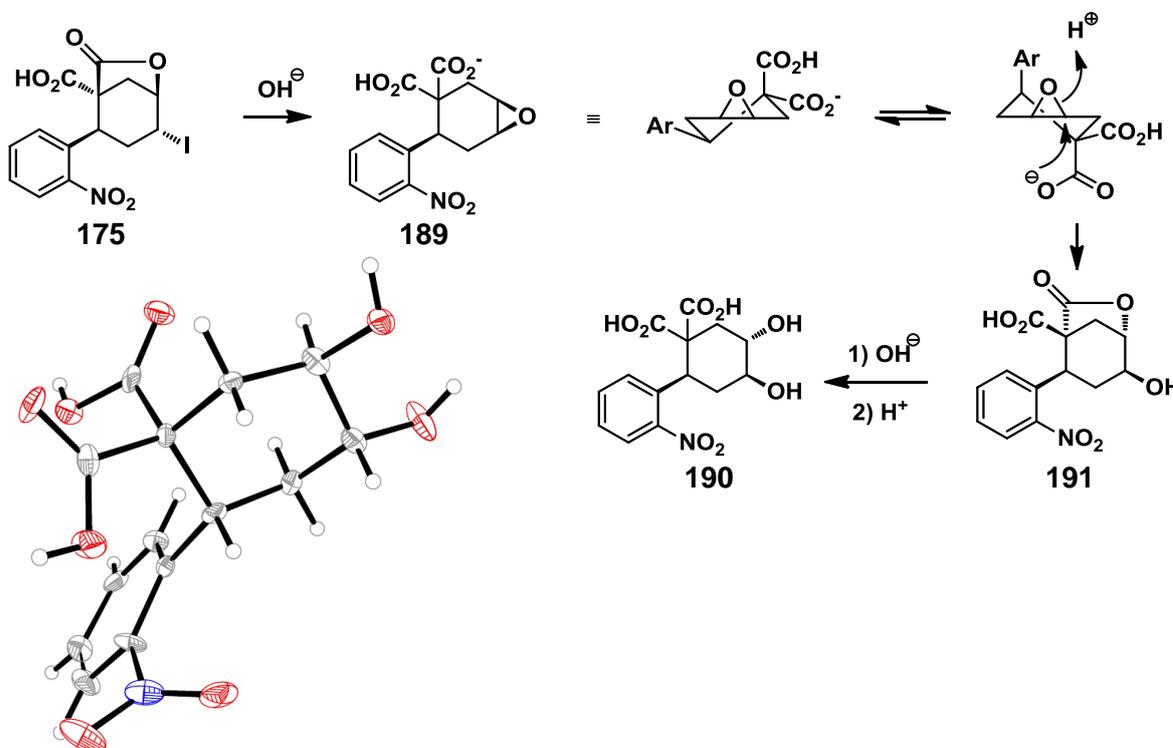


Abbildung 101: Möglicher Reaktionsverlauf bei der Bildung des Diols rac-**190**. Die relative Konfiguration wurde durch eine Kristallstruktur abgesichert. Das Bild zeigt ent-**190**.

8.4.4.7 Synthesestrategie „Dihydrochinolinon“

Aufgrund der gescheiterten Dehalogenierungsversuche überarbeitete man die Synthesestrategie und plante die Entfernung des Iodids über eine Hydrierung. Hierbei geht man von dem Iodlaktone rac-**175** aus. Dieses lässt sich mit verschiedenen Reduktionsmitteln dehalogenieren, was eine simultane Reduktion der Nitrogruppe zum Amin zur Folge hat. Das bei der Cyclisierung entstehende Laktam trägt an Position-6 eine Carboxylgruppe, die sich im Verlauf der Synthese über eine Decarboxylierung entfernen lassen sollte. Bei diesem Syntheseschritt geht allerdings die Stereoinformation an Position-6 verloren. Man ging aber davon aus, über eine sequenzielle Equilibrierung des Stereozentrums und Abtrennung des gewünschten Isomers, dieses Problem bewältigen zu können.

Als nächstes galt es eine Methode zu finden, um das Laktam in ein cyclisches Amidin zu überführen. Geplant war eine Aktivierung der Carbonylgruppe durch Schwefelung gefolgt von einer Substitution mit einem Amin.^[193]

Die Überführung der Hydroxygruppe in ein Amin mit Inversion des Stereozentrums lässt sich durch eine Mitsunobu Reaktion bewerkstelligen. Hierzu führt man zunächst ein Azid ein, das im finalen Schritt zum Amin reduziert werden kann.

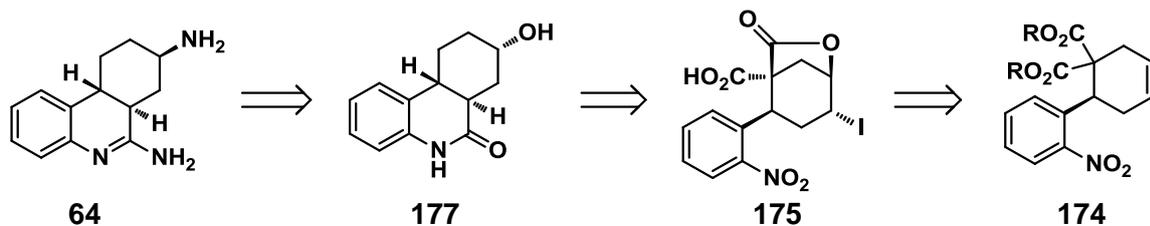


Abbildung 102: Retrosynthetischer Weg über einen Reduktion des Iodlaktams zum Chinolinon.

8.4.4.8 Hydrierung

Bei der Reduktion im sauren Milieu unter Verwendung von Hydrierkatalysatoren wie Palladium und Raney Nickel wird zunächst die Nitrogruppe reduziert und das Iod entfernt. Das freie Amin greift unter neutralen Bedingungen an der Carbonsäure an und es bildet sich das Laktam rac-**192**.

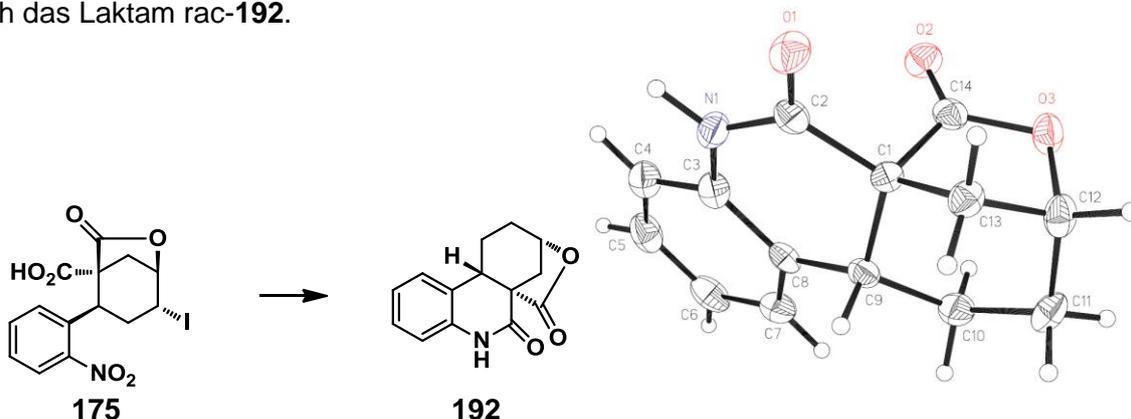


Abbildung 103: Hydrierung unter neutralen Reaktionsbedingungen. Die relative Konfiguration wurde durch eine Kristallstruktur abgesichert. Das Bild zeigt ent-**192**.

Diese Verbindung erwies sich als stabil gegenüber Decarboxylierungsversuchen im sauren sowie im basischen Milieu. Auch der Versuch einer Krapcho Decarboxylierung mit LiCl in DMSO bei 150 °C war nicht zielführend. Lediglich über eine Oxidation der Hydroxygruppe mit NaOCl unter stark basischen Bedingungen konnte das Laktam

geöffnet und das Carboxylat **rac-193** erhalten werden. Dies ging allerdings mit dem Verlust eines wichtigen Stereozentrums einher.

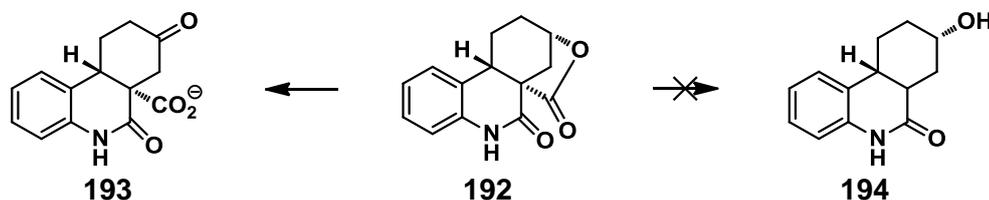


Abbildung 104: Erfolgreiche Versuche der Decarboxylierung.

Nachdem sich die über das Laktone **rac-192** verlaufenden Syntheserouten als problematisch erwiesen haben, wurden die Reaktionsbedingungen der Hydrierung des Iodlaktone in einer Reihe von Experimenten variiert. Dabei beobachtete man, dass der Zusatz von 10 % Triethylamin einen anderen Reaktionsverlauf bewirkte. Hier liegt die Carbonsäure als Carboxylat vor und fungiert nicht mehr als Elektrophil. Somit greift das Amin an der Carbonylgruppe des Laktone an und öffnet dieses unter Bildung des Laktams **rac-195**.

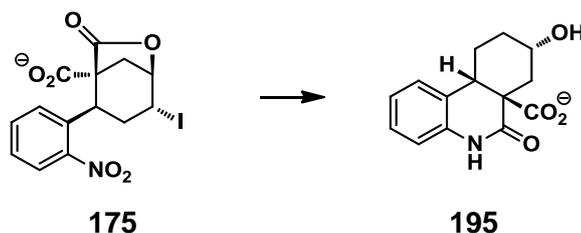


Abbildung 105: Hydrierung unter basischen und wasserfreien Reaktionsbedingungen.

Die freie Carbonsäure hat aufgrund sterischer Gegebenheiten nicht mehr die Möglichkeit zur Laktoneisierung, und eine Decarboxylierung kann ungehindert folgen. Man erhält ein Epimerengemisch aus **rac-196** und **rac-197** im Verhältnis von 3:1.

Diese aus 4 Einzelschritten bestehende Reaktionsfolge lässt sich in einem Autoklaven in Methanol/ NEt_3 bei 50 bar und 150 °C durchführen. Bei dem Einsatz von Palladium als Hydrierkatalysator erhält man nur geringe Ausbeuten, da es hier auch zu einer Hydrierung des Aromaten kommt. Besser geeignet ist eine katalytische Menge Raney Nickel. So lassen sich Ausbeuten von 84 % des Epimerengemisches aus **196** und **197** erhalten. An dieser Stelle kann eine Isomerentrennung säulenchromatographisch durchgeführt werden, aber in den folgenden Schritten kommt es aufgrund der basischen Reaktionsbedingungen immer wieder zur Epimerisierung, sodass die Trennung nur für analytische Zwecke erfolgte.

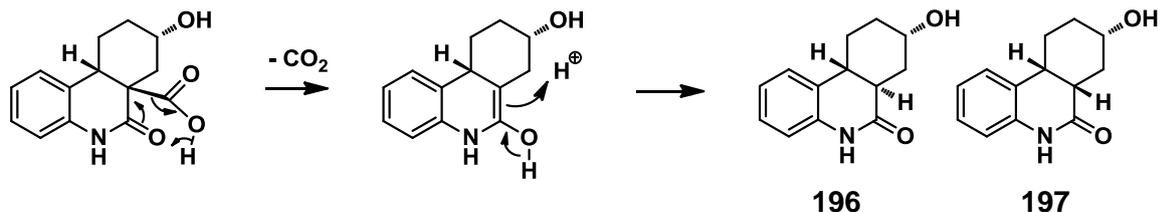


Abbildung 106: Decarboxylierung von rac-195.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurde unter Stereo inversion die Hydroxygruppe durch ein Azid substituiert. Man aktivierte die OH-Gruppe in einer Mitsunobu-artigen Reaktion mit DEAD und PPh_3 und verwendete Diphenylphosphorylazid als Azidquelle. Im nächsten Schritt reduzierte man das Azid hydrogenolytisch zum Amin und schützte dieses instantan mit einer Boc-Gruppe. Diese hat sich als essentiell für eine spätere Trennung der Epimere erwiesen und vermindert zudem die Polarität der Verbindung und erhöht zugleich ihre Löslichkeit in organischen Solventien.

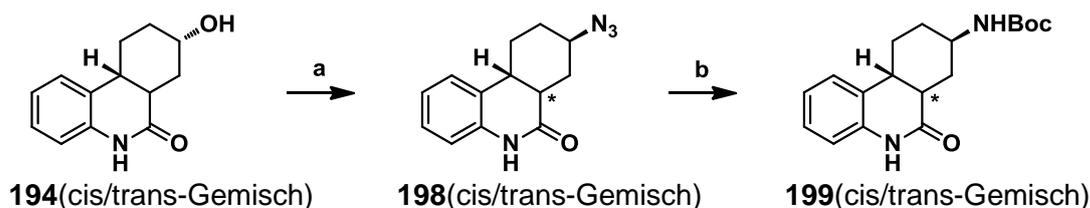


Abbildung 107: a) DEAD, PPh_3 , Ph_2PON_3 , THF, rt., 18 h, 94 %; b) H_2 , Pd/C, Boc_2O , rt., 18 h, 63 %.

Zur Herstellung eines Amidins aus einem Laktone wurde zunächst die Carbonylgruppe durch eine Schwefelung aktiviert. Die besten Resultate erhielt man bei der Umsetzung mit Lawesson's Reagenz in Toluol bei 100 °C. Die Thiocarbonylgruppe generiert eine am α -Kohlenstoff acide C-H Verbindung, die unter basischen Bedingungen leicht equilibriert. Da im nächsten Schritt mit einem Benzylamin substituiert werden sollte, wurde nur für analytische Zwecke eine Isomerentrennung an dieser Stelle durchgeführt. Das Benzylamidin erhielt man in guten Ausbeuten über eine Aktivierung des Thiolaktams mit HgCl_2 . Wobei eine Benzylgruppe hydrogenolytisch mit Pd/C nicht entfernt werden konnte, aber die Verwendung der säurelabilen 2,4-Dimethoxybenzylschutzgruppe zum erfolgreichen Abschluss der Synthese führte. Die Trennung der beiden Epimere gelang ebenfalls auf der Stufe des geschützten Amidins rac-201. Da die Entfernung der Schutzgruppen im Säuren verlief, war eine Isomerisierung im weiteren Syntheseverlauf nicht zu befürchten.

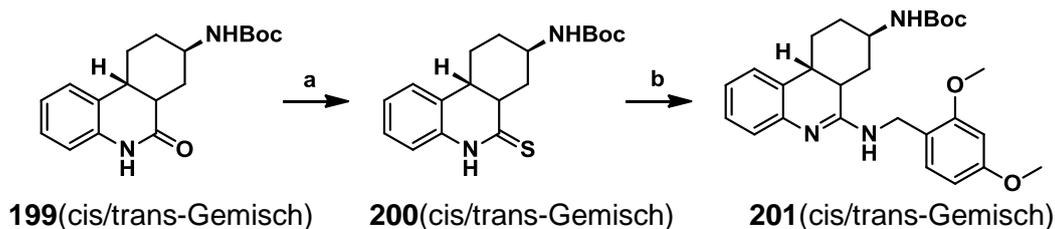


Abbildung 108: a) Lawesson's Reagenz, Toluol, 4 h, 100 °C, 66 %; b) 2,4-OMe-BnNH₂, HgCl₂, DIPEA, DMF, trans Isomer: 10 %; cis Isomer 36 %.

Nach Isolierung der beiden Epimere **rac-203** und **rac-204** erfolgte im finalen Schritt die Abspaltung der beiden säurelabilen Schutzgruppen mit einer Mischung aus TfOH, TIPS und MeOH in TFA. Die zu Beginn der Reaktion auftretende Rotfärbung ist vermutlich mit der Bildung von Benzylkationen zu erklären. Aufgrund der hohen Polarität des Produkts konnte die chromatographische Aufarbeitung nur mit C18 Umkehrphasenmaterial erfolgen. Nach Überführung in die Sulfatform mittels Ionenaustauschersäule gelang die Kristallisation der beiden Isomere **rac-66** und **rac-65**, dies ermöglichte schließlich eine Konfigurationsbestimmung durch Röntgenstrukturanalyse.

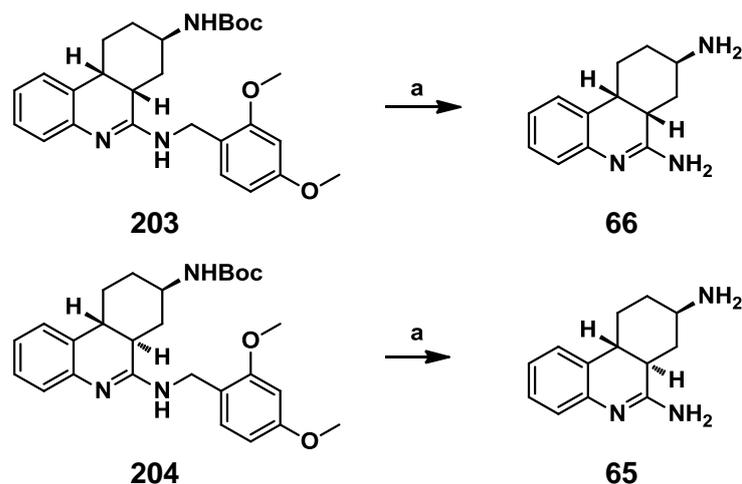


Abbildung 109: a) TfOH, TFA, TIPS, MeOH, 18 h, 37%.

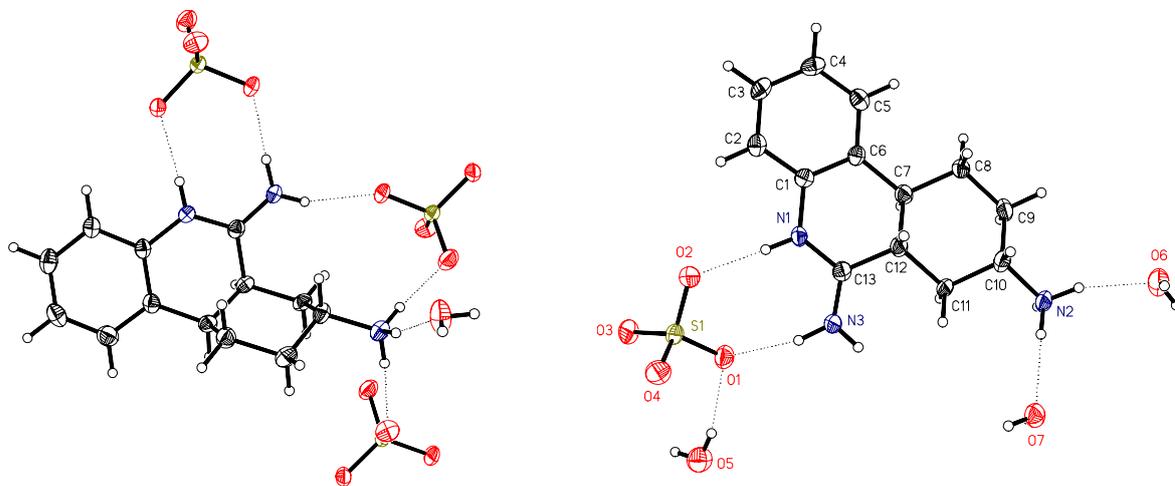


Abbildung 110: Kristallstrukturen von **66** und **65** als Sulfatsalz.

8.5 2,4-Diaminochinazoline

In der Literatur ist eine Vielzahl von möglichen Synthesewegen beschrieben. Die bedeutendsten Varianten sind in Abbildung 111 dargestellt.

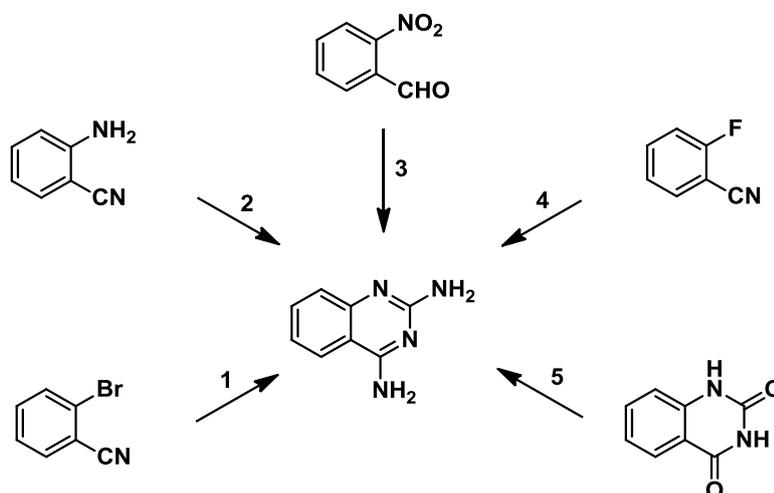


Abbildung 111: Unterschiedliche Herstellungsverfahren von 2,4-Diaminochinazolin.^[205]

Die traditionellen Synthesen von 2,4-Diaminochinazolin beinhalten im Wesentlichen die Verwendung von 2-Aminobenzonitril als Ausgangsmaterial (Abbildung 111, 2). Die Cyclisierung erfolgt durch den Einsatz von verschiedenen Reagenzien, wie Guanidin, Dicyandiamid oder Chloroformamidin Hydrochlorid, allerdings sind die Ausbeuten dieser Synthesen in den meisten Fällen eher moderat.

Bessere Ausbeuten liefern die Reaktionen von 2-Fluorbenzonnitril mit Guanidincarboxylat, aber auch hier sind immer noch hohe Temperaturen erforderlich, um die Cyclisierung zu initiieren (Abbildung 111, 4). Hergestellt wurde auf diesem Weg das 6-Methylchinazolin.^[166] Auch die Herstellung von 7-Hydroxy-2,4-diaminochinazolin aus 4-(Benzyloxy)-2-fluorbenzonnitril erfolgte in sehr guten Ausbeuten. Nach Abspaltung der Benzyloxyschutzgruppe konnte die Verbindung auch in unprotonierter Form längere Zeit unzersetzt gelagert werden.^[206]

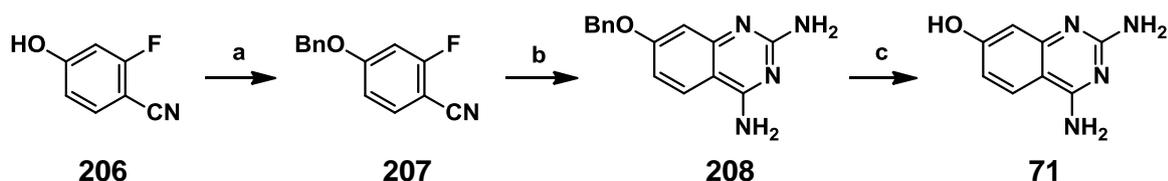


Abbildung 112: a) BnBr, K₂CO₃, Aceton, 20 h, reflux, 70 %; b) Guanidiniumcarbonat, DMA, 5 h, 150 °C, 93 %; c) H₂, Pd/C, MeOH, rt. 18 h, 90 %.

Weiterhin erwies sich die Herstellung der benötigten Fluoraryle als präparativ aufwendig, da Schiemann Reaktionen nur schlechte Ausbeuten liefern und zudem nicht beliebig hochskaliert werden sollten. Andere Verfahren benötigen toxische Fluoridquellen und teure Palladiumkatalysatoren, so dass man auf derartige Herstellungsprozesse verzichtete.^[207]

Eine elegante Methode zur Synthese von 4-substituierten 2,4-Diaminochinazolinen verläuft über eine Cyanoimidierung von Aldehyden und anschließende Umsetzung mit diversen Aminen unter reduktiven Bedingungen (Abbildung 111, 3).

Zur Synthese von 2,4,6-Triaminochinazolin stellte man freies Guanidin her und setzte es mit **209** unter Ringschlussreaktion zu dem 6-Nitro-2,4-diaminochinazolin **210** um (Abbildung 111, 2). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Nitroverbindung gelang die Aufarbeitung nur über eine Umkristallisation aus Eisessig. Dieser musste daraufhin aufwendig über mehrere Coevaporierungsschritte mit Toluol entfernt werden. Für die Palladium-katalysierte Hydrierung musste wegen der Löslichkeitsprobleme DMF als Lösemittel eingesetzt werden, was zu keinerlei Problemen bei der Reaktionsführung und späteren Aufarbeitung führte.

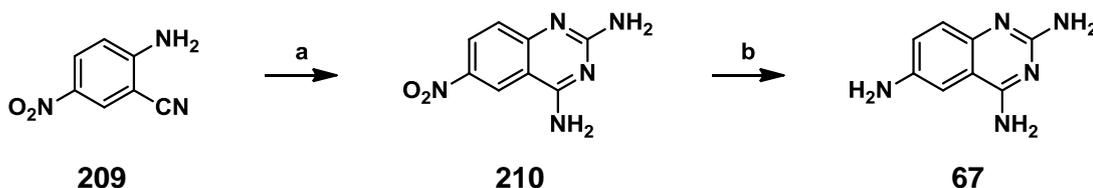


Abbildung 113: a) Guanidiniumcarbonat, MeONa, MeOH, reflux, 6 h, 78 %^[208] b) DMF, Pd/C, H₂; 18 h, 50 °C, quant.

Ausgehend von 2,4,6-Triaminochinazolin konnten durch reduktive Aminierung weitere N⁶-Derivate hergestellt werden. Über eine Eschweiler-Clarke Methylierung gelang es selektiv die Aminogruppe an Position-6 zweifach zu methylieren. Die deutlich weniger nucleophilen Aminogruppen an Position 2 und 4 wurden hierbei nicht substituiert.

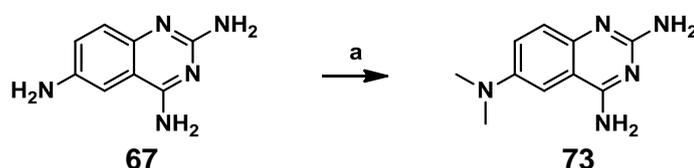


Abbildung 114: HCOOH, HCHO_{aq}, 30 min, reflux. 74 %.

Die Herstellung einer Reihe von Benzaldehydderivate erfolgte über reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid. Literaturbekannt ist auch eine Hydrierung der Imine mit RaNi, wie sie von Gangjee et al. beschrieben wurde.^[209] Zunächst erhitzte man die Amine zusammen mit den Aldehyden in abs. Ethanol, wobei sich das entsprechende Imin

bildete. Nach Zugabe des Reduktionsmittels erhielt man die monosubstituierte Triaminochinazolinderivate in guten Ausbeuten.

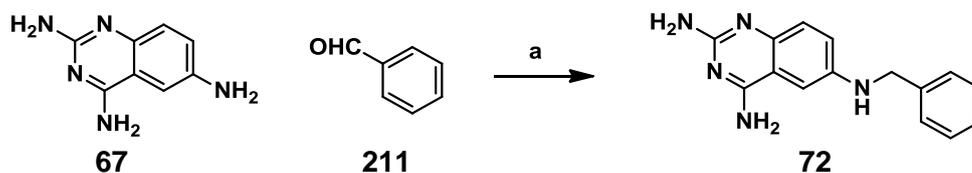


Abbildung 115: a) NaCNBH_3 , CH_3COOH , EtOH, rt., 8 h, 70 %.

Die dimeren Triaminochinazolinderivate wurden auf gleichem Wege hergestellt. Die Aufarbeitung dieser polaren, schlecht löslichen und oxidationsempfindlichen Substanzen gestaltete sich problematisch, sodass nur durch HPLC Trennung der gewünschte Reinheitsgrad erreicht werden konnte.

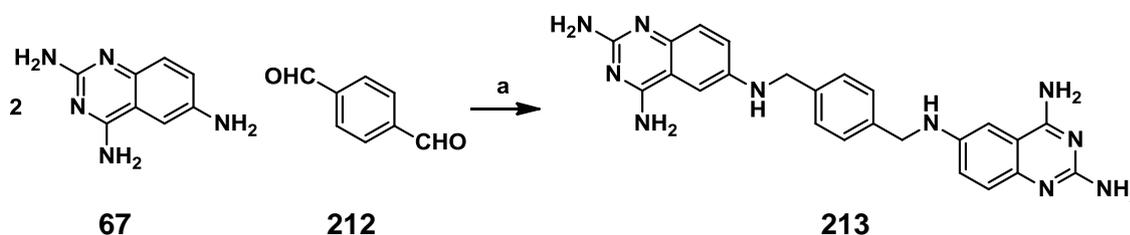


Abbildung 116: a) i) EtOH, TFA, 2 h, reflux; ii) NaCNBH_3 , HOAc, MeOH, rt., 6 h, 87 %.^[210]

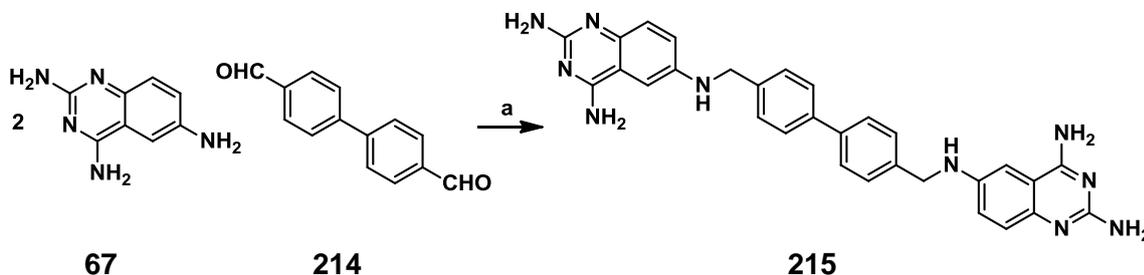


Abbildung 117: a) i) EtOH, TFA, 2 h, reflux; ii) NaCNBH_3 , HOAc, MeOH, rt., 6 h, 77 %.

Zur Herstellung längerkettiger Bis-Triaminochinazoline **219** entschied man sich zunächst, die Benzaldehyde **216** über phenolische Ether zu verbinden. Die Synthese dieses Linkers erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Jiand et al.^[211] Durch Einsatz von besser löslichem Cäsiumcarbonat an Stelle von Kaliumcarbonat konnte die Reaktionszeit von 48 h auf 18 Stunden deutlich verkürzt werden.

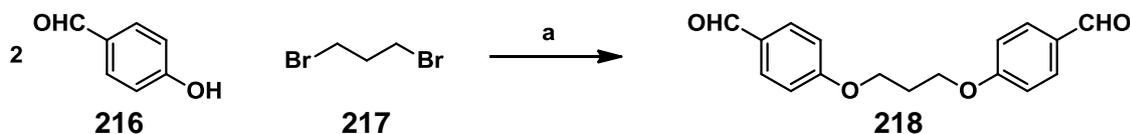


Abbildung 118: a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 18 h, 84 %.

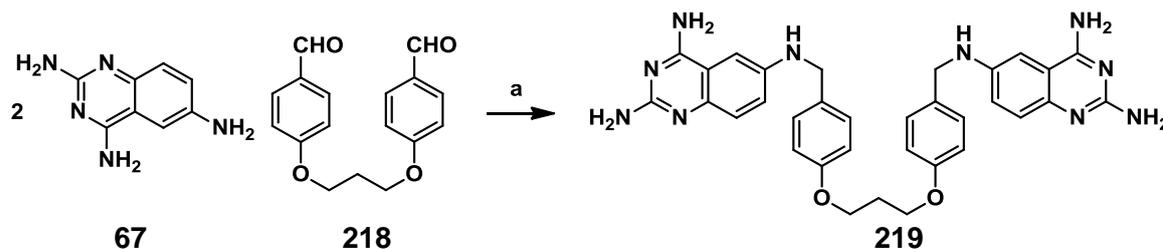


Abbildung 119: a) i) EtOH, TFA, 2 h, 100 °C; ii) NaCNBH₃, HOAc, MeOH, 18 h, 74 %.

Neil V. Harris et al. synthetisierten eine Reihe 5-substituierter Chinazoline mit Chloroformamidin Hydrochlorid als Reagenz, und zeigten so den breiten Anwendungsbereich dieser Methode.^[212] So war dies auch das eingesetzte Verfahren für die Herstellung von 5-Chloro-2,4-diaminochinazolin **221**, das als Ausgangsmaterial für die anschließende Synthese von 2,4,5,6-Tetraaminochinazolin benötigt wurde.

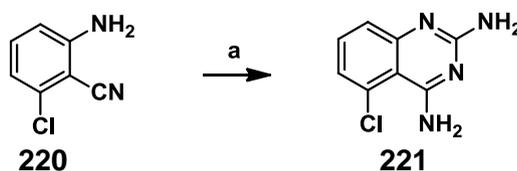


Abbildung 120: a) Chloroformamidin Hydrochlorid, CH₃(OCH₂CH₂O)₂CH₃ 2,5 h, 150 °C, 43 %.

Der erste Schritt zur Herstellung von 2,4,5,6-Tetraaminochinazolin ist die Nitrierung von 5-Chloro-2,4-diaminochinazolin **221** an Position-6. Durch Umkristallisation aus Ethanol konnte die isomerenreine Verbindung erhalten werden. In der Synthesevorschrift von Johnson et al. wurde im nächsten Schritt eine Aminolyse im Autoklaven mit moderaten Ausbeuten von 51 % durchgeführt.^[170] In dieser Arbeit substituierte man das Chlor durch eine Azidgruppe, was mit Natriumazid in DMSO bei 90 °C in guten Ausbeuten erfolgte. Nach Bildung des 5-Azido-6-nitro-2,4-diaminochinazolins kam es zu einer Folgereaktion, bei der die Nitrogruppe am Azid unter Stickstoffabspaltung angriff und so das Oxadiazol-N-oxid **223** entstand. Im finalen Schritt erfolgte eine Hydrierung. Hierbei gelang es, den Oxadiazol-N-oxid Ring zu reduzieren, so dass das 2,4,5,6-Tetraaminochinazolin **76** erhalten wurde. Diese Verbindung ist als freie Base extrem oxidationsempfindlich und bildet an der Luft binnen Minuten einen schwarzen stark polaren Feststoff. Nur in Form des Dihydrochlorids lässt sich der elektronenreiche Heteroaromat isolieren, doch auch als Salz ist das 2,4,5,6-Tetraaminochinazolin nur begrenzt haltbar und kann nur unter Schutzgas bei -20 °C über Wochen gelagert werden.

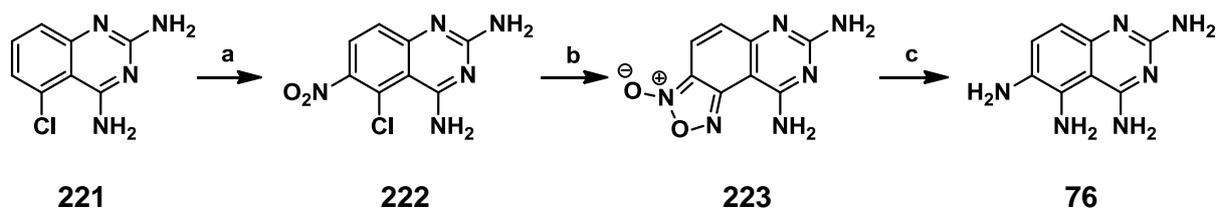


Abbildung 121: a) HNO_3 , H_2SO_4 , $-5 - 20\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 69 %; b) NaN_3 , DMSO, 2 h, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 74 %; c) H_2 , Pd/C, 18h, rt. 81 %.

Weitere Vertreter aus der Gruppe der Chinazoline, die für diese Arbeit von Interesse waren, sind 6-(Aminomethyl)chinazolin-2,4-diamin **74** und 6-(Piperazin-1-ylmethyl)-chinazolin-2,4-diamin **231**. Als Zwischenprodukt für die Herstellung dieser Strukturen wurde 6-Brom-2,4-diaminochinazolin **227** verwendet. Dieses ist zugänglich über eine Bromierung von 2-Cyanoanilin mit NBS zu 4-Brom-2-cyanoanilin **226**. Die Ringschlussreaktion erfolgte bei dieser Synthese mit Chloroformamidin Hydrochlorid in Diethylenglycoldimethylether bei $140\text{ }^\circ\text{C}$. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung fiel das Produkt **227** aus der Lösung aus und konnte bereits nach Waschen mit Diethylether für die weiteren Reaktionen verwendet werden.

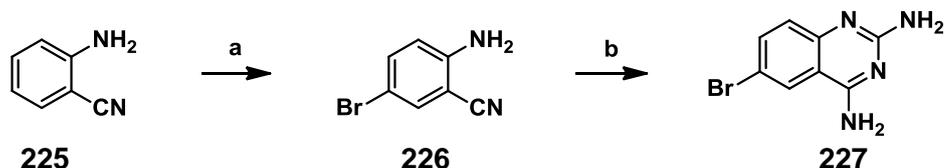


Abbildung 122: a) NBS, $-5-20\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, CHCl_3 , 66 %; b) Chloroformamidin Hydrochlorid, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_3$, 2,5 h, $140\text{ }^\circ\text{C}$, 84 %.

Als kupplungsfähige Trifluorborate dienen Aminomethyltrifluorborate. Zur Herstellung dieser Organoborverbindungen ging man von Bromchlormethan aus. Nach Metallierung mit BuLi, gefolgt von einer Transmetallierung mit Borsäuretrimethylester, konnte eine Umesterung mit Pinakol in Gegenwart von Chlortrimethylsilan durchgeführt werden. Man erhielt das lagerfähige Zwischenprodukt **229**, aus dem eine Vielzahl von Aminomethylboraten zugänglich ist. Dazu stellt man zunächst ein Lithiumamid her und substituiert das Chlor aus Verbindung **229** durch die entsprechende Aminogruppe. Das erhaltene Pinakolboran lässt zwar auch schon für Suzuki Kupplungen einsetzen, allerdings gestaltet sich die Aufarbeitung dieser Verbindungen als problematisch, so dass man sich entschied, das Trifluorborat herzustellen. Dazu versetzte man mit KHF_2 Lösung und erhielt das Kaliumsalz des Aminomethyltrifluorborats als kristallinen Niederschlag.^[213]

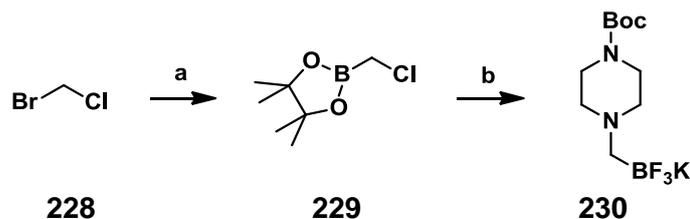


Abbildung 123: a) i) *n*-BuLi, THF, -78 °C ii) B(OMe)₃ iii) Pinacol, TMS 63 %; b) i) N-Bocpiperazin, *n*-BuLi, THF, ii) KHF₂, H₂O, 81 %.

Die Suzuki-Miyaura Kupplungsreaktionen mit Aminomethyltrifluorboraten wurden von Raushel et al. anhand von mehreren Beispielen beschrieben.^[213] Aufgrund der schlechten Löslichkeit des 6-Brom-2,4-diaminochinazolins **227** wählte man eine Dioxan/H₂O (10:1) Mischung als Solvent anstelle der beschriebenen THF/H₂O (4:1) Mischungen. Als Katalysatorsystem verwendete man den von Buchwald entwickelten XPhos Liganden (6 mol%) in Kombination mit Pd(OAc)₂ (3 mol%) und Cs₂CO₃ (3 mol%). Aufgrund der niedrigen Reaktivität des Arylbromids lagen die Reaktionszeiten bei über 18 Stunden. Dennoch konnten bei der Synthese von tert-Butyl-4-((2,4-Diaminochinazolin-6-yl)methyl)-piperazin-1-carboxylat **309** Ausbeuten von über 80 % erzielt werden.

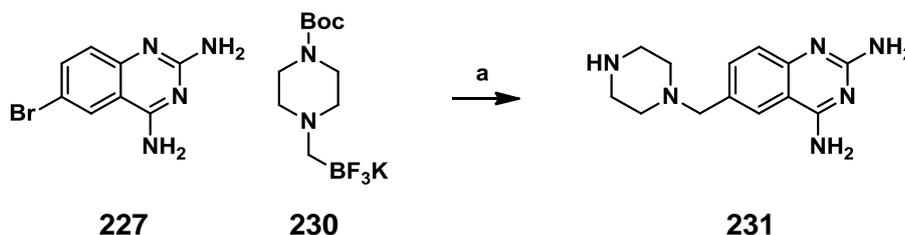


Abbildung 124: a) i) Pd(OAc)₂, XPhos, Dioxan/H₂O, 18h, 90 °C, 84 % ii) HCl, Dioxan, 60 %.

Auf gleichem Weg wurde auch 6-(Aminomethyl)chinazolin-2,4-diamin **74** im Arbeitskreis hergestellt.^[214] Optimierungsmöglichkeit besteht durch den Einsatz des reaktiveren 6-Iod-2,4-diaminochinazolins als Kupplungspartner. So ließe sich vermutlich auch eine Kupplungsreaktion mit Bis-Aminomethyltrifluorboraten zu dimeren 6-Methylamino-2,4-diaminoaminochinazolinen mit unterschiedlich langen Linkern bewerkstelligen.

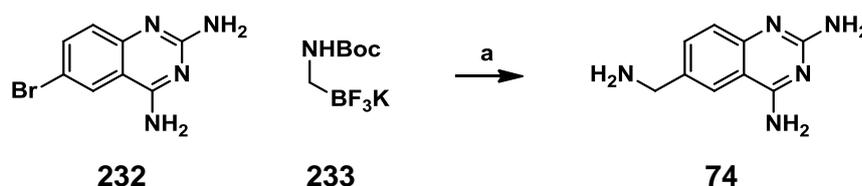


Abbildung 125: a) i) Pd(OAc)₂, XPhos, Dioxan/H₂O, 18h, 90 °C^[215]; ii) HCl, MeOH.

N-substituierte 2,4-Diaminochinazolines **237** werden üblicherweise aus 2,4-Dichloro-chinazolin **235** hergestellt, die aus Chinazolin-2,4-dion **234** durch Erhitzen in

Phosphoroxchlorid zugänglich sind. Bei der Umsetzung von **235** mit Aminen wird zunächst die reaktivere 4-Position substituiert und erst bei höheren Temperaturen die 2-Position. Auf diesem Weg ist eine effiziente Herstellung einer Vielzahl von Derivaten für ein drug-screening möglich. Trotz der vielfältigen Einsatzbereiche dieses Verfahrens, existieren mehrere Nachteile. So muss für die Chlorierung das sehr reaktive POCl_3 verwendet werden und die Substitution mit einem Amin an der 2-Position erfolgt nur bei höheren Temperaturen und liefert mit Ammoniak nur geringe Ausbeuten an 2,4-Diaminochinazolinen.

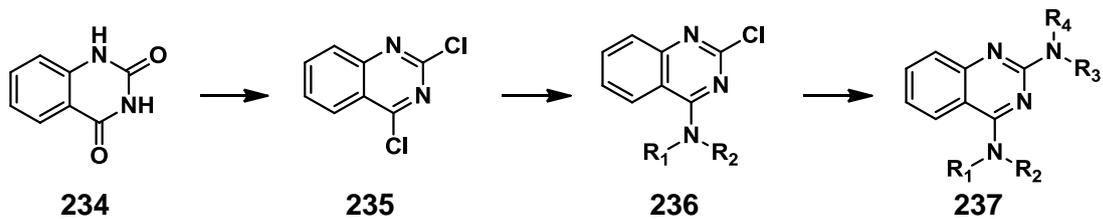


Abbildung 126: 2,4-Diaminochinazolinsynthese für N-substituierte Derivate.

Einen weiteren neuartigen Ansatz zu 2,4-Diaminochinazolinen stellt die Cu-katalysierte Ullmann-N-Arylierung von 2-Brombenzonitrilen mit Guanidin dar.^[216]

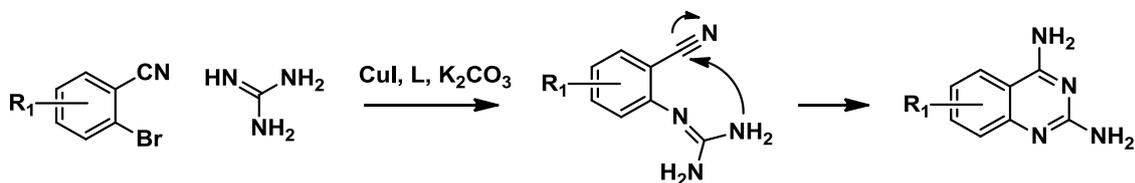


Abbildung 127: Kupfer-katalysierte Herstellung von 2,6-Diaminochinazolinen.

Auf diesem Weg konnte das 2,4,7-Triaminochinazolin **70** hergestellt werden. Ausgangsmaterial zur Herstellung von 2,4,7-Diaminochinazolin ist 4-Nitroanilin **238**. Eine Bromierung mit Bu_4NBr_3 führte in sehr guten Ausbeuten zur Bildung von 2-Brom-4-nitroanilin **239**. Die Einführung der Cyanogruppe erfolgt über eine Sandmeyer Reaktion. In der Literatur wird ein Verfahren beschrieben, bei dem eine salzsaure Diazoniumlösung in eine Vorlage mit Kaliumcyanidlösung getropft wird. Da es bei dieser Methode zur Freisetzung von Blausäure kommt, entschied man sich, das Diazoniumsalz als BF_4^- Salz zu isolieren und als Feststoff zu der Kaliumcyanidlösung zuzugeben. Da Diazoniumsalze in fester Form potentiell explosiv sein können, wurde eine Ansatzgröße von 5 mmol nicht überschritten und die Verbindung stets auf 0°C gekühlt. Die kupferkatalysierte Sandmeyer Reaktion erfolgte unter reger Stickstoffentwicklung, ohne dass ein kritischer Abfall des pH Wertes zu beobachten war.

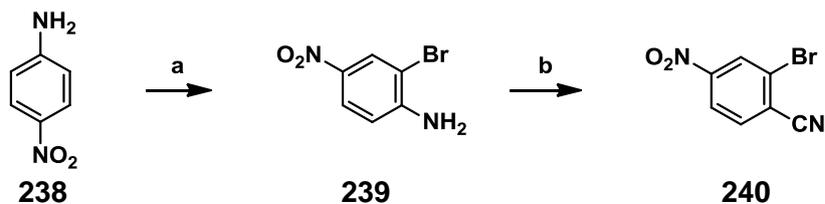


Abbildung 128: a) Bu_4NBr_3 , DCM, MeOH, 0,5 h, rt. 90 %; b) i) NaNO_2 , CH_3CN , H_2O , HBF_4 ii) KCN , CuCN , 1 h, rt., 57 %.

Die kupferkatalysierte Diaminochinazolinsynthese verlief wie von Yang et al. beschrieben, mit guten Ausbeuten.^[216] Die gefolgte palladiumkatalysierte Hydrierung der Nitrogruppe führte schließlich zu 2,4,7-Diaminochinazolin **70**. Diese Verbindung ist an Luft leicht zersetzlich und nur in protonierter Form (z.B. als Hydrochlorid) lagerfähig.

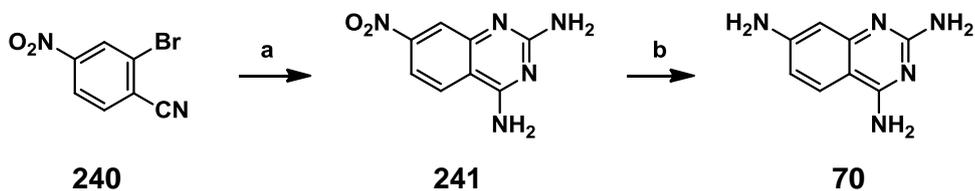


Abbildung 129: a) Guanidin, CuI , DMEDA, K_2CO_3 , DMF, 12 h, 80 °C, 84 %; b) H_2 , Pd/C, MeOH, rt, 18 h, 86 %.

8.6 1-Aminoisochinoline

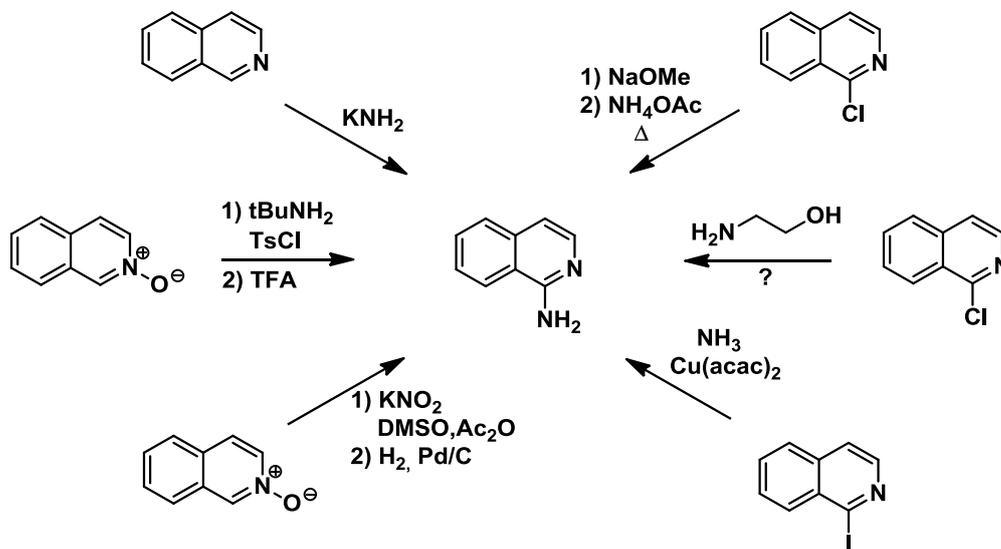


Abbildung 130: Synthesewege zu 1-Aminoisochinolin.

Erste historische Berichte zur Synthese von 1-Aminoisochinolin beschrieben ein Verfahren, in dem man Isochinolin mit Kaliumamid in verschiedenen aromatischen Kohlenwasserstoffen umsetzte^[217]

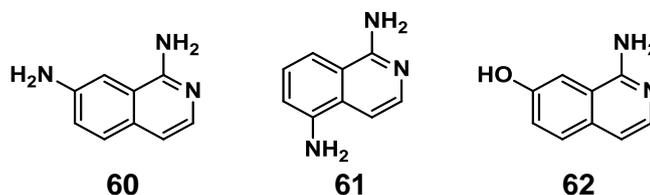
Bei anderen Syntheserouten stellt man zunächst das 1-Chlorisochinolin her und substituiert mit Aminen oder schrittweise zunächst mit Natriummethoxid gefolgt von Ammoniak in einer Ammoniumacetatschmelze.

Weiterhin lassen sich 1-Iodisochinoline kupferkatalysiert in 1-Aminoisochinoline überführen. Auch palladiumkatalysierte Aminolysen sind beschrieben, bei denen auch 1-Chlorisochinolin als Ausgangsmaterial verwendet werden kann.^[218]

Eine andere erwähnenswerte Methode beschreibt eine direkte Nitrierung an der 1-Position unter Pfitzner-Moffatt Bedingungen. Dabei greift ein Nitrit als Nucleophil an dem aktivierten Isochinolin-N-oxid an. Nach Hydrierung der Nitrogruppe erhält man das 1-Aminoisochinolin mit relativ geringem präparativen Aufwand.^[219, 220]

Jingjun Yin et al. entwickelte ein Verfahren in dem eine Reihe von Pyridinen, Chinolin- und Isochinolinverbindungen über ihr N-Oxid mit Tosylchlorid und tert-Butylamin in ortho Position aminiert werden konnten. Nach Abspaltung der säurelabilen tert-Butylgruppe erhielt man in moderaten bis sehr guten Ausbeuten 1-Aminopyridine, 2-Aminoquinoline sowie 1-Aminoisochinoline.^[221]

Für die vorliegende Arbeit waren die Isochinoline **60**, **61** und **62** von besonderem Interesse und konnten auf Grundlage der hier beschriebenen Methoden hergestellt werden.



1,7-Diaminoisochinolin

Das 1,7-Diaminoisochinolin wurde nach einer Patentvorschrift in einem leicht abgeänderten Verfahren hergestellt.^[222] Schwachstellen in der patentierten Synthese sind zunächst die zeitaufwendige und wenig ergiebige Aromatisierung des Tetrahydroisochinolins **243**. Mit einer Reaktionszeit von 7 Tagen und 46 % Ausbeute (55 % Lit.) besteht aufgrund der geringen Effizienz Optimierungsbedarf. Es wurden hierfür diverse Oxidationsmittel herangezogen und Reaktionsbedingungen variiert, wobei man beobachten konnte, dass die Umsetzung mit Iod bei hohen Temperaturen schon bei 12 Stunden Reaktionszeit gute Ergebnisse lieferte (siehe **Tabelle 10**).

Tabelle 10: Optimierung der Aromatisierung von Tetrahydroisochinolin.

	Reagenzien	Zeit	Temperatur	Ausbeute
1	243 , HgCl ₂ , HOAc	3 h	110 °C	7 %
2	243 , Fremy-Salz, Na ₂ CO ₃ , H ₂ O	7 d	rt.	46 %
3	243 , I ₂ , KOAc, EtOH	18 h	80 °C	20 %
4	243 , I ₂ , KOAc, DMF	12 h	150 °C	68 %

Den zweiten problematischen Schritt stellt die Chlorierung des Isochinolins an Position 1 dar, die mit einer sehr schlechten Ausbeute von 16 % (14 % Lit.) das eigentliche Manko der Synthese darstellt. In diesem Verfahren bildet man zunächst das N-Oxid mit mCPBA und erhält eine elektrophilere Stelle an C1. Dieser Schritt verläuft quantitativ ab, jedoch führt die Umsetzung mit POCl₃ in Toluol hauptsächlich zur Zersetzung der Verbindung. Eine Optimierung dieses Schrittes, durch Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur und Reagenzien: Ts-Cl, PCI₅), konnte nicht erreicht werden. Auch die in der

Literatur beschriebene Methode zur direkten Nitrierung an der 1-Position unter Pfitzner-Moffatt Bedingungen führte nicht zum gewünschten Produkt.^[219, 220]

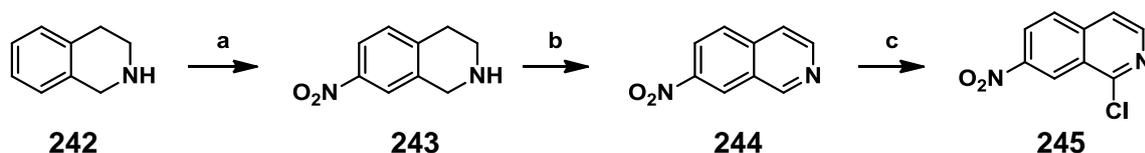


Abbildung 131: a) HNO₃, H₂SO₄, 2 h, 5 °C 32 %; b) I₂ (3 eq.), KOAc (5 eq.), DMF, 12 h, 140 °C, 68 %; c) i) mCPBA (1.5 eq.), CHCl₃, 24 h, rt., quant. ii) POCl₃ (2.6 eq.), Toluol, 90 °C, 2 h, 16 %.

Im weiteren Syntheseverlauf hielt man sich an die patentierte Synthesevorschrift und erhielt das gewünschte Produkt **60** in 50 %-iger Ausbeute über 3 Schritte hinweg.

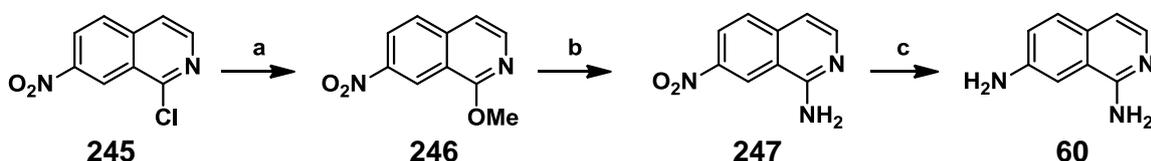


Abbildung 132: a) NaOMe (2 eq.), MeOH, 2 h, reflux, 79 %; b) NH₄OAc, 4 h, 140 °C, 69 %; c) Pd/C, MeOH, 4 h, rt., 91 %.

1-Amino-7-hydroxyisochinolin

Das Ausgangsmaterial 7-Hydroxyisochinolin **248** konnte nach einer Anleitung von Kuczniarz et al. über eine Pomeranz-Fritsch Reaktion hergestellt werden.^[223] Da im Verlauf der Synthese eine Metallierung an C-1 Position durchgeführt werden sollte, wurde die acide Hydroxygruppe TBS geschützt. Dies gelang mit TBSCl und Imidazol in DMF. Eine Aminierungsmethode von Isochinolinen an der C-1 Position erfolgte in zwei Schritten. Zunächst deprotoniert man an das acide C-H und substituiert mit Iodid. Das 1-Iodoisochinolin **250** wird als nächstes über eine kupferkatalysierte aromatische Substitution mit Ammoniak und Abspaltung der Schutzgruppe zu dem Produkt **62** überführt.

Normalerweise werden für derartige Deprotonierungen Organolithium Reagentien oder Lithiumamide (R₂NLi) eingesetzt, die allerdings wegen ihrer hohen Reaktivität und starken Nucleophilie oft unerwünschte Nebenreaktionen verursachen (z.B. Tschitschibabin-Addition). Des Weiteren werden für die Deprotonierung aromatischer Substrate mit Lithiumbasen sehr niedrige Temperaturen benötigt (-78 °C), was die Reaktionsführung in größerem Maßstab erschwert.

Knochel et al. entwickelten hierfür kostengünstige, leicht lösliche Magnesiumbasen mit hoher kinetischer Aktivität. Durch die Zugabe von Lithiumchlorid zu Alkylmagnesiumchloriden entstehen hochaktive Reagenzien des Typs RMgCl_2Li und R_2MgClLi , die in Br/Mg-Austauschreaktionen viel schneller reagieren als die homoleptischen Reagenzien RMgX und R_2Mg ohne den Zusatz von Lithiumchlorid.^[224] Diese konnten auch erfolgreich für die hier vorgestellte Halogenierungsreaktion verwendet werden.

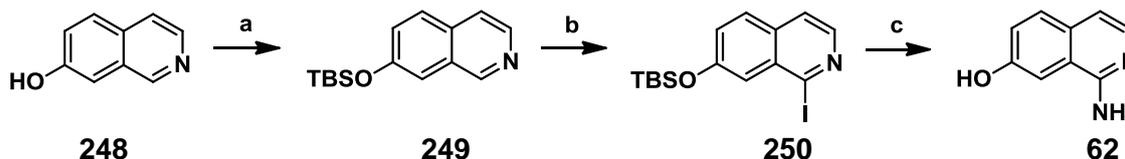


Abbildung 133: a) TBSCl (1.5 eq.), Im (1.5 eq.), DMF, 24 h, rt., 75 %; b) i) TMP-MgCl·LiCl (1.1 eq.), THF, 3 h, rt. ii) I₂ (1.1 eq.), THF, 30 min, rt., 61 %; c) NH₃·H₂O (32 %), Cu(acac)₂ (0.1 eq.), acac (0.4 eq.), Cs₂CO₃ (2 eq.), DMF, 2 h, 50 °C, 52 %.

Im letzten Schritt der Synthese gelang es, die Aminogruppe über eine Ullmann Aminierung einzuführen. Das hier eingesetzte Verfahren wurde von Ning Xia et al. entwickelt.^[225] Man arbeitet mit einem 2-Phasensystem, wobei die eigentliche Reaktion in der organischen Phase (DMF) abläuft und die wässrige Phase als Ammoniak Reservoir dient. Der Acetylaceton Ligand komplexiert das Kupfer und transportiert es in die organische Phase, in der die Metallierung des Aryliodids **250** und schließlich die Substitution mit Ammoniak stattfinden. Unter diesen basischen Reaktionsbedingungen kommt es gleichzeitig zur Abspaltung der Silylschutzgruppe, und man erhält nach chromatographischer Aufarbeitung die gewünschte Zielverbindung **62**.

1,5-Diaminoisochinolin

Bei der Synthese von 1,5-Diaminoisochinolin **61** entschied man sich, im ersten Schritt die Substitution mit dem Halogenid durchzuführen. Für diese Reaktion wurde der kostengünstigere Magnesium Diisopropylamid LiCl-Komplex verwendet, der eine deutlich geringere Ausbeute als das TMP-MgCl·LiCl Reagenz lieferte. Die anschließende Nitrierung gelang recht selektiv an der 5-Position. Schließlich erfolgte auch hier eine kupferkatalysierte Aminierung mit moderaten Ausbeuten. Die Reduktion der Nitrogruppe konnte in der finalen Stufe nahezu quantitativ durchgeführt werden.

als weiche Lewisäure Kupfersulfat zum Einsatz, allerdings mit etwas schlechteren Ausbeuten.^[228]

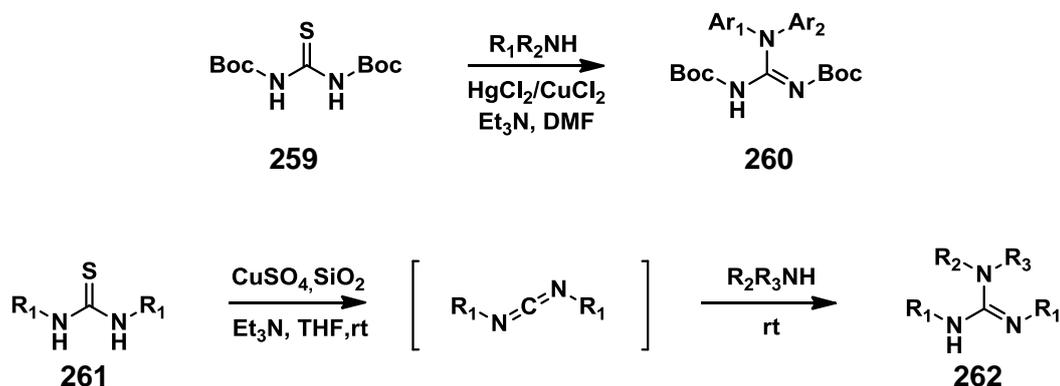


Abbildung 136: Guanidinherstellung aus Thioharnstoffen.

Weiterhin erwähnenswert ist ein Verfahren, bei dem Mukaiyama's Reagenz zur Aktivierung von Thioharnstoffen dient. Hiermit lassen sich durch Optimierung der Reaktionsbedingungen vor allem elektronenreiche Arylamine erfolgreich umsetzen.^[229]

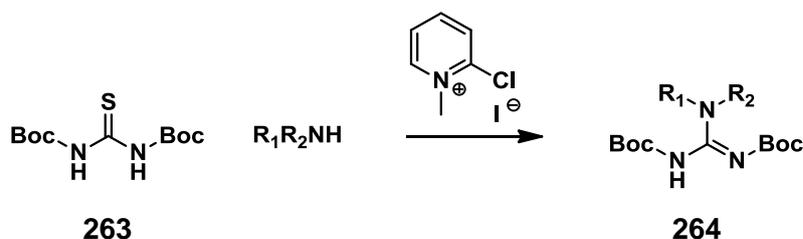


Abbildung 137: Aktivierung von Thioharnstoff mit Mukaiyama's Reagenz.

Thioharnstoffe werden in Methylisothioharnstoffe überführt, die sich mit starken Amino-Nucleophilen zu CH₃-SH substituieren werden, wobei man das entsprechende Guanidin in moderaten Ausbeuten erhält. Nur unter Zusatz von Quecksilber-(II)-salzen eignen sich auch weniger reaktive Arylamine als Ausgangsmaterial. Somit stellt dieses Verfahren keinen Vorteil gegenüber der klassischen Methode mit Thioharnstoff und Quecksilber(II)-chlorid dar.^[230]

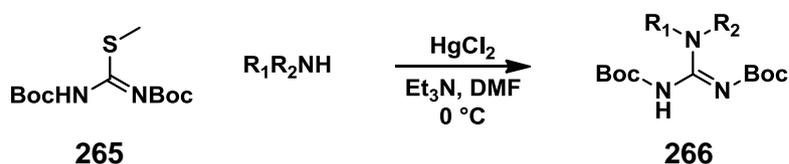


Abbildung 138: Guanidinsynthese über Methylisothioharnstoffe.

Aminoiminomethansulfon und -sulfinsäuren, die durch Oxidation von Thioharnstoff erhalten werden, sind ebenfalls nützliche Guanidierungsreagenzien. Sie kommen hauptsächlich bei der Herstellung von mehrfachsubstituierten Guanidinderivaten mit sterisch anspruchsvollen Resten zum Einsatz.^[231, 232, 233, 234]

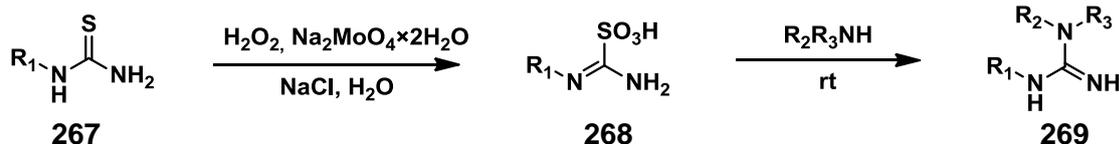


Abbildung 139: Guanidinsynthese über Oxidation von Thioharnstoffen.

Guanidierungsreaktionen mit Pyrazol-1-carboximidamid sind bereits seit langem bekannt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass elektronenziehende Gruppen am Pyrazolring die Reaktivität des Reagenzes erhöhen. So kann auch Bis-Boc-4-nitropyrazol-1-carboximidamid **272** zur Herstellung von geschützten Guanidinen verwendet werden. Die Nitrogruppe an Position 4 im Pyrazolring erhöht die Reaktivität und ergibt bessere Ausbeuten.^[235]

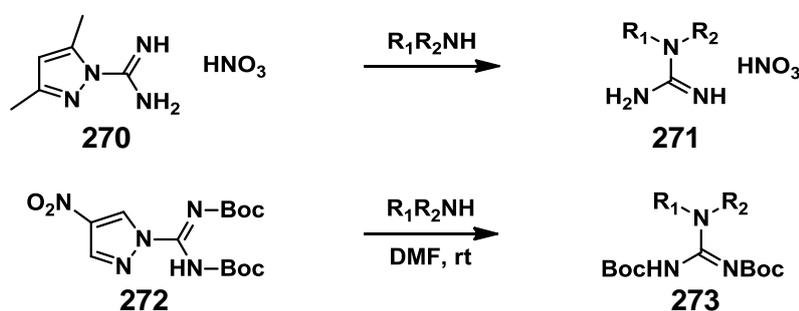


Abbildung 140: Pyrazol-1-carboximidamide als Guanidierungsreagenzien.

Es eignen sich auch andere heterocyclische Verbindungen, wie Benzotriazol- und Imidazolderivate, zur Herstellung von aktivierten Carboximidamiden. Durch Einführung einer Nitrogruppe erhält man auch hier höhere Reaktivitäten, die es ermöglichen, aromatische Amine erfolgreich umzusetzen.



Abbildung 141: Benzotriazol-Carboximidamid als Guanidierungsreagenz.

Schließlich sind noch Triflylguanidine zu erwähnen, die in der Literatur erstmals 1998 von Feichtinger et al. beschrieben wurden. Diese entwickelten sich daraufhin zu beliebten Guanidierungsreagenzien, die speziell auch zur Synthese von Bis-Carbamat-geschützten Guanidinen **277** einsetzbar sind.^[236]

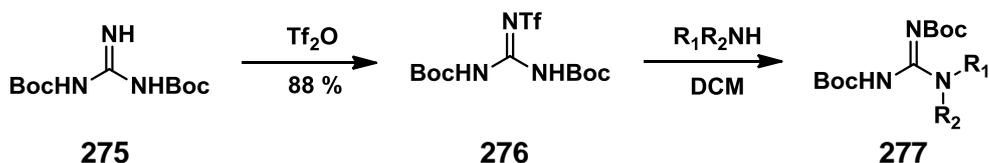
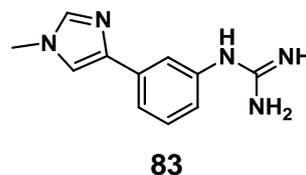
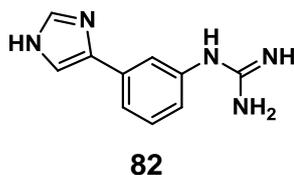
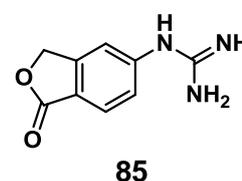
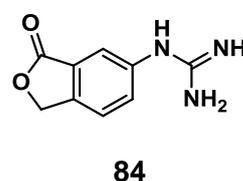
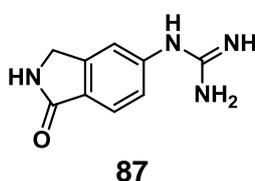
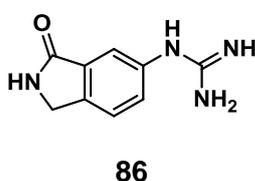


Abbildung 142: Bis-Boc Triflylguanidin als Guanidierungsreagenz.

Die Herstellung der hier benötigten arylsubstituierten Guanidine, ausgehend von den entsprechenden Anilinderivaten, gestaltete sich aufgrund ihrer geringen Nucleophilie als problematisch. Der Einsatz von Cyanamid und Pyrazol-1-carboximidamid ergab keinen messbaren Umsatz, sodass sehr reaktive Guanidierungsreagenzien verwendet werden mussten. Es hat sich herausgestellt, dass die HgCl_2 Aktivierung von Bis-Boc-Thioharnstoff zu den besten Ergebnissen führt. Die Edukte für diese Reaktion sind auf effizientem Weg zugänglich, Nebenprodukte lassen sich leicht abtrennen, und man erhält chromatographierbare Produkte, die sich problemlos in ihre freien Guanidinanaloga überführen lassen.



Zur Darstellung von **86** nutzte man Phthalimid als Ausgangsmaterial, das durch Reduktion einer Carbonylgruppe zu Isoindolin-1-on **279** überführt werden konnte. Am effizientesten hat sich ein Verfahren herausgestellt, bei dem zunächst das Edukt mit Natriumborhydrid behandelt und anschließend in einem weiteren Reduktionsschritt mit Zinn in HCl/HOAc reduziert wird. Zur Aufarbeitung ließ sich das Rohprodukt problemlos umkristallisieren, sodass man auf diesem Wege Isoindolin-1-on in großen Maßstab darstellen konnte. Im nächsten Schritt wurde zunächst nach einer Literaturvorschrift^[237] der Stickstoff des Laktams nitrosyliert und daraufhin das Zwischenprodukt mit KNO_3 und konz. H_2SO_4 nitriert. Da dieses Verfahren zu potentiell stark toxischen Verbindungen führen könnte, versuchte man eine direkte Nitrierung mit rauchender Salpetersäure bei 0°C . Dabei entstand das 2,6-Dinitroisoindolin-1-on **180** als gelbes kristallines Material allerdings nur mit schlechter Ausbeute. Durch Hydrierung mit RaNi bei Raumtemperatur und Normaldruck wurde die Nitrogruppe und gleichzeitig die labile N-N Bindung reduziert und man erhielt die gewünschte Aminoverbindung **281**.

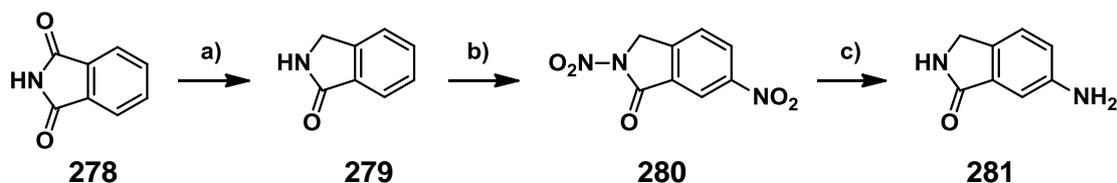


Abbildung 143: a) i) NaBH_4 , MeOH; rt. 3 h ii) Sn , HCl, HOAc; 5 h, 80°C , 53 %; b) HNO_3 , H_2SO_4 , 2 h, rt. 25 %; c) H_2 , Pd/C, MeOH, rt. 18 h, 53 %.

Die erhaltene Aminoverbindung wurde mit Bis-Boc-Thioharnstoff und HgCl_2 in die Bis-Boc-Guanidinverbindung **282** überführt, daraufhin mit HCl behandelt, wobei die Zielverbindung **86** in einer Ausbeute von 32 % über die letzten beiden Schritte erhalten wurde.

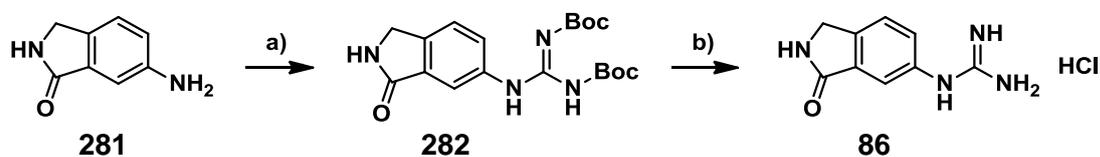


Abbildung 144: a) $(\text{BocNH})_2\text{CS}$, HgCl_2 , DIPEA, DMF, $-10 - 20^\circ\text{C}$; 67 %; b) HCl, Dioxan, rt., 48 %.

Die Synthese der isomeren Verbindung **87** gestaltete sich etwas aufwendiger. Zwar findet man in der Literatur^[238] eine Herstellungsmethode, ausgehend von 2-Methyl-4-nitrobenzoesäureethylester über Seitenkettenbromierung und anschließende Substitution mit Ammoniak, gefolgt von einer intramolekularen Aminolyse. Trotzdem wurde eine deutlich kostengünstigere Methode mit Phthalimid als Ausgangsmaterial entwickelt. Nach Einführung der Nitrogruppe erfolgte die Reduktion der Carbonylgruppe mit Natriumborhydrid. Bei Temperaturen unter -10°C bildet sich das Produkt **284** als Minderkomponente, im Verhältnis 1:3 zu seinem Isomer. Bei höheren Temperaturen erhält man zumindest ein 1:1 Isomergemisch, dass dieses Verfahren sinnvoll erscheinen lässt, zumal die oben beschriebene Verbindung **281** auch über diesen Weg gewonnen werden kann. Eine Isolation des racemischen Gemisches aus **284** kann durch mehrfache Umkristallisation erreicht werden. Schließlich erfolgt die Reduktion des N,O-Halbacetals und der Nitrogruppe mit Zinn HCl/HOAc zu dem Laktam **285**. Versuche, die C3-Carbonylgruppe des 5-Aminophthalimids mit LiBH_4 , LAH, DIBAH oder durch Hydrierung selektiv zu reduzieren sind fehlgeschlagen.

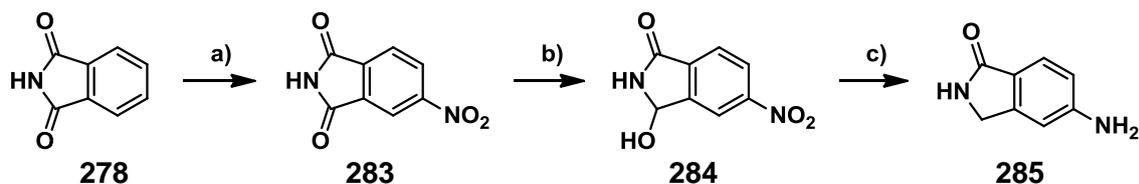


Abbildung 145: a) HNO_3 , H_2SO_4 , rt. 2 h, 64 %; b) NaBH_4 , MeOH, THF, 20°C ; 38 %; c) Sn , HCl, HOAc, 18 h, 90°C , 84 %.

Die Herstellung des Guanidins erfolgte, wie bei der isomeren Verbindung **86**, mittels Bis-Boc-Thioharnstoff und HgCl_2 in ähnlich guten Ausbeuten.

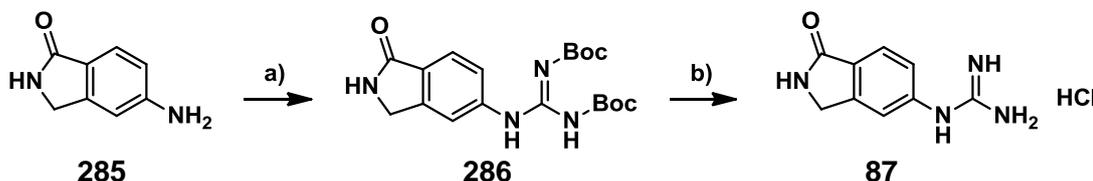


Abbildung 146: a) $(\text{BocNH})_2\text{CS}$, HgCl_2 , DIPEA, DMF, $-10 - 20^\circ\text{C}$; 71 %; b) HCl, Dioxan, rt., 63 %.

Aus einer weiteren Strukturklasse der Gruppe der Arylguanidine stammen das 6-Guanidinophthalid **84** und das isomere 5-Guanidinophthalid **85**. Ersteres lässt sich über eine Nitrierung von Phthalid herstellen. Dabei bildet sich mit hoher Selektivität das 6-Nitrophthalid **288**, das durch Umkristallisation isomerenrein isolierbar war. Nach Hydrierung der Nitrogruppe mittels Pd/C in einer Wasserstoffatmosphäre erhielt man 6-Aminophthalid **289** in guter Ausbeute.

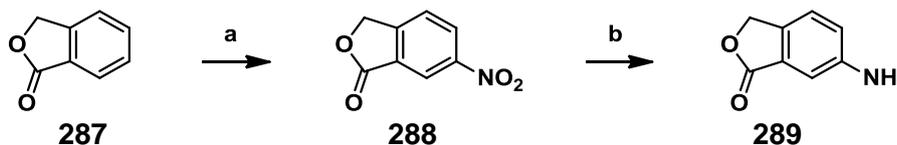


Abbildung 147: a) HNO_3 , H_2SO_4 , $0 - 20^\circ\text{C}$, 2 h, 68 %; b) H_2 , Pd/C, MeOH, rt. 18 h, 71 %.

Die Herstellung des Guanidins wurde analog zu den oben beschriebenen Guanidino-phthalamid Liganden durchgeführt:

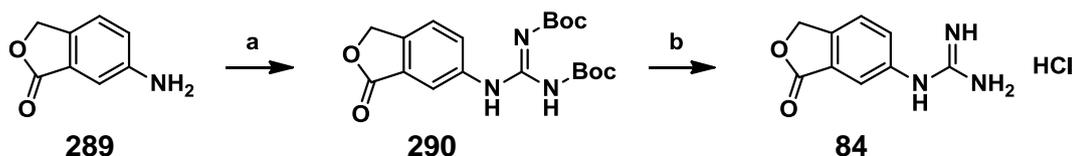


Abbildung 148: a) $(\text{BocNH})_2\text{CS}$, HgCl_2 , DIPEA, DMF, $-10 - 20^\circ\text{C}$; 76 %; b) HCl, Dioxan, rt., 60 %.

Als Ausgangsmaterial zur Synthese von 5-Guanidinophthalid wurde 5-Nitrophthalamid **283** eingesetzt. Nach heterogener Hydrierung mit RaNi in einer Wasserstoffatmosphäre erhielt man 6-Aminophthalamid **191** in guten Ausbeuten. Nach einer Vorschrift von Yang et al. konnte selektiv die elektronenärmere Carbonylgruppe reduziert werden.^[239] Durch Einsatz einer konzentrierten Natronlauge wird bei diesem Verfahren zunächst das Phthalamid zum Dicarboxylat hydrolysiert. Als Reduktionsmittel dient Zink, das durch eine katalytische Menge Kupfer(II)-sulfat aktiviert wird. Das so entstandene 4-Amino-2-(hydroxymethyl)benzoat cyclisiert nach Ansäuern auf $\text{pH}=1$ unter Bildung des Aminolaktons **292**.

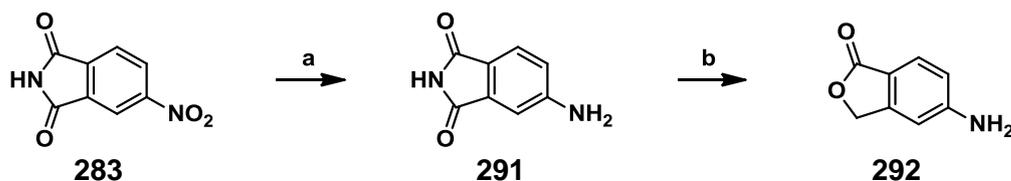


Abbildung 149: a) H₂, RaNi, MeOH, 3 h, rt., 77 %; b) Zn, NaOH, CuSO₄, H₂O, 18 h, 80 °C, 54 %.

Auch hier erfolgte die Guanidinsynthese über das Bis-Boc-Thioharnstoff/HgCl₂ Verfahren:

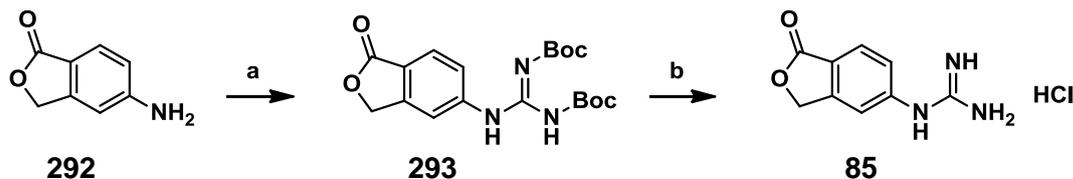


Abbildung 150: a) (BocNH)₂CS, HgCl₂, DIPEA, DMF, -10 - 20 °C; 71 %; b) HCl, Dioxan, rt., 60 %.

2-(3-(1H-Imidazol-4-yl)phenyl)guanidin

Eine literaturbekannte Synthesevorschrift^[240] von Griffin et al. wurde herangezogen, um 3-Nitro-(1H-imidazol-4-yl)benzol **296** zu gewinnen. Zunächst führt man hierbei eine Bromierung der Methylgruppe durch und setzt das Brom-3-nitroacetophenon **295** mit Formamid unter Bildung des Imidazols um. Schließlich konnte die Nitrogruppe hydrogenolytisch in ein Amin überführt werden.

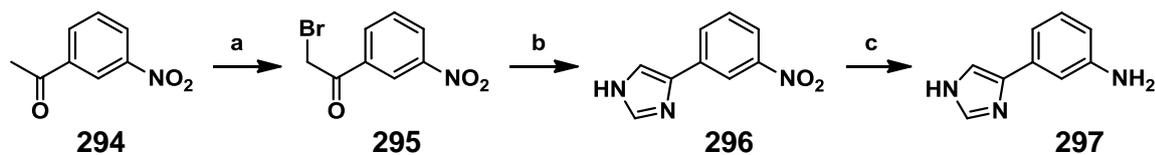


Abbildung 151: a) Br₂, AlCl₃; Et₂O, 0 °C; b) Formamid, 1 h, 190 °C, 65 %; c) H₂, Pd/C, MeOH, 18 h, rt.^[241]

Die erfolgreichste Guanidierungsmethode war auch hier wieder das Verfahren mit Bis-Boc-Thioharnstoff und Quecksilberchlorid. Guanidierungsversuche mit Dimethylpyrazol-1-carboximidamid **270** führten zu keinem nennenswerten Umsatz.

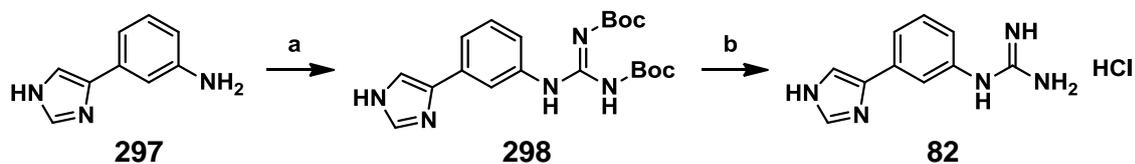


Abbildung 152: a) (BocNH)₂CS, HgCl₂, DIPEA, DMF, -10 - 20 °C; b) HCl, Dioxan, rt.^[241]

Das N-Methylimidazolderivat **83** war ebenfalls von Interesse, da die Möglichkeit, am Imidazol einen Linker anzubringen, untersucht werden sollte. Dazu wurde das 3-Nitro-(1H-imidazol-4-yl)benzol **296** mit Methyljodid bei möglichst niedrigen Temperaturen methyliert, um das kinetische Produkt zu erhalten. Es entstand bei dieser Reaktion ein 5:1 Verhältnis zwischen dem gewünschten 3-Nitro-(1-methylimidazol-4-yl)benzol **299** und dem sterisch ungünstigeren 3-Nitro-(3-methylimidazol-4-yl)benzol.

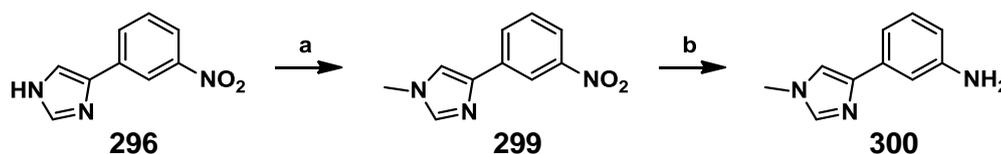


Abbildung 153: a) NaH, CH₃I, 18 h, 0 - 20 °C, 76 %; b) H₂, Pd/C, MeOH, 18 h, rt. 89 %.

Die Herstellung des Guanidins erfolgte hierbei mittels Bis-Boc-Thioharnstoff und dem weniger toxischen Silbernitrat in guten Ausbeuten 65 %.

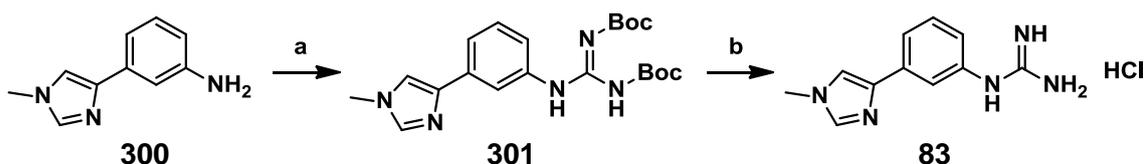


Abbildung 154: a) (BocNH)₂CS, AgNO₃, DIPEA, DMF, -10 - 20 °C; 65 %; b) HCl, Dioxan, rt., 80 %.

8.8 Peptidsynthese

Die Herstellung der cyclischen Peptide nach Robinson et al. erfolgte hier im leicht abgewandelten Verfahren.^[242] In Kooperation mit AK Schwalbe wurden am Peptidsynthesizer an 2-Chlorotrityl Harz mittels Fmoc-Strategie die linearen 14-mer Peptidstränge synthetisiert. Man verwendete hierbei Pbf-geschützte Arginin-, Boc-geschützte Lysin- sowie tert-Butyl-geschützte Threoninbausteine, die mit 95 %er TFA Lösung abspaltbar sind. Nach Festphasensynthese wurde Fmoc abgespalten und die geschützten Peptide über HPLC aufgereinigt.

Für die Cyclisierung verwendete man HATU/DIPEA im 5-fachen Überschuss als Kupplungsreagenz. Um eine Pseudoverdünnung zu erreichen wurde das lineare Peptid mittels Autoinjektor über einen Zeitraum von 4 Stunden langsam zu dem Kupplungsreagenz hinzugegeben. Hierdurch wird eine intermolekulare Kopplung zweier Peptidstränge vermieden.

Schließlich wurden die Schutzgruppen mit 95 % TFA Lösung entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC isoliert.

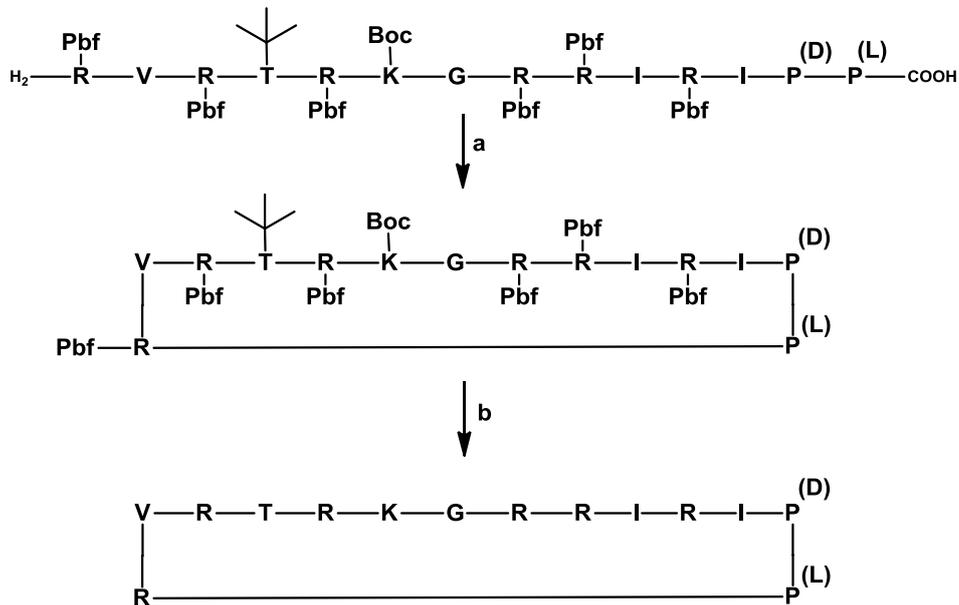


Abbildung 155: Synthese von L-22: a) HATU, DIPEA, DMF, rt, 18h; b) TFA, TIPS, H₂O (5:2.5:2.5), rt.

Auf demselben Wege wurde auch das L-22 (R3L) Peptid synthetisiert. Hierbei wurde das Arginin auf Position-3 durch ein Glycin substituiert.

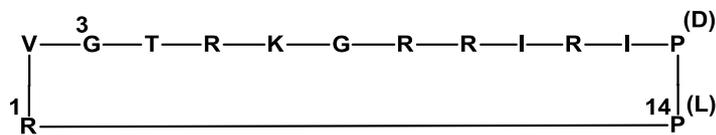
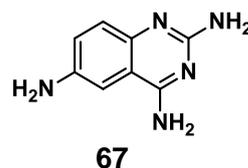
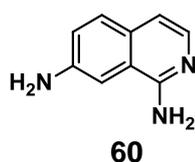


Abbildung 156: Struktur von L-22 (R3L)

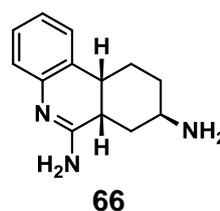
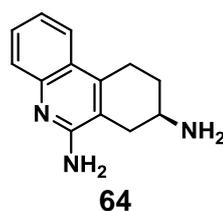
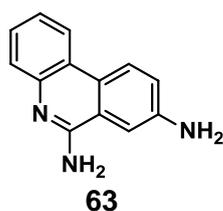
9. Zusammenfassung

Im Rahmen eines Ligandenscreenings, das nicht auf Strukturmodellen beruht, wurde zunächst die Untersuchung auf guanidinhaltige Verbindungen beschränkt. Durch systematische Selektion und Derivatisierung aktiver Spezies konnten strukturelle Gemeinsamkeiten affiner TAR-Liganden gefunden werden, so dass eine vorläufige Leitstruktur **60** (IC_{50} : 150 μ M) für die weitere Ligandenentwicklung erstellt werden konnte.



In Kooperation mit AK Schwalbe wurden eine Reihe von 1D-NMR Titrationsexperimenten der vielversprechendsten Liganden durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse konnten die Bindungsstellen dieser Liganden an TAR lokalisiert werden. Ein besonders interessanter Vertreter aus dieser Versuchsreihe ist das 2,4,6-Triaminochinazolin **67** (IC_{50} : 40 μ M). Dieses zeigte, neben einem intermediären Austausch in der *bulge* Region, als einzige der hier vermessenen Verbindungen, einen langsamen Austausch unterhalb des *loops* und im *stem* Bereich der RNA, wobei sich eine 2:1 Stöchiometrie einstellte.

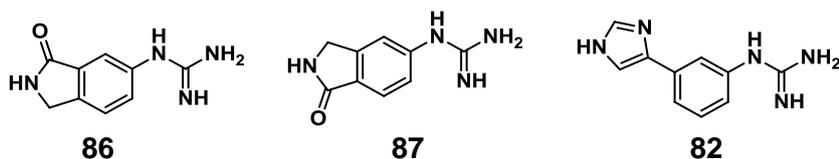
Über eine Erweiterung der Grundstruktur des Diaminoisochinolins **60** durch Annelierung eines weiteren Rings gelangte man zu der Gruppe der Phenanthridine. Da Polyaromaten sowie aromatische Aminoverbindungen potenzielle Zellgifte darstellen, untersuchte man in diesem Zusammenhang eine Reihe von partialhydrierten Analoga, wobei das 6,8-Diaminophenanthridin **63** zwar hoch affin (IC_{50} : 15 μ M), aber gleichzeitig stark cytotoxische Eigenschaften (CC_{50} : 1,5 μ g/ml) zeigte, beobachtete man im Fluoreszenzassay für das Tetrahydrodaminophenanthridin **64** eine deutliche Abnahme der Aktivität (IC_{50} : 300 μ M). Jedoch konnte im Zellassay eine antivirale Wirkung (IC_{50} HIV-1: 2,6 μ g/ml) bei etwas geringerer Toxizität (CC_{50} : 9,1 μ g/ml) festgestellt werden. Bei Hexahydro-6,8-diaminophenanthridin **66** (IC_{50} : 500 μ M) wurden hingegen nur geringe toxische Eigenschaften gemessen (CC_{50} : 59 μ g/ml), aber eine HIV inhibierende Wirkung ließ sich nicht eindeutig nachweisen.



Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass mittels eines dynamischen Ligandenscreenings, ohne Berücksichtigung von Strukturmodellen, in wenigen Optimierungscyclen, Liganden mit hoher Affinität identifiziert und entwickelt werden konnten.

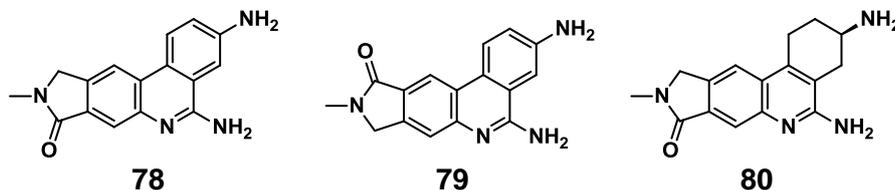
Zur Validierung der erstellten Bindungsmodelle und Diskussion der bisherigen Ergebnisse aus den Affinitätsmessungen, verwendete man ein computergestütztes Verfahren zur Bestimmung der Bindungsenergien in der simulierten Bindungsumgebung. Die Ergebnisse des molecular modeling wurden weiterhin einer Plausibilitätsprüfung unterzogen, bei der die berechneten Bindungsenergien mit den Resultaten aus dem Fluoreszenzassay und den 1D-NMR Titrationsen, in Einklang gebracht werden sollten. Das Ergebnis dieser Studie fiel überraschend gut aus. Tatsächlich konnte bei G26-Bulgebindern in den meisten Fällen eine Korrelation der gemessenen Affinitäten mit den berechneten Bindungsenergien gefunden werden.

Ausgehend von den Bindungsmodellen wurde der Versuch unternommen, durch eine zusätzliche Adressierung von C39 über einen Wasserstoffbrückenakzeptor, eine Affinitäts- und Selektivitätssteigerung zu erreichen. Eine Annelierung von Laktamen und Laktonen an das flexible Phenylguanidingerüst erbrachte zwar einen Affinitätsgewinn, jedoch wurde bei den isomeren Verbindungen **86** und **87**, eine identische Bindungsstärke gemessen. Auch das Imidazolylphenylguanidin **82** zeigte eine deutlich höhere Affinität als Phenylguanidin, jedoch nur in zweifach protonierter Form. Daher ist die gezielte Adressierung von C39 durch diesen Liganden eher unwahrscheinlich.

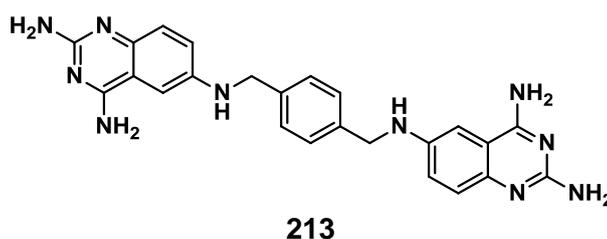


Zu diesen Negativergebnissen kam man auch durch in-silico Berechnungen. Doch diese prognostizierten für die starren Diaminophenanthridin- und Diaminotetrahydrophenanthridinlaktame höhere Bindungsenergien. Tatsächlich ermittelte man für das Diaminophenanthridinlaktam **78** einen IC_{50} von 10 μ M. Jedoch zeigte die isomere Verbindung **79** ohne erreichbaren H-Brückenakzeptor die gleiche Bindungsaffinität. Dies führte zum Schluss, dass es sich hierbei um starke Interkalationen handelt, die unselektiv an die RNA binden. Das Tetrahydro-6,8-diaminophenanthridinlaktam **80** ist ein deutlich schlechterer Interkalator und zeigt trotzdem gute Bindungsaffinitäten im Fluoreszenzassay (IC_{50} : 45 μ M). Zudem konnte durch NMR Experimente gezeigt werden, dass nur im *bulge* Bereich ein intermediärer Austausch zu beobachten ist. Bei 6,8-

Diaminophenanthridin hingegen konnte keine Verschiebung im *bulge* Bereich beobachtet werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Selektivitätssteigerung durch das Anbringen des zusätzlichen H-Brückenakzeptors erreicht wurde.



Zur weiteren Affinitäts- und Selektivitätssteigerung, wurde der Versuch unternommen, zwei Bindungsstellen simultan zu adressieren. Dies ließe sich durch Verknüpfung monomerer Bausteine über einen passgenauen Linker erreichen. Da durch NMR Experimente gezeigt werden konnte, dass 2,4,6-Triaminochinazolin als einziger der hier untersuchten Liganden im langsamen Austausch mit zwei TAR Regionen steht, entwickelte man mit diesem Baustein Dimere mit unterschiedlichen Linkerlängen im Bereich von 7 Å - 16,5 Å. Hierbei konnte N⁶,N^{6'}-(1,4-phenylenbis(methylen))-bis(chinazolin-2,4,6-triamin) **213** als hoch affiner TAR-Ligand, mit einem IC₅₀ von 150 nM, identifiziert werden. Der hierfür eingesetzte Spacer fixiert die heteroaromatischen Bausteine in einem Abstand von 7 Å, was der Distanz zweier aufeinanderfolgender Basenpaaren entspricht. Somit ist eine simultane Adressierung des unteren *loop*-Bereiches mit der *bulge* Region denkbar, wie es auch bei dimeren Liganden, wie rbt203, zu finden ist.



10. Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnten mehrere hoch affine Liganden gefunden werden, die unterschiedliche Regionen der RNA adressieren, wie durch NMR Titrationsexperimente verdeutlicht werden konnte. Kombiniert man Verbindungen mit erhöhter Präferenz zum *bulge* Bereich mit Liganden, die an der *loop* oder *stem* Region interagieren, mit einem exakt angepassten Linker, so sollte es gelingen, nicht nur einen

besonders affinen, sondern auch einen selektiven TAR Liganden zu entwickeln. Dazu wären Kombinationen aus GC-Basenpaar erkennenden *bulge* Bindern, wie das Tetrahydrophenanthridin **rac-80** und das im loop Bereich bindende 2,4,6-Triaminochinazolin **67**, von besonderem Interesse.

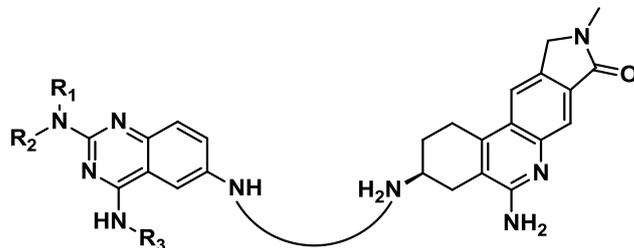


Abbildung 157: Kombination zweier Liganden mit unterschiedlichen Bindungsregionen, zur Steigerung der Selektivität.

Durch Methylierung der N² und N⁴ sollte sich die Toxizität des Bausteins 2,4,6-Triaminochinazolin reduzieren lassen. Zudem wäre durch Verringerung der Anzahl der H-Brückendonoren eine Steigerung der Selektivität zur Hauptbindungsstelle denkbar.

11. Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

NMR-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Geräte AM 250 (^1H : 250 MHz; ^{13}C : 62.9 MHz), AM 300 (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75.4 MHz) und AMX 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100.6 MHz) der Firma Bruker verwendet. Die Spektren werden über die Steuersoftware TopSpin der Firma Bruker aufgenommen; die Auswertung der Spektren erfolgt mit dem Programm MestreC. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben und auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen: DMSO- d_6 : $\delta = 2.50$ ppm; CDCl_3 - d_1 : $\delta = 7.26$ ppm. Die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die Feinstruktur der ^1H -Signale wird mit s für Singulett, bs für breites Singulett, d für Dublett, dd für Dublett von Dubletts, t für Triplett, q für Quartett, qn für Quintett, sx für Sextett und m für Multiplett angegeben. ^{13}C -Signale (δ) wurden Protonen-entkoppelt relativ zu CDCl_3 (t, 77.0 ppm), DMSO (Septett, 39.43 ppm) oder D_2O (s, 4.79 ppm) angegeben. Die für die Zuordnung relevanten Protonen sind kursiv abgebildet. Alle Messungen erfolgten bei 300 K.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Für die Aufnahme der FT-IR-Spektren wurden die Geräte PerkinElmer 1600 Series oder PerkinElmer UATR Two verwendet, Die Messungen wurden an KBr- Preßlingen bzw. ATR Diamantfenster mit der jeweiligen Substanz durchgeführt. Die Signale wurden auf ganze Zahlen gerundet und in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Die Bandenintensitäten werden mit s für strong, m für medium und w für weak gekennzeichnet.

Massenspektrometrie:

Für ESI-MS wird das Elektrospray-Gerät der Firma Fisons (VG Plattform II) und das nano-ESI Spektrometer von PerSeptive Biosystems (Mariner Biospectrometry Workstation) verwendet. Für MALDI-MS wurde das Gerät VG TOFSpec der Firma Fisons verwendet. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure. HRMS Spektren wurden mit dem Spektrometer von Thermo Scientific (MALDI LTQ Orbitrap) aufgenommen.

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heiztischmikroskop nach Kofler (unkorrigiert) und einer Schmelzpunktapparatur vom Typ 9200 der Firma Electrothermal.

Elementaranalyse:

Die Elementaranalysen wurden im Institut für Organische Chemie und chemische Biologie der Universität Frankfurt mit dem Gerät Heraeus CHN Rapid und Vario MICRO cube erstellt. Die Angaben erfolgten in Prozent (%).

Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F254 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke). Die Laufstrecke betrug 3.5 - 4.5 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda (Typ NU-6KL) bei Wellenlängen von 254 nm bzw. 366 nm sichtbar gemacht. Als Färbereagenz für Reduktionsmittel wurde Kaliumpermanganat-Lösung (3.00 g KMnO_4 , 20.0 g K_2CO_3 in 300 ml dest. Wasser + 5 ml 5 %iger NaOH-Lösung) verwendet. Alternativ setzte man eine Ceriumammoniummolybdat-Lösung (CAM) ein (40 g Ammoniumpentamolybdat + 1.6 g Cer-(IV)-sulfat + 800 ml verdünnte Schwefelsäure (1:9 mit Wasser, v/v). Beim Erhitzen, blau-schwarze Flecken auf hellem Hintergrund). Als Färbereagenz für Amine wurde eine Ninhydrinlösung verwendet (3.75 g Ninhydrin in 25 ml Aceton und 25 ml n-Butanol), die sich in der Regel durch Erhitzen violett verfärbten. Zur universellen Anfärbung nicht-aromatischer Verbindungen wurde eine Iodkammer eingesetzt.

Präparative Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) der Firma Merck oder alternativ von der Firma Macherey Nagel verwendet.

Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Für die analytischen HPLC-Messungen wurden folgende Apparaturen verwendet: Apparatur 1: Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit, Jasco DG-980-50 Degaser, Jasco PU-980-HPLC-Pump, Jasco UV-975 UV/VIS-Detektor, Polymer Laboratories PL-ELS 1000, Dr. A. Maisch ReprosiPur C18-AQ RP Säule, Kipp&Zonen Zweikanalschreiber BD112, Merck-Hitachi D-2500 Chromato-Integrator. Apparatur 2: Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit, Jasco DG-980-50 Degaser, Jasco PU-980 HPLC-Pump und Jasco UV-970 UV/VIS-Detektor mit einer Merck LiChrospher 60 RP-select B (5 μm) Säule. Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software BorWin Version 1.22 von JMBS Developments.

Wasserfreie Lösungsmittel:

THF wurde direkt vor Gebrauch von Natrium/Benzophenon unter Argon abdestilliert. Alle anderen benötigten wasserfreien Lösungsmittel wurden als absolutierte Ware über Molsieb in Crowncap-Flaschen von der Firma Fluka gekauft und permanent unter Argon gelagert. Ethanol wurde von der Firma Roth gekauft.

Autoklav:

Roth Laborautoklav Modell 1, Reaktionsvolumen 100 ml, max. Betriebsdruck 100 bar, max. Betriebstemperatur 150 °C.

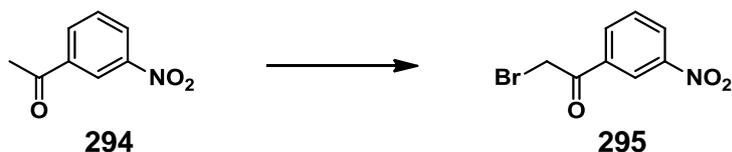
Kristallstrukturanalysen:

Die Kristallstrukturanalysen wurden im Institut für Organische Chemie und chemische Biologie der Universität Frankfurt an einem Siemens Smart Diffraktometer bei Temperaturen von -118 °C gemessen.

Fluoreszenztitrationen:

Die in vitro Messungen wurden in 96-well Platten der Firma Corning (schwarz, non-binding surface, Nr. 6860), sowie auf dem Gerät Safire2 der Firma Tecan bei 37 °C durchgeführt.

11.2 Synthese von 2-Brom-1-(3-nitrophenyl)ethanon 295:^[243]



Zu einer Lösung aus 5,00 g (30,3 mmol) 3-Nitroacetophenon in 30 ml Diethylether wurden 202 mg (1,51 mmol) Aluminiumtrichlorid zugesetzt. Man kühlte die Mischung auf 0 °C und tropfte langsam 1,55 ml (30,3 mmol) Brom in 10 ml Diethylether zu. Nach der Zugabe erwärmte man die Reaktionslösung auf Raumtemperatur und rührte 1 Stunde, wobei die orange Lösung sich vollständig entfärbte. Man fügte im Anschluss 100 ml dest. Wasser zu und extrahierte 3-mal mit 100 ml Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösemittel befreit. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhielt man 6,84 g (93 %) eines gelben kristallinen Feststoffs.

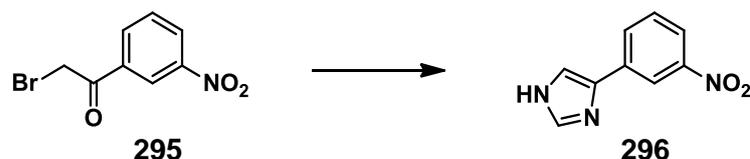
Smp.: 90-94 °C (Lit. 90-96 °C).^[243]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 8.78 (t, J = 1.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.45 (ddd, J = 8.2 Hz, J = 2.2 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.31 (dt, J = 7.8 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.73 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 4.49 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 189.3, 148.4, 135.1, 134.4, 130.2, 128.0, 123.7, 30.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3088 (w); 2943 (w); 1700 (m); 1610 (m); 1581 (w); 1525 (m); 1473 (m); 1437 (m); 1381 (m); 1351 (s); 1281 (m); 1201 (m); 1169 (m); 1104 (m); 1084 (m); 1023 (m); 998 (m); 958 (w); 926 (m); 873 (m); 816 (m); 785 (m); 734 (s); 669 (s); 620 (m); 559 (w); 537 (w); 469 (w).

Elementaranalyse (%) für C₈H₆BrNO₃ (189,17): C 39.37; H 2.48; N 5.74; gefunden: C 39.32; H 2.46; N 5.72.

11.3 Synthese von 4-(3-Nitrophenyl)-1H-imidazol 296:^[240]

Eine Lösung aus 5,00 g (20,5 mmol) 2-Brom-1-(3-nitrophenyl)ethanon in 100 ml Formamid wurde in einer Schutzgasatmosphäre auf 190 °C erhitzt. Dabei verfärbte sich die zuerst farblose Lösung dunkelorange. Nach einer Stunde Reaktionszeit, kühlte man die Mischung auf Raumtemperatur ab und versetzte sie mit 30 ml dest. Wasser, wobei sich die Lösung braun färbte und eine Schlierenbildung zu beobachten war. Die Lösung wurde auf eine kurze Ionenaustauschersäule (Dowex 50x8, strongly acidic) aufgetragen und mit dest. Wasser gewaschen. Im Anschluss neutralisierte man mit 100 ml 10 %iger Ammoniaklösung und eluierte schließlich das Rohprodukt mit 3 x 200 ml Methanol von der Säule. Nach Entfernung des Lösemittels am Rotationsverdampfer, wurde der braune Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet (NEt₃/MeOH/EE/n-Hexan 1:1:9:9). Man erhielt 2,53 g (65 %) eines bräunlichen Pulvers, das für die weiteren Synthesen nicht weiter aufgereinigt wurde. Eine kleine Probe wurde für analytische Zwecke aus Wasser umkristallisiert, wodurch gelbe Kristalle erhalten wurden.

Smp.: 223-225 °C (Lit. 223-224 °C).^[240]

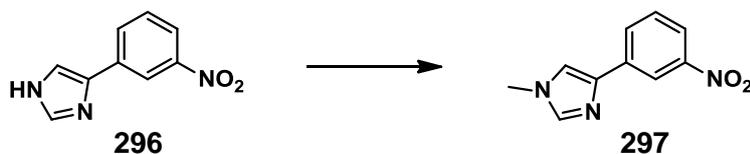
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.37 (br, 1H, NH); 8.57 (s, 1H, Ar-H); 8.21 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar-H); 8.03 (ddd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, $J = 0.7$ Hz, 1H, Ar-H); 7.89 (s, 1H, Ar-H); 7.79 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H, Ar-H); 7.64 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 148.3, 136.4, 130.3, 129.9, 120.3, 118.1, 114.4.

IR: $\tilde{\nu} = 2637$ (w); 1618 (w); 1518 (m); 1465 (m); 1343 (m); 1130 (w); 1062 (m); 968 (m); 913 (m); 885 (m); 866 (m); 824 (m); 795 (m); 782 (m); 736 (s); 691 (m); 666 (m); 653 (m); 621 (s); 453 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₇N₃O₂ (189,17): C 57.14; H 3.73; N 22.21; gefunden: C 56.81; H 3.76; N 22.28.

11.4 Synthese von 1-Methyl-4-(3-nitrophenyl)-1H-imidazol 297:



1,00 g (5,29 mmol) 4-(3-Nitrophenyl)-1H-imidazol wurde in 20 ml abs. THF gelöst und mit 254 mg (10,6 mmol) Natriumhydrid versetzt. Nachdem keine Gasentwicklung mehr zu erkennen war, wurde das Gemisch auf 0 °C abgekühlt und mit 496 μ l (7,93 mmol) Iodmethan versetzt. Man rührte 3 Stunden unter Eiskühlung und weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend destillierte man das Lösemittel ab und eluierte das Rohprodukt durch eine Kieselgelsäule (DCM/MeOH/n-Hexan 19:1:10). Man erhielt 820 mg (76 %) 1-Methyl-4-(3-nitrophenyl)-1H-imidazol als hellgelben Feststoff und 180 mg (17 %) des isomeren 1-Methyl-5-(3-nitrophenyl)-1H-imidazol.

Smp.: 100-101 °C.

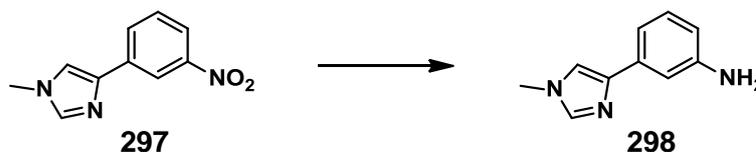
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 8.56 (t, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.12 (dt, J = 7.8 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.07 (ddd, J = 8.2 Hz, J = 2.2 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.53 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.51 (d, J = 0.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.31 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 3.77 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 148.2, 138.9, 138.3, 136.4, 130.1, 129.9, 120.4, 118.6, 118.0, 33.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2951 (w); 1716 (w); 1658 (w); 1619 (w); 1559 (m); 1520 (m); 1500 (m); 1411 (w); 1343 (s); 1312 (m); 1274 (m); 1228 (m); 1200 (m); 1102 (m); 1081 (m); 1051 (m); 995 (m); 956 (m); 889 (m); 868 (m); 830 (m); 815 (m); 761 (m); 736 (s); 695 (m); 683 (m); 676 (m); 645 (m); 617 (s); 528 (m); 467 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ (203,20): C 59.11; H 4.46; N 20.68; gefunden: C 59.17; H 4.50; N 20.86.

11.5 Synthese von 3-(1-Methyl-1H-imidazol-4-yl)anilin 298:



500 mg (2,46 mmol) 1-Methyl-4-(3-nitrophenyl)-1H-imidazol wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 50 mg Pd/C (10 %ig) versetzt. Man rührte das Gemisch in einer Wasserstoffatmosphäre 18 Stunden bei Raumtemperatur und filtrierte das Gemisch anschließend über Celite. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer, wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM/MeOH 19:1). Man erhielt 379 mg (89 %) eines braunen Feststoffes.

Smp.: 150-152 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.56 (s, 1H, Ar-H); 7.39 (s, 1H, Ar-H); 7.00 (s, 1H, Ar-H); 6.96 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H); 6.86 (dt, J = 7.6 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H); 6.39 (ddd, J = 7.8 Hz, J = 2.2 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, Ar-H); 4.99 (s, 2H, NH₂); 3.65 (s, 3H, CH₃).

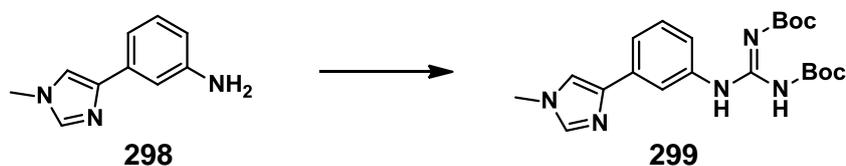
¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 148.5, 141.1, 137.8, 134.9, 128.7, 116.2, 112.3, 112.1, 109.9, 32.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3436 (w); 3330 (w); 3214 (m); 1642 (m); 1609 (m); 1583 (m); 1506 (m); 1489 (m); 1440 (m); 1419 (w); 1383 (w); 1360 (w); 1308 (w); 1254 (w); 1219 (m); 1184 (m); 1165 (m); 1067 (m); 972 (m); 863 (m); 824 (m); 788 (m); 770 (s); 703 (m); 693 (m); 623 (s); 536 (m); 494 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₁₀H₁₁N₃+H⁺ [M+H⁺] 174.1026; gefunden: 174.1025.

11.6 Synthese von N,N'-Bis-Boc-1-(3-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidin

299:



In einer Argonatmosphäre wurden 100 mg (0,577 mmol) 3-(1-Methyl-1H-imidazol-4-yl)anilin, 176 mg (0,635 mmol) N,N'-Bis-(tert-Butoxycarbonyl)thioharnstoff und 175 μ l (1,15 mmol) DIPEA in 10 ml abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man fügte 108 mg (0,635 mmol) Silbernitrat zu und rührte das Gemisch 6 Stunden, wobei eine Schwarzfärbung zu beobachten war. Nach beendeter Reaktion filtrierte man das Reaktionsgemisch über Celite und entfernte am Rotationsverdampfer das Lösemittel. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan/EE 1:3). Nach Entfernen des Lösemittels erhielt man ein öliges Produkt, das bei Zugabe einer kleinen Menge Diethylether auskristallisierte. Der Feststoff wurde mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 156 mg (65 %) des Produkts in Form von feinen farblosen Kristallen.

R_f: 0,20 (Cyclohexan/EE 1:3).

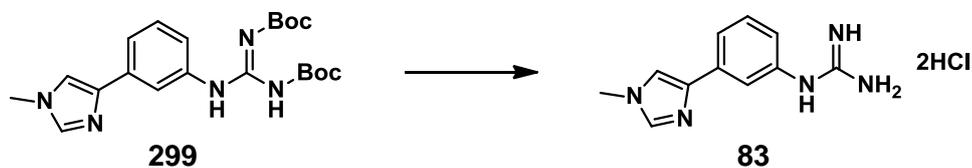
Smp.: 142-145 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.43 (s, 1H, NH); 10.03 (s, 1H, NH); 7.70 (s, 1H, Ar-H); 7.62 (s, 1H, Ar-H); 7.61 (s, 1H, Ar-H); 7.57-7.49 (m, 2H, Ar-H); 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H); 3.68 (s, 3H, CH₃); 1.52 (s, 9H, t-Bu); 1.40 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.6, 152.9, 152.1, 139.9, 138.4, 136.8, 135.2, 128.8, 120.74, 120.70, 118.3, 117.2, 83.3, 78.7, 33.0, 27.8, 27.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3257 (w); 2985 (w); 1719 (m); 1628 (m); 1608 (m); 1567 (m); 1550 (m); 1507 (w); 1478 (w); 1397 (m); 1367 (m); 1322 (m); 1296 (m); 1279 (m); 1263 (m); 1237 (m); 1223 (m); 1193 (m); 1151 (s); 1099 (s); 1054 (m); 1025 (m); 999 (w); 944 (w); 903 (w); 890 (w); 860 (m); 835 (m); 807 (m); 796 (m); 761 (m); 729 (m); 689 (m); 669 (m); 656 (m); 621 (m); 536 (w); 462 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₂₁H₂₉N₅O₄+H⁺ [M+H⁺] 416.2292; gefunden: 416.2291.

11.7 Synthese von 1-(3-(1-Methyl-1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidin Dihydrochlorid 83:

200 mg (0,481 mmol) N,N'-Bis-Boc-1-(3-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidin wurden in 5 ml Dioxan gelöst und mit 1 ml konz. Salzsäure versetzt. Man rührte 2 Stunden bei Raumtemperatur und destillierte das Lösemittel im Vakuum ab. Der Rückstand wurde in wenig Ethanol gelöst und mit Diethylether gefällt. Man filtrierte den farblosen Niederschlag ab und trocknete im Vakuum. Nach Umkristallisation aus Ethanol, wurden 122 mg (80 %) einer farblosen kristallinen Substanz isoliert.

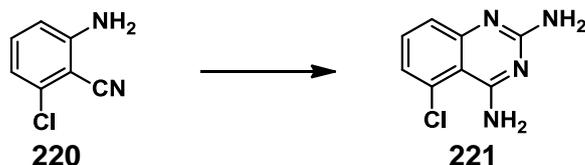
Smp.: 154-157 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.39 (s, 1H, NH); 9.20 (s, 1H, NH); 8.23 (s, 1H, Ar-H); 7.82-7.64 (m, 7H, Ar-H, NH₂); 7.57 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar-H); 7.28 (dd, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar-H); 3.90 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 156.0, 136.6, 136.1, 132.3, 130.5, 128.3, 124.8, 123.1, 121.0, 119.6, 35.5.

IR: $\tilde{\nu} = 3330$ (m); 3051 (m); 2821 (w); 1682 (s); 1646 (s); 1627 (m); 1611 (m); 1590 (m); 1552 (m); 1470 (w); 1400 (w); 1347 (w); 1306 (w); 1225 (w); 1170 (m); 1096 (w); 1025 (w); 909 (w); 829 (m); 807 (s); 718 (m); 694 (m); 651 (m); 619 (s); 544 (m); 501 (s).

Elementaranalyse (%) für C₁₁H₁₅Cl₂N₅*1,5H₂O (315,20): C 41.92; H 5.76; N 22.22; gefunden: C 41.73; H 5.46; N 22.02.

11.8 Synthese von 5-Chlorchinazolin-2,4-diamin 221:^[244]

10,0 g (65,5 mmol) 6-Chloroanthranilonitril und 11,3 mg (98,3 mmol) Chloroformamidin Hydrochlorid wurden in 100 ml Bis-2-methoxyethyl Ether gelöst und unter Schutzgas 3 Stunden bei 150 °C gerührt. Nach Zugabe von 300 ml Diethylether wurde das 5-Chlorchinazolin-2,4-diamin als Hydrochlorid gefällt und über eine Nutsche abfiltriert. Der Feststoff wurde in 1 l siedendem Ammoniakwasser (2 %ig) gelöst und durch eine kurze Säule mit Aktivkohle filtriert. Nach dem Abkühlen fielen 5,50 g (43 %) 5-Chlorchinazolin-2,4-diamin aus der Lösung aus. Durch Umkristallisation aus Wasser erhielt man farblose Nadeln, die zu analytischen Zwecken genutzt wurden.

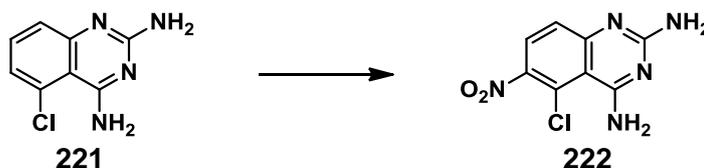
Smp.: 182-185 °C (Lit. 183-185 °C).^[244]

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 7.39 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.33 (s, 2H, NH₂); 7.16 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.04 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.21 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 161.0, 160.1, 155.5, 132.1, 129.003, 128.998, 124.3, 122.1, 107.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3461 (w); 3372 (w); 3310 (w); 3094 (w); 1652 (w); 1628 (m); 1605 (m); 1549 (s); 1505 (m); 1464 (m); 1451 (m); 1385 (m); 1344 (m); 1260 (m); 1201 (m); 989 (w); 975 (w); 935 (m); 808 (s); 774 (w); 746 (m); 644 (m); 595 (m); 577 (m); 535 (m); 492 (s); 482 (s).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇ClN₄ (194,62): C 49.37; H 3.63; N 28.79; gefunden: C 49.10 H 3.76; N 28.91.

11.9 Synthese von 5-Chlor-6-nitrochinazolin-2,4-diamin 222:^[244]

5,00 g (25,7 mmol) 5-Chlorchinazolin-2,4-diamin wurden 50 ml Schwefelsäure (98 %ig) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man tropfte so langsam 10 ml rauchende Salpetersäure zu, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Nach beendeter Zugabe erwärmte man die Reaktionsmischung innerhalb von 2 Stunden langsam auf 20 °C. Anschließend schüttete man die Lösung vorsichtig auf 500 g Eis und filtrierte den Niederschlag ab. Man wusch den Filterkuchen mit dest. Wasser und kristallisierte das Rohprodukt aus einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) um. Man erhielt 4,25 g (69 %) eines gelben Feststoffs.

Smp.: 231-233 °C (225-227 °C).^[244]

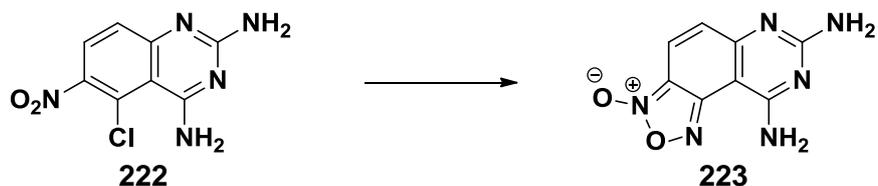
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 7.90 (d, J = 10.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.18 (d, J = 10 Hz, 1H, Ar-*H*); 3.49 (br, 2H, NH₂); 2.54 (br, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 176.064, 176.062, 136.1, 133.9, 130.649, 130.647, 119.9, 117.4.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3465 (w); 3320 (w); 3063 (m); 1666 (m); 1633 (m); 1606 (m); 1593 (m); 1554 (s); 1505 (s); 1463 (s); 1376 (m); 1338 (s); 1273 (m); 1166 (m); 1098 (m); 1006 (m); 965 (m); 892 (m); 834 (s); 798 (s); 760 (m); 732 (s); 642 (m); 623 (m); 561 (m); 538 (s).

HRMS-MALDI: berechnet für C₈H₆ClN₅O₂ [M+H⁺] 241.0316; gefunden: 240.2322.

11.10 Synthese von 7,9-Diamino-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-f]chinazolin-3-oxid 223:



1,00 g (4,17 mmol) 5-Chlor-6-nitrochinazolin-2,4-diamin und 407 mg (6,26 mmol) Natriumazid wurden in 10 ml abs. DMSO gelöst und 6 Stunden in einer Schutzgasatmosphäre auf 90 °C erhitzt. Die orangefarbene Lösung wurde nach beendeter Reaktion auf 50 g Eiswasser gegeben und der Niederschlag abfiltriert. Der Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie aufgearbeitet (EE/MeOH 9:1) und im Anschluss aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 674 mg (74 %) eines orangen Pulvers.

Smp.: >300 °C.

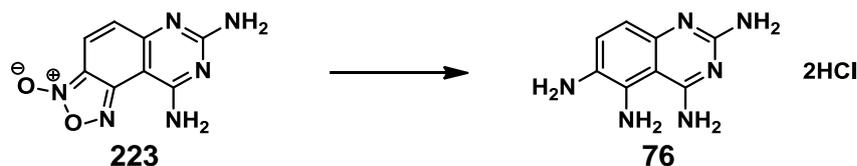
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 7.56 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.10 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.89 (s, 2H; *NH*₂); 6.42 (br, 1H, *NH*).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 163.9, 160.4, 158.8, 150.3, 132.5, 116.8, 110.9, 90.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3413 (w); 3335 (w); 3113 (m); 1660 (m); 1602 (m); 1546 (s); 1499 (m); 1476 (m); 1449 (m); 1406 (m); 1372 (m); 1305 (m); 1238 (m); 1173 (m); 1017 (m); 997 (m); 956 (m); 848 (m); 818 (s); 755 (m); 733 (m); 702 (m); 640 (m); 602 (m); 566 (s); 483 (s).

HRMS-MALDI: berechnet für C₈H₆N₆O₂+H⁺ [M+H⁺] 219.0625, gefunden: 219.0627.

11.11 Synthese von Chinazolin-2,4,5,6-tetraamin Dihydrochlorid 76:



500 mg (2,29 mmol) 7,9-Diamino-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-f]chinazolin-3-oxid wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 50 mg Pd/C (10 %ig) 18 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion versetzte man die Reaktionslösung unter Schutzgas mit 20 ml konzentrierter methanolischer HCl-Lösung. Man filtrierte über Celite und engte die Lösung auf 10 ml ein. Nach Zugabe von 200 ml Diethylether fiel das Produkt als Dihydrochlorid aus. Man filtrierte ab und reinigte mittels Umkehrphasenchromatographie auf (C18 Waters; H₂O/CH₃CN/TFA 90:10:0,1). Schließlich eluierte man mit einer wässrigen Methanollösung über eine Dowex-Cl Säule und überführte das Produkt wieder in die Dihydrochloridform. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 488 mg (81 %) eines hellgelben Feststoffs.

Smp.: >280 °C (Zers.).

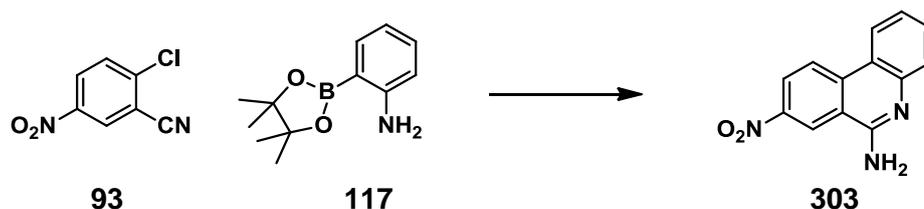
¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ / ppm = 7.61 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar- H); 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar- H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ / ppm = 164.7, 154.6, 140.5, 140.3, 131.0, 117.7, 108.7, 102.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3312 (w); 3134 (m); 2803 (m); 2588 (m); 1646 (m); 1629 (s); 1611 (m); 1550 (m); 1513 (m); 1472 (m); 1386 (m); 1342 (m); 1256 (w); 1215 (w); 1168 (w); 1112 (w); 1084 (w); 1041 (w); 984 (w); 825 (m); 794 (w); 736 (m); 698 (m); 681 (m); 636 (m); 584 (s); 558 (s); 478 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₈H₁₀N₆+H⁺ [M+H⁺] 191.1040, gefunden: 191.1041.

11.12 Synthese von 6-Amino-8-nitrophenanthridin 303:



200 mg (1,10 mmol) 2-Chloro-5-nitrobenzonitril, 240 mg (1,10 mmol) (2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin und 785 mg (2,41 mmol) Caesiumcarbonat wurden in einem Gemisch aus 20 ml Dioxan und 2 ml Wasser gelöst, und die Lösung in einer Argonatmosphäre wurde mehrfach entgast. Nach Zusatz von 63 mg (55 μ mol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) wurde das Reaktionsgemisch 16 Stunden auf 90 °C erhitzt, wobei sich die Lösung gelb färbte. Nach beendeter Reaktion setzte man 20 ml einer 0,1 molaren Salzsäurelösung zu und filtrierte den Niederschlag ab. Zur weiteren Aufarbeitung wurde mittels Säulenchromatographie (n-Hexan/EE/NEt₃ 3:2:0,01) das Produkt aufgereinigt. Man erhielt 231 mg (89 %) 8-Nitrophenanthridin-6-amin als gelben Feststoff. Für analytische Zwecke kristallisierte man die Verbindung aus abs. Ethanol um und erhielt orange Nadelchen.

R_f: 0.19 (n-Hexan/EE/NEt₃ 2:1:0,03).

Smp.: 295-299 °C.

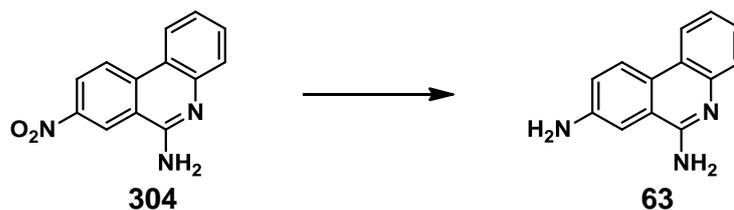
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm 9.34 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H); 8.89 (d, J = 9.2 Hz, 1H, Ar-H); 8.54 (m, 2H, Ar-H); 7.62 (m, 2H, Ar-H); 7.43 (s, 2H, NH₂); 7.34 (ddd, J = 8.2 Hz, J = 6.8 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 155.5, 146.5, 145.7, 138.0, 130.7, 125.8, 124.4, 124.0, 123.5, 122.3, 121.0, 118.8, 118.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3460 (w); 3311 (w); 3097 (w); 1651 (m); 1595 (m); 1572 (w); 1557 (w); 1511 (m); 1480 (m); 1470 (m); 1428 (m); 1332 (s); 1273 (m); 1236 (m); 1154 (m); 1125 (m); 912 (m). 899 (m); 857 (m); 830 (m); 814 (m); 796 (m); 749 (m); 722 (s); 675 (m); 639 (m); 593 (m); 555 (m); 514 (m); 498 (m); 464 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₃H₉N₃O₂ (239,23): C 65.27; H, 3.79; N, 17.56; gefunden: C 64.98; H 3.87; N 17.32.

11.13 Synthese von 6,8-Diaminophenanthridin 63:



100 mg (418 μ mol) 8-Nitrophenanthridin-6-amin und 20 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) wurden mit 30 ml Methanol versetzt und in einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck kräftig gerührt. Nach drei Stunden erhielt man einen quantitativen Umsatz des Edukts. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und säulenchromatographisch aufgearbeitet (EE/MeOH/NH₃aq. 2:1:0,03). Durch Umkristallisation aus abs. Ethanol erhielt man 56 mg (64 %) 8-Aminophenanthridin-6-amin in Form von gelben Nadelchen.

R_f: 0.27 (EE/MeOH/NH₃aq. 2:1:0,03).

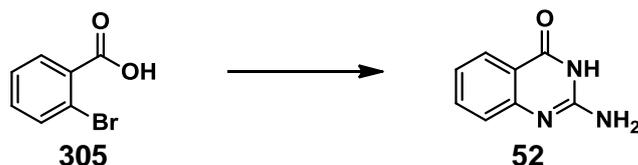
Smp.: 227 °C (Zers.).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.31 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H); 8.23 (dd, J = 8.1 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, Ar-H); 7.44 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H); 7.32 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 7.0 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H); 7.23 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Ar-H); 7.25-7.11 (m, 2H, Ar-H); 6.58 (s, 2H, NH₂); 5.47 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 154.8, 148.0, 142.6, 126.1, 125.1, 123.41, 123.40, 121.5, 121.2, 120.7, 120.2, 119.7, 105.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3452 (w); 3365 (m); 3127 (m); 1599 (m); 1574 (m); 1532 (m); 1489 (m); 1465 (m); 1403 (m); 1355 (m); 1337 (m); 1302 (m); 1261 (m); 1245 (m); 1227 (m); 1061 (m); 1001 (m); 936 (w); 835 (m); 745 (s); 731 (s); 659 (m); 568 (s); 545 (s); 522 (s); 457 (s).

Elementaranalyse (%) für C₁₃H₁₁N₃ (209,25): C 74.62; H 5.30; N 20.08; gefunden: C 74.57; H 5.40; N 20.19.

11.14 Synthese von 2-Aminochinazolin-4(3H)-on 52:^[245]

1,00 g (4,97 mmol) 2-Brombenzoesäure, 2,00 g (9,95 mmol) Guanidiniumchlorid, 6,48 g (19,9 mmol) Caesiumcarbonat und 95 mg (0,497 mmol) Kupfer(I)iodid wurden mit 20 ml abs. DMF versetzt und bei 110 °C 24 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch eine kurze Kieselgelsäule, mit Methanol als Eluent, filtriert. Schließlich kristallisierte man aus Ethanol um und erhielt 717 mg (52 %) 2-Aminochinazolin-4(3H)-on in Form eines farblosen Feststoffs.

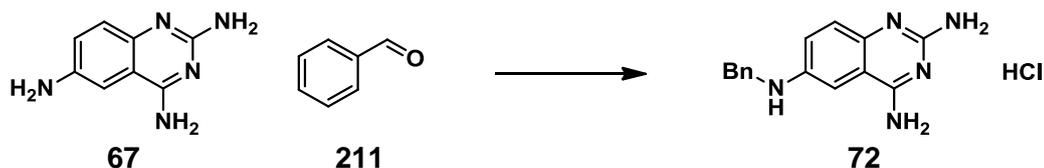
Smp.: >300 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 10.95 (s, 1H, NH); 7.87 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.55 (ddd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.6 Hz; 1H, Ar-*H*); 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.34 (br, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 163.2, 152.4, 150.2, 133.9, 125.9, 123.1, 121.4, 117.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3581 (w); 3399 (m); 3147 (m); 3063 (m); 2642 (m); 1801 (w); 1689 (m); 1657 (m); 1633 (m); 1608 (s); 1575 (m); 1558 (m); 1511 (m); 1473 (s); 1451 (m); 1402 (m); 1340 (m); 1248 (m); 1166 (m); 1153 (m); 1123 (m); 1041 (m); 1018 (m); 897 (m); 785 (m); 764 (s); 716 (w); 680 (m); 623 (m); 591 (m); 537 (s); 491 (m); 465 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇N₃O*1/3H₂O (167,11): C 57.50; H 4.62; N 25.15; gefunden: C 57.65; H 4.41; N 25.30.

11.15 Synthese von N⁶-Benzylchinazolin-2,4,6-triamin Hydrochlorid 72:

200 mg (1,14 mmol) 2,4,6-Triaminochinazolin und 127 mg (1,20 mmol) Benzaldehyd wurden in 80 ml abs. Ethanol und 1 ml Eisessig gelöst. Nach 30 minütigem Rühren, wurden 107 mg (1,71 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und bei Raumtemperatur weitere 8 Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel abdestilliert. Der Rückstand wurde mehrmals mit Methanol extrahiert, das Extrakt am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit und säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM/MeOH 9:1) und anschließend mit C18 (Waters) Umkehrphasenmaterial (H₂O/CH₃CN/TFA 90:10:0.1). Nach Lyophilisieren der Produktlösung eluierte man das TFA-Salz mit Methanol/H₂O (5:1) durch einen Dowex-Cl Ionenaustauscher und erhielt nach Trocknen im Vakuum 271 mg (70 %) N⁶-Benzylchinazolin-2,4,6-triammoniumchlorid Dihydrat als gelbes Pulver.

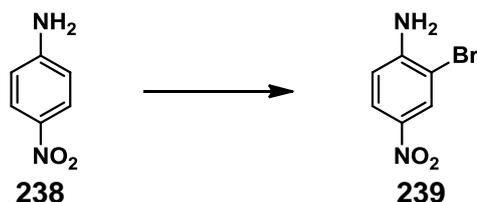
Smp.: >230 Zers. (224 - 225 °C).^[246]

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.51 (s, 1H, NH); 8.78 (s, 1H, NH); 8.55 (s, 1H, NH); 7.58-7.09 (m, 11H, Ar-H, NH); 4.34 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.4, 153.1, 145.7, 139.2, 130.2, 128.1, 127.5, 126.7, 124.1, 117.3, 109.9, 101.7, 46.4.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3301 (w); 3134 (w); 2927 (w); 1646 (m); 1624 (s); 1589 (s); 1533 (s); 1488 (s); 1451 (m); 1410 (s); 1271 (m); 1170 (m); 1072 (w); 1028 (w); 814 (m); 767 (m); 731 (m); 697 (s); 658 (m); 616 (m); 546 (s); 463 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₅H₁₆ClN₅·2H₂O (337,80): C 53.33; H 5.97; N 20.73; gefunden: C 53.16; H 5.58; N 20.67.

11.16 Synthese von 2-Brom-4-nitroanilin 239:^[247]

5,00 g (36,2 mmol) 4-Nitroanilin wurden in einer Mischung aus 120 ml Dichlormethan und 80 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 19,2 g (39,8 mmol) Bu_4NBr_3 versetzt, wobei sich die Lösung orange färbt. Nach 30 Minuten wurde die Lösung mit 100 ml Dichlormethan versetzt und mit 100 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung, 50 ml gesättigte NaCl-Lösung und 50 ml dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und mit Dichlormethan durch eine kurze Kieselgelsäule eluiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels erhielt man 7,10 g (90 %) eines gelben Feststoffs.

Smp.: 104 °C (Lit. 106 °C).^[248]

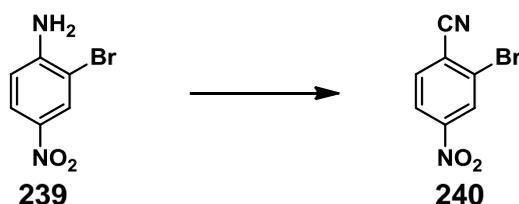
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 8.23 (d, J = 2.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.98 (dd, J = 9.1 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 6,84 (br, 2H, NH_2); 6.83 (d, J = 9.1 Hz, 1H, Ar-*H*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 152.3, 136.1, 128.7, 125.0, 113.3, 104.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3466 (w); 3367 (m); 3197 (w); 3098 (w); 2696 (w); 2418 (w); 1620 (m); 1583 (m); 1481 (m); 1297 (s); 1262 (s); 1154 (m); 1118 (s); 1026 (m); 893 (m); 817 (m); 744 (s); 696 (m); 638 (m); 546 (m); 527 (m); 457 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_6\text{H}_5\text{BrN}_2\text{O}_2$ (217,02): C 33.21; H, 2.32; N 12.91; gefunden: C 33.18; H 2.32; N 12.90.

11.17 Synthese von 2-Brom-4-nitrobenzonitril 240:



1,00 g (4,61 mmol) 2-Brom-4-nitroanilin wurde in 10 ml einer 25 %igen Tetrafluoroborsäure und 1 ml Acetonitril gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Man tropfte anschließend so langsam eine Lösung aus 392 mg (4,61 mmol) Kaliumnitrit in 2 ml dest. Wasser zu, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Nach der Zugabe wurde 1 Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend unter Kühlung die Lösung im Vakuum auf das halbe Volumen eingengt. Dabei fiel das Diazoniumsalz als farbloser Feststoff aus. Man filtrierte über eine gekühlte Glasritze ab und wusch mit Diethylether. Anschließend wurde das getrocknete Diazoniumsalz bei 0 °C portionsweise in eine Lösung aus 41 mg (0,46 mmol) Kupfercyanid und 600 mg (9,22 mmol) Kaliumcyanid in 50 ml dest. Wasser gegeben, wobei eine Gasentwicklung zu beobachten war. Man rührte das Gemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur und extrahierte mehrfach mit Ethylacetat. Die organische Phase wurde mit dest. Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösemittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (n-Hexan/EE 5:1) erhielt man 594 mg (57 %) eines bräunlichen Feststoffs.

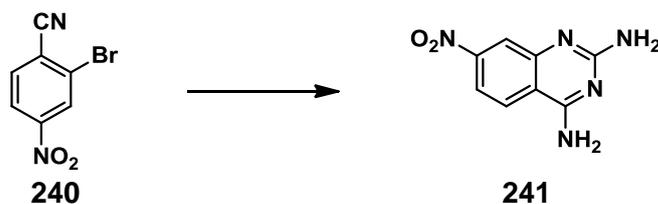
Smp.: 112-113 °C (Lit. 81-84 °C).^[249]

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.65 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H); 8.37 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H); 8.26 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 150.1, 136.2, 127.6, 125.6, 123.1, 120.1, 116.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3096 (m); 3027 (w); 2926 (w); 2870 (w); 2232 (w); 1948 (w); 1820 (w); 1593 (w); 1558 (w); 1525 (s); 1468 (m); 1390 (w); 1376 (w); 1348 (s); 1285 (m); 1199 (w); 1115 (m); 1043 (m); 907 (m); 882 (m); 853 (m); 779 (m); 743 (s); 700 (m); 676 (m); 594 (m); 585 (m); 549 (m); 516 (w); 467 (m).

Elementaranalyse (%) für C₇H₃BrN₂O₂ (227,01): C 37.03; H 1.33; N 12.34; gefunden: C 37.32; H 1.40; N 12.08.

11.18 Synthese von 7-Nitrochinazolin-2,4-diamin **241**:^[249]

In einer Argonatmosphäre wurden 1,00 g (4,40 mmol) 2-Brom-4-nitrobenzonitril, 505 mg (5,23 mmol) Guanidiniumchlorid, 1,22 g (8,81 mmol) K₂CO₃ und 78 mg (0,881 mmol) DMEDA mit 20 ml DMF versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dabei färbte sich die Lösung violett. Nach Zugabe von 84 mg (0,44 mmol) CuI erhitzte man 12 h auf 80 °C, wobei sich das Reaktionsgemisch erst grün und dann bräunlich färbte. Nach beendeter Reaktion filtrierte man den Feststoff ab und wusch den Filterkuchen 2-mal mit 5 ml DMF. Das Filtrat wurde vom Lösemittel befreit und über Säulenchromatographie aufgearbeitet (Gradient: n-Hexan/EE 6:1 zu EE/MeOH 7:1). Nach dem Entfernen des Lösemittels erhielt man einen hellen orangefarbenen Feststoff 760 mg (84 %).

R_f: 0.77 (EE/MeOH 9:1).

Smp.: >300 °C.

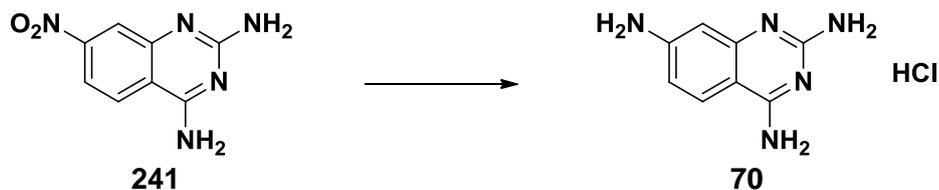
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.70 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.64 (br, 2H, NH₂); 6.42 (br, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.0, 161.9, 152.7, 150.2, 125.7, 118.8, 114.0, 112.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3517 (w); 3459 (m); 3407 (m); 3330 (w); 3051 (w); 1666 (m); 1603 (m); 1557 (s); 1521 (s); 1472 (m); 1441 (m); 1411 (s); 1378 (s); 1348 (s); 1263 (m); 1180 (m); 1148 (m); 1124 (m); 1072 (m); 985 (m); 943 (m); 912 (m); 839 (m); 782 (m); 767 (m); 747 (s); 723 (s); 672 (m); 592 (m); 578 (m); 557 (m); 513 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇N₅O₂ (205,17): C 46.83; H 3.44; N 34.13; gefunden: C 46.48; H 3.34; N 33,81.

11.19 Synthese von Chinazolin-2,4,7-triamin Hydrochlorid 70:



800 mg (3,90 mmol) 7-Nitrochinazolin-2,4-diamin wurden in 50 ml MeOH gelöst, mit 80 mg Pd/C (10 %Pd) versetzt und in einer H₂-Atmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend filtrierte man über Celite und entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EE/MeOH 9:1). Man erhielt 590 mg (86 %) eines beigefarbenen Feststoffes. Eine analytische Probe wurde über eine C-18 Säule (Waters) eluiert (H₂O/CH₃CN/TFA 90:10:0,1) und anschließend mittels eines Dowex-Cl Ionenaustauschers in die Chloridform überführt. Nach Umkristallisation aus einer Mischung aus Ethanol und Diethylether (5:1) erhielt man Chinazolin-2,4,7-triamin Hydrochlorid in Form eines hellbraunen Pulvers.

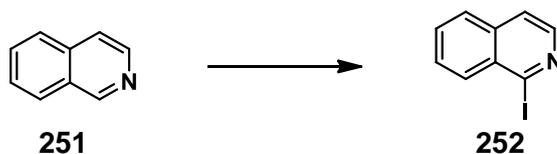
Smp.: >300 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.03 (s, 1H, NH); 8.39 (s, 1H, NH); 8.13 (s, 1H, NH); 7.85 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.45 (br, 1H, NH₂); 6.56 (dd, J = 8.9 Hz; J = 1.6 Hz; 1H; Ar-H); 6.51 (br, 2H, NH₂); 6.37 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.2, 155.0, 154.6, 141.1, 126.2, 112.4, 98.0, 95.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3423 (w); 3321 (m); 3195 (m); 3125 (m); 2977 (m); 1670 (m); 1629 (s); 1585 (m); 1514 (m); 1471 (m); 1410 (m); 1374 (m); 1335 (m); 1258 (m); 1226 (m); 1185 (m); 1143 (m); 995 (m); 844 (m); 770 (m); 731 (m); 700 (s); 647 (m); 602 (s); 580 (s); 566 (s); 493 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₁₀ClN₅·1/4H₂O (216,16): C 44.45; H 4.90; N 32.40; gefunden: C 44.68; H 4.86; N 32.55.

11.20 Synthese von 1-Iodoisochinolin 252:^[224]

In einer Schutzgasatmosphäre wurden bei Raumtemperatur 26,2 ml (1,3 M in THF, 34,1 mmol) Isopropylmagnesiumchlorid LiCl-Komplex Lösung tropfenweise mit 4,8 ml (34,1 mmol) Diisopropylamin versetzt und 6 Stunden gerührt. Anschließend wurden 4,00 g (31,0 mmol) Isochinolin in 25 ml abs. THF langsam zugetropft, wobei sich die Lösung rot färbte. Nach 2 Stunden war die Transmetallierung abgeschlossen und 8,65 g (34,1 mmol) Iod in 30 ml abs. THF wurden zugegeben. Nach 5 Minuten versetzte man mit 50 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung und extrahierte die wässrige Phase mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (Hexan/DCM 1:1). Man erhielt 3,32 g (38 %) hellgelbe Kristalle.

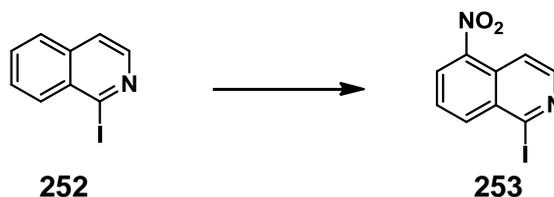
Smp.: 74-78 °C (lit: 74-76.8 °C).^[224]

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 8.27 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.95 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.90 - 7.75 (m, 3H, Ar-*H*).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 143.2, 135.7, 131.7, 131.4, 131.0, 129.5, 127.53, 127.51, 121.4.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3047 (w); 1993 (w); 1835 (w); 1775 (w); 1612 (w); 1577 (m); 1539 (m); 1490 (m); 1444 (m); 1362 (m); 1317 (m); 1302 (m); 1288 (m); 1252 (m); 1219 (m); 1173 (m); 1135 (m); 1051 (m); 1022 (m); 967 (w); 955 (m); 871 (m); 822 (s); 787 (m); 777 (m); 751 (s); 654 (m); 637 (s); 535 (m); 503 (m); 465 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₆IN (255,06): C 42.38; H 2.37; N 5.49; gefunden: C 42.12; H 2.25; N 5.42.

11.21 Synthese von 1-Iod-5-nitroisochinolin 253:^[212]

1,00 g (3,92 mmol) 1-Iodoisochinolin wurden in 10 ml (98 %) Schwefelsäure gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 3 ml Salpetersäure (100 %) so langsam zugetropft, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Man rührte weitere 3 Stunden bei 0 °C und schüttete die Reaktionslösung auf 100 g Eis. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhielt man 600 mg (51 %) 1-Iod-5-Nitroisochinolin als gelben Feststoff.

Smp.: 210-212 °C.

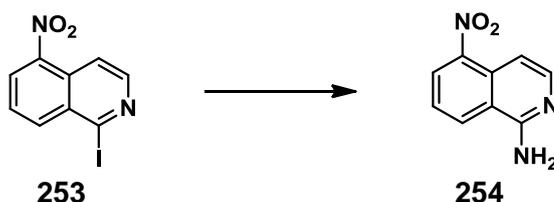
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 8.69 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.23 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 0.8 Hz); 7.98 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-*H*).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 146.0, 139.0, 133.1, 130.8, 129.1, 128.7, 128.3, 127.4, 115.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3039 (w); 3005 (w); 1924 (w); 1620 (m); 1576 (w); 1516 (s); 1481 (m); 1445 (m); 1395 (m); 1355 (m); 1336 (m); 1304 (m); 1222 (m); 1183 (m); 1156 (m); 1027 (m); 992 (m); 946 (m); 874 (m); 832 (m); 813 (s); 783 (m); 750 (m); 740 (s); 708 (s); 638 (m); 588 (m); 548 (m); 535 (m); 487 (m); 462 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₅IN₂O₂ (300,05): C 36.03; H 1.68; N 9.34; gefunden: C 35.96; H 1.57; N 9.39.

11.22 Synthese von 1-Amino-5-nitroisochinolin 254:



500 mg (1,67 mmol) 1-Iodo-5-nitroisochinolin, 66,7 mg (0,666 mmol) Acetylaceton, 44,0 mg (0,166 mmol) $\text{Cu}(\text{acac})_2$, 1,09 g (3,33 mmol) Cs_2CO_3 wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 1,5 ml Ammoniakwasser (32 %) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Exsikkator 18 Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 9:1). Man erhielt 180 mg (57 %) 1-Amino-5-nitroisochinolin in Form eines gelben Feststoffes.

Smp.: 225-228 °C (Lit. 226-227 °C).^[250]

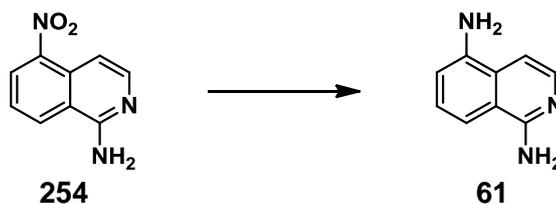
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm 8.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar-*H*); 8.42 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1,0$ Hz, 1H, Ar-*H*); 8.02 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.63 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.31 (dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 0.5$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.29 (s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 160.3, 133.1, 133.0, 132.4, 130.9, 129.3, 127.7, 125.7, 98.4.

IR: $\tilde{\nu} = 3157$ (w); 3011 (w); 2917 (w); 2851 (m); 1679 (m); 1630 (m); 1608 (m); 1517 (s); 1470 (m); 1361 (m); 1324 (m); 1236 (m); 1193 (m); 1099 (w); 1075 (m); 950 (w); 930 (w); 902 (m); 877 (m); 777 (s); 739 (m); 685 (m); 633 (m); 592 (w); 576 (w); 552 (m); 515 (m); 457 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}^+$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 190.0611, gefunden: 190.0614.

11.23 Synthese von 1,5-Diaminoisochinolin 61:



165 mg (0,872 mmol) 1-Amino-5-nitroisochinolin wurden in 10 ml Methanol gelöst und unter Schutzgas mit 16 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %Pd) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und Normaldruck 18 Stunden gerührt. Man filtrierte die Mischung über Celite und wusch den Filterkuchen mit kaltem Methanol. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer kristallisierte man den Feststoff aus Ethanol um und erhielt 110 mg (79 %) 1,5-Diaminoisochinolin als bräunliche Blättchen.

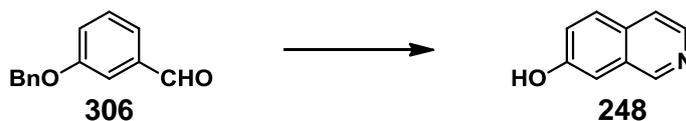
Smp.: 221 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.68 (d, J = 6.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.13 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.03 (d, J = 6.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.75 (dd, J = 7.5 Hz, J = 0.8 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.45 (s, 2H, NH₂); 5.58 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 157.1, 143.7, 139.4, 125.7, 125.7, 117.9, 110.79, 110.76, 104.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3308 (w); 1633 (m); 1587 (m); 1560 (m); 1494 (m); 1435 (m); 1401 (m); 1377 (m); 1348 (m); 1287 (m); 1273 (m); 1205 (m); 1072 (w); 1006 (w); 935 (w); 869 (m); 784 (s); 738 (s); 703 (m); 548 (s); 499 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₉N₃ (159,19): C 67.90; H 5.70; N 26.40 gefunden: C 67.68; H 5.76; N 26.40.

11.24 Synthese von 7-Hydroxyisochinolin 248:^[223]

7,43 g (70,7 mmol) Aminoacetaldehyddimethylacetal wurden zu einer Lösung aus 10,0 g (47,1 mmol) 3-(Benzyloxy)benzaldehyd in 110 ml Toluol gegeben und am Wasserabscheider 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend kühlte man die Lösung auf 5 °C und setzte unter Schutzgas 20 ml (141 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid und 20,1 g (141 mmol) Bortrifluorid Etherat zu, wobei die Innentemperatur nicht über 10 °C steigen durfte. Man rührte das Gemisch 5 Tage bei Raumtemperatur, wobei das Produkt als Salz aus der Lösung ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und schließlich in 75 ml dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser stellte man den pH Wert auf 9 ein und ein farbloser Feststoff fiel aus der Lösung aus, den man abfiltrierte und mit Diethylether wusch. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 3,35 g (49 %) eines leicht gelblichen Pulvers.

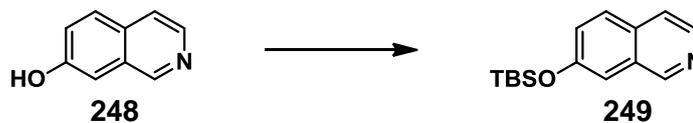
Smp.: 229-230 °C (Lit.: 228-230 °C).^[223]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 10.13 (s, 1H, OH); 9.09 (s, 1H, Ar-H); 8.28 (d, J = 5.6 Hz, 1H, Ar-H); 7.82 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.67 (d, J = 5.7 Hz, 1H, Ar-H); 7.34 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, Ar-H); 7.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 156.2, 150.4, 139.9, 129.8, 129.6, 128.1, 123.1, 120.0, 107.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2842 (w); 2571 (w); 1633 (w); 1591 (m); 1557 (w); 1505 (m); 1445 (m); 1379 (m); 1339 (m); 1321 (m); 1277 (m); 1220 (m); 1197 (m); 1141 (m); 1037 (m); 963 (m); 942 (w); 914 (m); 869 (m); 853 (m); 839 (s); 806 (m); 730 (m); 649 (m); 553 (m); 536 (s); 480 (s); 467 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₇NO (145,16): C 74.47; H 4.86; N 9.65; gefunden: C 74.20; H 4.86; N 9.62.

11.25 Synthese von 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)isochinolin 249:^[251]

Zu einer Suspension aus 5,00 g (34,4 mmol) 7-Hydroxyisochinolin und 3,52 g (51,7 mmol) Imidazol in 30 ml abs. DMF wurden 7,79 g (51,7 mmol) tert-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben. Die Mischung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über Magnesiumsulfat und entfernte am Rotationsverdampfer das Lösemittel. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE 2:1) und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 6,76 g (47 %) eines hellgelben Öls, das mit der Zeit erstarrte.

R_f : 0.38 (Hexan/EE 1:1).

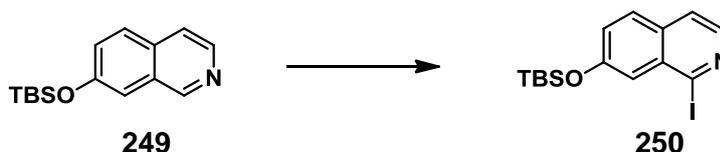
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 9.21 (s, 1H, Ar-H); 8.37 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, Ar-H); 7.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, Ar-H); 7.75 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, Ar-H); 7.48 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar-H); 7.37 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, Ar-H); 0.99 (s, 9H, t-Bu) 0.26 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 153.7, 151.0, 141.0, 130.8, 129.4, 128.3, 126.4, 119.9, 113.7, 25.4, 17.9, -4.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2955 (m); 2929 (m); 2885 (w); 2857 (m); 2569 (w); 1734 (w); 1633 (w); 1593 (m); 1557 (w); 1504 (m); 1472 (m); 1448 (m); 1381 (m); 1361 (m); 1337 (m); 1322 (m); 1276 (m); 1255 (m); 1217 (m); 1199 (m); 1142 (m); 1038 (m); 1007 (w); 970 (m); 936 (m); 914 (m); 833 (s); 771 (s); 730 (m); 686 (m); 666 (m); 649 (m); 551 (m); 537 (m); 479 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NOSi}$ (259,42): C 69.45; H 8.16; N 5.40; C 69.20; H 8.37; N 5.47.

11.26 Synthese von 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-iodoisochinolin 250:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden bei Raumtemperatur 3,26 ml (1,3 M in THF, 4,24 mmol) Isopropylmagnesiumchlorid Lithiumchloridkomplex Lösung mit 710 μ l (4,24 mmol) Tetramethylpiperidin versetzt und 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde 1,00 g (3,85 mmol) 7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)isochinolin in 10 ml abs. THF langsam zutropft, wobei sich die Lösung rot färbte. Nach 3 Stunden war die Transmetallierung abgeschlossen und 1,08 g (4,24 mmol) Iod in 10 ml abs. THF wurden zugegeben. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurde mit 20 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gequencht und die wässrige Phase mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (n-Hexan/EE 8:1) erhielt man 909 mg (61 %) eines bräunlichen Öls.

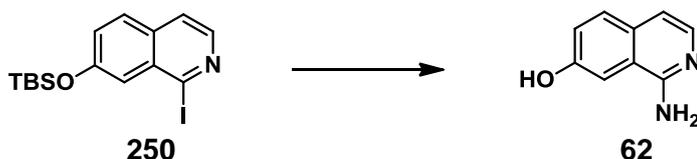
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 8.16 (d, J = 5.5 Hz, 1H, Ar- H); 7.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar- H); 7.79 (d, J = 5.5 Hz, 1H, Ar- H); 7.45 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, Ar- H); 7.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar- H); 0.99 (s, 9H, tBu); 0.32 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 155.0, 150.0, 139.4, 131.9, 129.8, 128.3, 127.8, 120.8, 114.3, 25.6, 18.3, -4.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2932 (m); 2859 (w); 1619 (w); 1580 (m); 1541 (m); 1497 (m); 1464 (w); 1439 (m); 1365 (m); 1334 (m); 1284 (m); 1250 (m); 1224 (m); 1213 (m); 1171 (w); 1148 (m); 1125 (w); 1083 (m); 1049 (w); 1037 (w); 1007 (w); 983 (m); 925 (s); 869 (m); 835 (s); 816 (m); 781 (m); 687 (m); 670 (m); 636 (m); 572 (w); 546 (w); 529 (w); 479 (w).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{INOSi} + \text{H}^+$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 386.0432; gefunden: 386.0434.

11.27 Synthese von 1-Aminoisochinolin-7-ol 62:



In einem verschlossenen Glasreaktor wurden 250 mg (649 μ mol) 7-((tert-Butyldimethylsilyloxy)-1-iodo)isochinolin, 17,1 mg (64,8 μ mol) $\text{Cu}(\text{acac})_2$, 26,0 mg (260 μ mol) Acetylaceton und 423 mg (1,30 mmol) Cäsiumcarbonat in 10 ml DMF gelöst und mit 1,5 ml (32 %ig) wässriger Ammoniaklösung versetzt. Man erhitze das Gemisch 2 Stunden auf 50 °C. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet (EE/MeOH/ NH_3 90:10:1). Man kristallisierte den Rückstand aus Ethanol um und erhielt 61 mg (52 %) braune Kristalle, die unter UV-Licht blau fluoreszieren.

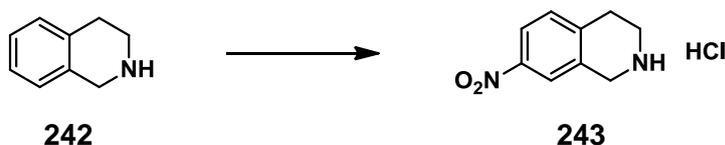
Smp.: 278 °C (Zers.).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 9.70 (s, 1H, OH); 7.57 (m, 2H, Ar-H); 7.39 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H); 7.20 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.3, 1H, Ar-H); 6.81 (d, J = 5.8 Hz, 1H, Ar-H); 6.45 (s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 156.0, 154.9, 138.2, 130.6, 127.7, 121.3, 109.8, 106.2.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3429 (w); 3349 (w); 2355 (w); 1645 (m); 1598 (m); 1512 (m); 1427 (m); 1386 (m); 1313 (m); 1285 (m); 1235 (m); 1142 (m); 1005 (m); 936 (m); 890 (m); 840 (m); 824 (s); 780 (m); 750 (m); 719 (m); 689 (m); 619 (m); 572 (m); 544 (m); 531 (s); 491 (s).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O} + \text{H}^+$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 161.0709; gefunden: 161.0711.

11.28 Synthese von 7-Nitro-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin Hydrochlorid 243:^[168]

Unter Eiskühlung wurden 40 ml konzentrierte Schwefelsäure langsam zu 11,5 ml (90,1 mmol) Tetrahydroisochinolin gegeben. Im Anschluss tropfte man 10 ml 100 %ige Salpetersäure so zu, dass die Temperatur der Lösung nicht über 5 °C stieg. Die Reaktionsmischung wurde nach der Zugabe 2 h bei 5 °C gerührt und anschließend auf Eis gegossen. Die Lösung wurde mit 35 %iger Natronlauge auf einen pH-Wert von 12 gebracht und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Den Rückstand löste man in 80 ml Ethanol und tropfte unter Eiskühlung 20 ml konzentrierte Salzsäure hinzu. 6.2 g (32 %) des Hydrochlorids wurde als ein brauner Feststoff abfiltriert und für die folgenden Reaktionen eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde ein Teil der Probe aus abs. Ethanol umkristallisiert.

Smp.: >242 °C (Zers.) (Lit. 236-240 °C).^[168]

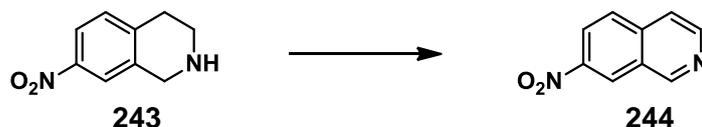
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 9.76 (s, 2H, NH₂); 8.21 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H); 8.11 (dd, J = 8.5 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, Ar-H); 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar-H); 4.38 (s, 2H, CH₂); 3.39 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂); 3.14 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 145.9, 140.2, 130.9, 130.1, 121.91, 121.87, 43.1, 39.7, 24.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2956 (m); 2758 (m); 2465 (w); 1600 (m); 1588 (m); 1520 (s); 1490 (m); 1477 (m); 1459 (m); 1428 (m); 1389 (w); 1343 (s); 1256 (w); 1234 (w); 1180 (w); 1136 (m); 1090 (m); 1067 (w); 987 (w); 954 (m); 929 (w); 908 (w); 856 (m); 829 (m); 805 (m); 743 (m); 663 (w); 534 (w); 491 (w); 453 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₁₁ClN₂O₂ (214.65): C 50.36; H 5.17; N 13.05; gefunden: C 50.07; H 5.04; N 12.67.

11.29 Synthese von 7-Nitroisochinolin 244:



2,00 g (9,32 mmol) 7-Nitrotetrahydroisochinolin Hydrochlorid, 7,10 g Iod (28,0 mmol) und 4,60 g (46,6 mmol) Kaliumacetat wurden in 20 ml DMF gelöst und 12 h bei 140 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und mit 30 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Durch säulen-chromatographische Trennung (n-Hexan/EE 2:1) erhielt man 1,11 g (68 %) 7-Nitroisochinolin.

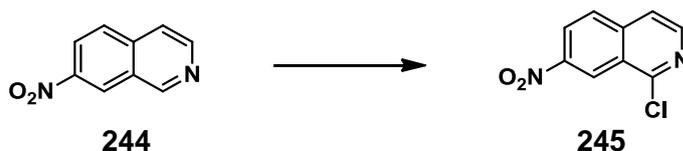
Smp.: 178 °C (Lit. 176-179 °C).^[252]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 9.49 (s, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.48 (dd, *J* = 9.1 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 154.3, 146.5, 138.2, 128.5, 127.2, 124.4, 123.7, 120.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 1630 (s), 1583 (m), 1538 (m), 1522 (s), 1492 (s), 1448 (w), 1420 (m), 1398 (w), 1362 (m), 1339 (s), 1320 (m), 1270 (w), 1237 (w), 1210 (w), 1160 (w), 1135 (w), 1121 (w), 1084 (m), 1031 (m), 954 (w), 952 (w), 893 (m), 853 (m), 803 (m), 784 (w), 770 (w), 734 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₆H₁₈N₄O (282,15): C 62.07; H 3.47; N 16.09; gefunden: 62.18; H 3.60; N 15.92.

11.30 Synthese von 1-Chlor-7-nitroisochinolin 245:^[168]

Zu einer Lösung aus 1,00 g (5,74 mmol) 7-Nitroisochinolin in 30 ml Chloroform wurden 1,49 g (8,61 mmol) m-Chlorperbenzoesäure gegeben und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Der hellgelbe Niederschlag wurde über eine Nutsche abfiltriert und mit Chloroform gewaschen. Das Filtrat wurde mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 20 ml gesättigte NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase trocknete man über Magnesiumsulfat und entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Das farblose N-oxid wurde ohne weitere Aufarbeitung für die folgende Synthese eingesetzt. Zu einer Suspension aus 1,10 g (5,74 mmol) 7-Nitroisochinolin-2-oxid in 60 ml abs. Toluol wurden 1,36 ml (14,9 mmol) Phosphoroxychlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 90 °C unter Schutzgas gerührt und nach dem Abkühlen vorsichtig auf Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die organische Phase mit wenig gesättigte NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über Magnesiumsulfat und arbeitete das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf (n-Hexan/DCM/EE 30:30:1). Durch Umkristallisation aus Ethanol erhielt man 193 mg (16 %) 1-Chlor-7-nitroisochinolin in Form von gelben Nadelchen.

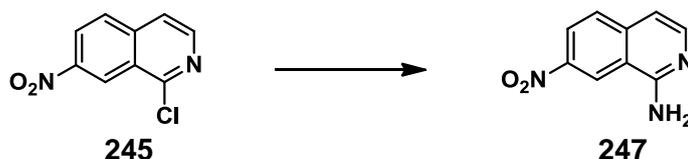
Smp.: 161-165 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 9.04 (d, J = 2.3, 1H), 8.60 (dd, J = 9.0, J = 2.3, 1H), 8.55 (d, J = 5.7, 1H), 8.37 (d, J = 9.0, 1H), 8.12 (dd, J = 5.7, J = 0.6, 1H).

¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 153.5, 147.0, 145.0, 140.2, 129.1, 126.2, 124.7, 123.3, 120.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3090 (w), 3066 (w), 3035 (w), 2854 (w), 1938 (w), 1805 (w), 1670 (m), 1625 (s), 1609 (w), 1582 (m), 1571 (m), 1519 (s), 1487 (m), 1439 (w), 1406 (w), 1380 (w), 1347 (s), 1307 (w), 1291 (m), 1254 (m), 1224 (w), 1176 (w), 1146 (w), 1092 (m), 994 (m), 904 (m), 893.3 (w), 864 (m), 798 (m), 738 (m), 690 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₅ClN₂O₂ (208,60): C 51.82; H 2.42; N 13.43; gefunden: C 51.62; H 2.55; N 13.21.

11.31 Synthese von 7-Nitro-1-aminoisochinolin 247:^[168]

Eine Lösung von 180 mg (0,863 mmol) 1-Chlor-7-nitroisochinolin in 40 ml abs. Methanol wurde mit 93,2 mg (1,73 mmol) Natriummethoxid versetzt und 3 h unter Schutzgas zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand mit 100 ml Essigsäureethylester versetzt und mit 20 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Aufarbeitung (n-Hexan/EE 5:1) ergab 140 mg 1-Methoxy-7-Nitroisochinolin, das mit 2,00 g wasserfreiem Ammoniumacetat in ein Parr Reaktor gegeben und 4 h bei 140 °C gerührt wurde. Nach dem Abkühlen versetzte man das Reaktionsgemisch mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und extrahierte die Lösung mit 100 ml Dichlormethan. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im unter vermindertem Druck abdestilliert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte über eine säulenchromatische Trennung (n-Hexan/EE 2:3), wobei 90 mg (55 % über 2 Schritte) 1-Amino-7-nitroisochinolin in Form eines braunen Feststoffs erhalten wurde. Für analytische Zwecke kristallisierte man das Produkt aus Toluol um.

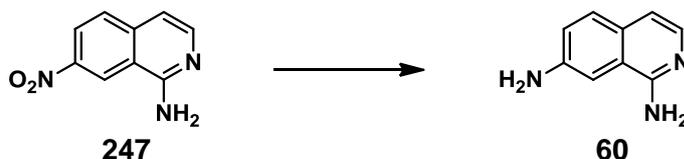
Smp.: 234-235 °C (Lit. 225-233 °C).^[168]

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 9.28 (s, 1H, Ar-H); 8.32 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar-H); 8.01 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, Ar-H); 7.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar-H); 7.42 (br s, 2H, NH₂); 7.03 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 158.8, 146.6, 144.1, 140.4, 128.0, 123.1, 121.6, 115.3, 109.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3453 (s); 3335 (w); 3084 (m); 1671 (s); 1616 (s); 1574 (m); 1499 (s); 1471 (s); 1372 (w); 1323 (s); 1294 (s); 1217 (w); 1120 (m); 1016 (w); 906 (w); 840 (m); 797 (m); 739 (m); 478 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₉H₇N₃O₂+H⁺ [M+H⁺] 190.0611; gefunden: 190.0611.

11.32 Synthese von 1,7-Diaminoisochinolin 60:^[168]

82,0 mg (0,433 mmol) 1-Amino-7-nitroisochinolin wurden in 30 ml Methanol gelöst und mit 40 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) versetzt. Die Mischung wurde 4 h bei Raumtemperatur und Normaldruck in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt und nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) über Celite filtriert. Das Lösemittel wurde im Vakuum abdestilliert und der entstandene Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM/MeOH/NH₃ 3:1:0,01). Man erhielt 63 mg (91 %) 1,7-Diaminoisochinolin in Form eines amorphen orangen Feststoffs.

R_f: 0.13 (EE/MeOH 5:1).

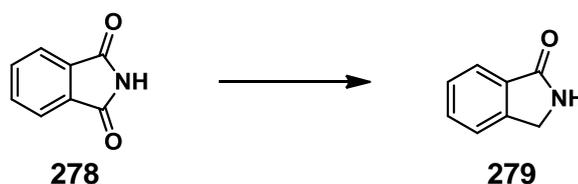
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.47 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.41 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.03 (m, 2H, Ar-*H*), 6.72 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.14 (s, 2H, NH₂), 5.27 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CD₃CN): δ / ppm = 156.1, 147.5, 137.0, 131.0, 128.9, 122.5, 120.2, 112.6, 104.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3459 (w); 3300 (m); 3192 (m); 1622 (m); 1594 (m); 1555 (m); 1512 (m); 1433 (m); 1383 (m); 1346 (m); 1301 (m); 1248 (m); 1144 (m); 999 (m); 924 (w); 886 (w); 830 (s); 780 (m); 580 (s); 517 (s); 500 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₉N₃ (159,19): C 67.90; H 5.70; N 26.40; gefunden: C 67.63; H 5.84; N 26.23.

11.33 Synthese von Isoindolinon 279:



25,0 g (130 mmol) Phthalimid wurden in einer Mischung aus 350 ml THF und 125 ml Methanol gelöst und bei 0 °C mit 10,9 g (289 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Nach 1 Stunde wurde das Kältebad entfernt und bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Feststoff in 350 ml Eisessig und 125 ml konz. Salzsäure gelöst. Man erhitzte die Lösung auf 80 °C und versetzte portionsweise mit 101 g (850 mmol) Zinn. Nach 5 Stunden war die Reaktion beendet und man destillierte das Lösemittel im Vakuum ab, neutralisierte unter Eiskühlung mit 1 M Natronlauge und extrahierte mehrmals mit Dichlormethan. Nach Entfernen des Lösemittels, kristallisierte man den Rückstand aus Essigsäureethylester um und erhielt 12,0 g (53 %) Isoindolinon in Form von farblosen Kristallen.

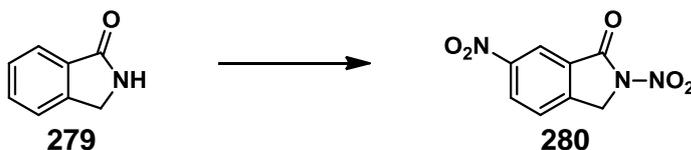
Smp.: 150 °C (Lit. 149-151 °C).^[253]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 8.53 (br s, 1H, NH); 7.67 (d, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.62-7.55 (m, 2H, Ar-*H*); 7.47 (ddd, J = 7.8 Hz, J = 5.9 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, Ar-*H*), 4.37 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 169.8, 144.0, 132.5, 131.1, 127.5, 123.6, 122.6, 44.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3203 (w); 3078 (w); 2934 (w); 2883 (w); 1675 (m); 1624 (m); 1591 (m); 1470 (m); 1447 (m); 1352 (m); 1318 (m); 1303 (m); 1209 (m); 1186 (w); 1139 (m); 1085 (w); 1054 (w); 1013 (w); 941 (w); 843 (w); 798 (w); 771 (m); 748 (m); 725 (s); 711 (s); 599 (m); 565 (m); 484 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇NO (133.15): C 72.16; H 5.30; N 10.52; gefunden: C 72.10; H 5.22; N 10.51.

11.34 Synthese von 2,6-Dinitroisindolin-1-on 280:

1,00 g (7,51 mmol) Isoindolinon wurde in 10 ml 98 %ige Schwefelsäure gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man tropfte 3,3 ml rauchende Salpetersäure so langsam zu, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Nach der Zugabe wurde die Reaktionslösung 1 Stunde auf 0 °C gekühlt und nach Entfernen des Kältebads bei Raumtemperatur weitere 2 Stunden gerührt. Nach der Reaktion schüttete man die Reaktionsmischung vorsichtig auf 100 g Eis und filtrierte den Feststoff ab. Anschließend wusch man mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dest. Wasser. Das gelbe Pulver wurde aus Ethanol umkristallisiert und man erhielt 420 mg (25 %) 2,6-Dinitroisindolin-1-on als gelbe Nadeln.

R_f: 0.31 (n-Hexan/EE 2:1).

Smp.: 173 °C.

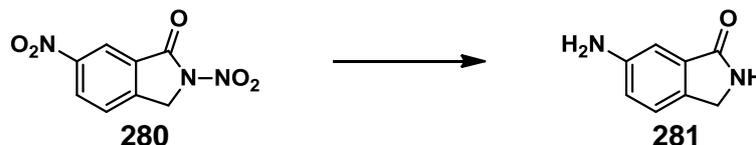
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.64 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 178.0, 159.2, 144.2, 129.6, 129.4, 126.0, 119.8, 51.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3064 (w), 1763 (s), 1614 (m), 1560 (m), 1530 (m), 1443 (w), 1353 (m), 1286 (m), 1253 (m), 1204 (m), 1117 (m), 1064 (w), 930 (w), 875 (w), 848 (w), 724 (m), 673 (m), 477 (w).

Elementaranalyse (%) für C₈H₅N₃O₅ (223.14): C 43.06; H 2.26; N 18.83; gefunden: C 42.81; H 2.15; N 18.92.

11.35 Synthese von 6-Aminoisoindolin-1-on 281:



1,00 g (4,48 mmol) 2,6-Dinitroisoindolin-1-on wurde in 50 ml Methanol gelöst, mit 100 mg Pd/C (10 %Pd) versetzt und in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und Normaldruck 18 Stunden gerührt. Nach der Reaktion filtrierte man über Celite und entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Der Feststoff wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (EE/MeOH 19:1) und man erhielt 350 mg (53 %) 6-Aminoisoindolin-1-on als hellbraunen Feststoff. Eine analytische Probe wurde mittels C18 Säule (CH₃CN/H₂O 70:30; 0,1 % TFA) aufgearbeitet.

R_f: 0.37 (EE/MeOH 9:1).

Smp.: 123-125 °C (TFA-Salz).

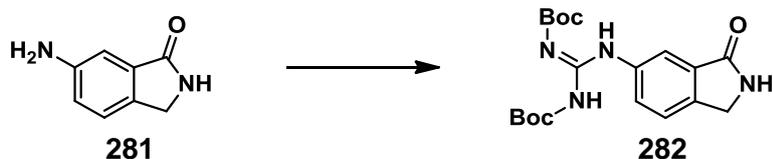
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.29 (br, 1H), 7.63 (br, 3H, NH); 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 6.78 (s, 1H, Ar-H), 6.76 (dd, J = 2.1 Hz, J = 0.5 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H). (TFA-Salz)

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 170.3, 158.3 (q, J_{CF} = 37 Hz), 148.7, 146.2, 123.8, 122.3, 115.3, 109.0, 44.5. (TFA-Salz)

IR: $\tilde{\nu}$ = 3197 (w); 2850 (w); 2595 (w); 1669 (s); 1616 (m); 1597 (m); 1526 (m); 1488 (m); 1456 (m); 1429 (m); 1369 (w); 1330 (w); 1303 (w); 1247 (w); 1178 (s); 1118 (s); 1053 (w); 926 (w); 887 (w); 846 (m); 795 (m); 768 (m); 752 (m); 713 (m); 687 (m); 607 (m); 551 (m); 531 (m); 470 (m). (TFA-Salz)

Elementaranalyse (%) für C₈H₈N₂O (148,16): C 64.85; H 5.44; N 18.91; gefunden: C 64.47; H 5.27; N 18.95. (vor C-18 Trennung)

11.36 Synthese von N,N'-Bis-Boc-3-(3-oxoisindolin-5-yl)guanidin 282:



In einer Schutzgasatmosphäre werden 500 mg (3,37 mmol) 6-Aminoisindolin-1-on, 980 mg (3,54 mmol) N,N'-Bis-(tert-Butoxycarbonyl)thioharnstoff und 1,40 ml (10,1 mmol) Triethylamin in 20 ml abs. DMF gelöst und bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0,96 g (3,54 mmol) HgCl_2 versetzt. Die gelbe Suspension wurde 1 Stunde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und nach Entfernen des Kältebades eine weitere Stunde bei Raumtemperatur, wobei sich eine schwarze Suspension von HgS bildete. Man filtrierte nach beendeter Reaktion über Celite und destillierte das Lösemittel im Vakuum ab. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (Hexan/EE 1:4) und nach Entfernen des Lösemittels erhielt man 880 mg (67 %) eines farblosen Pulvers.

Smp.: $>270\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zers.).

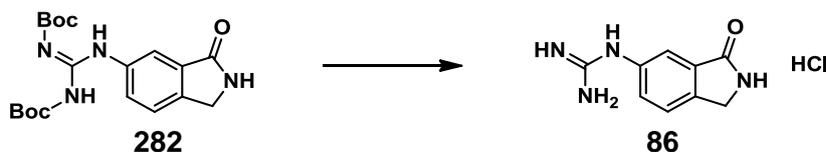
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 11.64 (s, 1H, NH), 10.49 (s, 1H, NH), 7.95 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.70 (s, 1H, NH), 4.40 (s, 2H, CH_2), 1.53 (s, 9H, t-Bu), 1.51 (s, 9H, t-Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 171.0, 153.8, 139.7, 137.0, 132.6, 126.5, 123.6, 117.6, 45.2, 28.1.

IR: $\tilde{\nu} = 3285$ (w); 1733 (m); 1694 (s); 1635 (m); 1597 (m); 1539 (m); 1410 (m); 1368 (m); 1312 (s); 1224 (m); 1150 (s); 1135 (s); 1114 (s); 1059 (s); 1029 (m); 866 (w); 802 (m); 774 (m); 763 (m); 715 (m); 681 (m); 631 (m); 594 (m); 562 (w); 492 (w); 459 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$ (390.43): C 58.45; H 6.71; N 14.35; gefunden: C 58.25; H 6.73; N 14.25.

11.37 Synthese von 1-(3-Oxoisoindolin-5-yl)guanidin Hydrochlorid 86:



250 mg (0,640 mmol) 1,2-Bis-Boc-3-(3-oxoisoindolin-5-yl)guanidin wurden in 20 ml Dioxan gelöst und mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur, wurde das Lösemittel abdestilliert und der Rückstand mit 20 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 161 mg (0,704 mmol) Pikrinsäure in 1,6 ml Ethanol bildete sich ein voluminöser Niederschlag, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser (1:2) erhielt man 130 mg (48 %) des Pikratsalzes, das anschließend mit Methanol durch eine Dowex-Cl Säule eluiert wurde. Nach dem Trocknen im Vakuum und Umkristallisation aus abs. Ethanol erhielt man 56 mg (39 %) des Hydrochlorids als einen farblosen Feststoff.

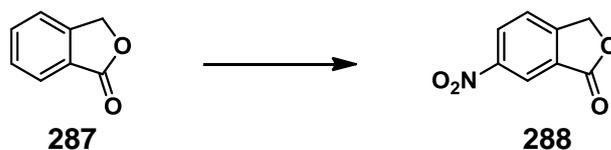
Smp.: >300 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.09 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1H, NH), 7.64 (dd, J = 8.0 Hz, J = 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (s, 4H, NH₂), 7.48 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.44 (dd, J = 8.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 4.38 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 169.0, 156.1, 141.8, 135.0, 133.9, 127.7, 124.9, 118.6, 44.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3113 (m); 1671 (s); 1627 (m); 1593 (m); 1492 (m); 1464 (m); 1406 (w); 1324 (m); 1263 (w); 1217 (w); 1142 (w); 1045 (w); 1014 (w); 914 (w); 840 (w); 774 (m); 658 (s); 614 (s); 586 (m); 511 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₁₁ClN₄O (226,66): C 47.69; H 4.89; N, 24.72; gefunden: C 47.56; H 4.97; N 25.00.

11.38 Synthese von 6-Nitroisobenzofuran-1(3H)-on 288:

15,0 g (112 mmol) 3H-Isobenzofuran-1-on wurden in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst und im Kältebad auf 0 °C gekühlt. Man tropfte langsam 25 ml rauchende Salpetersäure zu, sodass die Temperatur nicht über 10 °C stieg. Anschließend erwärmte man das Reaktionsgemisch über einen Zeitraum von 2 Stunden auf Raumtemperatur und schüttete den Reaktionsansatz nach beendeter Reaktion auf 300 g Eis. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und aus 250 ml Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 13,6 g (68 %) 6-Nitroisobenzofuran-1(3H)-on als farblose Kristalle.

R_f: 3.1 (n-Hexan/EE 1:1).

Smp.: 143-144 °C (Lit. 141 °C).^[254]

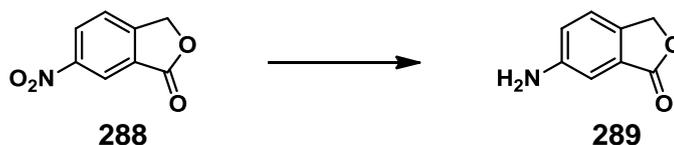
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.60 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 8.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.97 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 0.6 Hz, 1H, Ar-*H*); 5.57 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 168.7, 153.1, 148.3, 128.7, 126.5, 124.8, 119.9, 70.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3083 (w); 1755 (s); 1615 (m); 1522 (m); 1472 (w); 1441 (m); 1342 (s); 1264 (m); 1215 (m); 1195 (m); 1125 (w); 1093 (s); 1050 (m); 1003 (m); 915 (m); 844 (m); 822 (m); 786 (m); 775 (m); 735 (s); 666 (m); 642 (s); 548 (m); 509 (m); 482 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₅NO₄ (179.13): C 53.64; H 2.81; N 7.82; gefunden: C 53.39; H 2.63; N 7.99.

11.39 Synthese von 6-Aminoisobenzofuran-1(3H)-on 289:



2,00 g (11,2 mmol) 6-Nitroisobenzofuran-1(3H)-on und 100 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %Pd) wurden in 30 ml Methanol suspendiert. Das Gemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion filtrierte man die Reaktionslösung über Celite und destillierte das Lösemittel ab. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE 1:1). Man erhielt 1,19 g (71 %) eines farblosen Feststoffs, der bei 366 nm blau fluoreszierte.

R_f: 0.24 (n-Hexan/EE 1:1).

Smp.: 186 °C (Lit.186-187 °C).^[255]

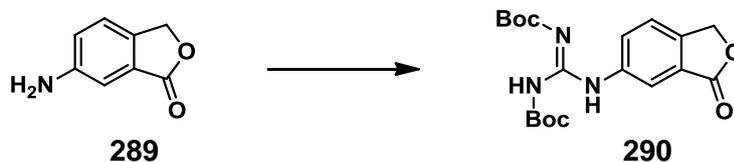
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.28 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.97 (dd, J = 8.2 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.91 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar-*H*); 5.53 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 168.7, 153.1, 128.7, 126.4, 124.7, 119.9, 70.2.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3084 (w); 1755 (s); 1616 (m); 1523 (m); 1472 (w); 1441 (m); 1343 (s); 1264 (m); 1215 (m); 1195 (m); 1125 (w); 1094 (s); 1050 (m); 1004 (s); 916 (m); 844 (m); 823 (m); 786 (m); 775 (m); 735 (s); 666 (m); 642 (s); 548 (m); 510 (m); 481 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇NO₂ (149,15): C 64.42; H 4.73; N 9.39; gefunden: C 64.48; H 4.85; N 9.31.

11.40 Synthese von N,N'-Bis-Boc-3-(3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin 290:



In einer Argonatmosphäre wurden 0,500 g (3,35 mmol) 6-Aminoisobenzofuran-1(3H)-on, 1,02 g (3,69 mmol) N,N'-Bis-(tert-Butoxycarbonyl)thioharnstoff und 1,71 ml (10,1 mmol) DIPEA in 10 ml abs. DMF gelöst und bei einer Temperatur von 0 °C mit 1,00 g (3,69 mmol) HgCl₂ versetzt. Es trat eine sofortige Gelbfärbung ein, man entfernte nach 10 Minuten das Kältebad und erwärmte langsam auf Raumtemperatur, wobei ein schwarzer Niederschlag bildete. Man rührte noch weitere 2 Stunden und filtrierte nach beendeter Reaktion über Celite. Das Lösemittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographiert (n-Hexan/EE 4:1). Man erhielt 993 mg (76 %) eines farblosen Pulvers.

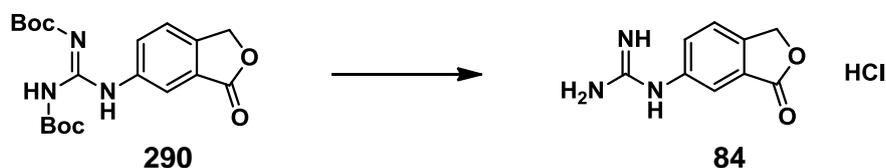
Smp.: 250 °C (Zers.).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.36 (s, 1H, NH); 10.16 (s, 1H, NH); 8.17 (d, J = 0.12 Hz, 1H, Ar-H); 7.79 (dd, J = 8.2 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H); 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H); 5.41 (s, 2H, CH₂); 1.53 (s, 9H, t-Bu); 1.42 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 170.2, 162.2, 152.6, 151.8, 143.3, 137.5, 129.0, 125.3, 123.1, 118.3, 83.2, 78.9, 69.7, 27.8, 27.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 2987 (w); 1758 (m); 1711 (m); 1637 (m); 1576 (m); 1501 (w); 1397 (m); 1368 (m); 1339 (m); 1309 (m); 1298 (m); 1232 (m); 1142 (s); 1100 (m); 1049 (m); 1029 (m); 998 (m); 909 (w); 876 (w); 851 (w); 812 (m); 772 (m); 750 (m); 723 (m); 694 (w); 628 (m); 591 (w); 541 (m); 461 (w).

Elementaranalyse (%) für C₁₉H₂₅N₃O₆ (391.42): C 58.30; H 6.44; N 10.74; gefunden: C 58.03; H 6.42; N 10.56.

11.41 Synthese von 1-(3-Oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin Hydrochlorid 84:

500 mg (1,28 mmol) N,N'-Bis-Boc-3-(3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin wurden in 10 ml Dioxan gelöst und mit 2 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Man rührte 1 Stunde bei Raumtemperatur und entfernte das Lösemittel über Vakuumdestillation. Der Destillationsrückstand wurde in wenig Ethanol gelöst und durch Zugabe von Ether gefällt. Man filtrierte den farblosen Niederschlag ab und kristallisierte aus Ethanol um, wobei 174 mg (60 %) farblose Kristalle erhalten wurden.

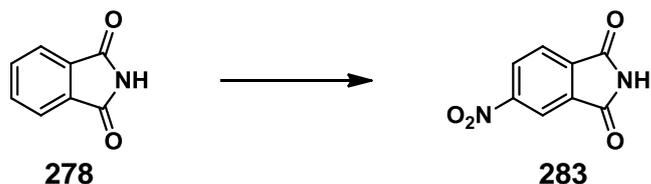
Smp.: 241-243 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.29 (s, 1H, N-H); 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H); 7.68 (s, 5H, 1CH+ NH₂), 7.62 (dd, J = 8.2 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, Ar-H); 5.44 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 169.9, 156.1, 144.8, 136.2, 130.6, 126.1, 124.3, 120.3, 69.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3144 (m); 3049 (w); 1735 (s); 1666 (s); 1641 (s); 1604 (m); 1589 (m); 1495 (m); 1457 (w); 1409 (m); 1365 (m); 1308 (m); 1296 (m); 1250 (w); 1238 (w); 1159 (w); 1132 (w); 1064 (m); 1001 (s); 934 (w); 911 (w); 853 (w); 771 (m); 635 (m); 590 (m); 533 (m); 511 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₁₀ClN₃O₂*1/2H₂O (236.66): C 45.68; H 4.69; N 17.76; gefunden: C 46.08; H 4.40; N 17.79.

11.42 Synthese von 5-Aminophthalimid 283:

Zu einer Mischung aus 100 ml konz. H_2SO_4 und 25 ml HNO_3 (100 %ig) wurden unter Eiskühlung 10.0 g (68,0 mmol) Phthalimid so schnell zugegeben, dass die Temperatur nicht über 10 °C anstieg. Nach beendeter Zugabe wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend schüttete man die Lösung auf 500 ml Eiswasser, wobei ein hellgelber Feststoff ausfiel. Man filtrierte das Rohprodukt ab und wusch mit Wasser. Nach Umkristallisation aus EtOH erhielt man 8,40 g (64 %) Nitrophthalimid in Form farbloser Plättchen.

R_f: 0.42 (EE/n-Hexan 1:2).

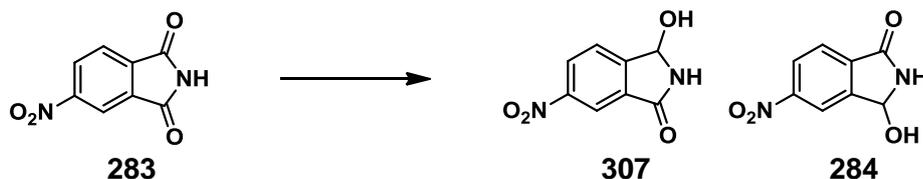
Smp.: 194-195 °C (Lit. 194.5-195 °C).^[256]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.82 (s, 1H, N-H), 8.60 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 8.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 167.4, 167.1, 151.3, 137.2, 134.0, 129.3, 124.4, 117.7.

IR: $\tilde{\nu} = 3186$ (w); 1773 (w); 1729 (m); 1622 (w); 1602 (w); 1544 (m); 1466 (w); 1346 (m); 1305 (m); 1287 (m); 1172 (w); 1141 (w); 1109 (w); 1070 (m); 1052 (m); 1029 (m); 937 (w); 899 (w); 864 (w); 800 (w); 745 (m); 713 (s); 668 (m); 646 (m); 606 (m); 549 (m); 533 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₄N₂O₄ (192.13): C 50.01; H 2.10; N 14.58 gefunden: C 49.76; H 2.20; N 14.69.

11.43 Synthese von (\pm)-5-Amino-3-hydroxyisoindolin-1-on **284**:

10,0 g (52,0 mmol) 5-Nitroptalimid wurden in einer Mischung aus 100 ml THF und 100 ml Methanol gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0 °C ab, versetzte mit 1,97 g (52,0 mmol) Natriumborhydrid und rührte 1 Stunde, wobei zunächst eine Violettfärbung und schließlich eine Rotfärbung zu beobachten waren. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mit 5 ml Eisessig gequenchet. Die gelbe Lösung wurde am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Hierbei fielen 3,45 g (34 %) (\pm)-3-Hydroxy-6-nitroisoindolin-1-on **307** als hellgelbe Kristalle aus. Die mit (\pm)-5-Amino-3-hydroxyisoindolin-1-on **284** angereicherte Lösung wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE/MeOH 2:9:1). Man erhielt 3,82 g (38 %) (\pm)-5-Amino-3-hydroxyisoindolin-1-on **284** in Form eines farblosen Pulvers.

Smp.: 270-274 °C.

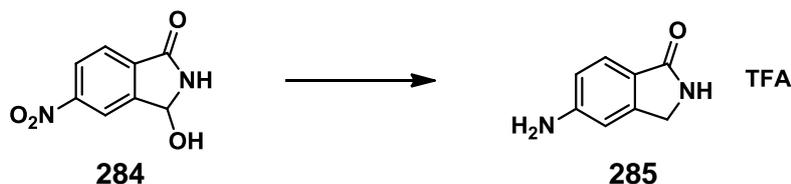
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 9.37 (s, 1H, NH); 8.30-8.40 (m, 2H, Ar-H); 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H); 6.64 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); 6.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 166.2, 150.0, 148.0, 137.3, 124.8, 123.8, 118.8, 77.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3288 (m), 3103 (w), 1689 (s), 1624 (w), 1533 (s), 1437 (w), 1419 (w), 1384 (w), 1347 (s), 1269 (w), 1204 (m), 1139 (w), 1079 (m), 1049 (m), 922 (w), 902 (w), 864 (w), 834 (w), 792 (w), 776 (w), 729 (m), 679 (w), 642 (w), 594 (w).

Elementaranalyse (%) für C₈H₆N₂O₄: C 49.49; H 3.12; N 14.43; O 32.96; gefunden: C 49.13; H 2.93; N 14.43.

11.44 Synthese von 5-Aminoisoindolin-1-on Hydrotrifluoracetat 285:



2,00 g (12,18 mmol) 5-Amino-3-hydroxyisoindolin-1-on wurden in 200 ml Eisessig und 100 ml konz. Salzsäure gelöst und auf 80-90 °C erhitzt. Man versetzte portionsweise über einen Zeitraum von 8 Stunden mit 5,79 g (48,73 mmol) Zinnpulver und erhitzte die Reaktionsmischung weitere 10 Stunden. Das Lösemittel wurde nach beendeter Reaktion im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit 1M Natronlauge neutralisiert. Anschließend befreite man die Mischung durch wiederholte Coevaporation mit Toluol von der Essigsäure und extrahierte anschließend den Feststoff mit siedendem Ethanol. Nach einer Filtration durch 50 g Kieselgel mit einem Eluenten aus EE/MeOH 4:1 erhielt man 1,52 g (84 %) eines bräunlichen Feststoffs. Zu analytischen Zwecken wurde ein Teil mittels C18 Säule (CH₃CN/H₂O/TFA 70:30:0,1) aufgearbeitet.

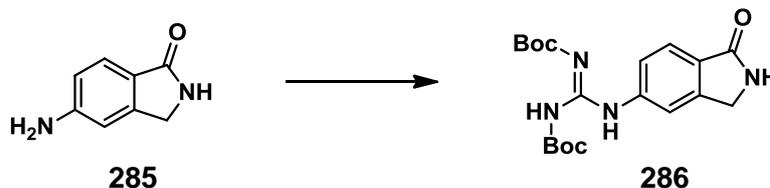
Smp.: 233-235 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 9.06 (s, 3H, NH); 8.54 (s, 1H, NH); 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H); 7.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.20 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-H); 4.29 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 169.5, 158.3 (q, *J*_{CF} = 34 Hz), 139.6, 137.7, 133.7, 124.4, 122.2, 115.0 (w q, *J*_{CF} = 302 Hz), 112.3, 44.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3316 (w); 3097 (w); 2599 (w); 2088 (w); 1668 (m); 1621 (m); 1490 (m); 1462 (m); 1438 (m); 1418 (m); 1353 (w); 1325 (w); 1296 (w); 1179 (s); 1124 (s); 905 (w); 836 (m); 821 (m); 798 (m); 773 (m); 734 (m); 721 (s); 704 (m); 630 (m); 601 (m); 585 (m); 552 (m); 523 (s); 454 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₉F₃N₂O₃·1/3H₂O (268.18): C 43.79; H 3.63; F 20.79; N 10.22; O 21.39; gefunden: C 44.97; H 3.39; N 10.68.

11.45 Synthese von *N,N*-Bis-Boc-3-(1-oxoisindolin-5-yl)guanidin 286:

500 mg (3,37 mmol) 5-Aminoisindolin-1-on, 979 mg (3,54 mmol) *N,N*-Di-(*tert*-Butoxycarbonyl)thioharnstoff und 1,72 ml (10,1 mmol) DIPEA wurden in 20 ml abs. DMF gelöst und auf -10 °C gekühlt. Nach Zugabe von 962 mg (3,54 mmol) HgCl₂ bildete sich zunächst eine gelbe Suspension. Man rührte das Gemisch 1 Stunde und erwärmte anschließend langsam auf Raumtemperatur. Nach 30 Minuten entstand ein schwarzer Niederschlag aus HgS und nach weiteren 2 Stunden Reaktionszeit war die Reaktion abgeschlossen. Nach Zugabe von 100 ml Methanol filtrierte man den Feststoff über Celite ab und entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Rohprodukt über eine Säule eluiert (n-Hexan/EE 1:4). Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 937 mg (71 %) eines farblosen Pulvers.

Smp.: >300 °C.

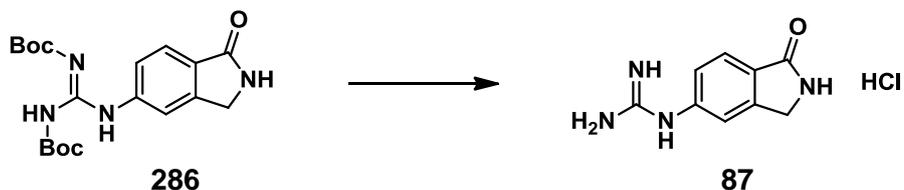
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 11.67 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, NH), 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.80 (s, 1H, NH), 4.45 (s, 2H, CH₂), 1.53 (s, 18H, CH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 171.0, 153.4, 152.7, 145.0, 140.0, 128.3, 124.4, 123.9, 123.7, 121.9, 116.7, 77.2, 45.6, 28.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3176 (w); 2981 (w); 1696 (s); 1638 (m); 1614 (m); 1575 (m); 1464 (m); 1417 (m); 1363 (m); 1343 (m); 1313 (s); 1297 (m); 1279 (m); 1241 (s); 1147 (s); 1118 (s); 1057 (m); 1029 (m); 874 (w); 854 (m); 807 (m); 772 (s); 758 (m); 728 (m); 703 (m); 642 (m); 608 (w); 554 (w); 458 (w).

Elementaranalyse (%) für C₁₉H₂₆N₄O₅ (390.43): C 58.45; H 6.71; N 14.35; gefunden: C 58.45; H 6.86; N 14.36.

11.46 Synthese von 1-(1-Oxoisoindolin-5-yl)guanidin Hydrochlorid 87:



500 mg (1,28 mmol) 1,2-Bis-Boc-3-(1-oxoisoindolin-5-yl)guanidin wurden in 20 ml Dioxan gelöst und unter Rühren mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt. Nach 30 Minuten wurde das Lösemittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Ethanol gelöst und mit Diethylether gefällt. Nach Filtration wurde der farblose Feststoff im Vakuum getrocknet. Man erhielt 182 mg (63 %) eines farblosen Pulvers.

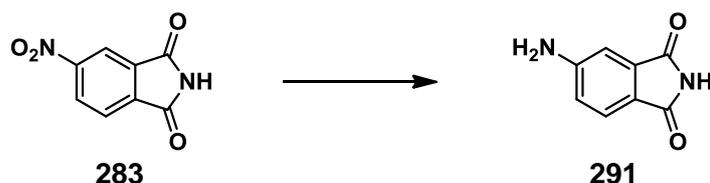
Smp.: 298 °C (Zers.).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.42 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, NH), 7.86-7.64 (m, 5H, NH₂, Ar-H), 7.43 (s, 1H, Ar-H), 7.31 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H, Ar-H), 4.36 (s, 1H, CH₂). (Spektrum zeigt Spuren von EtOH)

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 169.1, 155.9, 145.5, 138.2, 130.0, 123.9, 123.3, 118.8, 44.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3260 (m); 1667 (m); 1591 (m); 1563 (m); 1486 (m); 1445 (m); 1415 (m); 1357 (w); 1266 (m); 1214 (w); 1146 (w); 1046 (w); 968 (w); 878 (w); 855 (m); 769 (m); 683 (m); 592 (s); 535 (s); 507 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₁₁ClN₄O+0,1EtOH (231.27): C 47.78; H 5.06; N 24.23; gefunden: C 47.77; H 5.09; N 24.19.

11.47 Synthese von 5-Aminophtalimid 291:^[257]

1,00 g (5,20 mmol) 5-Nitrophtalamid wurden in 40 ml Methanol gelöst und mit 500 mg Raney-Nickel versetzt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur und Normaldruck 3 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, wobei sich ein gelber Niederschlag bildete. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit 200 ml THF versetzt und über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Feststoff aus einer Mischung aus Wasser und Methanol (3:1) umkristallisiert. Man erhielt 650 mg (77 %) 5-Aminophtalamid in Form von gelben Nadeln.

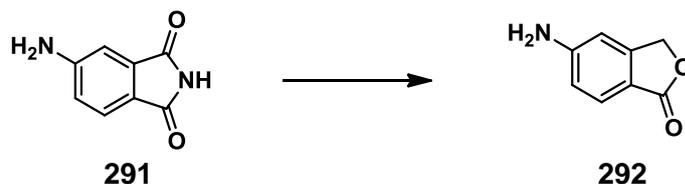
Smp.: 293-295 °C (Lit. 294 °C).^[257]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.70 (s, 1H, NH); 7.42 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, Ar-H); 6.86 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, Ar-H); 6.79 (dd, $J=8.2$ Hz, $J=2.0$ Hz, 1H, Ar-H); 6.38 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 169.6, 169.2, 154.7, 135.4, 124.5, 117.8, 116.7, 106.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3441 (w); 3352 (w); 3230 (m); 1760 (w); 1704 (s); 1642 (m); 1612 (m); 1586 (m); 1505 (m); 1386 (s); 1344 (m); 1322 (m); 1259 (m); 1183 (w); 1067 (m); 1038 (s); 917 (m); 851 (m); 836 (m); 761 (m); 748 (s); 634 (m); 563 (m); 538 (m); 492 (s).

Elementaranalyse (%) für C₈H₆N₂O₂ (162,15): C 59.26; H 3.73; N 17.28 gefunden: C 59.11; H 3.85; N 17.44.

11.48 Synthese von 5-Aminophtalid 292:^[258]

Zu einer Lösung aus 15,8 g (0,395 mol) Natriumhydroxid in 30 ml Wasser wurde 25,8 g (0,395 mol) Zinkpulver und 35 mg Kupfersulfat gegeben. 8,00 g (49,3 mmol) 5-Aminophtalimid wurden portionsweise über einen Zeitraum von 45 Minuten bei 0 °C zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit 40 ml Wasser verdünnt und bei 70-80 °C 18 Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion filtrierte man über Celite und säuerte das Filtrat mit konzentrierter Salzsäure unter Kühlung auf pH = 1 an. Der Suspension wurde in der Hitze homogenisiert, und nach dem Abkühlen bildete sich 5-Aminophtalid in Form von gelben Kristallen, die für die Analytik verwendet wurden. Nach Neutralisation mit Natriumcarbonat fiel der Rest des Produkts aus. Man filtrierte den Feststoff ab und getrocknete im Vakuum. Es konnten 3,96 g (54 %) 5-Aminophtalid als beige Blättchen erhalten werden.

Smp.: 193-194 °C (Lit.192-192.5 °C).^[258]

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 1H; Ar-H); 6.66 (dd, J = 1.9, J = 8.4, 1H; Ar-H); 6.59 (dd, J = 1.5, J = 1.0, 1H; Ar-H); 6.23 (s, 2H, NH₂); 5.15 (s, 2H, CH₂).

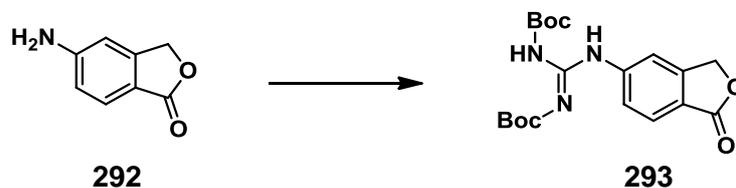
¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 170.7, 154.6, 150.0, 126.1, 114.7, 111.0, 104.4, 68.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3405 (m); 3331 (w); 3220 (w); 1725 (m); 1640 (m); 1608 (m); 1497 (w); 1434 (m); 1371 (m); 1335 (m); 1279 (s); 1216 (m); 1191 (w); 1130 (m); 1096 (m); 1056 (s); 995 (m); 931 (w); 865 (m); 836 (m); 823 (m); 792 (w); 771 (s); 743 (m); 700 (m); 687 (s); 610 (m); 578 (m); 553 (s); 463 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇NO₂ (149,15): C, 64.42; H, 4.73; N, 9.39; gefunden: C 64.25; H 4.58; N 9.36.

11.49 Synthese von *N,N*-Bis-Boc-3-(1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin

293:



In einem 100 ml Dreihalskolben wurden in einer Schutzgasatmosphäre 500 mg (3,35 mmol) 5-Aminoisobenzofuran-1-on, 1,02 g (3,69 mmol) *N,N*-Di-(*tert*-Butoxycarbonyl)thioharnstoff und 1,7 ml (10,1 mmol) DIPEA in 10 ml abs. DMF gelöst. Man kühlte die Lösung auf -10 °C und versetzte mit 1,00 g (3,69 mmol) Quecksilberchlorid, wobei eine Gelbfärbung zu beobachten war. Nach 10 Minuten wurde das Kältebad entfernt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Hierbei bildete sich schwarzes Quecksilbersulfid. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur versetzte man die Reaktionsmischung mit 100 ml Methanol und filtrierte über Celite. Das Filtrat wurde durch Vakuumdestillation vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE 4:1). Man erhielt 995 mg (76 %) eines leicht bräunlichen Pulvers.

Smp.: 260 °C (Zers.).

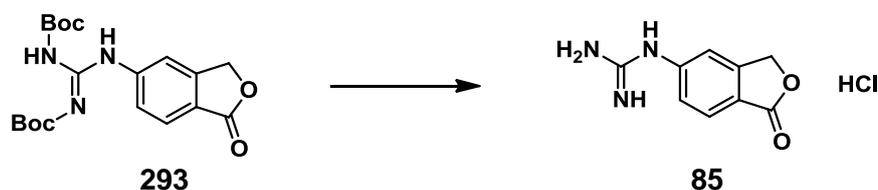
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 11.14 (s, 1H, NH), 10.27 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, Ar-H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (s, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 5.39 (s, 2H, CH₂), 1.50 (s, 9H, t-Bu), 1.42 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 170.6, 153.3, 148.3, 142.4, 126.4, 123.1, 122.2, 122.0, 121.3, 120.2, 114.5, 77.2, 69.6, 28.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3437 (w); 3353 (w); 2891 (m); 1673 (s); 1652 (m); 1608 (m); 1559 (w); 1519 (m); 1476 (w); 1433 (w); 1422 (w); 1397 (w); 1308 (w); 1289 (w); 1269 (w); 1178 (w); 1148 (m); 1103 (w); 1014 (w); 1001 (w); 956 (w); 888 (w); 870 (w); 835 (m); 821 (m); 767 (m); 758 (m); 733 (m); 700 (m); 626 (m); 593 (m); 572 (m); 516 (m); 489 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₉H₂₅N₃O₆ (391,42): C 58.30; H 6.44; N 10.74; gefunden: C 58.03; H 6.50; N 10.51.

11.50 Synthese von 1-(1-Oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin Hydrochlorid 85:



500 mg (1,28 mmol) *N,N*-Bis-Boc-3-(1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)guanidin wurden in 30 ml Dioxan gelöst und mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Man rührte das Gemisch bei Raumtemperatur 5 Stunden und entfernte anschließend das Lösungsmittel über eine Vakuumdestillation. Der Rückstand wurde aus abs. Ethanol umkristallisiert, wobei man 210 mg (72 %) hellbraune kristalline Blättchen erhielt.

Smp.: 266-270 °C.

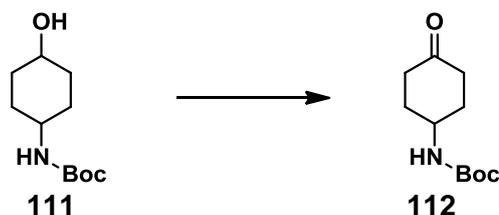
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 10.75 (s, 1H, NH); 7.92 (s, 4H, NH₂); 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.53 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.41 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar-*H*); 5.39 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 169.8, 155.7, 149.0, 141.3, 126.3, 123.6, 121.4, 116.6, 69.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3314 (m); 3164 (m); 3036 (m); 2938 (m); 1747 (m); 1664 (m); 1611 (s); 1587 (s); 1557 (m); 1484 (m); 1457 (m); 1408 (m); 1353 (m); 1313 (m); 1285 (m); 1260 (m); 1202 (m); 1110 (w); 1062 (s); 1017 (w); 993 (m); 899 (w); 855 (w); 815 (w); 782 (m); 765 (m); 715 (m); 686 (s); 634 (m); 555 (m); 532 (m); 514 (m); 468 (m); 455 (s).

Elementaranalyse (%) für C₉H₁₀ClN₃O₂ (227,65): C 47.48; H 4.43; N 18.46; gefunden: C 47.40; H 4.27; N 18.72.

11.52 Synthese von tert-Butyl-(4-oxocyclohexylamin)carbammat 112:



6,4 ml (74,3 mmol) Oxalylchlorid wurden in 110 ml trockenem Dichlormethan in einer Schutzgasatmosphäre auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und über einen Zeitraum von 10 Minuten mit 7,9 ml (112 mmol) DMSO in 18 ml Dichlormethan versetzt. Man rührte weitere 20 Minuten und tropfte anschließend innerhalb 45 Minuten 10,0 g (46,5 mmol) tert-Butyl-(4-Hydroxycyclohexylamin)carbammat in 550 ml Dichlormethan zu. Die Reaktionsmischung wurde 45 Minuten bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und nach beendeter Reaktion mit 35 ml Triethylamin versetzt. Man erwärmte die Lösung auf Raumtemperatur und fügte 500 ml Chloroform zu und wusch mit je 300 ml gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und dest. Wasser. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Man kristallisiert aus Cyclohexan um und erhielt 17,8 g (76 %) tert-Butyl-(4-oxocyclohexylamin)carbammat als farbloser Feststoff.

Smp.: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$.

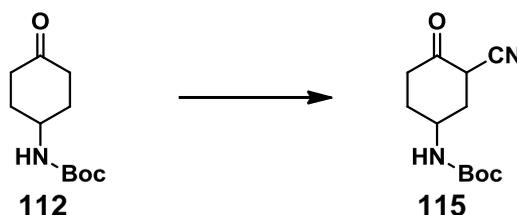
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 6.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, NH); 3.74 (m, 1H, CH-NHBoc); 2.38 (m, 2H, CH_2); 2.24 (td, $J = 10.3$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H, CH_2); 2.01-1.88 (m, 2H, CH_2); 1.61 (m, 2H, CH_2); 1.39 (s, 9H, t-Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 209.8, 154.8, 77.5, 46.4, 38.3, 31.2, 28.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3364 (s); 3018 (w); 2976 (m); 2952 (m); 2933 (m); 2880 (w); 1719 (s); 1679 (s); 1525 (s); 1460 (w); 1447 (w); 1439 (w); 1425 (w); 1390 (w); 1372 (m); 1364 (m); 1313 (m); 1291 (w); 1269 (m); 1255 (m); 1233 (m); 1204 (w); 1165 (s); 1104 (m); 1051 (m); 1030 (m); 1000 (m); 958 (w); 940 (m); 882 (s); 843 (w); 780 (w); 768 (w); 741 (w); 701 (w); 628 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ (213,27): C 61.95; H 8.98; N 6.57; gefunden: C 62.08; H 9.13; N 6.51.

11.53 Synthese von tert-Butyl-(3-cyano-4-oxocyclohexylamin)carbammat 115:



In einer Argonatmosphäre wurden zu einer Lösung aus 1,52 ml (10,8 mmol) Diisopropylamin in 30 ml abs. THF bei Raumtemperatur 5,16 ml (10,3 mmol) 2M BuLi Lösung langsam zugetropft und 30 Minuten gerührt. Man kühlt auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und setzte portionsweise 1,00 g (4,69 mmol) tert-Butyl-(4-oxocyclohexyl)carbammat im Argongegenstrom zu. Man rührte weitere 2 Stunden bei $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, wobei eine Gelbfärbung der Lösung zu beobachten war. Das Enolat wurde anschließend über eine Kanüle zu einer Lösung aus 1,27 g (7,03 mmol) Tosylnitril in 20 ml abs. THF, die auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurde, zugetropft. Man rührte die Reaktionsmischung 2 Stunden und versetzte mit 50 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wird die organische Phase abgetrennt, und die wässrige Phase mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE 2:1). Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man 680 mg (62 %) eines gelblichen Schaums.

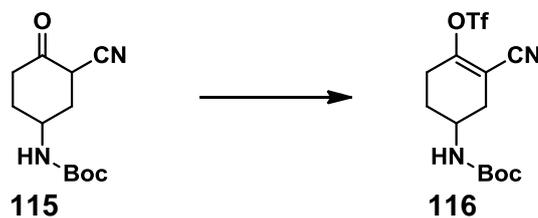
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 4.50 (s, 1H, NH^{Boc}); 3.92 (m, 1H, $\text{CH-NH}^{\text{Boc}}$); 2.47-2.36 (m, 3H, CHCN , CH_2); 2.31-2.16 (m, 1H; CH_2); 1.76-1.56 (m, 2H, CH_2); 1.45 (s, 9H, t-Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 157.0, 154.8, 121.0, 77.5, 66.8, 45.3, 30.1, 28.1, 27.2, 26.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3434 (w); 3356 (w); 3243 (w); 2979 (w); 2184 (m); 1686 (s); 1652 (m); 1609 (m); 1514 (m); 1448 (w); 1390 (m); 1365 (m); 1312 (m); 1248 (m); 1229 (m); 1165 (s); 1049 (m); 1016 (m); 1003 (m); 868 (w); 780 (w); 571 (m); 480 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}^+$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 261.1210; gefunden: 261.1207.

11.54 Synthese von (\pm)-4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yl-trifluormethanesulfonat 116:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 800 mg (3,36 mmol) tert-Butyl-(3-cyano-4-oxocyclohexyl)carbamate und 1,14 ml (6,71 mmol) DIPEA in 20 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Man tropfte langsam 624 μl (3,69 mmol) Triflylanhydrid in 3 ml abs. Dichlormethan zu und rührte 1 Stunde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend quenchte man die Reaktionslösung mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und erwärmte auf Raumtemperatur. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der ölige Rückstand wurde chromatographiert (n-Hexan/EE 2:1) und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 1,05 g (84 %) eines gelblichen Schaums.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 4.55 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH); 3.87 (m, 1H, CH-NHBoc); 2.93-2.54 (m, 3H, CH_2); 2.33 (m, 1H, CH_2); 2.14-1.98 (m, 1H, CH_2); 1.96-1.76 (m, 1H, CH_2); 1.45 (s, 9H, t-Bu); 1.25 (m, Spuren von n-Hexan).

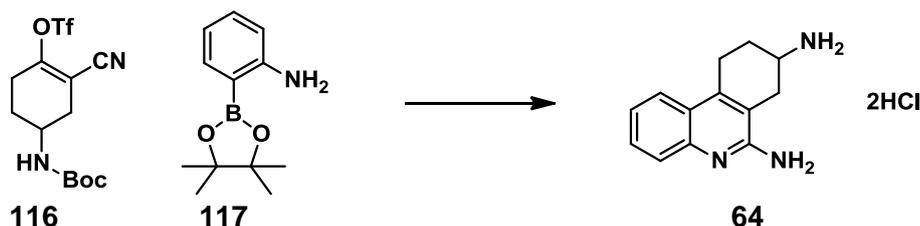
$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 157.7, 154.9, 118.3 (q, $J_{\text{CF}} = 320$ Hz), 113.2, 103.2, 80.4, 43.7, 32.7, 28.3, 27.3, 26.8.

IR: $\tilde{\nu} = 3345$ (w); 2973 (w); 2185 (w); 1679 (s); 1516 (s); 1417 (s); 1393 (m); 1367 (m); 1312 (m); 1275 (m); 1250 (m); 1230 (s); 1207 (s); 1172 (s); 1137 (s); 1059 (s); 911 (w); 887 (m); 876 (m); 846 (m); 820 (m); 784 (m); 765 (m); 704 (m); 657 (m); 610 (s); 593 (s); 509 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}+5\%$ n-Hexan (374,65): C 42.64; H 4.76; N 7.48; S 8.56; gefunden: C 42.82; H 4.57; N 7.75; S 8,61.

11.55 Synthese von 7,8,9,10-Tetrahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrochlorid

64:



In einer Argonatmosphäre wurden 500 mg (1,35 mmol) 4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yltrifluormethansulfonat, 296 mg (1,35 mmol) 2-Aminoboronsäurepinacolester und 1,32 g (4,05 mmol) Cäsiumcarbonat in 40 ml entgastem Dioxan/H₂O (10:1) gelöst und mit 78,0 mg (67,5 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) versetzt. Das Gemisch wurde 2 Stunden bei 90 °C gerührt, wobei nach beendeter Reaktion ein schwarzer Niederschlag zu beobachten war. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, und der Rückstand an Kieselgel adsorbiert und über säulenchromatographische Aufarbeitung gereinigt (EE/MeOH 9:1). Das Zwischenprodukt wurde in 20 ml Dioxan gelöst und mit 2 ml konz. HCl versetzt. Nach 3 Stunden wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und durch Zugabe von Diethylether gefällt. Der Niederschlag 260 mg (64 %) wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Eine analytische Probe wurde aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt das Dihydrochlorid in Form eines farblosen Feststoffs.

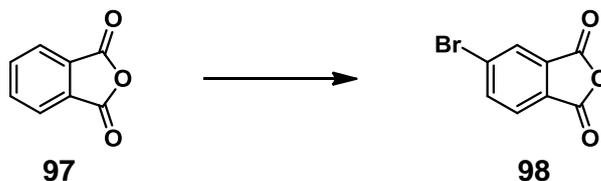
Smp.: >300 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 14.53 (br, 1H, NH); 8.56 (br, 5H, NH); 8.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H); 7.82-7.65 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar-H); 3.61 (br, CH-NH₂); 3.31-3.05 (m, 2H, CH₂); 2.94 (dd, *J* = 16.8 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH₂); 2.68 (dd, *J* = 17.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH₂); 2.35-2.18 (m, 1H, CH₂); 1.99 (m, 1H, CH₂).

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 153.0, 147.5, 133.6, 131.6, 124.8, 124.2, 120.2, 117.1, 116.7, 44.6, 27.4, 24.2, 23.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3330 (s); 3029 (s); 2924(s); 1690 (s); 1661 (s); 1610 (m); 1560 (w); 1510 (w); 1490 (m); 1432 (m); 1401 (m); 1362 (w); 1283 (w); 1265 (w); 1230 (w); 1191 (w); 1143 (m); 1057 (w); 1005 (w); 902 (w); 769 (w); 676 (m); 594 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₃H₁₇Cl₂N₃·3/4H₂O (310,16): C 50.34; H 6.39; N 13.55; gefunden: C 50.55; H 6.29; N 13.35.

11.56 Synthese von 5-Bromphthalsäureanhydrid 59:^[189]

21,6 g (0,540 mol) Natriumhydroxid wurden in 180 ml Wasser gelöst und bei Raumtemperatur mit 40,0 g (270 mmol) Phthalsäureanhydrid versetzt. Über einen Tropftrichter wurden 14,4 ml (0,28 mol) Brom innerhalb einer halben Stunde zugetropft und anschließend 6 Stunden auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 4 °C filtrierte man den Niederschlag ab und wusch mit kaltem Wasser. Man trocknete das Zwischenprodukt sorgfältig durch Coevaporation mit Toluol und versetzte das beige Pulver vorsichtig mit 50 ml Thionylchlorid. Unter einer Schutzgasatmosphäre wurde das Gemisch 2,5 Stunden zum Sieden erhitzt, bis eine klare gelbe Lösung entstand. Das Thionylchlorid wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit 200 ml heißem Essigsäureethylester digeriert. Man filtrierte die Lösung und trocknete über Magnesiumsulfat. Nach dem Entfernen des überschüssigen Lösemittels kristallisierte man aus Essigsäureethylester um und erhielt 24,9 g (41 %) farblose Kristalle.

Smp.: 105-106 °C.

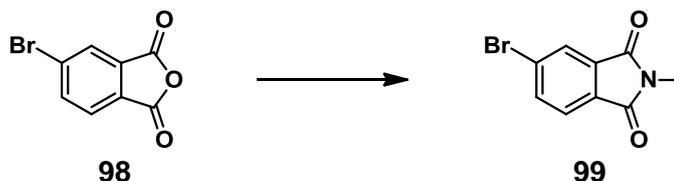
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8,03 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, Ar-H); 8,00 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, Ar-H); 7,77 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 1$ Hz, 1H, Ar-H); 3,02 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.4, 161.8, 138.8, 133.2, 130.2, 129.8, 128.0, 126.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3090 (m), 2015 (w); 1851 (s); 1812 (m); 1771 (s); 1599 (m); 1462 (w); 1452 (w); 1421 (m); 1392 (w); 1330 (m); 1290 (w); 1250 (s); 1170 (m); 1113 (m); 1048 (m); 980 (w); 908 (s); 887 (m); 866 (m); 852 (m); 734 (s); 694 (m); 658 (m); 637 (w); 590 (m).

Elementaranalyse (%) für C₈H₃BrO₃ (227,01): C 42.33; H 1.33; gefunden: C 42.47; H 1.40.

11.57 Synthese von 5-Brom-2-methylphthalimid 99:



20,0 g (88,1 mmol) 5-Brom-1,3-isobenzofurandion wurden in 100 ml Pyridin gelöst und mit 12 ml (96,0 mmol) einer 8 M ethanolischen Methylaminlösung versetzt, wobei eine exotherme Reaktion einsetzte. Das Reaktionsgemisch wurde weitere drei Stunden zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel abdestilliert und der Rückstand mit Ether gewaschen. Nach Umkristallisation aus Pyridin erhielt man 15,6 g (74 %) 5-Brom-2-methylisindolin-1,3-dion als farbloser kristalliner Feststoff.

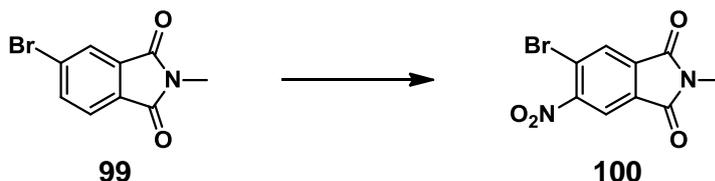
Smp.: 147-149 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8,00 (s, 1H, Ar-H); 7,98 (dd, $J = 6.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H); 7,75 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar-H); 3,02 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 167.1, 166.5, 136.7, 133.7, 130.6, 127.6, 125.6, 124.6, 23.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3446 (w); 3085 (w); 1938 (w); 1848 (w); 1763 (s); 1721 (s); 1601 (s); 1433 (s); 1415 (m); 1380 (s); 1248 (m); 1183 (w); 1170 (m); 1103 (m); 1074 (w); 1053 (m); 1008 (s); 974 (w); 902 (w); 876 (w); 845 (m); 736 (s); 720 (m); 663 (m); 607 (m); 574 (m).

Elementaranalyse (%) für C₉H₆BrNO₂ (240.05): C 45.03; H 2.52; N 5.83; gefunden: C 44.89; H 2.76; N 5.94.

11.58 Synthese von 5-Bromo-2-methyl-6-nitrophthalimid 100:

5,00 g (20,8 mmol) 5-Brom-2-methylisindolin-1,3-dion wurden portionsweise in 60 ml eisgekühlte konz. Schwefelsäure zugegeben. Man kühlte das Gemisch auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ab und tropfte 15 ml 100 %ige Salpetersäure so zu, dass die Temperatur nicht über $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ stieg. Nach der Zugabe wurde das Gemisch über einen Zeitraum von 3 Stunden auf Raumtemperatur erhitzt und anschließend auf Eis geschüttet. Der Niederschlag wurde über eine Nutsche abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhielt man 5,00 g (84 %) hellgelbe Kristalle.

Smp.: $213\text{ }^{\circ}\text{C}$.

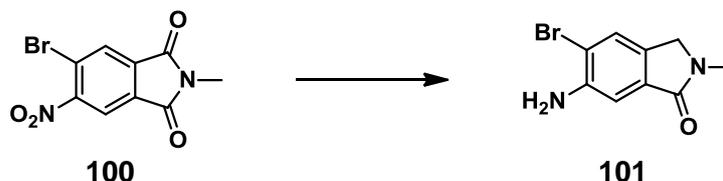
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 8.49 (s, 1H, Ar-H), 8.40 (s, 1H, Ar-H); 3.07 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 165.6, 165.5, 153.3, 134.9, 132.2, 128.8, 119.2, 119.0, 24.2.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3100 (w); 3034 (w); 2942 (w); 1814 (w); 1783 (m); 1721 (s); 1703 (s); 1618 (w); 1545 (s); 1456 (w); 1431 (m); 1365 (m); 1322 (w); 1255 (m); 1235 (w); 1196 (w); 1142 (m); 1108 (w); 1022 (s); 981 (w); 928 (m); 910 (w); 826 (m); 796 (w); 734 (s); 695 (w); 614 (m); 598 (w); 575 (w).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_9\text{H}_5\text{BrN}_2\text{O}_4$ (285.05): C 37.92; H 1.77; N 9.83; gefunden: C 37.88; H 1.81; N 9.89.

11.59 Synthese von 6-Amino-5-brom-2-methylisindolin-1-on 101:



3,50 g (12,3 mmol) 5-Brom-2-methyl-6-nitroisindolin-1,3-dion wurden in 200 ml abs. THF und 50 ml abs. Methanol gelöst und unter einer Schutzgasatmosphäre auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von 270 mg (12,3 mmol) Lithiumborhydrid färbte sich die Reaktionslösung innerhalb von 30 Minuten violett. Danach wurde das Gemisch über einen Zeitraum von einer Stunde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, wobei eine Rotfärbung und zu beobachten war. Man digerierte mit 5 ml Essigsäure und destillierte das Lösungsmittel ab. Das erhaltene Zwischenprodukt aus 5-Brom-3-hydroxy-2-methyl-6-nitroisindolin-1-on wurde ohne weitere Aufarbeitung mit 100 ml Eisessig und 50 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und auf $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Zu der heißen Lösung wurden über einen Zeitraum von einer Stunde 12,0 g (101 mmol) Zinn in kleinen Portionen zugegeben, und um Anschluss noch weitere drei Stunden erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC Kontrolle) wurde das Lösemittel abdestilliert und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, wobei Zinnhydroxid ausfiel. Man extrahierte die Suspension mehrfach mit Dichlormethan, trocknete die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat und destillierte das Lösungsmittel ab. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel (EE/MeOH 9:1) filtriert und im Anschluss aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 863 mg (29 %) 6-Amino-5-brom-2-methylisindolin-1-on als farblose Nadeln.

Smp.: $223\text{ }^{\circ}\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 7.57 (s, 1H, Ar-H); 7.05 (s, 1H, Ar-H); 5.49 (s, 2H, NH_2); 4.26 (s, 2H, CH_2); 3.01 (s, 3H, CH_3).

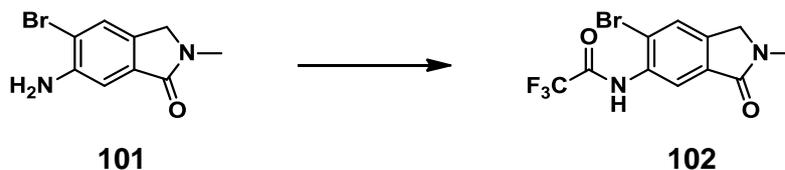
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 166.9, 145.5, 132.7, 129.6, 126.7, 111.1, 107.9, 50.3, 28.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3468 (m); 3335 (s); 3184 (w); 2918 (w); 1671 (s); 1626 (m); 1603 (m); 1570 (w); 1482 (s); 1424 (m); 1399 (m); 1344 (m); 1285 (w); 1262 (w); 1222 (w); 1185 (w);

1152 (w); 1054 (w); 991 (m); 900 (w); 873 (m); 822 (w); 770 (m); 738 (w); 701 (w); 680 (m); 614 (w); 581 (m).

Elementaranalyse (%) für $C_9H_9BrN_2O$ (241.08): C 44.84; H 3.76; N. 11.62; gefunden: C 44.97; H 3.87; N 11.56.

11.60 Synthese von 6-Trifluoracetamino-5-brom-2-methylisindolin-1-on 102:



Zu einer Lösung aus 2,50 g (10,4 mmol) 6-Amino-5-brom-2-methylisindolin-1-on, 5,4 ml (31,1 mmol) DIPEA und 100 mg DMAP in 250 ml abs. Dichlormethan wurden unter Argon 2,0 ml (14,5 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben. Das Gemisch wurde bei 40 °C zwei Stunden gerührt und im Anschluss mit 50 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gequenchet. Man trennte die organische Phase ab, extrahierte die wässrige Lösung mit Dichlormethan und trocknete die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat. Nachdem das Lösemittel durch Destillation entfernt wurde, trennte man das Produkt säulenchromatographisch ab (n-Hexan/EE 1:2). Man erhielt 3,06 g (88 %) 6-Trifluoracetamino-5-brom-2-methylisindolin-1-on als hellgelben Feststoff.

R_f: 0.36 (n-Hexan/EE 1:2).

Smp.: 162 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.39 (s, 1H, NH); 8.04 (s, 1H, Ar-H); 7.71 (s, 1H, Ar-H); 4.49 (s, 2H, CH₂); 3.07 (s, 3H, CH₃).

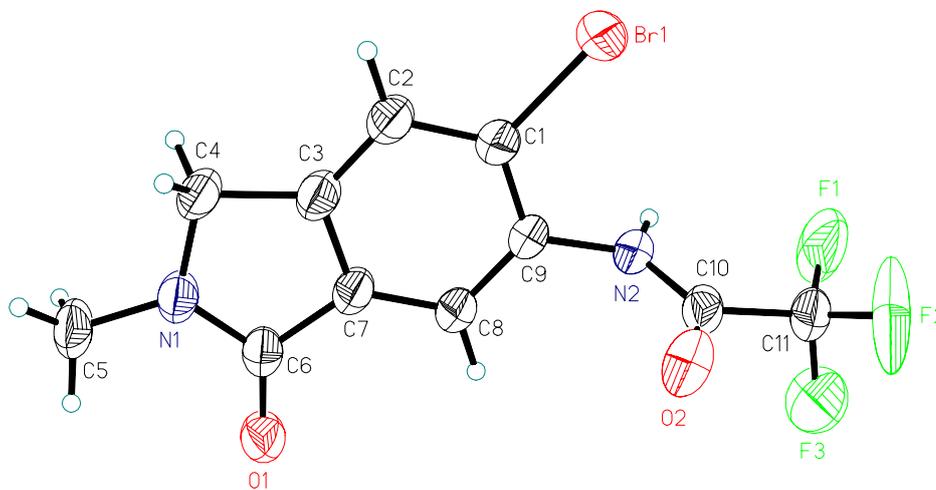
¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 165.7, 155.4 (q, J_{CF} = 37.3 Hz), 142.6, 133.2, 132.8, 128.1, 124.0, 122.8, 115.8 (q, J_{CF} = 288 Hz), 50.8, 29.0.

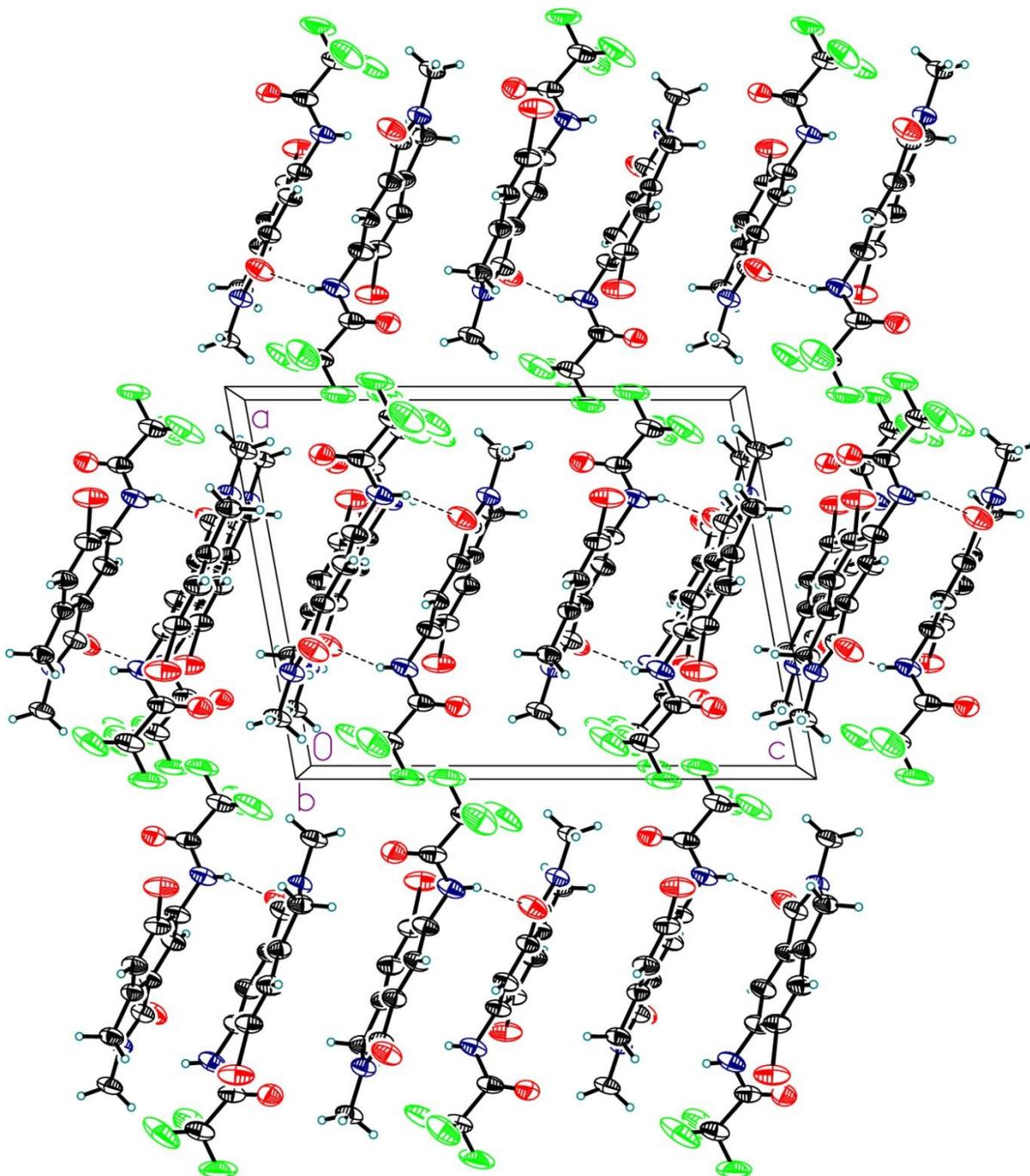
IR: $\tilde{\nu}$ = 3389 (m); 3235 (m); 3034 (w); 2941 (w); 1741 (s); 1686 (s); 1666 (s); 1618 (w); 1594 (w); 1542 (s); 1449 (w); 1422 (m); 1406 (w); 1348 (w); 1306 (w); 1277 (w); 1245 (w); 1210 (m); 1180 (m); 1151 (s); 1132 (m); 1058 (w); 980 (w); 925 (w); 904 (w); 880 (w); 864 (w); 802 (w); 770 (w); 763 (w); 756 (w); 718 (w); 687 (w); 676 (w); 642 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₁H₈BrF₃N₂O₂ (337.09): C 39.19; H 2.39; N 8.31; gefunden: C 39.13; H 2.50; N 8.27.

Kristallstruktur:

Die Isoindol Gruppe ist fast planar (mittlere Abweichung von der Ebene: 0,019 Å). Der Winkel zwischen der Isoindol und der Ebene der Amidgruppe an C9 beträgt 77,6°. Die Moleküle werden durch intermolekulare NH...O Wasserstoffbrücken verbunden und bilden Zick-Zack-Ketten entlang der kristallographischen b-Richtung aus. Benachbarte Ketten werden durch schwache intermolekulare CH...O-Kontakte verbunden. Die CF₃-Gruppe zeigt eine große Amplitude der Drehbewegung. Folglich sind die beobachteten C-F Bindungs-längen etwas zu kurz.





Wasserstoffbrücken:

Atome	N-H [Å]	H...O [Å]	N...O [Å]	N-H-O [°]	Symmetrie
N2 - H2B ... O1	0.83(3)	1.95(4)	2.749(5)	160(5)	1-x, y-1/2, 1/2-z

Bindungslängen:

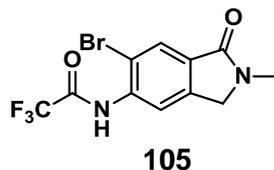
Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
Br(1)-C(1)	1.889(4)	C(4)-N(1)	1.465(5)
O(1)-C(6)	1.251(5)	F(3)-C(11)	1.329(5)
C(3)-C(2)	1.367(5)	C(1)-C(9)	1.396(5)
C(3)-C(7)	1.401(5)	N(1)-C(6)	1.333(5)
C(3)-C(4)	1.504(5)	N(1)-C(5)	1.465(5)
O(2)-C(10)	1.205(5)	C(7)-C(8)	1.377(5)
C(2)-C(1)	1.397(5)	C(7)-C(6)	1.474(5)
C(10)-N(2)	1.337(5)	F(2)-C(11)	1.278(5)
C(10)-C(11)	1.542(5)	C(9)-C(8)	1.377(5)
N(2)-C(9)	1.433(5)	F(1)-C(11)	1.295(5)

Bindungswinkel:

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel[°]
C(2)-C(3)-C(7)	120.3(3)	C(8)-C(7)-C(3)	121.4(3)
C(2)-C(3)-C(4)	130.7(3)	C(8)-C(7)-C(6)	130.3(3)
C(7)-C(3)-C(4)	109.0(3)	C(3)-C(7)-C(6)	108.1(3)
C(3)-C(2)-C(1)	118.2(3)	C(8)-C(9)-C(1)	119.9(3)
O(2)-C(10)-N(2)	126.9(4)	C(8)-C(9)-N(2)	120.5(3)
O(2)-C(10)-C(11)	118.7(4)	C(1)-C(9)-N(2)	119.5(3)
N(2)-C(10)-C(11)	114.3(4)	O(1)-C(6)-N(1)	125.7(4)
C(10)-N(2)-C(9)	122.1(4)	O(1)-C(6)-C(7)	127.2(3)
N(1)-C(4)-C(3)	101.7(3)	N(1)-C(6)-C(7)	107.1(3)
C(9)-C(1)-C(2)	121.3(3)	F(3)-C(11)-C(10)	109.4(3)
C(9)-C(1)-Br(1)	120.4(3)	F(2)-C(11)-F(1)	110.4(4)
C(2)-C(1)-Br(1)	118.2(3)	F(2)-C(11)-F(3)	105.5(4)
C(6)-N(1)-C(4)	114.1(3)	F(1)-C(11)-F(3)	104.7(4)
C(6)-N(1)-C(5)	123.7(3)	F(2)-C(11)-C(10)	111.6(4)
C(4)-N(1)-C(5)	122.1(3)	F(1)-C(11)-C(10)	114.6(4)
C(7)-C(8)-C(9)	118.8(3)		

Torsionswinkel:

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(7)-C(3)-C(2)-C(1)	2.2(6)	C(2)-C(1)-C(9)-N(2)	174.4(4)
C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-178.3(4)	Br(1)-C(1)-C(9)-N(2)	-4.5(5)
O(2)-C(10)-N(2)-C(9)	3.6(6)	C(10)-N(2)-C(9)-C(8)	-81.0(5)
C(11)-C(10)-N(2)-C(9)	-179.4(3)	C(10)-N(2)-C(9)-C(1)	101.3(5)
C(2)-C(3)-C(4)-N(1)	-179.9(4)	C(4)-N(1)-C(6)-O(1)	179.2(4)
C(7)-C(3)-C(4)-N(1)	-0.4(4)	C(5)-N(1)-C(6)-O(1)	-4.9(6)
C(3)-C(2)-C(1)-C(9)	1.5(6)	C(4)-N(1)-C(6)-C(7)	0.0(5)
C(3)-C(2)-C(1)-Br(1)	-179.6(3)	C(5)-N(1)-C(6)-C(7)	175.9(4)
C(3)-C(4)-N(1)-C(6)	0.2(4)	C(8)-C(7)-C(6)-O(1)	5.3(7)
C(3)-C(4)-N(1)-C(5)	-175.8(3)	C(3)-C(7)-C(6)-O(1)	-179.4(4)
C(2)-C(3)-C(7)-C(8)	-4.2(6)	C(8)-C(7)-C(6)-N(1)	-175.6(4)
C(4)-C(3)-C(7)-C(8)	176.2(4)	C(3)-C(7)-C(6)-N(1)	-0.3(4)
C(2)-C(3)-C(7)-C(6)	-180.0(4)	C(3)-C(7)-C(8)-C(9)	2.3(6)
C(4)-C(3)-C(7)-C(6)	0.4(4)	C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	177.1(4)
C(2)-C(1)-C(9)-C(8)	-3.3(6)	C(1)-C(9)-C(8)-C(7)	1.4(6)
Br(1)-C(1)-C(9)-C(8)	177.8(3)	N(2)-C(9)-C(8)-C(7)	-176.3(4)
O(2)-C(10)-C(11)-F(2)	-40.2(5)	N(2)-C(10)-C(11)-F(2)	142.5(4)
O(2)-C(10)-C(11)-F(1)	-166.6(4)	N(2)-C(10)-C(11)-F(1)	16.1(5)
O(2)-C(10)-C(11)-F(3)	76.2(5)	N(2)-C(10)-C(11)-F(3)	-101.2(4)

11.61 Synthese von 5-Trifluoracetamino-6-brom-2-methylisindolin-1-on 105:

Diese Verbindung wurde auf gleichem Weg hergestellt wie das isomere 6-Trifluoracetamino-5-brom-2-methylisindolin-1-on ausgehend von 6-Amino-5-brom-2-methylisindolin-1-on. Bei der Reduktion im ersten Schritt erhielt man das Vorprodukt dieser Verbindung als Minderkomponente.

R_f: 0.43 (n-Hex/EE 1:2).

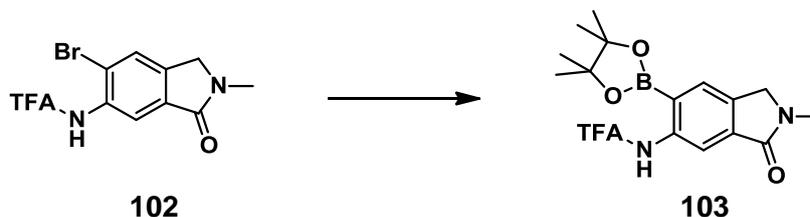
Smp.: 165-175 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.47 (s, 1H, NH); 7.97 (s, 1H, Ar-H); 7.74 (s, 1H, Ar-H); 4.47 (s, 2H, CH₂); 3.08 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 165.1, 155.3 (q, J_{CF} = 37.3 Hz), 141.8, 135.6, 133.5, 126.7, 124.1, 120.2, 115.8 (q, J_{CF} = 288 Hz), 50.9, 29.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3147 (m); 3029 (w); 2855 (w); 1735 (s); 1664 (s); 1622 (w); 1582(w); 1533 (m); 1469 (w); 1432 (w); 1414 (m); 1332 (w); 1303 (w); 1275 (w); 1250 (w); 1239 (w); 1207 (m); 1165 (s); 1137 (m); 1059 (w); 991 (m); 929 (w); 901 (w); 884 (m); 826 (w); 770 (m); 721 (m); 691 (w); 622 (w); 573 (w).

Elementaranalyse (%) für C₁₁H₈BrF₃N₂O₂ (337.09): C 39.19; H 2.39; N 8.31; gefunden: C 39.36; H 2.35; N 8.34.

11.62 Synthese von (6-Trifluoracetamino-2-methyl-1-oxoisindolin-5-yl)boronsäurepinacolester 103:

In einem ausgeheizten Dreihalskolben wurden 15 ml abs. Dioxan unter einer Argonatmosphäre entgast. Man fügte 62 mg (0,222 mmol) Tricyclohexylphosphin und 34 mg (0,074 mmol) Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) zu und rührte 30 Minuten. Zu der dunkelroten Lösung wurden 452 mg (1,78 mmol) Bis(pinacolato)diboron, 218 mg (2,22 mmol) trockenes Kaliumacetat und schließlich 500 mg (1,48 mmol) 6-Trifluoracetamino-5-brom-2-methylisindolin-1-on zugegeben. Die sich bildende gelbgrüne Lösung wurde 8 Stunden bei 110 °C erhitzt, wobei nach beendeter Reaktion ein schwarzer Niederschlag zu beobachten war. Nach dem Abkühlen wurden 200 ml Toluol zugesetzt und die Lösung mit 50 ml dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Nach Umkristallisation aus Cyclohexan erhielt man 569 mg (68 %) eines farblosen Feststoffs, der unter UV-Licht blau fluoreszierte.

R_f : 0,22 (n-Hexan/EE 1:2).

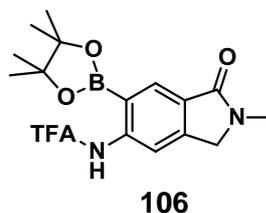
Smp.: 175-177 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 11.06 (s, 1H, NH); 7.86 (s, 1H, Ar-H); 7.85 (s with ^{10}B and ^{11}B sidebands, 1H, Ar-H); 4.48 (s, 2H, CH_2); 3.09 (s, 3H, NCH_3); 1.30 (s, 12H, CCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 166.3, 155.0 (q, $J_{\text{CF}} = 37.5$ Hz), 139.4, 138.8, 135.6, 130.0, 123.8, 117.7, 116.6, 115.8 (w q, $J_{\text{CF}} = 288$ Hz), 84.2, 51.2, 29.0, 24.5.

IR: $\tilde{\nu} = 3291$ (w); 2978 (w); 1725 (m); 1697 (m); 1634 (w); 1609 (m); 1561 (w); 1440 (m); 1399 (m); 1387 (m); 1373 (m); 1314 (w); 1286 (m); 1257 (m); 1240 (m); 1209 (m); 1146 (s); 1067 (w); 1003 (w); 967 (w); 902 (m); 856 (m); 827 (w); 770 (w); 744 (m); 722 (m); 680 (w); 646 (w); 618 (w); 568 (m); 519 (w); 481 (w).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{BF}_3\text{N}_2\text{O}_4$ (384,16): C 53.15; H 5.25; N 7.29; gefunden: C 53.37; H 5.50; N 7.24.

11.63 Synthese von (5-Trifluoracetamino-2-methyl-1-oxoisindolin-6-yl)boronsäurepinacolester 106:

Die isomere Verbindung wurde auf gleichem Wege wie (6-Trifluoracetamino-2-methyl-1-oxoisindolin-5-yl)boronsäurepinacolester **103** hergestellt:

Smp.: 186-188 °C.

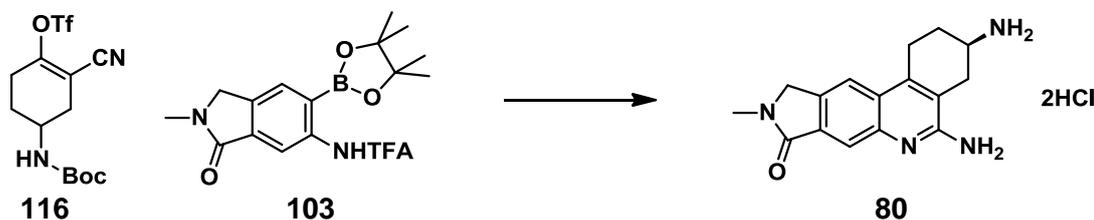
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 11.09 (s, 1H, NH); 7.887 (s, 1H, Ar-H); 7.883 (s, 1H, Ar-H); 4.51 (s, 2H, CH₂); 3.07 (s, 3H, NCH₃); 1.31 (s, 12H, CCH₃).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 167.6, 155.1 (q, J_{CF} = 37.4 Hz), 146.1, 144.6, 132.0, 129.3, 115.8 (w q, J_{CF} = 288 Hz), 113.7, 85.3, 52.2, 29.5, 24.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3306 (w); 2979 (w); 1726 (m); 1686 (s); 1637 (w); 1603 (m); 1561 (w); 1485 (w); 1441 (m); 1422 (w); 1394 (m); 1367 (m); 1317 (m); 1260 (m); 1205 (m); 1183 (m); 1157 (s); 1143 (s); 1065 (w); 1013 (w); 1000 (w); 962 (w); 926 (w); 905 (m); 857 (m); 771 (m); 751 (w); 715 (m); 676 (m); 647 (m); 630 (w); 581 (w); 518 (w); 462 (w).

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₂₀BF₃N₂O₄ (384.16): C 53.15; H 5.25; N 7.29; gefunden: C 53.06; H 4.98; N 7.26.

11.64 Synthese von (\pm)-3,5-Diamino-9-methyl-3,4,9,10-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]-phenanthridin-8(2H)-on Dihydrochlorid **80**:



In einer Argonatmosphäre wurden 100 mg (260 μ mol) der Boronsäure **103**, 96,4 mg (260 μ mol) des Triflats **116** und 254 mg (781 μ mol) Cäsiumcarbonat in 5 ml einer Dioxan/Wasser Mischung (10:1) gelöst. Man entgaste die Lösung sorgfältig und versetzte mit 15 mg (13,0 mmol) Tetrakis(triphenyl)palladium(0). Das Gemisch wurde 5 Stunden auf 100 °C erhitzt und nach beendeter Reaktion mit 10 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Man extrahierte die Lösung mehrmals mit Ethylacetat, trocknete die organische Phase über Magnesiumsulfat und destillierte das Lösemittel ab. Der Rückstand wurde über Säulenchromatographie aufgearbeitet (DCM/MeOH 9:1) und man erhielt 50 mg (50 %) des Zwischenprodukts. Dieses wurde in 15 ml Dioxan gelöst und mit 1 ml konz. Salzsäure versetzt. Man rührte das Gemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur wobei ein weißer Niederschlag zu beobachten war. Das Lösemittel wurde abdestilliert und der Rückstand aus abs. Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 40 mg (47 %) des Hydrochlorids eines farblosen Feststoffs.

Smp.: >300 °C.

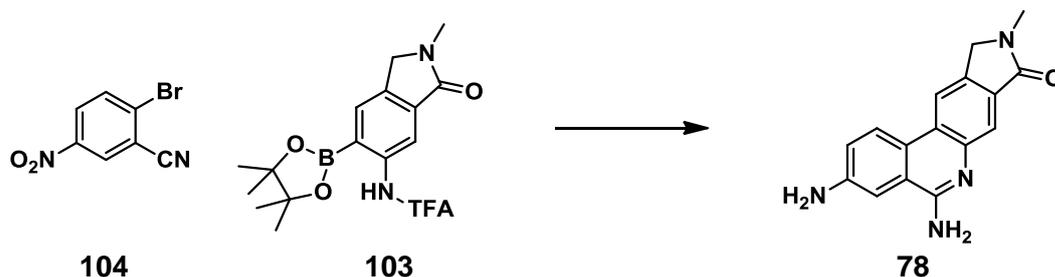
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 14.40 (s, 1H, NH); 8,50 (br, 3H, NH_3); 8,39 (s, 2H, NH_2); 8,21 (s, 1H, Ar-H); 7,93 (s, 1H, Ar-H); 4,60 (s, 2H, NCH_2); 3,64 (m, 1H, CHNH_3); 3,21 (m, 1H, CH_2); 3,14 (s, 3H, CH_3); 2,96 (dd, $J = 17.3$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H, CH_2); 2,67 (m, 1H, CH_2); 2,55 (m, 1H, CH_2); 2,26 (m, 1H, CH_2); 1,97 (m, 1H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 166.5, 153.0, 148.0, 137.00, 136.99, 135.3, 133.8, 122.8, 119.5, 118.5, 111.6, 51.8, 44.9, 29.7, 27.9, 24.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3357 (w); 3034 (m); 1651 (s); 1548 (m); 1431 (m); 1402 (m); 1231 (w); 1143 (m); 1008 (w); 902 (w); 773 (w); 732 (w); 677 (m); 594 (m); 488 (s).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (382.29): C 50.27; H 6.06; N 14.66; gefunden: C 50.19; H 5.81; N 14.47.

11.65 Synthese von 3,5-Diamino-9-methyl-9,10-dihydro-8H-pyrrolo[3,4-b]-phenanthridin-8-on Hydrochlorid **78**:



165 mg (0,728 mmol) 2-Bromo-5-nitrobenzonitril, 280 mg (0,728 mmol) Boronsäurepinacolester **103** und 781 mg (2,40 mmol) Caesiumcarbonat wurden in einem Gemisch aus 10 ml Dioxan und 1 ml Wasser gelöst und in einer Argonatmosphäre mehrfach entgast. Nach Zusatz von 42 mg (5 mol%) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) wurde das Reaktionsgemisch 16 Stunden auf 100 °C erhitzt, wobei sich die Lösung rot färbte. Nach beendeter Reaktion setzte man 20 ml einer 0,1 molaren Salzsäurelösung zu und filtrierte den Niederschlag ab. Man erhielt 110 mg (51 %) des Zwischenprodukts in Form eines roten Feststoffs. Dieses wurde zusammen mit 20 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %Pd) mit 30 ml Methanol versetzt und in einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck kräftig gerührt. Nach drei Stunden erhielt man einen vollständigen Umsatz des Edukts. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und säulenchromatographisch aufgearbeitet (EE/MeOH/NH₃aq. 4:1:0,01) und anschließend C-18 Säule (waters) (H₂O/CH₃CN/TFA 80:20:0,1). Man überführte das TFA Salz in das Chlorid mittels Dowex-Cl und MeOH als Eluent und erhielt 80 mg (81 %) eines gelben amorphen Feststoffs.

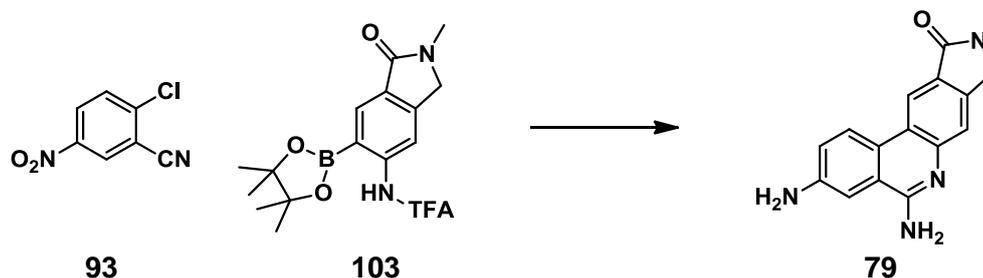
Smp.: >300 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 13.80 (br, 1H, NH); 8.54 (s, 1H, Ar-H); 8.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H); 8.35 (br, 2H, NH₂); 7.78 (s, 1H, Ar-H); 7.45 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar-H); 7.32 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar-H); 5.99 (br, 2H, NH₂); 4.56 (s, 2H, CH₂); 3.11 (s, 3H, CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ = 3135 (w); 2923 (w); 1661 (s); 1613 (s); 1558 (m); 1532 (m); 1469 (m); 1403 (m); 1370 (m); 1344 (m); 1271 (m); 1224 (m); 1176 (m); 1112 (m); 1073 (m); 883 (w); 826 (m); 763 (m); 679 (m); 596 (s); 532 (s); 510 (s); 462 (s).

HRMS-MALDI: berechnet für C₁₆H₁₄N₄O+H⁺ [M+H⁺] 279.1240; gefunden: 279.1243.

11.66 Synthese von 3,5-Diamino-9-methyl-8H-pyrrolo[3,4-b]phenanthridin-10(9H)-on 79:



150 mg (0,822 mmol) 2-Chloro-5-nitrobenzonitril, 316 mg (0,822 mmol) Boronsäureester und 883 mg (2,71 mmol) Caesiumcarbonat wurden in einem Gemisch aus 20 ml Dioxan und 2 ml Wasser gelöst und in einer Argonatmosphäre mehrfach entgast. Nach Zusatz von 47 mg (41.1 μ mol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) wurde das Reaktionsgemisch 16 Stunden auf 90 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion setzte man 20 ml einer 0,1 molaren Salzsäurelösung zu, filtrierte den Niederschlag ab und eluierte diesen durch eine kurze Säule (EE/MeOH/ NEt_3 6:1:0,01). Man erhielt 134 mg (53 %) des Zwischenprodukts in Form eines gelben Feststoffs. Dieser wurde ohne weitere Aufarbeitung in 20 ml Methanol gelöst und mit 30 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %Pd) versetzt. Man rührte das Gemisch in einer Wasserstoffatmosphäre 18 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Säulenchromatographischer Aufarbeitung (EE/MeOH/ NEt_3 4:1:0,01) kristallisierte man das Produkt aus abs. Ethanol um und erhielt 33 mg (21 % über 2 Schritte) eines gelben Feststoffs.

Smp.: >300 °C.

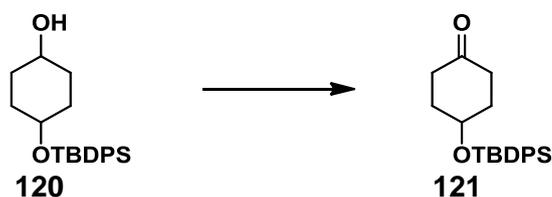
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 8.52 (s, 1H, NH); 8.48 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.57 (s, 1H, Ar-H); 7.45 (br, 2H, NH_2); 7.32 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.22 (dd, J = 8.8 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, Ar-H); 5.66 (br, 2H, NH_2); 4.51 (s, 2H, CH_2); 3.10 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 171.2, 167.4, 155.5, 148.6, 144.4, 138.7, 124.1, 123.3, 120.7, 120.6, 119.8, 117.5, 115.3, 105.4, 50.9, 29.0.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3342 (w); 3223 (w); 1662 (s); 1622 (s); 1570 (m); 1538 (m); 1470 (m); 1447 (m); 1417 (m); 1399 (m); 1368 (m); 1344 (w); 1317 (m); 1260 (m); 1205 (m); 1177 (m); 1102 (m); 1076 (w); 1041 (m); 935 (w); 881 (w); 850 (m); 821 (m); 797 (m); 765 (m); 732 (m); 718 (m); 677 (m); 655 (m); 602 (m); 548 (s); 513 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für $C_{16}H_{14}N_4O+H^+$ $[M+H^+]$ 279.1240; gefunden: 279.1242.

11.67 Synthese von 4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)cyclohexanon 121:



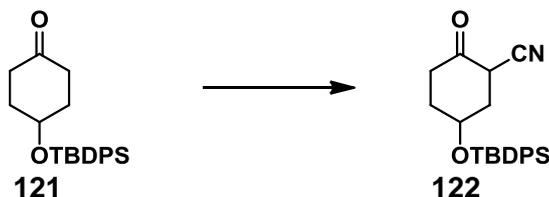
In einer Schutzgasatmosphäre wurden 394 μ l (4,60 mmol) Oxalylchlorid in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf -70 °C gekühlt. Man tropfte langsam 490 μ l (6,90 mmol) DMSO in 5 ml abs. Dichlormethan zu, wobei eine Gasentwicklung zu beobachten war. Nach 30 Minuten wurde die Lösung tropfenweise mit 1,02 g (2,88 mmol) 4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)cyclohexanol in 10 ml trockenem Dichlormethan versetzt und weitere 2 Stunden bei -70 °C gerührt. Anschließend wurden 2 ml (14,4 mmol) Triethylamin zugegeben und das Kältebad entfernt. Nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hat, wurde sie mit 50 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (n-Hexan/EE 4:1), und man erhielt 730 mg (72 %) eines farblosen Öls.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm = 7.77-7.61 (m, 4H, Ar-H); 7.52-7.33 (m, 6H, Ar-H); 4.15 (m, 1H, CHOR); 2.74 (m, 2H, CH_2); 2.21 (dt, $J = 10,3$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 2H, CH_2); 2.06-1.88 (m, 2H, CH_2); 1.87-1.69 (m, 2H, CH_2); 1.10 (s, 9H, t-Bu).

^{13}C -NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm = 211.6, 135.7, 133.9, 129.8, 127.7, 66.9, 37.0, 33.7, 27.0, 19.3.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3069 (m), 2948 (m), 2932 (m), 2901 (m), 2857 (m), 1706 (s), 1588 (w), 1472 (m), 1442 (w), 1429 (m), 1388 (w), 1372 (m), 1311 (w), 1251 (w), 1207 (w), 1187 (w), 1146 (m), 1113 (s), 1094 (m), 1038 (s), 1004 (s), 982 (m), 937 (w), 888 (w), 854 (w), 824 (m), 746 (m), 706 (s), 670 (m), 622 (m), 615 (m), 575 (w).

Elementaranalyse (%) für $C_{22}H_{28}O_2Si$ (352,54): C 74.95; H 8.01; gefunden: C 74.88; H 8.07.

11.68 Synthese von (±)-5-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-oxocyclohexanarbonitril 122:

In einer Schutzgasatmosphäre wurden 2,00 g (5,67 mmol) 4-((tert-Butyl-diphenylsilyl)-oxy)cyclohexanon in 20 ml abs. THF gelöst und bei -78°C mit 3,7 ml (7,38 mmol) 2M LDA Lösung versetzt. Man rührte 2 Stunden, wobei eine Gelbfärbung zu beobachten war. Man überführte die Enolatlösung über eine Kanüle langsam zu einer -78 °C kalten Lösung aus Tosylcyanid in 15 ml abs. THF, rührte die Reaktionslösung 2 Stunden bei gleichbleibender Temperatur und quenchte anschließend mit gesättigter Ammoniumchloridlösung. Man trennte die organische Phase ab und extrahierte die wässrige Phase mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Säulenchromatographie (n-Hexan/EE 9:1) erhielt man 1,39 g (65 %) eines farblosen Schaums.

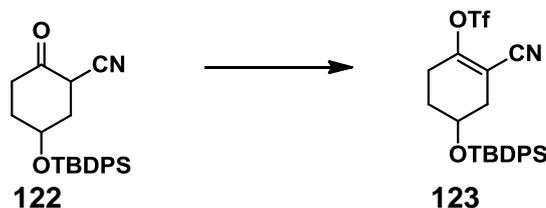
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 7.75-7.61 (m, 4H, Ar-H); 7.55-7.33 (m, 6H, Ar-H); 4.27 (m, 0.7H, keto-CHOR); 4.14 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 5.4 Hz, 0.7H, keto-CHCN); 4.05 (m, 0.3H, enol-CHOR); 3.40 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 6.2 Hz, 0.3H, enol-CH₂); 2.90 (dt, *J* = 14.0 Hz, *J* = 6.2 Hz, 0.7H, keto-CH₂); 2.61 (dt, *J* = 14.7 Hz, *J* = 4.9 Hz, 0.3H, enol-CH₂); 2.53-2.29 (m, 2H, CH₂); 0.29-2.12 (m, 0.7H, CH₂); 2.10-1.84 (m, 2H, CH₂); 1.73 (m, 1H, CH₂); 1.13 (s, 6H, keto-t-Bu); 1.09 (s, 3H, enol-t-Bu). (Stereoisomere)

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 200.0, 135.6, 135.5, 132.9, 132.9, 130.3, 130.2, 128.0, 128.0, 116.6, 64.9, 38.6, 38.6, 35.6, 33.3, 27.0, 19.3. (Stereoisomere)

IR: $\tilde{\nu}$ = 3047 (w); 2933 (w); 2879 (w); 2857 (w); 2250 (w); 1721 (s); 1589 (w); 1472 (w); 1462 (w); 1442 (w); 1427 (m); 1391 (w); 1362 (m); 1354 (m); 1303 (w); 1286 (w); 1266 (w); 1199 (w); 1139 (m); 1111 (m); 1082 (m); 1045 (m); 1014 (m); 951 (m); 858 (m); 841 (m); 821 (m); 810 (m); 744 (m); 698 (s); 674 (m); 623 (m); 616 (m); 593 (m); 513 (s); 502 (m); 486 (s); 472 (m).

HRMS (MALDI): berechnet für C₂₃H₂₇NO₂Si+K⁺ [M+H⁺] 416.1443; gefunden: 416.1443.

**11.69 Synthese von (\pm)-4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yl
Trifluormethansulfonat 123:**



1,00 g (2,65 mmol) 5-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-oxocyclohexanecarbonitril und 901 μ l DIPEA wurden in 30 ml abs. Dichlormethan gelöst und bei -80 °C mit 534 μ l (3,18 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid versetzt. Man rührte die Mischung 2 Stunden und fügte anschließend 50 ml dest. Wasser hinzu. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Nach säulenchromatischer Trennung (n-Hexan/EE 9:1) erhielt man 1,31 g (97 %) eines gelblichen Öls.

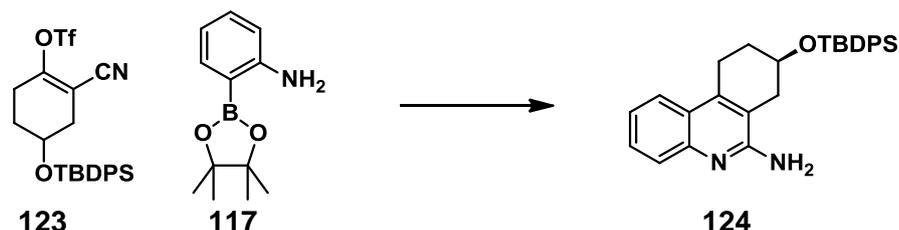
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 7.75-7.57 (m, 4H, Ar-H); 7.53-7.33 (m, 6H, Ar-H); 4.12 (m, 1H, CHOR); 3.00-2.77 (m, 1H, CH_2); 2.52-2.33 (m, 3H, CH_2); 2.01-1.84 (m, 1H, CH_2); 1.75-1.59 (m, 1H, CH_2); 1.07 (s, 9H, t-Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 158.3, 135.61, 135.56, 133.2, 133.1, 130.14, 130.09, 127.94, 127.90, 118.3 (w q, $J_{\text{CF}} = 325$ Hz), 113.9, 102.0, 63.5, 35.1, 28.9, 26.8, 24.9, 19.1. (diastereotopes Ph an Si)

IR: $\tilde{\nu}$ = 3073 (w); 2933 (w); 2860 (w); 2226 (w); 1671 (w); 1590 (w); 1473 (w); 1426 (m); 1392 (w); 1366 (m); 1249 (m); 1213 (s); 1136 (m); 1112 (m); 1085 (m); 1059 (s); 1009 (m); 999 (m); 967 (w); 938 (w); 891 (m); 863 (m); 821 (m); 809 (m); 788 (m); 760 (m); 741 (m); 700 (s); 682 (m); 622 (m); 598 (s); 576 (m); 504 (s); 486 (s).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_4\text{SSi}+\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 532.1196; gefunden: 532.1203.

11.70 Synthese von (\pm)-8-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-7,8,9,10-tetrahydro-phenanthridin-6-amin 124:



In einer Argonatmosphäre wurden 320 mg (0,628 mmol) 4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-cyanocyclohex-1-en-1-yl Trifluormethansulfonat, 138 mg (0,628 mmol) 2-Aminoboronsäurepinacolester und 614 mg (1,88 mmol) Cäsiumcarbonat in 10 ml entgastem Dioxan/H₂O (10:1) gelöst und mit 29 mg (25,1 mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium(0) versetzt. Man erhitze 2 Stunden auf 90 °C. Nach beendeter Reaktion war ein schwarzer Niederschlag zu beobachten. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand auf Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatischer Aufarbeitung (Gradient: n-Hexan/EE 2:1 zu 1:1) erhielt man 104 mg (37 %) eines farblosen Pulvers.

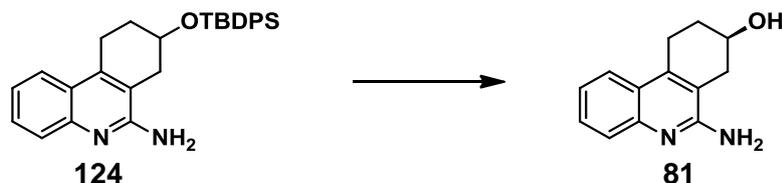
Smp.: 202 °C.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 8.35 (dd, J = 8.6 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.91 (dd, J = 8.1 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.72-7.57 (m, 5H, Ar-*H*); 7.52-7.34 (m, 7H, Ar-*H*); 7.23 (br, 2H, NH₂); 4.32 (m, 1H, CH-OR); 3.23-3.06 (m, 1H, CH₂); 3.0-2.89 (m, 1H, CH₂); 2.86 (dd, J = 16.7 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, CH₂); 2.72 (dd, J = 17.6 Hz, J = 5.3 Hz, 1H, CH₂); 1.86 (m, 2H, CH₂); 1.00 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (62.9 MHz, DMSO): δ / ppm = 146.6, 137.1, 135.11, 135.09, 133.5, 133.4, 130.9, 129.8, 129.7, 128.8, 127.8, 127.7, 123.48, 123.45, 121.2, 116.9, 116.4, 66.5, 33.2, 29.0, 26.6, 21.5, 18.7.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3069 (w); 2931 (w); 2857 (w); 1645 (m); 1611 (w); 1508 (w); 1466 (w); 1427 (m); 1113 (s); 1100 (s); 1073 (m); 1004 (m); 892 (w); 841 (m); 824 (m); 812 (m); 749 (m); 740 (m); 700 (s); 622 (m); 609 (m); 524 (m); 508 (s); 485 (s); 459 (m).

ESI: berechnet für C₂₉H₃₂N₂OSi+H⁺ [M+H⁺] 453.23; gefunden: 453.8.

11.71 Synthese von (\pm)-6-Amino-7,8,9,10-tetrahydrophenanthridin-8-ol 81:

100 mg (221 μ mol) 8-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)-7,8,9,10-tetrahydrophenanthridin-6-amin wurden in 10 ml THF gelöst und mit 116 mg (442 μ mol) TBAF versetzt. Man rührte bei Raumtemperatur 18 Stunden und destillierte nach beendeter Reaktion das Solvenz im Vakuum ab. Nach Säulenchromatographie (EE/MeOH 9:1) erhielt man 42 mg (89 %) eines farblosen Feststoffs.

R_f : 0.3 (EE/MeOH 9:1).

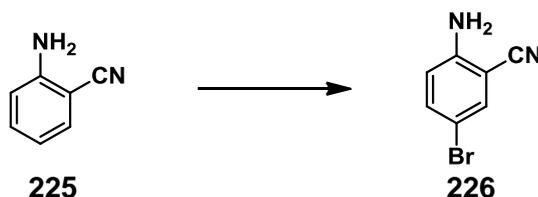
Smp.: 261 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 7.73 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar- H); 7.48-7.36 (m, 2H, Ar- H); 7.15 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 6.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, Ar- H); 6.12 (s, 2H, NH_2); 4.88 (d, J = 4.1 Hz, 1H, OH); 4.01 (m, 1H, CHOH); 3.11 (dt, J = 17.5 Hz, J = 5.7 Hz, 1H, CH_2); 3.00-2.82 (m, 1H, CH_2); 2.73 (dd, J = 17.2 Hz, J = 4.6 Hz, 1H, CH_2); 2.36 (dd, J = 17.2 Hz, J = 6.8 Hz); 2.05-1.87 (m, 1H, CH_2); 1.86-1.63 (m, 1H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 157.0, 145.7, 139.7, 127.6, 125.2, 122.5, 122.3, 120.8, 116.8, 64.2, 33.2, 29.8, 22.6.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3423 (s), 3339 (m), 3261 (m), 3224 (m), 2942 (m), 2862 (w), 1654 (s), 1609 (m), 1600 (w), 1561 (m), 1508 (m), 1471 (m), 1448 (s), 1421 (m), 1336 (w), 1260 (w), 1219 (w), 1146 (w), 1108 (w), 1088 (m), 1042 (m), 995 (m), 952 (w), 861 (m), 828 (w), 750 (s), 700 (w), 663 (w).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (223.27): C 69.93; H, 6.77 N, 12.55; gefunden: C 70.14; H 6.63; N 12.25.

11.72 Synthese von 2-Amino-5-bromobenzonitril 226:^[260]

10,0 g (84,7 mmol) 2-Aminobenzonitril wurden in 150 ml Chloroform gelöst und bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ portionsweise mit 15,8 g (88,9 mmol) NBS versetzt. Man rührte die Reaktionsmischung 2 Stunden im Eisbad und ließ sie anschließend auf Raumtemperatur erwärmen. Nach weiteren 2 Stunden Rühren war die Reaktion beendet und man fügte 100 ml gesättigte Natriumthiosulfatlösung zu. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und durch eine kurze Kieselgelsäule mit Dichlormethan eluiert. Anschließend engte man die Lösung bis zur beginnenden Kristallisation ein und ließ das Produkt bei Raumtemperatur auskristallisieren. Man erhielt 11,0 g (66 %) eines farblosen Feststoffs.

Smp.: $93\text{--}94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit. $93\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$).^[260]

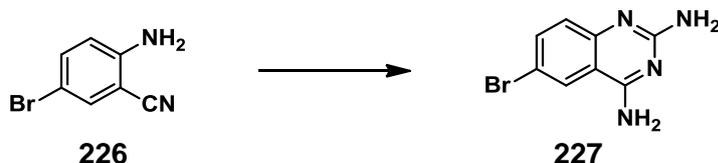
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 7.58 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar- H); 7.42 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar- H); 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar- H); 6.25 (s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 150.9, 136.6, 133.8, 117.2, 116.7, 105.1, 94.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3436 (w); 3351 (m); 3241 (w); 3061 (w); 2218 (m); 1916 (w); 1769 (w); 1629 (m); 1594 (m); 1560 (m); 1484 (m); 1408 (m); 1318 (w); 1303 (m); 1256 (m); 1179 (m); 1155 (m); 1082 (w); 888 (m); 865 (m); 828 (s); 757 (m); 654 (m); 595 (m); 563 (m); 489 (s).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrN}_2$ (197.03): C 42.67; H 2.56; N 14.22; gefunden: C 42.37; H 2.46; N 14.27.

11.73 Synthese von 6-Bromchinazolin-2,4-diamin 227:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 5,00 g (25,4 mmol) 2-Amino-5-bromobenzonitril in 100 ml Diethylenglycoldimethylether gelöst und mit 3,21 g (27,9 mmol) Chloroformamidin Hydrochlorid versetzt. Man erhitzte 3 Stunden auf 140 °C wobei das Produkt als brauner Niederschlag aus der Lösung ausfiel. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 200 ml Diethylether versetzt. Man filtrierte den Niederschlag ab und wusch mit wenig Wasser. Man erhielt 5,12 g (84 %) 6-Bromchinazolin-2,4-diamin. Eine analytische Probe wurde über Säulenchromatographie aufgearbeitet (EE/MeOH 9:1) und bei 220 °C im Vakuum sublimiert. Man erhielt das Semihydrochlorid in Form von gelben Kristallen.

R_f: 0.18 (EE/MeOH 9:1).

Smp.: 263-265 °C.

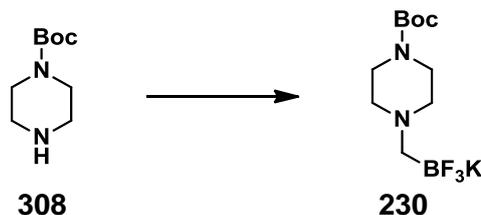
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.66 (br, 2H, NH₂); 7.63 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.46 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 161.5, 160.9, 151.3, 135.1, 126.4, 125.8, 111.6, 111.1.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3428 (w); 3369 (w); 3314 (w); 3145 (w); 1634 (m); 1610 (m); 1563 (m); 1553 (m); 1503 (m); 1464 (m); 1446 (m); 1389 (m); 1376 (m); 1327 (m); 1280 (m); 1249 (w); 1141 (w); 1102 (m); 1078 (w); 988 (w); 960 (w); 889 (w); 869 (w); 829 (m); 809 (m); 788 (m); 745 (w); 691 (m); 613 (m); 555 (s); 524 (s); 512 (s); 471 (s).

Elementaranalyse (%) für C₈H₇BrN₄*0,5HCl (257,30): C 37.34; H 2.94; N 21.77; gefunden: C 37.45; H 3.12; N 21.89.

11.75 Synthese von Kalium ((4-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)trifluorborat 230:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 500 mg (2,68 mmol) 1-Boc-Piperazin in 20 ml abs. THF gelöst und auf -70 °C gekühlt. Man tropfte 1,48 ml (2,95 mmol, 2M in Cyclohexan) n-BuLi zu und rührte die Lösung 1 Stunde bei gleichbleibender Temperatur. Anschließend wurden 474 mg (2,68 mmol) 2-(Chlormethyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan zugesetzt. Nach 1 Stunde wurde das Kältebad entfernt und die Lösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wurde in 200 ml Diethylether aufgenommen, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in wenig Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit einer gesättigten Lösung KHF₂ (6,2 g, 8,86 mmol) versetzt. Der weiße voluminöse Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum scharf getrocknet. Man extrahierte den Feststoff mit heißem Aceton und engte die Lösung bis zum Beginn der Kristallisation ein. Nach Abkühlen wurde der weiße Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Man erhielt 665 mg (81 %) von Kalium ((4-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)trifluorborat als farbloses Pulver.

Smp.: 200 °C Zers. (Lit. 200 °C Zers.).^[261]

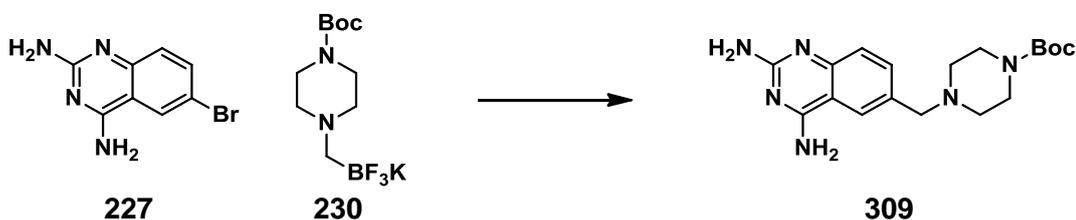
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 8.69 (br, 1H); 3.91 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H, CH₂); 3.32 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH₂); 3.11 (t, *J* = 12.4 Hz, 2H, CH₂); 2,81 (dq, *J* = 11.9 Hz, *J* = 2.8 Hz, 2H, CH₂), 1.99 (m, 2H, CH₂), 1.40 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 153.3, 79.5, 52.8, 27.8.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3054 (w); 2984 (w); 2939 (w); 2791 (w); 1645 (m); 1473 (m); 1439 (m); 1394 (m); 1368 (m); 1302 (m); 1284 (m); 1270 (m); 1253 (m); 1209 (w); 1162 (m); 1140 (m); 1087 (m); 1068 (m); 1052 (m); 1032 (s); 1002 (s); 957 (s); 856 (m); 828 (w); 816 (w); 776 (m); 758 (w); 731 (w); 591 (w); 579 (m); 529 (m); 480 (w); 454 (w).

ESI: berechnet für C₁₀H₁₉BF₃N₂O₂-H⁺ [M-H⁺] 267.2; gefunden 267.2.

11.76 Synthese von tert-Butyl-4-((2,4-Diaminochinazolin-6-yl)methyl)piperazin-1-carboxylat 309:



In einer Argonatmosphäre wurden 14,1 mg (62,7 μ mol) Palladiumacetat und 59,5 mg (0,125 mmol) XPhos in 20 ml eines Gemisches aus entgastem Dioxan und H₂O (10:1) gelöst. Anschließend wurden 500 mg (2,09 mmol) 6-Brom-2,4-diaminochinazolin, 832 mg (2,72 mmol) Kalium ((4-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)trifluoroborat und 2,04 g (6,27 mmol) Cäsiumcarbonat zugegeben. Das Gemisch wurde 18 Stunden auf 90 °C erhitzt, wobei nach beendeter Reaktion ein schwarzer Niederschlag aus Palladium zu beobachten war. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer extrahierte man den Feststoff mit einer heißen Mischung aus Ethylacetat und Methanol (9:1) und arbeitete das Gemisch säulenchromatographisch auf (EE/MeOH 9:1). Man erhielt 631 mg (84 %) eines hellgelben Pulvers.

Smp.: 229 °C.

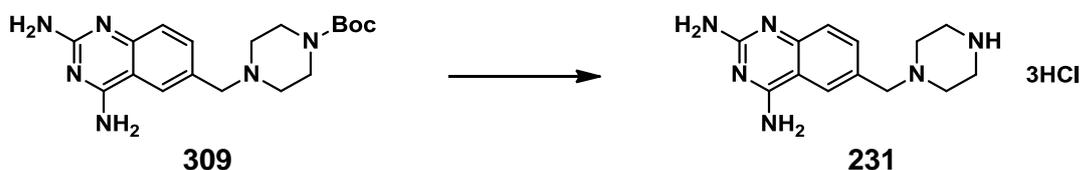
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.85 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.45 (dd, J = 8.6 Hz, J = 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.31 (br, 2H, NH₂); 7.17 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.03 (br, 2H, NH₂); 3.46 (br, 2H, Ar-CH₂); 3.31 (m, 4H, CH₂); 2.30 (m, 4H, CH₂); 1.38 (s, 9H, t-Bu).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.3, 160.2, 153.7, 151.0, 133.7, 129.3, 123.7, 123.6, 109.7, 78.6, 61.9, 54.2, 52.2, 27.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3403 (w); 3105 (w); 2799 (w); 1685 (m); 1638 (s); 1609 (m); 1561 (s); 1514 (m); 1453 (s); 1429 (s); 1405 (m); 1365 (m); 1328 (m); 1288 (m); 1274 (m); 1233 (m); 1161 (s); 1128 (s); 1076 (m); 1002 (s); 949 (w); 921 (w); 856 (m); 847 (m); 839 (m); 798 (m); 769 (m); 698 (w); 656 (w); 584 (m); 560 (m); 500 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₈H₂₆N₆O₂·3/4H₂O (371,95): C 58.12; H 7.45; N 22.59; gefunden: C 58.12; H 7.45; N 22.59.

11.78 Synthese von 6-(Piperazin-1-ylmethyl)chinazolin-2,4-diamin Trihydrochlorid 231:



300 mg (837 μmol) tert-Butyl-4-((2,4-Diaminochinazolin-6-yl)methyl)piperazin-1-carboxylat wurden in 20 ml Dichlormethan und 5 ml TFA gelöst. Man rührte 3 Stunden bei Raumtemperatur und destillierte nach beendeter Reaktion das Lösemittel ab. Nach Zugabe von 50 ml Diethylether filtrierte man den Niederschlag ab und eluierte durch eine C18 Säule (Waters; $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 10:90:0.1). Das TFA Salz wurde in einer wässrigen Methanollösung aufgenommen und durch eine Dowex-Cl Säule filtrierte. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 186 mg (60 %) eines farblosen Pulvers.

Smp.: >300 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 12.95 (s, 1H, NH); 9.85 (s, 2H, NH_2); 9.12 (s, 1H); 8.94 (s, 1H); 8.56 (s, 1H); 8.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar-H); ~7.97 (br, 2H, NH_2); 7.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar-H); 4.29 (br, 2H, Ar- CH_2); ~3.66 (br, 4H, CH_2); ~3.42 (br, 4H, CH_2).

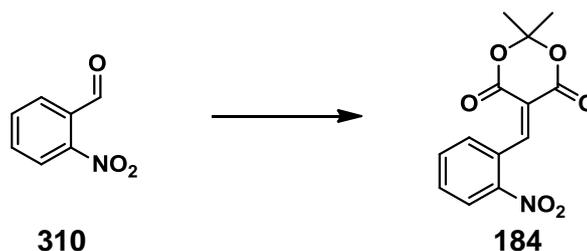
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 162.8, 154.9, 145.2, 139.5, 137.93, 137.89, 128.4, 116.9, 109.1, 47.47, 47.44.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3299 (w); 3110 (m); 2719 (m); 2493 (w); 1626 (s); 1597 (s); 1539 (m); 1493 (m); 1448 (m); 1417 (m); 1390 (m); 1233 (w); 1162 (w); 1079 (w); 1012 (w); 984 (w); 956 (m); 918 (w); 897 (w); 863 (w); 830 (m); 779 (m); 739 (m); 603 (s); 583 (s); 567 (m); 538 (m); 485 (m); 473 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_6+\text{H}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 259.1666; gefunden: 259.1669.

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_6+1.8\text{H}_2\text{O}$ (400.13): C 39.02; H 6.20; N 21.00; gefunden: C 39.19; H 6.18; N 20.75.

11.79 Synthese von 2,2-Dimethyl-5-(2-nitrobenzyliden)-1,3-dioxan-4,6-dion 184:



25,0 g (0.165 mol) Nitrobenzaldehyd, 25,0 g (0,174 mol) Meldrumssäure und 20,7 g (0,246 mol) NaHCO_3 wurden in 100 ml Essigsäureanhydrid 5 h auf 60-70 °C erhitzt. Die zu Beginn hellgelbe Lösung färbte sich unter CO_2 -Entwicklung allmählich orange. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches war die Bildung eines hellen Niederschlags zu beobachten. Anschließend neutralisierte man mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, filtrierte den gelben Feststoff ab und wusch mit dest. Wasser. Das Rohprodukt wurde in Essigsäureethylester gelöst und mehrmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und schließlich über MgSO_4 getrocknet. Man entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer und kristallisierte aus abs. Ethanol um. Es wurden 36,07 g (79 %) hellgelbe Kristalle erhalten.

Smp.: 116 °C.

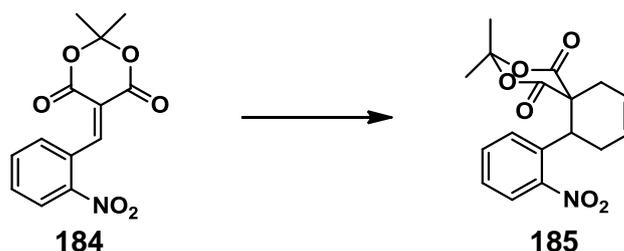
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 8.86 (s, 1H, Ar-CH); 8.28 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, Ar-H); 7.86 (dt, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, Ar-H); 7.74 (dddd, $J = 8.07$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, $J = 0.5$ Hz, 1H, Ar-H); 7.62 (Ψ d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar-H); 1.79 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 161.1, 158.9, 156.0, 146.2, 134.1, 130.8, 130.23, 130.19, 124.3, 117.3, 105.2, 27.1.

IR: $\tilde{\nu} = 3904$ (w), 3871 (w), 3854 (w), 3840 (w), 3822 (w), 3802 (w), 3751 (w), 3736 (w), 3712 (w), 3690 (w), 3676 (w), 3650 (w), 3630 (w), 3620 (w), 3588 (w), 3568 (w), 3481 (w), 3108 (w), 3083 (w), 3053 (w), 3005 (w), 2989 (w), 2942 (w), 2843 (w), 2345 (w), 2066 (w), 1845 (w), 1771 (s), 1742 (s), 1732 (s), 1636 (s), 1605 (m), 1571 (m), 1514 (s), 1475 (w), 1444 (w), 1390 (s), 1382 (m), 1337 (s), 1290 (s), 1256 (m), 1222 (s), 1200 (s), 1149 (m), 1119 (m), 1078 (w), 1035 (s), 1001 (m), 968 (w), 938 (m), 926 (m), 893 (w), 880 (w), 865 (m), 830 (w), 800 (m), 794 (m), 766 (w), 727 (s), 693 (m), 670 (w), 643 (w).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_6$ (277.23): C 56.32; H 4.00; N 5.05; **gefunden:** C 56.23; H 4.05; N 5.08.

11.80 Synthese von (\pm)-3,3-Dimethyl-11-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxaspiro-[5.5]undec-8-en-1,5-dion 185:



10,0 g (36.07 mmol) 2,2-Dimethyl-5-(2-nitrobenzyliden)-1,3-dioxan-4,6-dion und 21,3 g (180,4 mmol) 3-Sulfolen wurden in 30 ml Nitromethan gelöst und 18 h bei 110 °C und einem Druck von 10 bar gerührt, wobei sich eine Braunfärbung einstellte. Das Reaktionsgemisch wurde mit 500 ml Essigsäureethylester aufgenommen und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand zunächst mit heißem Wasser und anschließend mit einer heißen n-Hexan/Essigsäureethylester Mischung des Verhältnisses 4:1 gewaschen. Das Produkt wurde schließlich im Vakuum getrocknet. Man erhielt 5,74 g (48 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs, dessen Reinheit für die weitere Synthese ausreichend war. Zu analytischen Zwecken wurde eine Probe durch Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan/EE 4:1). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhielt man farblose, nadelförmige Kristalle.

R_f : 0.19 (n-Hexan/EE 4:1).

Smp.: 210 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 7.85 (dd, J = 8.1 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar- H); 7.74 (dt, J = 7.7 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar- H); 7.56 (dt, J = 8.0 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar- H); 7.40 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, Ar- H); 5.99 (ddd, J = 9.9 Hz, J = 5.0 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, CH=CH); 5.73 (m, 1H, CH=CH); 4.03 (dd, J = 11.4 Hz, J = 5.2 Hz, 1H, Ar-CH); 2.80-2.73 (m, 3H, CH_2); 2.47-2.40 (m, 1H, CH_2); 1.64 (s, 3H, CH_3); 1.21 (s, 3H, CH_3).

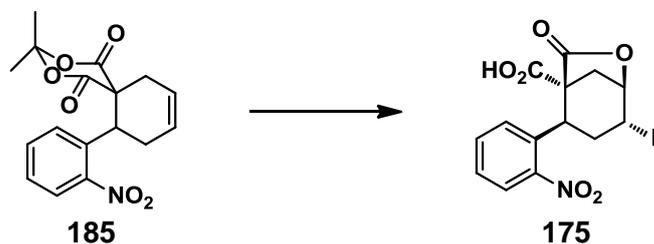
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 169.9, 166.0, 150.5, 133.2, 133.0, 129.1, 128.2, 126.6, 124.8, 121.4, 105.3, 50.9, 39.9, 34.4, 29.2, 28.9, 27.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3630 (w), 3620 (w), 3588 (w), 3568 (w), 3546 (w), 3482 (w), 3108 (w), 3082 (w), 3042 (w), 2989 (w), 2926 (w), 2372 (w), 2345 (w), 1870 (w), 1846 (w), 1770 (m), 1740 (s), 1686 (w), 1664 (w), 1654 (w), 1648 (w), 1637 (w), 1618 (w), 1604 (w), 1576 (w), 1560

(w), 1529 (s), 1499 (w), 1484 (w), 1458v 1446 (w), 1424 (w), 1397 (w), 1384 (m), 1359 (m), 1317 (m), 1285 (s), 1251 (m), 1224 (m), 1197 (m), 1107 (m), 1078 (w), 1035 (m), 986 (w), 976 (w), 958 (w), 939 (w), 889 (w), 853 (m), 789 (w), 751 (w), 742 (w), 714 (w), 682 (w), 672 (w), 656 (w), 630 (w), 601 (w).

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₁₇NO₆ (331.32): C 61.63; H 5.17; N 4.23; gefunden: C 61.40; H 5.13; N 4.22.

11.81 Synthese von (±)-(1S,2S,4R,5R)-4-Iod-2-(2-nitrophenyl)-7-oxo-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-1-carbonsäure 175:



2,00 g (6.04 mmol) 3,3-Dimethyl-11-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxaspiro-[5.5]undec-8-en-1,5-dion wurden in einer Mischung aus 250 ml Tetrahydrofuran und 50 ml Natronlauge (5 %ig) gelöst und bei Raumtemperatur 30 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und unter Eiskühlung mit verdünnter HCl auf pH = 2 angesäuert. Hierbei entstand ein voluminöser Niederschlag der Dicarbonsäure. Man extrahierte mit 500 ml Diethylether und wusch die organische Phase mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung. Anschließend wurde die Lösung mit 100 ml NaHCO₃-Lösung (5 %ig) ausgeschüttelt und wieder als Dicarboxylat in die wässrige Phase überführt. Die klar gelbe wässrige Phase wurde abgetrennt und mit 15 ml einer I₂/KI/H₂O (1:2:6)-Mischung (1,3 eq. Iod) versetzt. Dieses Gemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die dunkelbraune Lösung mit verdünnter HCl auf pH = 4 angesäuert. Dabei fiel das Produkt als heller Niederschlag aus. Die Suspension wurde dreimal mit je 200 ml Essigsäureethylester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit Natriumthiosulfatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels und Umkristallisation aus i-PrOH erhielt man 2,09 g (81 %) eines hellgelben kristallinen Feststoffs.

R_f: 0.30 (DCM/MeOH 9:1).

Smp.: 194 °C.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 13.3 (br, 1H, COOH); 7.85 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, Ar-H); 7.73 (dd, J = 7.9 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H); 7.65 (dt, J = 8.0 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H); 7.49 (ddd, J = 8.4 Hz, J = 7.3 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, Ar-H); 5.05 (dd, J = 5.5 Hz, J = 4.1 Hz, 1H, CH); 4.75 (m, 1H, CH); 4.00 (dd, J = 10.8 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, CH-Ar);

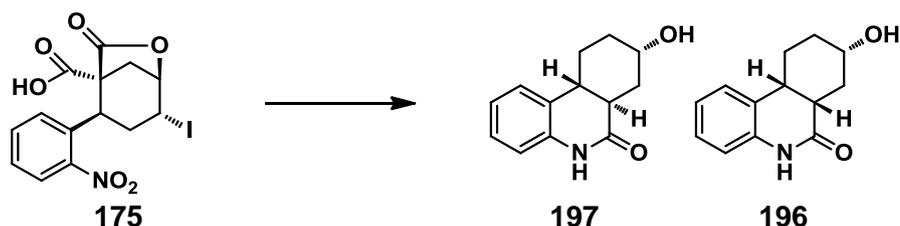
3.00 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, CH_2); 2.85 (ddd, $J = 12.6$ Hz, $J = 5.7$ Hz, $J = 0.6$ Hz, 1H, CH_2); 2.40-2.36 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO-d_6): δ / ppm = 176.3, 149.2, 135.0, 133.2, 128.4, 128.3, 124.5, 79.1, 43.5, 35.7, 35.5, 35.3, 23.5.

IR: $\tilde{\nu} = 3871$ (w), 3864 (w), 3854 (w), 3840 (w), 3822 (w), 3802 (w), 3780 (w), 3770 (w), 3760 (w), 3752 (w), 3746 (w), 3736 (w), 3725 (w), 3712 (w), 3702 (w), 3690 (w), 3676 (w), 3670 (w), 3650 (w), 3630 (w), 3620 (w), 3588 (w), 3568 (w), 3448 (m), 2971 (w), 2372 (w), 2345 (w), 1870 (w), 1847 (w), 1830 (w), 1773 (s), 1707 (w), 1701 (w), 1685 (w), 1654 (w), 1608 (s), 1560 (w), 1523 (s), 1500 (w), 1490 (w), 1458 (w), 1443 (w), 1400 (m), 1354 (m), 1315 (m), 1274 (w), 1232 (w), 1167 (w), 1152 (w), 1134 (w), 1091 (w), 1034 (w), 1022 (w), 964 (m), 900 (w), 862 (w), 818 (w), 786 (w), 747 (m), 708 (w), 671 (w), 611 (w), 588 (w), 573 (w).

Elementaranalyse (%) für $[\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{INO}_6] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (426.16 g/mol): C 39.46; H 3.07; N 3.29; gefunden: C 39.38; H 3.05; N 3.45.

11.82 Synthese von (\pm)-(6aR,8S,10aR)-8-Hydroxy-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-phenanthridin-6(5H)-on **197**:



5,00 g Iodlaktone **175** wurden in 40 ml Methanol und 5 ml Triethylamin gelöst und mit 1,0 g Raney-Nickel versetzt. Das Gemisch wurde in einem Autoklaven bei 150 °C in einer H₂ Atmosphäre (50 bar) 5 Tage gerührt. Nach beendeter Reaktion filtrierte man die Suspension über Celite und extrahierte den Filterkuchen gründlich mit Methanol. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, und der Rückstand über eine Säule mit DCM/MeOH (19:1) eluiert. Man erhielt 2,20 g (84 %) eines Isomerengemisches (cis/trans = 3:1), das anschließend über mehrfache Säulenchromatographie (n-Hexan/EE/MeOH 10:9:1) getrennt werden konnte. (**196**: 700 mg; **197**: 272 mg). Durch Umkristallisation aus Ethanol konnte das cis **196** und das trans **197** Isomer in Form von farblosen Kristallen erhalten werden.

Rac-107:

Smp.: 221 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 10.06 (s, 1H, NH); 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H); 7.15 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H); 6.96 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H); 6.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H); 4.41 (d, J = 2.9 Hz, 1H); 4.05 (m, 1H); 2,54 (m, 1H, CH₂); 2.32 (dt, J = 12.5 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, CH₂); 2.17 (m; 2H, CH₂); 1.81 (d, J = 13.3 Hz, 1H, CH₂); 1.67 (ddd, J = 15.3 Hz, 12.9 Hz, J = 3.3 Hz, 1H CH₂); 1,50 (tt, J = 13.0 Hz, J = 1.5 Hz, 1H CH₂); 1.39 (m, 1H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 172.4, 137.5, 127.6, 127.0, 124.0, 121.9, 114.7, 63.2, 36.9, 36.8, 32.6, 30.9, 22.1.

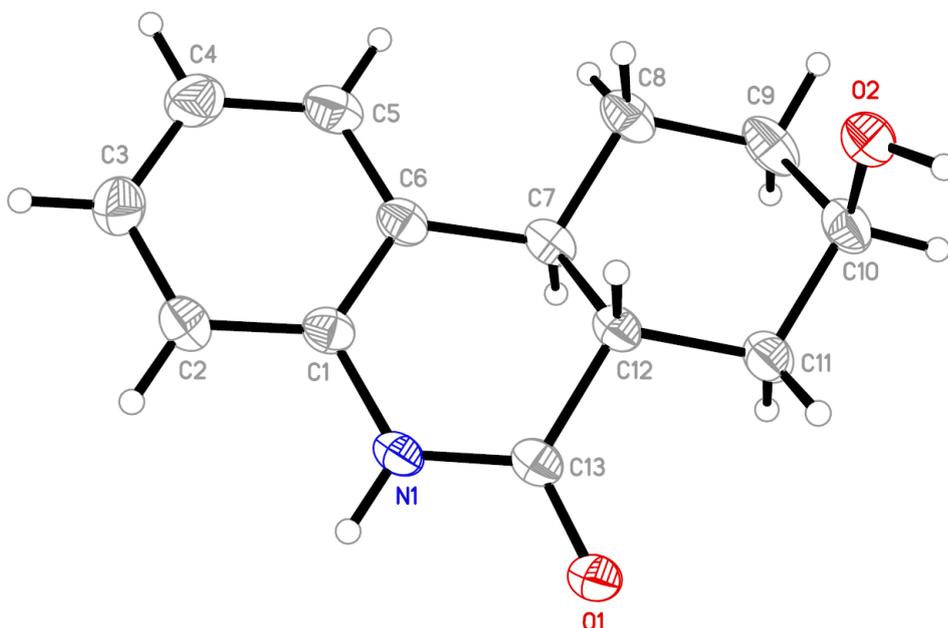
IR: $\tilde{\nu}$ = 3394 (m), 3344 (m), 3204 (m), 3057 (m), 2915 (m), 1668 (s), 1589 (m), 1484 (m), 1399 (m), 1346 (m), 1314 (m), 1253 (m), 1216 (w), 1149 (w), 1100 (m), 986 (m), 931 (m), 866 (w), 813 (w), 754 (m), 649 (m), 435 (w).

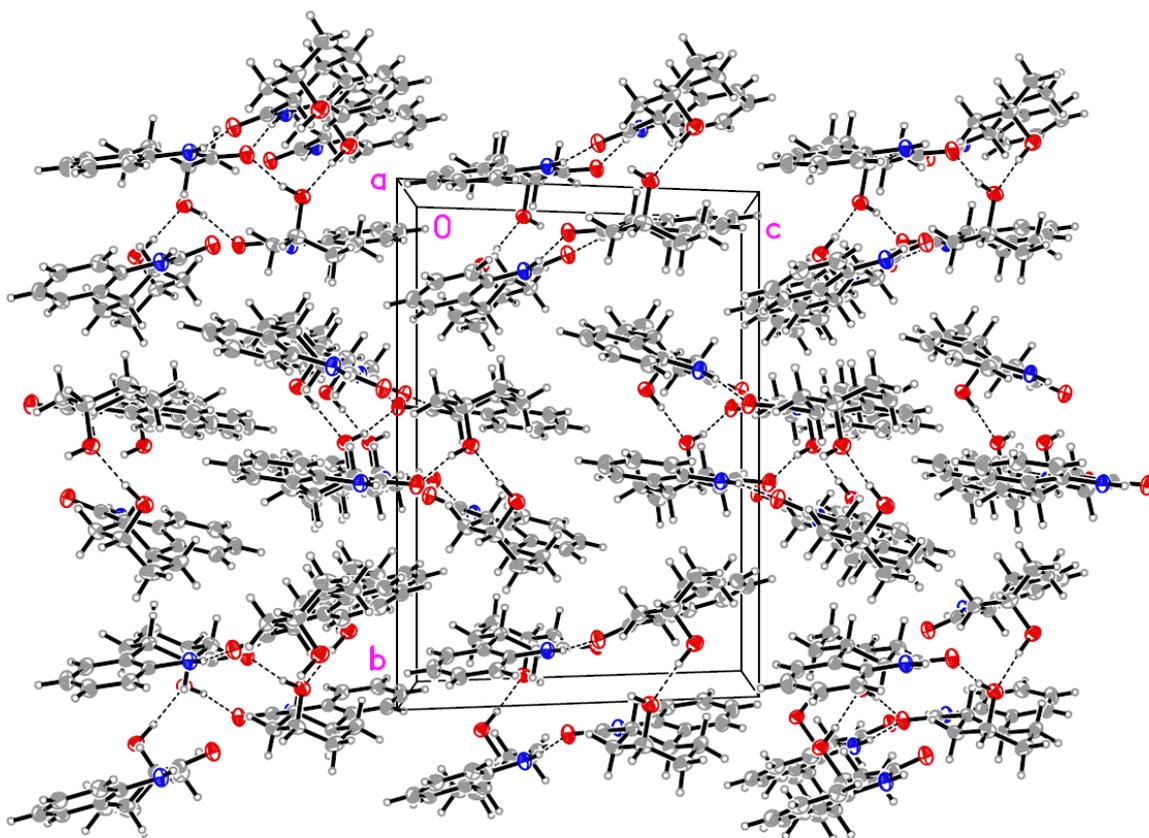
ESI: berechnet für C₁₃H₁₅NO₂ [M-H⁺] 216.1; gefunden: 215.8.

Elementaranalyse (%) für [C₁₃H₁₅NO₂] (217,26): C 71.87; H 6.96; N 6.45; gefunden: C 71.79; H 6.79 ; N 6.44.

Kristallstruktur (rac)-197:

Die asymmetrischen monomeren Einheiten bestehen aus zwei unabhängigen Molekülen. Die beiden Moleküle haben sehr ähnliche Konformation. Der aromatische Sechsring ist planar. Der zentrale Sechsring weist eine 1,3-diplanar Konformation auf und die gesättigten sechsgliedrigen Ringe hatte besitzen eine Sessel-Konformation. Die Hydroxygruppe und die H-Atome an C7 und C12 (oder C25 und C20) liegen in axialen Positionen bezüglich des gesättigten sechsgliedrigen Ring. Die beiden unabhängigen Moleküle sind über die Amid-Gruppen über zwei NH...O Wasserstoffbrücken verbunden. Die Paare von Molekülen werden durch intermolekulare OH...O-Wasserstoffbrücken verbundenen, die parallel entlang der kristallographischen a-Richtung kristallisieren. Die Bindung zwischen den benachbarten stabförmigen Schichtungen ist sehr schwach.





Wasserstoffbrücken:

Atome	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D-H-A [°]	Symmetrie
N1 - H1A ... O3	0.89(2)	2.05(2)	2.9324(16)	169.6(16)	x, y, z
N2 - H2B ... O1	0.873(17)	2.037(17)	2.9061(16)	173.7(15)	x, y, z
O2 - H2C ... O1	0.84(2)	1.94(2)	2.7673(15)	166.8(19)	2-x, -y, 1-z
O4 - H4B ... O2	0.94(2)	1.83(2)	2.7662(15)	176(2)	1-x, -y, 1-z

Bindungslängen:

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
O(1)-C(13)	1.2421(16)	C(1)-C(2)	1.3892(19)
O(3)-C(26)	1.2325(16)	C(25)-C(20)	1.5350(18)
O(2)-C(10)	1.4418(17)	C(20)-C(19)	1.5151(19)
O(4)-C(23)	1.4311(17)	C(20)-C(21)	1.5345(18)
N(1)-C(13)	1.3442(17)	C(19)-C(18)	1.3890(19)
N(1)-C(1)	1.4121(17)	C(19)-C(14)	1.4001(18)
C(6)-C(5)	1.3913(19)	C(7)-C(8)	1.5335(17)
C(6)-C(1)	1.4018(17)	C(7)-C(12)	1.5386(18)
C(6)-C(7)	1.5181(18)	C(12)-C(11)	1.5333(18)

N(2)-C(26)	1.3548(17)	C(14)-C(15)	1.3914(19)
N(2)-C(14)	1.4095(17)	C(11)-C(10)	1.5260(18)
C(13)-C(12)	1.5160(17)	C(15)-C(16)	1.380(2)
C(25)-C(26)	1.5183(17)	C(24)-C(23)	1.5305(19)
C(25)-C(24)	1.5290(18)	C(8)-C(9)	1.531(2)
C(18)-C(17)	1.391(2)	C(21)-C(22)	1.527(2)
C(3)-C(4)	1.384(2)	C(23)-C(22)	1.515(2)
C(3)-C(2)	1.384(2)	C(16)-C(17)	1.384(2)
C(5)-C(4)	1.391(2)	C(9)-C(10)	1.514(2)

Bindungswinkel:

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel[°]
C(13)-N(1)-C(1)	124.22(11)	C(24)-C(25)-C(20)	111.22(11)
C(5)-C(6)-C(1)	117.76(12)	C(19)-C(20)-C(21)	114.36(12)
C(5)-C(6)-C(7)	125.17(12)	C(19)-C(20)-C(25)	109.93(11)
C(1)-C(6)-C(7)	117.05(11)	C(21)-C(20)-C(25)	110.09(11)
C(26)-N(2)-C(14)	124.45(11)	C(18)-C(19)-C(14)	117.65(12)
C(2)-C(1)-C(6)	121.32(12)	C(18)-C(19)-C(20)	125.15(12)
C(2)-C(1)-N(1)	119.39(12)	C(14)-C(19)-C(20)	117.17(12)
C(6)-C(1)-N(1)	119.29(12)	C(6)-C(7)-C(8)	114.42(11)
O(1)-C(13)-N(1)	120.84(11)	C(6)-C(7)-C(12)	109.76(10)
O(1)-C(13)-C(12)	122.85(11)	C(8)-C(7)-C(12)	110.24(10)
N(1)-C(13)-C(12)	116.32(11)	O(3)-C(26)-N(2)	121.29(12)
C(26)-C(25)-C(24)	111.60(11)	O(3)-C(26)-C(25)	122.99(12)
C(26)-C(25)-C(20)	112.53(11)	N(2)-C(26)-C(25)	115.68(12)
C(13)-C(12)-C(11)	111.32(11)	C(16)-C(15)-C(14)	120.01(13)
C(13)-C(12)-C(7)	111.37(10)	C(25)-C(24)-C(23)	110.49(11)
C(11)-C(12)-C(7)	111.30(11)	C(9)-C(8)-C(7)	111.07(12)
C(15)-C(14)-C(19)	121.23(12)	C(19)-C(18)-C(17)	121.20(13)
C(15)-C(14)-N(2)	119.34(12)	C(4)-C(3)-C(2)	119.87(14)
C(19)-C(14)-N(2)	119.43(12)	C(22)-C(21)-C(20)	111.22(12)
C(10)-C(11)-C(12)	111.48(11)	O(4)-C(23)-C(22)	107.48(12)
O(4)-C(23)-C(24)	110.84(11)	C(3)-C(2)-C(1)	119.76(13)
C(22)-C(23)-C(24)	110.87(11)	C(10)-C(9)-C(8)	112.70(11)
C(4)-C(5)-C(6)	121.10(13)	C(16)-C(17)-C(18)	120.24(14)
C(15)-C(16)-C(17)	119.64(13)	C(3)-C(4)-C(5)	120.18(14)
C(23)-C(22)-C(21)	111.46(12)	O(2)-C(10)-C(9)	107.72(12)
O(2)-C(10)-C(11)	110.89(11)	C(9)-C(10)-C(11)	110.83(11)

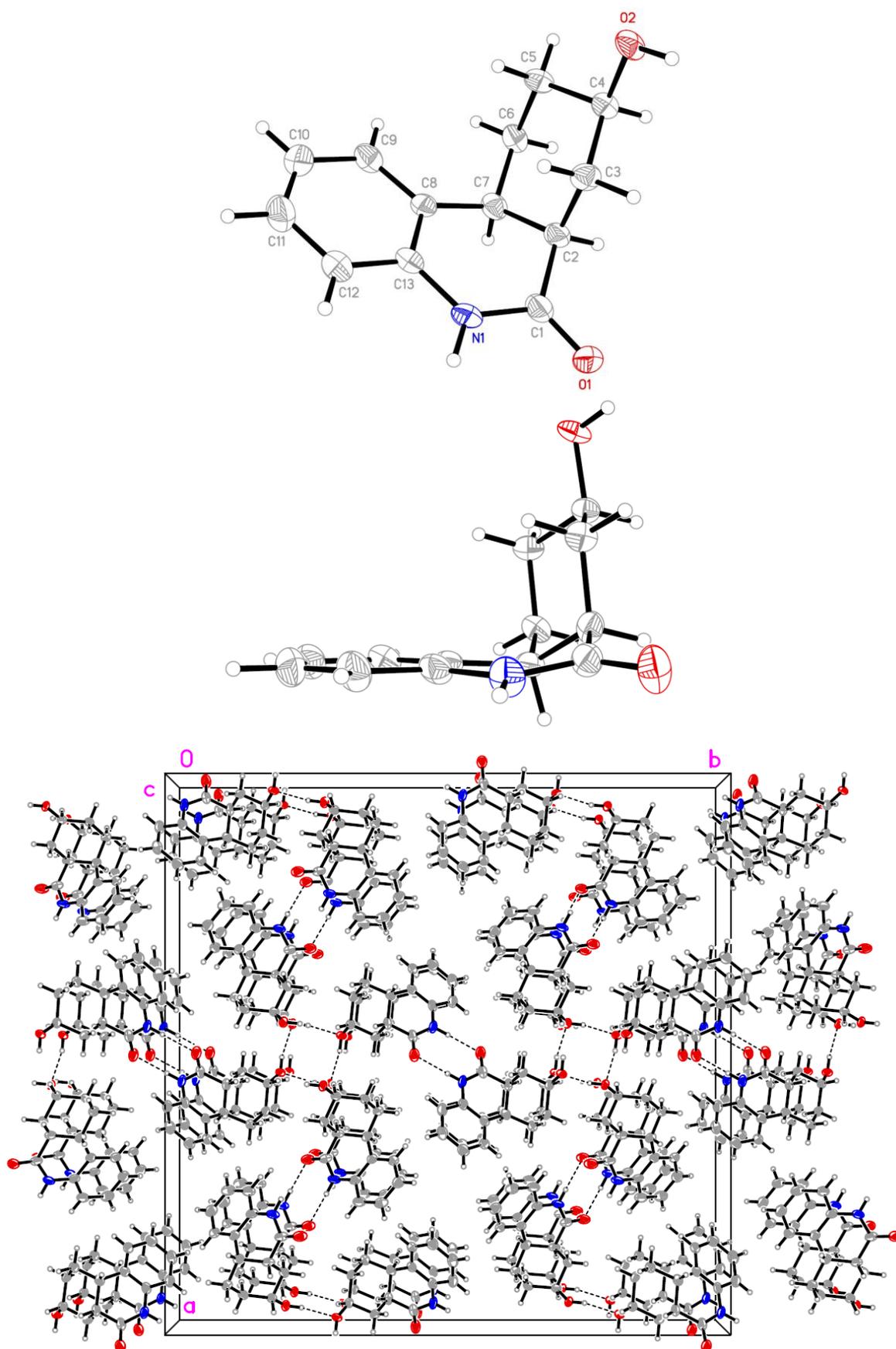
Torsionswinkel

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(5)-C(6)-C(1)-C(2)	0.6(2)	C(1)-C(6)-C(7)-C(12)	-37.43(16)
C(7)-C(6)-C(1)-C(2)	-177.59(12)	C(14)-N(2)-C(26)-O(3)	171.71(13)
C(5)-C(6)-C(1)-N(1)	-179.95(12)	C(14)-N(2)-C(26)-C(25)	-6.24(19)
C(7)-C(6)-C(1)-N(1)	1.90(18)	C(24)-C(25)-C(26)-O(3)	25.72(18)
C(13)-N(1)-C(1)-C(2)	-158.97(13)	C(20)-C(25)-C(26)-O(3)	151.57(13)
C(13)-N(1)-C(1)-C(6)	21.5(2)	C(24)-C(25)-C(26)-N(2)	-156.36(12)
C(1)-N(1)-C(13)-O(1)	175.70(12)	C(20)-C(25)-C(26)-N(2)	-30.52(16)
C(1)-N(1)-C(13)-C(12)	-4.06(19)	O(1)-C(13)-C(12)-C(11)	22.11(18)
C(26)-C(25)-C(20)-C(19)	50.78(14)	N(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-158.15(12)
C(24)-C(25)-C(20)-C(19)	176.83(10)	O(1)-C(13)-C(12)-C(7)	146.95(13)
C(26)-C(25)-C(20)-C(21)	177.63(11)	N(1)-C(13)-C(12)-C(7)	-33.30(16)
C(24)-C(25)-C(20)-C(21)	-56.32(15)	C(6)-C(7)-C(12)-C(13)	52.26(14)
C(21)-C(20)-C(19)-C(18)	19.56(19)	C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	179.17(11)
C(25)-C(20)-C(19)-C(18)	143.98(13)	C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	177.12(10)
C(21)-C(20)-C(19)-C(14)	-162.09(12)	C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-55.97(14)
C(25)-C(20)-C(19)-C(14)	-37.67(16)	C(18)-C(19)-C(14)-C(15)	2.0(2)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	20.05(19)	C(20)-C(19)-C(14)-C(15)	-176.47(12)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-161.96(12)	C(18)-C(19)-C(14)-N(2)	-178.39(12)
C(5)-C(6)-C(7)-C(12)	144.57(13)	C(20)-C(19)-C(14)-N(2)	3.14(18)
C(26)-N(2)-C(14)-C(15)	-158.86(13)	C(25)-C(24)-C(23)-C(22)	-56.68(15)
C(26)-N(2)-C(14)-C(19)	21.5(2)	C(1)-C(6)-C(5)-C(4)	-0.8(2)
C(13)-C(12)-C(11)-C(10)	-178.96(11)	C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	177.14(13)
C(7)-C(12)-C(11)-C(10)	56.16(15)	C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	-0.3(2)
C(19)-C(14)-C(15)-C(16)	-1.2(2)	O(4)-C(23)-C(22)-C(21)	-64.88(14)
N(2)-C(14)-C(15)-C(16)	179.16(13)	C(24)-C(23)-C(22)-C(21)	56.41(16)
C(26)-C(25)-C(24)-C(23)	-176.42(11)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-0.8(2)
C(20)-C(25)-C(24)-C(23)	57.02(14)	C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	0.3(2)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	179.28(11)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-179.22(13)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	55.01(15)	C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-55.26(16)

C(14)-C(19)-C(18)-C(17)	-1.3(2)	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	1.0(2)
C(20)-C(19)-C(18)-C(17)	177.06(13)	C(19)-C(18)-C(17)-C(16)	-0.2(2)
C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	179.83(11)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	0.6(2)
C(25)-C(20)-C(21)-C(22)	55.49(15)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	0.3(2)
C(25)-C(24)-C(23)-O(4)	62.61(15)	C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	-56.13(16)
C(8)-C(9)-C(10)-O(2)	-66.86(14)	C(12)-C(11)-C(10)-O(2)	64.83(15)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	54.62(16)	C(12)-C(11)-C(10)-C(9)	-54.76(16)

Kristallstruktur (rac)-196:

Der aromatische Ring ist planar. Der Ring mit Atomen C1, C2, N1, C7, C8 und C13 hat eine 1,3-diplanar Konformation (sowohl die Amidbindung und die aromatische Verbindung sind planar). Der gesättigte Sechsring liegt in einer Sessel-Konformation. Die C4-O2 und C2-C1-Bindungen stehen äquatorial. Die C7-C8-Bindung liegt in einer axialen Position in Bezug auf den gesättigten sechsgliedrigen Ring. Vier Moleküle sind durch OH...O Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxygruppen zu Tetrameren verbunden, die eine viergliedrige Inversionsachse bilden. Die Amidgruppen sind paarweise über zwei NH...O-Wasserstoffbrücken verbunden und bilden dabei ein Inversionszentrum.



Wasserstoffbrücken:

Atome	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D-H-A [°]	Symmetrie
N1 - H1A ... O1	0.88	1.98	2.861(4)	178	1-x, -y, 2-z
O2 - H2B ... O2	0.84	1.91	2.721(3)	162	1/4+y, 3/4-x, 3/4-z

Bindungslängen:

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
O(2)-C(4)	1.430(4)	C(13)-C(8)	1.403(5)
O(1)-C(1)	1.236(4)	C(9)-C(10)	1.381(5)
C(5)-C(4)	1.517(5)	C(9)-C(8)	1.387(5)
C(5)-C(6)	1.519(5)	C(7)-C(8)	1.517(5)
C(3)-C(4)	1.518(4)	C(7)-C(6)	1.530(5)
C(3)-C(2)	1.540(5)	C(7)-C(2)	1.536(5)
N(1)-C(1)	1.347(4)	C(1)-C(2)	1.502(5)
N(1)-C(13)	1.410(4)	C(12)-C(11)	1.387(5)
C(13)-C(12)	1.387(5)	C(10)-C(11)	1.371(5)

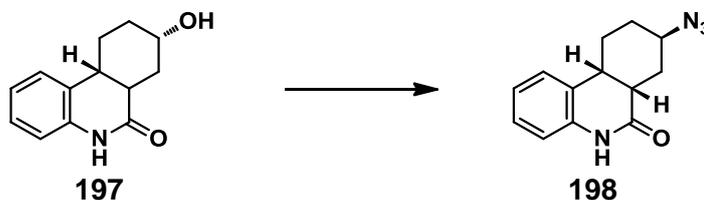
Bindungswinkel:

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(4)-C(5)-C(6)	110.7(3)	C(9)-C(8)-C(7)	124.3(3)
C(4)-C(3)-C(2)	110.9(3)	C(13)-C(8)-C(7)	118.3(3)
C(1)-N(1)-C(13)	124.8(3)	C(5)-C(6)-C(7)	112.5(3)
C(12)-C(13)-C(8)	121.1(3)	C(1)-C(2)-C(7)	112.5(3)
C(12)-C(13)-N(1)	119.5(3)	C(1)-C(2)-C(3)	108.9(3)
C(8)-C(13)-N(1)	119.3(3)	C(7)-C(2)-C(3)	111.5(3)
C(10)-C(9)-C(8)	122.1(4)	C(11)-C(12)-C(13)	119.5(4)
C(8)-C(7)-C(6)	115.3(3)	C(11)-C(10)-C(9)	119.7(4)
C(8)-C(7)-C(2)	110.3(3)	C(10)-C(11)-C(12)	120.3(4)
C(6)-C(7)-C(2)	109.4(3)	O(2)-C(4)-C(5)	109.1(3)
O(1)-C(1)-N(1)	121.7(3)	O(2)-C(4)-C(3)	109.3(3)
O(1)-C(1)-C(2)	122.1(3)	C(5)-C(4)-C(3)	110.3(3)
N(1)-C(1)-C(2)	116.1(3)	C(9)-C(8)-C(13)	117.2(3)

Torsionswinkel:

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(1)-N(1)-C(13)-C(12)	-166.9(4)	O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-89.9(4)

C(1)-N(1)-C(13)-C(8)	15.1(5)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	87.1(4)
C(13)-N(1)-C(1)-O(1)	-178.5(3)	C(8)-C(7)-C(2)-C(1)	49.2(4)
C(13)-N(1)-C(1)-C(2)	4.4(5)	C(6)-C(7)-C(2)-C(1)	177.0(3)
C(10)-C(9)-C(8)-C(13)	-0.1(5)	C(8)-C(7)-C(2)-C(3)	-73.5(4)
C(10)-C(9)-C(8)-C(7)	176.4(3)	C(6)-C(7)-C(2)-C(3)	54.3(4)
C(12)-C(13)-C(8)-C(9)	-0.4(5)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	178.7(3)
N(1)-C(13)-C(8)-C(9)	177.6(3)	C(4)-C(3)-C(2)-C(7)	-56.5(4)
C(12)-C(13)-C(8)-C(7)	-177.1(3)	C(8)-C(13)-C(12)-C(11)	0.5(6)
N(1)-C(13)-C(8)-C(7)	0.8(5)	N(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-177.5(3)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	27.0(5)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.6(6)
C(2)-C(7)-C(8)-C(9)	151.5(3)	C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-0.4(6)
C(6)-C(7)-C(8)-C(13)	-156.5(3)	C(13)-C(12)-C(11)-C(10)	-0.1(6)
C(2)-C(7)-C(8)-C(13)	-32.0(4)	C(6)-C(5)-C(4)-O(2)	-177.5(3)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	57.2(4)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	-57.4(4)
C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	69.8(4)	C(2)-C(3)-C(4)-O(2)	177.3(3)
C(2)-C(7)-C(6)-C(5)	-55.1(4)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	57.3(4)
O(1)-C(1)-C(2)-C(7)	145.9(4)	N(1)-C(1)-C(2)-C(7)	-37.0(5)

11.83 Synthese von (±)-(6aS,8R,10aR)-8-Azido-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrophenanthridin-6(5H)-on 198:

In einer Argonatmosphäre wurden 2,00 g (9,21 mmol) 8-Hydroxy-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrophenanthridin-6(5H)-on als Epimerengemisch und 2,90 g (11,1 mmol) Triphenylphosphin in 100 ml abs. THF suspendiert und bei -5 °C mit 2,17 ml (13,8 mmol) DEAD und anschließend 3,36 ml (15,7 mmol) Diphenylphosphorylazid versetzt. Man rührte das Reaktionsgemisch 60 Minuten im Kältebad und erwärmte anschließend langsam auf Raumtemperatur. Nach 18 Stunden war die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und das Lösemittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (Cyclohexan/EE 4:1) und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 2,10 g (94 %) eines farblosen Feststoffs.

Smp.: 187 °C.

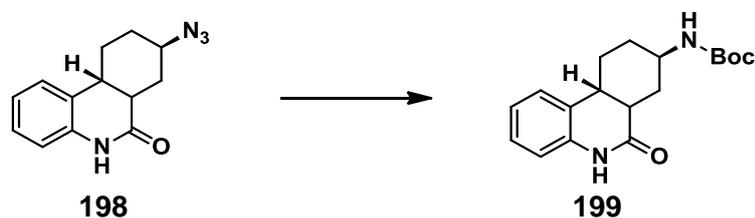
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 8.26 (s, 1H, NH); 7.19 (dt, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.16 (br d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.02 (dt, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.78 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H, Ar-*H*); 3.57 (tt, *J* = 11.1 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH); 3,00 (m, 1H, CH); 2.90 (td, *J* = 11,4 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, CH); 2.79 (brd, *J* = 12.6 Hz, 1H,); 2.07 (tq, *J*_D = 11.3 Hz, *J* = 4.6 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH₂); 1.85-1.75 (m, 1H, CH₂); 1.8-1.4 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 171.2, 135.8, 127.9, 127.7, 127.5, 123.5, 115.4, 56.1, 39.7, 38.5, 31.2, 29.8, 28.5.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3195 (m); 3067 (m); 2986 (m); 2986 (m); 2930 (m); 2861 (w); 2098 (s); 1675 (s); 1592 (m); 1492 (m); 1441 (w); 1397 (m); 1294 (m); 1250 (m); 1122 (w); 1008 (w); 931 (w); 875 (w); 840 (m); 759 (m); 700 (w); 671 (w); 487 (w).

ESI: berechnet für C₁₃H₁₄N₄O [M+H⁺] 243.12; gefunden: 242.7.

11.84 Synthese von (\pm)-tert-Butyl-(6-oxo-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydro-phenanthridin-8-yl)-carbammat 199:



1,00 g (4,13 mmol) 8-Azido-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrophenanthridin-6(5H)-on wurden in 100 ml abs. THF gelöst und mit 1,35 g (6,19 mmol) Bocanhydrid, 1,40 ml (8,26 mmol) DIPEA und 100 mg Pd/C (10 %Pd) versetzt. Man rührte die Mischung 18 Stunden bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre (Normaldruck). Nach beendeter Reaktion filtrierte man über Celite, entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer und arbeitete säulenchromatisch auf (Cyclohexan/EE 1:1). Man erhielt 820 mg (63 %) eines farblosen Pulvers, das aus Ethanol für analytische Zwecke umkristallisiert wurde.

Smp.: 263-265 °C.

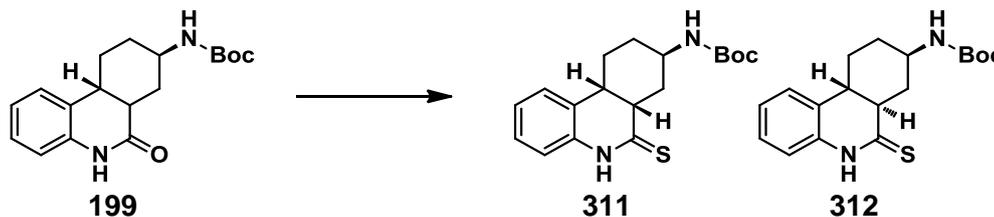
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 10.09 (s, 1H, NH); 7.15 (m, 2H, Ar-H); 7.02-6.78 (m, 2H, Ar-H); 6.74 (d, J = 6.1 Hz, 1H, NHBoc); 2.84 (m, 1H, CH); 2.44-1.01 (m, 8H, CH); 1.39 (s, 9H, t-Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ / ppm = 170.4, 154.6, 136.7, 127.9, 127.4, 127.0, 122.0, 114.8, 77.3, 45.2, 41.4, 39.4, 37.9, 32.5, 30.0, 29.1, 28.2.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3374 (w); 3208 (w); 3070 (w); 2978 (w); 2939 (w); 2854 (w); 1675 (s); 1616 (w); 1596 (m); 1520 (m); 1492 (m); 1443 (w); 1388 (m); 1363 (m); 1343 (w); 1316 (m); 1294 (m); 1272 (m); 1250 (m); 1231 (m); 1193 (w); 1169 (m); 1126 (w); 1084 (w); 1045 (m); 1019 (m); 961 (w); 930 (w); 902 (w); 882 (m); 864 (w); 844 (w); 796 (w); 770 (w); 746 (s); 696 (m); 669 (w); 611 (m); 585 (w); 515 (w); 489 (m); 476 (m); 460 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (316,39): C 66.44; H 7.44; N 8.61.
Gefunden: C 66.35; H 7.51; N 8.44.

11.85 Synthese von (±)-tert-Butyl-(6-thio-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydro-phenanthridin-8-yl)carbammat 311 und 312:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 700 mg (2,21 mmol) tert-Butyl-(6-oxo-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydrophenanthridin-8-yl)carbammat und 492 mg (1,22 mmol) Lawesson's Reagenz in 70 ml abs. Toluol gelöst und 3 Stunden auf 100 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Kieselgel adsorbiert und chromatographiert (Gradient: Cyclohexan/EE 9:1 zu 4:1). Man erhielt 650 mg (88 %) des racemischen Epimerengemisches (**F1/F2** 3:1), das durch mehrfache säulenchromatographische Trennung separiert werden konnte. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man beide Isomere **F1**: 200 mg (27 %). **F2**: 100 mg (14 %) in Form von hellgelben lockeren Pulvern. Die Isomeren konnten auf dieser Stufe nicht eindeutig zugewiesen werden.

F1:

Smp.: 230-231 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.21 (s, 1H, NHCS); 7.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.16-7.05 (m, 2H, Ar-*H*); 6.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, NHBoc); 3.56-3.16 (m, 1H, CHNHBoc); 2.71 (br d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH); 2.48 (m, 1H, CH); 2.36 (ddd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 10.3 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, CH₂); 2.19 (ddd, *J* = 13.6 Hz, 11.4 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH₂); 1.90 (br d, *J* = 10.6 Hz, 1H, CH₂); 1.40 (s, 9H, t-Bu); 1.35-1.13 (m, 3H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 202.1, 154.7, 135.8, 128.8, 127.2, 124.4, 124.2, 115.6, 77.3, 48.6, 46.1, 36.7, 35.3, 31.0, 28.2, 26.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3354 (m); 3162 (w); 3104 (w); 3072 (w); 2987 (m); 2973 (m); 2935 (m); 2854 (w); 2831 (w); 2812 (w); 1938 (w); 1684 (s); 1617 (m); 1533 (m); 1505 (s); 1489 (s); 1458 (m); 1449 (m); 1391 (m); 1375 (m); 1365 (m); 1348 (m); 1333 (m); 1313 (s); 1288 (m); 1265 (m); 1249 (m); 1228 (m); 1209 (m); 1196 (m); 1157 (s); 1109 (s); 1052 (m); 1041 (m); 1018 (m); 1004 (m); 954 (m); 930 (w); 917 (w); 888 (w); 866 (m); 854 (m); 819 (m); 811 (m); 790 (m); 777 (m); 748 (s); 718 (m); 651 (m);

Elementaranalyse (%) für C₁₈H₂₄N₂O₂S (332,46 g/mol): C 65.03; H 7.28; N 8.43; S 9.64; gefunden: C 64.76; H 7.19; N 8.12; S 9.76.

F2:

Smp.: 236-238 °C.

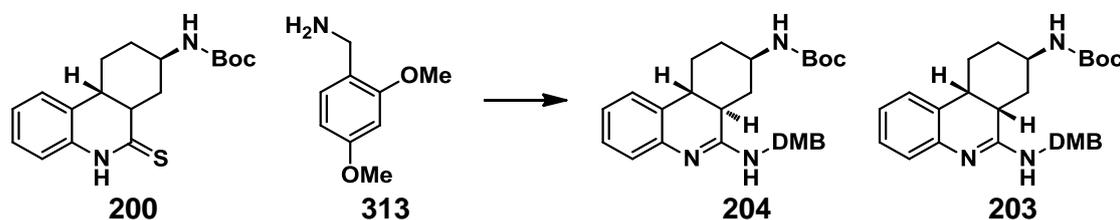
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.16 (s, 1H, NHCS); 7.23 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H); 7.18 (dd, J = 7.4 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, Ar-H); 7.15-7.06 (m, 2H, Ar-H); 6.78 (d, J = 6.7 Hz, 1H, NHBoc); 3.63 (m, 1H, CHNHBoc); 3.00 (m, 1H, CH); 2.87 (m, 1H, CH); 2.70 (br, 1H, CH₂); 1.82 (m, 1H, CH₂); 1.66-1.48 (m, 2H, CH₂); 1.39 (s, 9H, t-Bu); 1.36-1.14 (m, 3H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 201.4, 154.7, 146.7, 135.3, 127.4, 127.3, 124.3, 115.8, 77.2, 62.1, 53.3, 49.9, 44.3, 36.3, 32.4, 28.2.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3355 (w); 3168 (w); 3104 (w); 2984 (w); 2934 (w); 2854 (w); 2825 (w); 1681 (s); 1618 (w); 1519 (s); 1488 (s); 1458 (m); 1443 (m); 1377 (m); 1362 (m); 1344 (m); 1315 (s); 1298 (m); 1267 (m); 1250 (m); 1230 (m); 1197 (m); 1168 (s); 1130 (m); 1105 (s); 1060 (m); 1045 (m); 1017 (m); 974 (w); 956 (m); 927 (w); 894 (w); 870 (m); 821 (w); 792 (m); 745 (s); 734 (m); 689 (w); 633 (m); 617 (m); 555 (w); 536 (w); 499 (m); 473 (w); 455 (m).

Elementaranalyse (%) für C₁₈H₂₄N₂O₂S (332,46): C 65,03; H 7,28; N 8,43; S 9,64; gefunden: C 65,01; H 7,07; N 8,21; S 9,46.

11.86 Synthese von (±)-tert-Butyl-((6aR,8R,10aR)-6-((2,4-dimethoxybenzyl)amino)-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrophenanthridin-8-yl)carbammat **204:**



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 600 mg (1,80 mmol) tert-Butyl-(6-thio-5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydrophenanthridin-8-yl)carbammat als Epimerengemisch, 326 µl (2,17 mmol) 2,4-dimethoxybenzylamin und 614 µl (3,61 mmol) DIPEA in 50 ml abs. DMF gelöst und bei 0 °C mit 414 mg (1,89 mmol) HgCl₂ versetzt, wobei sich die Lösung orange färbte. Man entfernte das Kältebad nach 30 Minuten und rührte bei Raumtemperatur weitere 8 Stunden. Es fiel schwarzes HgS aus, das nach beendeter Reaktion mit Celite abfiltriert wurde. Man entfernte das Lösemittel am Rotationsverdampfer und arbeitete den Rückstand durch Säulenchromatographie auf (EE/EtOH 19:1). Man erhielt nach mehrmaligem chromatographieren 303 mg (36 %) **203** und 85 mg (10 %) **204** in Form von beigen Schäumen.

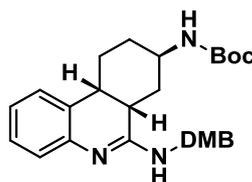
203:

R_f: 0.41 (EE/EtOH 19:1).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 7.17-6.98 (m, 3H, Ar-H, NH?); 6.96-6.71 (m, 4H, Ar-H, NH); 6.54 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H); 6.45 (dd, J = 8.3 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H); 4.54 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CH₂); 4.31 (d, J = 15.5 Hz, 1H, CH₂); 3.81 (s, 3H, CH₃); 3.73 (s, 3H, CH₃); 2.48-2.36 (m, 1H, CH); 2.33-2.17 (m, 1H, CH); 2.02 (t, J = 13.1 Hz, 1H, CH₂); 1.88 (m, 1H, CH₂); 1.39 (s, 9H, t-Bu); 1.40-1.09 (m, 4H, CH₂); 0.86 (m, 1H, CH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ = 3356 (w); 2932 (w); 1684 (m); 1611 (m); 1583 (m); 1563 (m); 1505 (s); 1478 (m); 1451 (m); 1365 (m); 1250 (m); 1207 (m); 1156 (s); 1130 (m); 1038 (m); 933 (m); 866 (w); 833 (m); 759 (m); 735 (m); 690 (m); 631 (m); 464 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₂₇H₃₅N₃O₄+H⁺ [M+H⁺] 466.2700; gefunden: 466.2697.

204:

R_f: 0.32 (EE/EtOH 19:1).

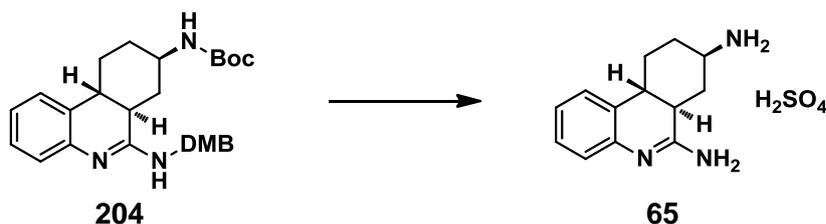
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm = 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*); 7.20-7.10 (m, 2H, Ar-*H*); 7.04 (d, J = 6.4 Hz, 1H, Ar-*H*); 6.92 (m, 1H, Ar-*H*); 6.50 - 6.42 (m, 2H, Ar-*H*); 5,65 (br, 1H, NH); 4.70 (d, J = 13.9 Hz, 1H, CH₂-Ar); 4.59 (d, J = 13.9 Hz, 1H, CH₂-Ar); 3.86 (s, 3H, CH₃); 3.79 (s, 3H, CH₃); 3.61 (br, 1H, CH-NHBoc); 2,73 (br, 2H, NH); 2.33 - 2.10 (m, 1H, CH); 1.96-1.83 (m, 1H, CH); 1.68 (m, 1H, CH₂); 1.43 (s, 9H, t-Bu); 1,53-1.29 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.4 MHz, DMSO-*d*₆): δ / ppm = 187.1, 159.2, 157.4, 154.6, 145.9, 129.1, 128.0, 126.7, 126.6, 123.0, 121.0, 119.5, 104.1, 98.0, 77.3, 55.3, 55.0, 48.4, 38.1, 36.8, 33.1, 31.3, 28.2, 27.00, 26.99.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3397 (w); 2930 (m); 2856 (w); 1694 (m); 1612 (m); 1585 (m); 1564 (m); 1505 (s); 1478 (m); 1451 (s); 1390 (m); 1365 (m); 1287 (m); 1251 (m); 1207 (s); 1156 (s); 1129 (m); 1035 (s); 934 (m); 865 (w); 832 (m); 783 (m); 760 (m); 709 (m); 688 (m); 631 (m); 543 (m); 463 (m).

HRMS-MALDI: berechnet für C₂₇H₃₅N₃O₄+H⁺ [M+H⁺] 466.2700; gefunden: 466.2701.

11.87 Synthese von (\pm)-(6aR,8R,10aR)-6a,7,8,9,10,10a-Hexahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrogensulfat **65**:



80 mg (172 μmol) **204** wurden in 5 ml TFA und 100 μl Methanol gelöst und mit 106 μl (516 μmol) TIPS und 150 μl (1,72 mmol) Trifluormethansulfonsäure versetzt. Man rührte das Gemisch bei Raumtemperatur, wobei es sich nach wenigen Minuten intensiv rot verfärbte. Nach 18 Stunden entfernte man das Lösemittel im Vakuum und versetzte mit 50 ml Ether. Man filtrierte den Niederschlag ab und arbeitete mit Umkehrphasenchromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 90:10:0,1; C18 Waters) auf. Nach Entfernen des Lösemittels eluierte man das Produkt mit einer Methanol/Wasser Mischung (3:1) durch eine Dowex- SO_4 Ionenaustauschersäule. Das erhaltene Sulfatsalz wurde aus EtOH/ H_2O (5:1) umkristallisiert. Man erhielt 20 mg (37 %) **65** in Form von farblosen kubischen Kristallen.

Smp.: >300 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ / ppm = 7.39 (d, J = 7.2 Hz, 1H, Ar- H); 7.38 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ar- H); 7.29 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 7.1 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, Ar- H); 7.15 (dd, J = 7.2 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, Ar- H); 3.56 (dd, J = 9.7 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, CH); 3.49 (tt, J = 11.0 Hz, J = 3.9 Hz, 1H, CH- NH_2); 3.21 (ddd, J = 9.7 Hz, J = 5.2 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, CH); 2.61 (dt, J = 14.2 Hz, J = 3.6 Hz, 1H, CH_2); 2.20-2.12 (m, 1H, CH_2); 2.07 (ddd, J = 15.1 Hz, J = 11.2 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, CH_2); 1.97-1.86 (m, 1H, CH_2); 1.79-1.62 (m, 2H, CH_2).

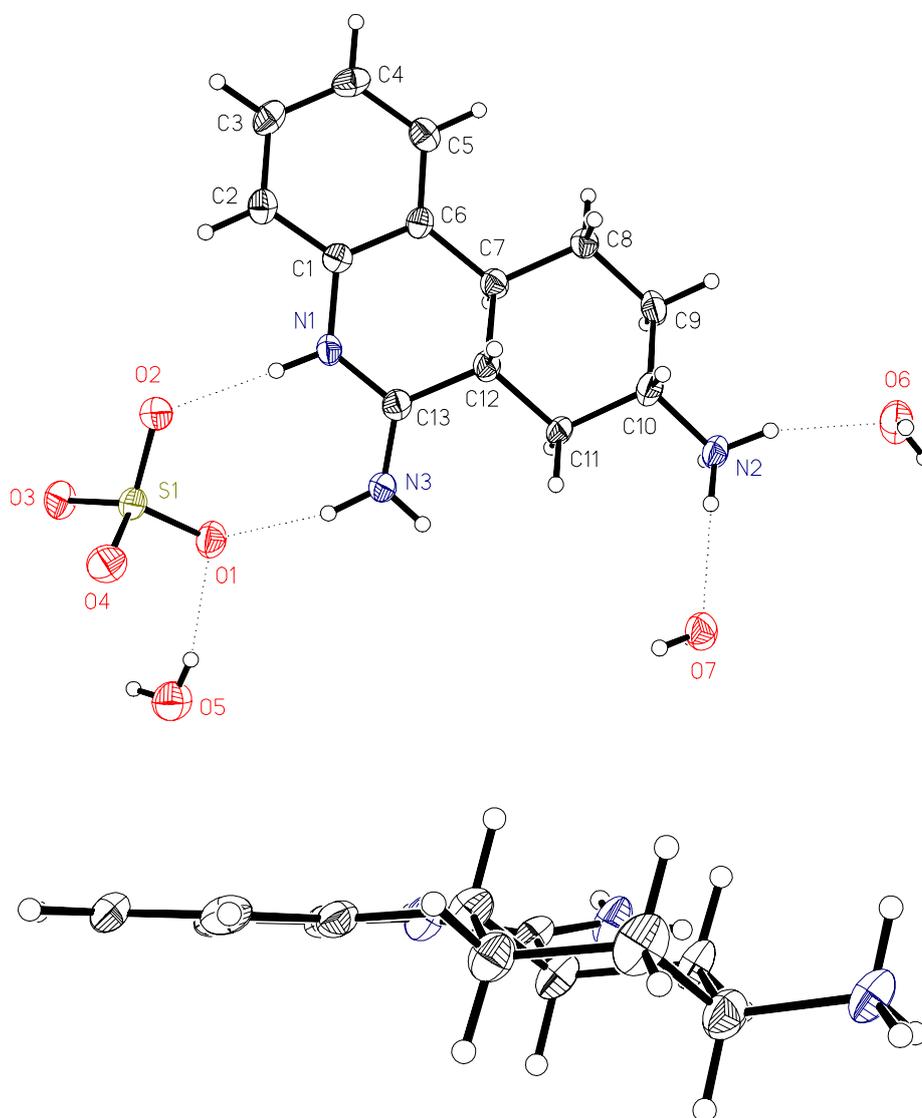
IR: $\tilde{\nu}$ = 2811 (w); 1655 (m); 1593 (w); 1556 (w); 1488 (w); 1399 (w); 1350 (w); 1266 (w); 1068 (s); 890 (m); 819 (m); 762 (m); 726 (m); 616 (s); 539 (m); 483 (s); 465 (s).

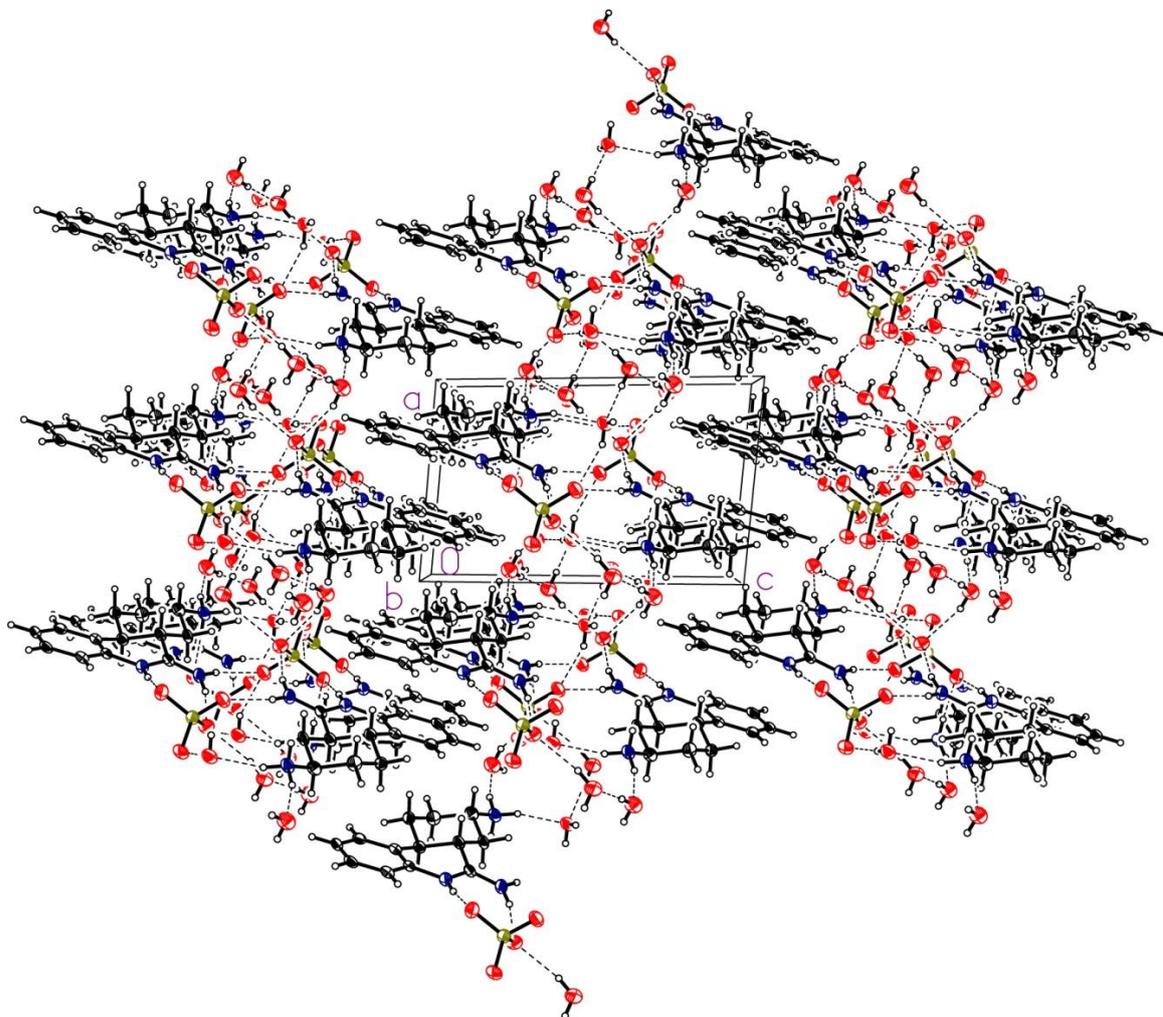
Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (313,37 g/mol): C 49.83; H 6.11; N 13.41; S 10.23; gefunden: C 49.57; H 6.12; N 13.12; S 9.94.

Kristallstruktur rac-65:

Die asymmetrische Einheit enthält ein Kation, ein Sulfat-Anion und drei Hydrate. Der Benzolring ist planar. Der zentrale Sechsering zeigt eine 1,3-diplanar (twist) Konformation.

Der gesättigte Sechsring hat eine Sessel-Konformation mit den C7-C6, C10-N2 und C12-C13-Bindungen in äquatorialen Positionen. Die Cyclohexylringe sind über die C7-C12 Einfachbindung trans-verknüpft. Das Kation fungiert Wasserstoffbrückendonator von sechs NH...O Bindungen und ist mit drei Sulfat-Gruppen und zwei Wassermolekülen verbunden. Von den Wassermolekülen gehen je zwei Wasserstoffbrücken aus. O5 und O6 sind Wasserstoffbrückenakzeptoren, während O7 ein Akzeptor von zwei Wasserstoffbrücken ist. Die Wasserstoffbrückenbindung führt zu einem zweidimensionalen Netz, mit Schichten parallel zu der (0 0 1)-Ebene. Benachbarte Schichten sind entlang der *c*-Achse durch schwache intermolekulare CH... π (Aryl) Kontakte und einem schwachen intermolekularen CH...O (Hydrat) Kontakt verbunden.



**Wasserstoffbrücken:**

Atome	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D-H-A [°]
N(1)-H(1A)...O(2)	0.86(3)	1.94(3)	2.796(3)	169(3)
N(2)-H(2B)...O(2)#1	0.91	1.96	2.868(3)	175.7
N(2)-H(2C)...O(7)	0.91	1.95	2.828(3)	160.4
N(2)-H(2D)...O(6)	0.91	1.90	2.781(3)	161.9
N(3)-H(3B)...O(4)#2	0.83(4)	2.02(4)	2.832(3)	163(4)
N(3)-H(3C)...O(1)	0.93(3)	1.91(4)	2.816(3)	167(3)
O(5)-H(5B)...O(1)	0.840(4)	2.085(9)	2.907(3)	166(3)
O(5)-H(5C)...O(7)#3	0.840(4)	1.987(6)	2.825(3)	175(4)
O(6)-H(6A)...O(5)#4	0.840(4)	1.916(6)	2.755(3)	176(3)
O(6)-H(6B)...O(1)#5	0.839(4)	2.032(12)	2.829(3)	158(3)
O(7)-H(7B)...O(3)#2	0.839(4)	1.926(9)	2.754(3)	169(3)
O(7)-H(7C)...O(4)#1	0.839(4)	2.036(15)	2.827(3)	157(3)

Bindungslängen:

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
S(1)-O(3)	1.466(2)	C(5)-H(5A)	0.9500
S(1)-O(2)	1.474(2)	C(8)-C(9)	1.519(4)
S(1)-O(4)	1.479(2)	C(8)-C(7)	1.535(4)
S(1)-O(1)	1.486(2)	C(8)-H(8A)	0.9900
N(1)-C(13)	1.332(3)	C(8)-H(8B)	0.9900
N(1)-C(1)	1.416(3)	C(2)-C(3)	1.374(4)
N(1)-H(1A)	0.86(3)	C(2)-C(1)	1.379(4)
N(3)-C(13)	1.293(4)	C(2)-H(2A)	0.9500
N(3)-H(3B)	0.83(4)	C(7)-C(12)	1.527(4)
N(3)-H(3C)	0.93(3)	C(7)-H(7A)	1.0000
C(6)-C(5)	1.384(4)	C(11)-C(10)	1.527(4)
C(6)-C(1)	1.401(4)	C(11)-C(12)	1.535(4)
C(6)-C(7)	1.516(4)	C(11)-H(11A)	0.9900
N(2)-C(10)	1.494(3)	C(11)-H(11B)	0.9900
N(2)-H(2B)	0.9100	C(13)-C(12)	1.502(4)
N(2)-H(2C)	0.9100	C(12)-H(12A)	1.0000
N(2)-H(2D)	0.9100	C(4)-C(3)	1.394(4)
C(5)-C(4)	1.387(4)	C(4)-H(4A)	0.9500
C(3)-H(3A)	0.9500	O(5)-H(5B)	0.840(4)
C(9)-C(10)	1.507(4)	O(5)-H(5C)	0.840(4)
C(9)-H(9A)	0.9900	O(6)-H(6A)	0.840(4)
C(9)-H(9B)	0.9900	O(6)-H(6B)	0.839(4)
C(10)-H(10A)	1.0000	O(7)-H(7B)	0.839(4)
O(7)-H(7C)	0.839(4)	O(7')-H(7B)	1.23(3)

Bindungswinkel:

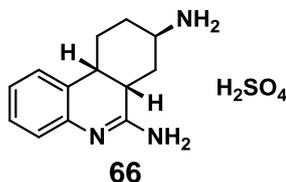
Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel[°]
O(3)-S(1)-O(2)	111.09(12)	C(7)-C(8)-H(8A)	109.4
O(3)-S(1)-O(4)	110.14(12)	C(9)-C(8)-H(8B)	109.4
O(2)-S(1)-O(4)	109.15(13)	C(7)-C(8)-H(8B)	109.4
O(3)-S(1)-O(1)	109.00(12)	H(8A)-C(8)-H(8B)	108.0
O(2)-S(1)-O(1)	108.57(12)	C(3)-C(2)-C(1)	120.0(3)
O(4)-S(1)-O(1)	108.85(12)	C(3)-C(2)-H(2A)	120.0
C(13)-N(1)-C(1)	124.4(2)	C(1)-C(2)-H(2A)	120.0
C(13)-N(1)-H(1A)	118 (2)	C(6)-C(7)-C(12)	110.6(2)
C(1)-N(1)-H(1A)	116.8(19)	C(6)-C(7)-C(8)	114.4(2)

C(13)-N(3)-H(3B)	123(3)	C(12)-C(7)-C(8)	110.4(2)
C(13)-N(3)-H(3C)	126(2)	C(6)-C(7)-H(7A)	107.0
H(3B)-N(3)-H(3C)	111(3)	C(12)-C(7)-H(7A)	107.0
C(5)-C(6)-C(1)	117.5(3)	C(8)-C(7)-H(7A)	107.0
C(5)-C(6)-C(7)	124.1(2)	C(10)-C(11)-C(12)	109.9(2)
C(1)-C(6)-C(7)	118.1(2)	C(10)-C(11)-H(11A)	109.7
C(10)-N(2)-H(2B)	109.5	C(12)-C(11)-H(11A)	109.7
C(10)-N(2)-H(2C)	109.5	C(10)-C(11)-H(11B)	109.7
H(2B)-N(2)-H(2C)	109.5	C(12)-C(11)-H(11B)	109.7
C(10)-N(2)-H(2D)	109.5	H(11A)-C(11)-H(11B)	108.2
H(2B)-N(2)-H(2D)	109.5	C(2)-C(1)-C(6)	121.7(3)
H(2C)-N(2)-H(2D)	109.5	C(2)-C(1)-N(1)	119.4(2)
C(6)-C(5)-C(4)	121.3(3)	C(6)-C(1)-N(1)	118.9(2)
C(6)-C(5)-H(5A)	119.4	N(3)-C(13)-N(1)	119.3(3)
C(4)-C(5)-H(5A)	119.4	N(3)-C(13)-C(12)	123.6(3)
C(9)-C(8)-C(7)	111.3(2)	N(1)-C(13)-C(12)	117.1(2)
C(9)-C(8)-H(8A)	109.4	C(13)-C(12)-C(7)	110.6(2)
C(13)-C(12)-C(11)	112.4(2)	C(13)-C(12)-H(12A)	107.2
C(7)-C(12)-C(11)	112.0(2)	C(7)-C(12)-H(12A)	107.2
C(11)-C(12)-H(12A)	107.2	C(5)-C(4)-C(3)	119.9(3)
C(5)-C(4)-H(4A)	120.0	C(8)-C(9)-H(9B)	109.3
C(3)-C(4)-H(4A)	120.0	H(9A)-C(9)-H(9B)	108.0
C(2)-C(3)-C(4)	119.6(3)	N(2)-C(10)-C(9)	110.6(2)
C(2)-C(3)-H(3A)	120.2	N(2)-C(10)-C(11)	108.0(2)
C(4)-C(3)-H(3A)	120.2	C(9)-C(10)-C(11)	111.4(2)
C(10)-C(9)-C(8)	111.6(2)	N(2)-C(10)-H(10A)	108.9
C(10)-C(9)-H(9A)	109.3	C(9)-C(10)-H(10A)	108.9
C(8)-C(9)-H(9A)	109.3	C(11)-C(10)-H(10A)	108.9
C(10)-C(9)-H(9B)	109.3	H(5B)-O(5)-H(5C)	114(3)
H(6A)-O(6)-H(6B)	114(3)	H(7B)-O(7)-H(7C)	114(3)

Torsionswinkel:

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(1)-C(6)-C(5)-C(4)	-0.4(4)	C(13)-N(1)-C(1)-C(6)	13.3(4)
C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	173.9(3)	C(1)-N(1)-C(13)-N(3)	-174.7(3)
C(5)-C(6)-C(7)-C(12)	152.2(3)	C(1)-N(1)-C(13)-C(12)	7.3(4)
C(1)-C(6)-C(7)-C(12)	-33.5(3)	N(3)-C(13)-C(12)-C(7)	142.4(3)

C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	26.8(4)	N(1)-C(13)-C(12)-C(7)	-39.8(4)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-158.9(3)	N(3)-C(13)-C(12)-C(11)	16.4(4)
C(9)-C(8)-C(7)-C(6)	-180.0(2)	N(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-165.7(2)
C(9)-C(8)-C(7)-C(12)	54.5(3)	C(6)-C(7)-C(12)-C(13)	51.0(3)
C(3)-C(2)-C(1)-C(6)	0.3(4)	C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	178.7(2)
C(3)-C(2)-C(1)-N(1)	-175.7(3)	C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	177.2(2)
C(5)-C(6)-C(1)-C(2)	0.3(4)	C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-55.2(3)
C(7)-C(6)-C(1)-C(2)	-174.4(3)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-178.9(2)
C(5)-C(6)-C(1)-N(1)	176.3(2)	C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	55.9(3)
C(7)-C(6)-C(1)-N(1)	1.7(4)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	-0.1(4)
C(13)-N(1)-C(1)-C(2)	-170.6(3)	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.8(4)
C(5)-C(4)-C(3)-C(2)	0.7(4)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	56.8(3)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-55.8(3)	C(12)-C(11)-C(10)-N(2)	-177.8(2)
C(8)-C(9)-C(10)-N(2)	177.0(2)	C(12)-C(11)-C(10)-C(9)	-56.2(3)

11.88 Synthese von (\pm)-(6a*S*,8*R*,10a*R*)-6a,7,8,9,10,10a-Hexahydrophenanthridin-6,8-diamin Dihydrogensulfat **66:**

Das entsprechende Epimer wurde auf gleichem Weg ausgehend von **66** hergestellt. Dieses kristallisierte in Form von farblosen Nadelchen.

Smp.: >300 °C.

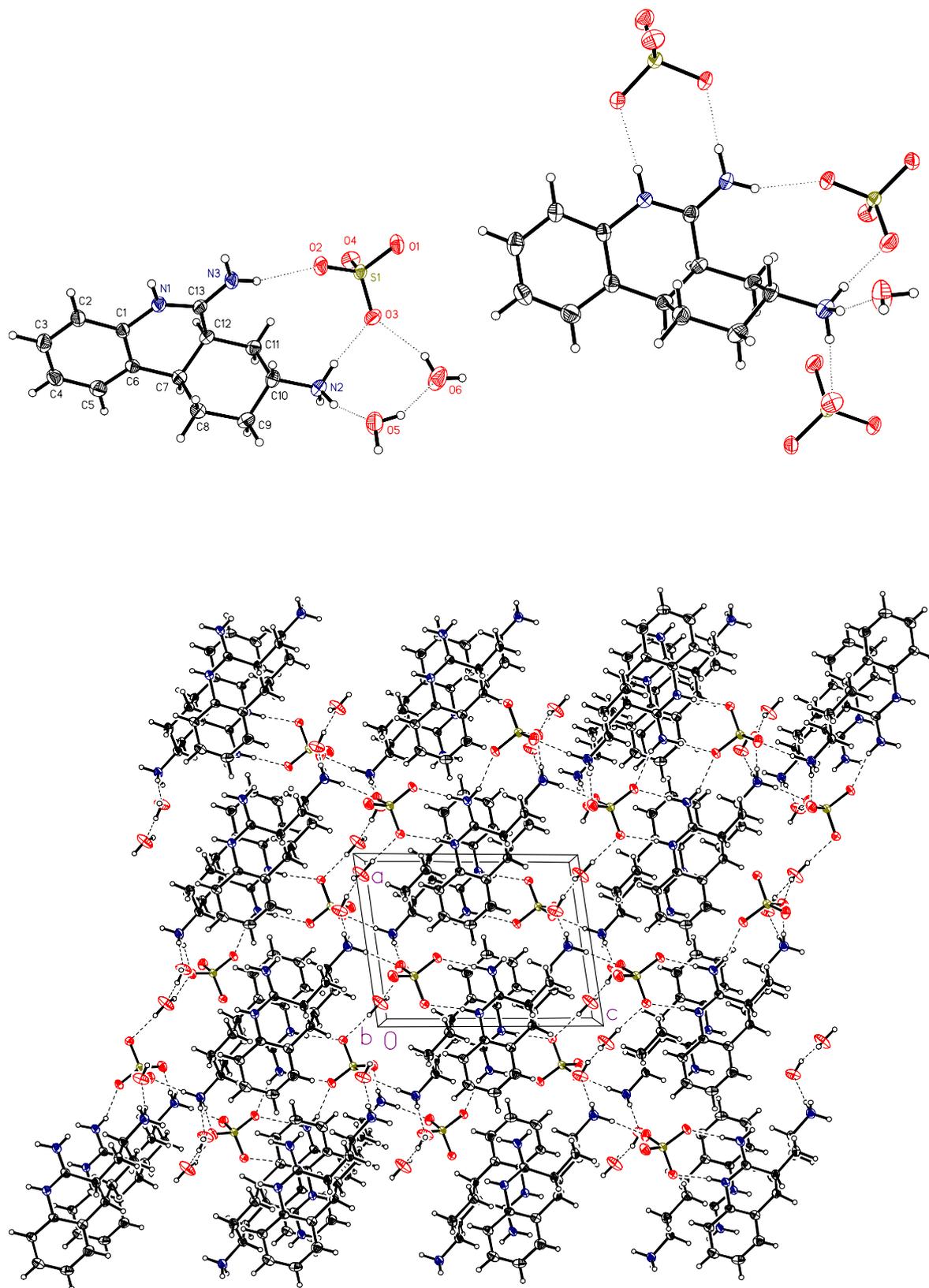
¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ / ppm = 7.39 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.38 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.29 (dt, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, Ar-*H*); 7.14 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, Ar-*H*); 3.41 (tt, $J = 11.3$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 1H, CH); 2.80 - 2.61 (m, 4H, CH, CH₂); 2.38-2.25 (m, 1H, CH₂); 1.82-1.46 (m, 3H, CH₂).

IR: $\tilde{\nu} = 2936$ (m); 2100 (w); 1650 (m); 1585 (m); 1535 (m); 1481 (m); 1448 (m); 1395 (m); 1261 (m); 1150 (m); 1050 (s); 968 (m); 883 (m); 839 (m); 788 (m); 765 (s); 728 (m); 656 (m); 617 (s); 601 (s); 480 (m); 468 (m).

ESI: berechnet für C₁₃H₁₇N₃+H⁺ [M+H⁺] 216.14; gefunden: 216.7.

Kristallstruktur 66:

Der chirale Baustein enthält ein Kation, ein Sulfat-Anion und zwei Hydrat Moleküle. Der Benzolring ist planar. Der zentrale sechsgliedrige Ring hat eine 1,3-diplanar (twist) Konformation. Der gesättigte Sechsring liegt in einer Sessel-Konformation mit den C7-C6 und C10-N2-Bindungen in äquatorialen Positionen und der C12-C13-Bindung in einer axialen Position. Die beiden sechsgliedrige Ringe sind über die C7-C12 Einfachbindung cis-Verbindung. Das Kation fungiert als NH...O Wasserstoffbrücken Donor und ist mit drei Sulfat-Gruppen und einem Wassermolekül verbunden.



Wasserstoffbrücken:

Atome	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D-H-A [°]
N(1)-H(1A)...O(1)#1	0.85(3)	1.93(3)	2.775(3)	169(3)
N(2)-H(2B)...O(5)	0.93(3)	1.89(3)	2.793(4)	163(3)
N(2)-H(2C)...O(3)	0.90(4)	1.91(4)	2.801(4)	171(3)
N(2)-H(2D)...O(4)#2	0.94(3)	1.83(4)	2.756(4)	169(3)
N(3)-H(3B)...O(2)#1	0.91(3)	1.88(3)	2.779(4)	172(3)
N(3)-H(3C)...O(2)	0.82(3)	2.04(3)	2.825(4)	160(3)
O(5)-H(5B)...O(6)	0.83(4)	1.99(4)	2.754(4)	152(3)
O(5)-H(5C)...O(4)#3	0.92(4)	1.86(5)	2.776(3)	173(4)
O(6)-H(6A)...O(3)	0.80(4)	2.07(4)	2.826(4)	158(4)
O(6)-H(6B)...O(1)#4	0.87(4)	1.94(4)	2.808(4)	176(4)

Bindungslängen:

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
N(3)-C(13)	1.308(4)	C(1)-C(2)	1.390(4)
N(3)-H(3B)	0.91(3)	C(1)-C(6)	1.399(4)
N(3)-H(3C)	0.82(3)	C(10)-C(9)	1.515(4)
N(2)-C(10)	1.496(4)	C(10)-C(11)	1.517(4)
N(2)-H(2B)	0.93(3)	C(10)-H(10A)	1.0000
N(2)-H(2C)	0.90(4)	C(7)-C(6)	1.510(4)
N(2)-H(2D)	0.94(3)	C(7)-C(8)	1.524(4)
N(1)-C(13)	1.332(4)	C(7)-C(12)	1.534(4)
N(1)-C(1)	1.412(4)	C(7)-H(7A)	1.0000
N(1)-H(1A)	0.85(3)	C(12)-C(11)	1.535(4)
C(13)-C(12)	1.515(4)	C(12)-H(12A)	1.0000
C(5)-C(4)	1.384(4)	C(8)-H(8A)	0.9900
C(5)-C(6)	1.387(4)	C(8)-H(8B)	0.9900
C(5)-H(5A)	0.9500	C(4)-C(3)	1.385(4)
C(2)-C(3)	1.383(4)	C(4)-H(4A)	0.9500
C(2)-H(2A)	0.9500	C(11)-H(11A)	0.9900
C(8)-C(9)	1.534(4)	C(11)-H(11B)	0.9900
C(3)-H(3A)	0.9500	S(1)-O(3)	1.468(2)
C(9)-H(9A)	0.9900	S(1)-O(2)	1.471(2)
C(9)-H(9B)	0.9900	S(1)-O(4)	1.475(2)
O(5)-H(5B)	0.83(4)	S(1)-O(1)	1.480(2)
O(5)-H(5C)	0.92(4)	O(6)-H(6B)	0.87(4)
O(6)-H(6A)	0.80(4)		

Bindungswinkel:

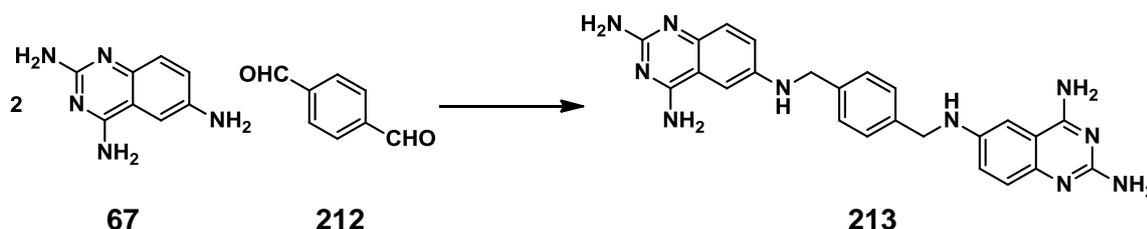
Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel[°]
C(13)-N(3)-H(3B)	118.9(18)	C(1)-N(1)-H(1A)	116(2)
C(13)-N(3)-H(3C)	122(2)	C(2)-C(1)-C(6)	121.7(3)
H(3B)-N(3)-H(3C)	119(3)	C(2)-C(1)-N(1)	119.0(3)
C(10)-N(2)-H(2B)	110.4(19)	C(9)-C(10)-H(10A)	108.6
C(10)-N(2)-H(2C)	111(2)	C(11)-C(10)-H(10A)	108.6
H(2B)-N(2)-H(2C)	106(3)	C(6)-C(7)-C(8)	112.2(2)
C(10)-N(2)-H(2D)	113(2)	C(6)-C(7)-C(12)	110.3(2)
H(2B)-N(2)-H(2D)	111(3)	C(8)-C(7)-C(12)	111.5(2)
H(2C)-N(2)-H(2D)	104(3)	C(6)-C(7)-H(7A)	107.5
C(13)-N(1)-C(1)	123.5(3)	C(8)-C(7)-H(7A)	107.5
C(13)-N(1)-H(1A)	120(2)	C(12)-C(7)-H(7A)	107.5
N(3)-C(13)-N(1)	119.2(3)	C(13)-C(12)-C(7)	111.0(2)
N(3)-C(13)-C(12)	122.4(3)	C(13)-C(12)-C(11)	113.9(2)
N(1)-C(13)-C(12)	118.3(3)	C(7)-C(12)-C(11)	111.7(2)
C(6)-C(1)-N(1)	119.4(3)	C(13)-C(12)-H(12A)	106.6
N(2)-C(10)-C(9)	110.3(2)	C(7)-C(12)-H(12A)	106.6
N(2)-C(10)-C(11)	109.9(2)	C(11)-C(12)-H(12A)	106.6
C(9)-C(10)-C(11)	110.7(2)	C(4)-C(5)-C(6)	120.8(3)
N(2)-C(10)-H(10A)	108.6	C(4)-C(5)-H(5A)	119.6
C(6)-C(5)-H(5A)	119.6	C(7)-C(8)-H(8A)	109.3
C(3)-C(2)-C(1)	119.0(3)	C(9)-C(8)-H(8A)	109.3
C(3)-C(2)-H(2A)	120.5	C(7)-C(8)-H(8B)	109.3
C(1)-C(2)-H(2A)	120.5	C(9)-C(8)-H(8B)	109.3
C(5)-C(6)-C(1)	118.0(3)	H(8A)-C(8)-H(8B)	107.9
C(5)-C(6)-C(7)	123.5(3)	C(5)-C(4)-C(3)	120.3(3)
C(1)-C(6)-C(7)	118.5(3)	C(5)-C(4)-H(4A)	119.8
C(7)-C(8)-C(9)	111.8(3)	C(3)-C(4)-H(4A)	119.8
C(10)-C(11)-C(12)	110.9(2)	C(10)-C(11)-H(11B)	109.5
C(10)-C(11)-H(11A)	109.5	C(12)-C(11)-H(11B)	109.5
C(12)-C(11)-H(11A)	109.5	H(11A)-C(11)-H(11B)	108.1
C(2)-C(3)-C(4)	120.2(3)	C(8)-C(9)-H(9B)	109.7
C(2)-C(3)-H(3A)	119.9	H(9A)-C(9)-H(9B)	108.2
C(4)-C(3)-H(3A)	119.9	O(3)-S(1)-O(2)	109.81(13)
C(10)-C(9)-C(8)	109.9(2)	O(3)-S(1)-O(4)	108.75(13)
C(10)-C(9)-H(9A)	109.7	O(2)-S(1)-O(4)	109.93(12)
C(8)-C(9)-H(9A)	109.7	O(3)-S(1)-O(1)	110.03(12)

C(10)-C(9)-H(9B)	109.7	O(2)-S(1)-O(1)	109.08(12)
O(4)-S(1)-O(1)	109.24(13)	H(6A)-O(6)-H(6B)	105(4)
H(5B)-O(5)-H(5C)	110(3)		

Torsionswinkel:

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(1)-N(1)-C(13)-N(3)	177.8(3)	C(1)-N(1)-C(13)-C(12)	1.0(4)
C(13)-N(1)-C(1)-C(2)	-164.1(3)	N(1)-C(1)-C(6)-C(5)	-178.6(3)
C(13)-N(1)-C(1)-C(6)	16.2(4)	C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-176.7(3)
N(3)-C(13)-C(12)-C(7)	149.1(3)	N(1)-C(1)-C(6)-C(7)	3.0(4)
N(1)-C(13)-C(12)-C(7)	-34.2(4)	C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	-88.5(4)
N(3)-C(13)-C(12)-C(11)	22.0(4)	C(12)-C(7)-C(6)-C(5)	146.5(3)
N(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-161.3(3)	C(8)-C(7)-C(6)-C(1)	89.8(3)
C(6)-C(7)-C(12)-C(13)	49.0(3)	C(12)-C(7)-C(6)-C(1)	-35.2(4)
C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	-76.3(3)	C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-177.7(3)
C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	177.3(2)	C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	-53.4(3)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	52.0(3)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	-1.2(5)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	-1.6(4)	N(2)-C(10)-C(11)-C(12)	-179.5(3)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	178.7(3)	C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	58.4(3)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-0.3(5)	C(13)-C(12)-C(11)-C(10)	72.2(3)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	178.0(3)	C(7)-C(12)-C(11)-C(10)	-54.5(3)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	1.7(4)	N(2)-C(10)-C(9)-C(8)	178.9(2)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	0.1(5)	C(11)-C(10)-C(9)-C(8)	-59.3(3)
C(5)-C(4)-C(3)-C(2)	1.3(5)	C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	56.9(3)

11.89 Synthese von N⁶,N^{6'}-(1,4-Phenylenebis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid 213:



100 mg (571 μmol) 2,4,6-Triaminochinazolin und 38,8 mg (571 μmol) Terephthalaldehyd wurden in 100 ml abs. Ethanol gelöst und mit 100 μl TFA versetzt. Man erhitzte das Gemisch 30 Minuten zum Rückfluss und kühlte anschließend ab, wobei ein gelber Niederschlag zu beobachten war. Der gelbe Feststoff wurde abfiltriert und in 100 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 54 mg (856 μmol) NaCNBH_3 und 100 μl Essigsäure rührte man die Reaktionsmischung 2 Stunden bei Raumtemperatur, wobei sich eine orangegelbe Lösung bildete. Nach beendeter Reaktion wurden 327 mg (1,43 mmol) Pikrinsäure zugesetzt. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser und Diethylether gewaschen und getrocknet. Man löste das Pikratsalz in einer Mischung aus DMF und Methanol (2:1) und eluierte es durch eine Ionenaustauschersäule (Dowex-Cl). Anschließend versetzte man die Lösung mit 200 ml Diethylether und filtrierte den beige Niederschlag ab, wusch gründlich mit Diethylether und trocknete den Feststoff im Vakuum. Man erhielt 112 mg (87 %) eines leicht gelblichen Pulvers. Ein Teil der analytischen Probe wurde mittels HPLC aufgereinigt (Reprosil AQ 250x20; 9 ml/min; 77/23 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 17 min) und für die biologischen Tests eingesetzt.

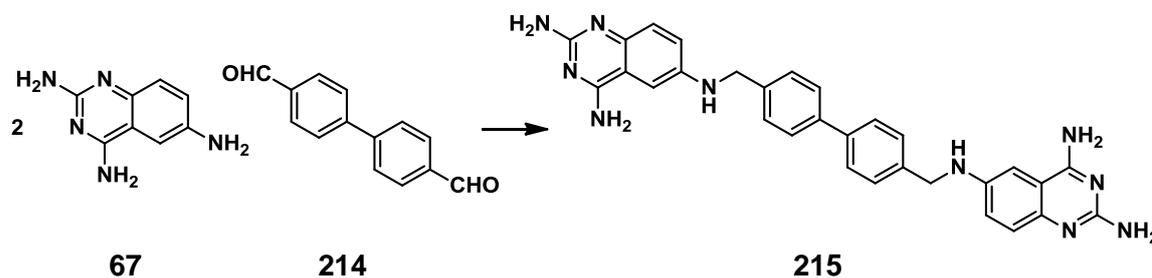
HPLC (analytisch): Reprosil AQ; 0,8 ml/min; 77/23 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 5,08 min).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 12.26 (s, 2H, NH); 8.71 (s, 2H, NH_2); 8.53 (s, 2H, NH_2); 7.43 (m, 4H, NH_2); 7,38 (s, 4H, Ar-H); 7.22 (m, 6H, Ar-H); 6.53 (t, J = 5.3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 4.30 (d, J = 4.9 Hz, 4H, CH_2). (Cl^- -Salz)

IR: $\tilde{\nu}$ = 3302 (m); 3137 (m); 1675 (m); 1646 (s); 1630 (s); 1592 (m); 1534 (s); 1494 (m); 1453 (m); 1435 (m); 1416 (m); 1359 (m); 1271 (m); 1209 (w); 1092 (w); 820 (m); 742 (m); 684 (m); 608 (m); 539 (m); 488 (m). (Cl^- -Salz)

ESI: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 453,2; gefunden: 453,9. (TFA-Salz)

11.90 Synthese von N⁶,N^{6'}-([1,1'-Biphenyl]-4,4'-diylbis(methylen))bis(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid 215:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 100 mg (571 μmol) 2,4,6-Triaminochinazolin und 81,1 mg (285 μmol) [1,1'-Biphenyl]-4,4'-dicarbaldehyd wurden in 100 ml abs. Ethanol gelöst und mit 100 μl TFA versetzt. Man erhitzte das Gemisch 30 Minuten zum Rückfluss und kühlte anschließend ab, wobei ein gelber Niederschlag zu beobachten war. Der gelbe Feststoff wurde abfiltriert und in 100 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 54 mg (856 μmol) NaCNBH_3 und 100 μl Essigsäure rührte man die Reaktionsmischung 2 Stunden bei Raumtemperatur, wobei sich eine orangegelbe Lösung bildete. Nach beendeter Reaktion wurden 327 mg (1,43 mmol) Pikrinsäure zugesetzt. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser und Diethylether gewaschen und getrocknet. Man löste das Pikratsalz in einer Mischung aus DMF und Methanol (2:1) und eluierte es durch eine Ionenaustauschersäule (Dowex-Cl). Anschließend versetzte man die Lösung mit 200 ml Diethylether und filtrierte den beigen Niederschlag ab, wusch gründlich mit Diethylether und trocknete den Feststoff im Vakuum. Man erhielt 44 mg (26 %) eines gelben Pulvers. Ein Teil der Probe wurde mittels HPLC aufgereinigt (Reprosil AQ 250x20; 8 ml/min; 72/28 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 48 min) und für biologische Test eingesetzt.

HPLC (analytisch): Reprosil AQ; 0,8 ml/min; 72/28 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 4,33 min.

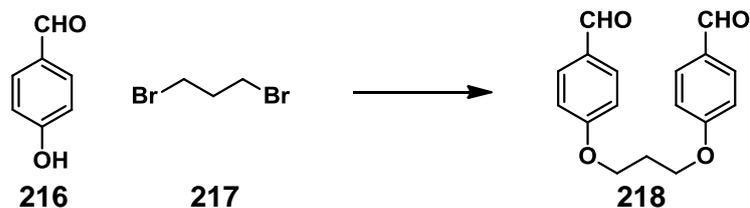
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.42 (s, 2H, NH); 8.77 (s, 2H, NH₂); 8.55 (s, 2H, NH₂); 8.61 (d, J = 8.2 Hz, 4H, Ar-H); 7.49 (d, J = 8.2 Hz, Ar-H); 7.45 (br, 4H, NH₂); 7.30-7.21 (m, 6H, Ar-H); 6.62 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂-NH); 4.37 (d, J = 5.4 Hz, 4H, CH₂). (Cl⁻-Salz)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.5, 153.1, 145.8, 138.5, 138.5, 130.2, 128.2, 126.4, 124.1, 117.5, 110.9, 101.5, 46.0. (Cl⁻-Salz)

IR: $\tilde{\nu}$ = 3317 (m); 3133 (m); 1645 (s); 1589 (m); 1538 (s); 1486 (m); 1463 (m); 1414 (m); 1317 (m); 1253 (m); 1166 (m); 1100 (w); 1006 (w); 931 (w); 823 (m); 805 (m); 769 (m); 677 (m); 552 (s); 499 (s). (Cl⁻-Salz)

HRMS-MALDI: berechnet für C₃₀H₂₈N₁₀ [M+H⁺] 529.2571; gefunden: 529.2569. (TFA-Salz)

11.91 Synthese von 4,4'-(Propan-1,3-diylbis(oxy))dibenzaldehyd 218:



1,00 g (4,95 mmol) 1,2-Dibromethan, 1,21 g (9,91 mmol) 4-Hydroxybenzaldehyd und 6,46 g (19,8 mmol) Cs_2CO_3 wurden in 100 ml wasserfreiem Acetonitril suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argon zum Rückfluss erhitzt und 48 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und der Filterkuchen mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingengt, und der Rückstand in 100 ml Dichlormethan gelöst und mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt (n-Hexan/EE 2:1). Bei dem Einengen der Fraktionen kristallisierte das Produkt in Form von farblosen Nadelchen aus. Man erhielt 1,18 g (84 %) des Dialdehyds.

Smp.: 126-127 °C.

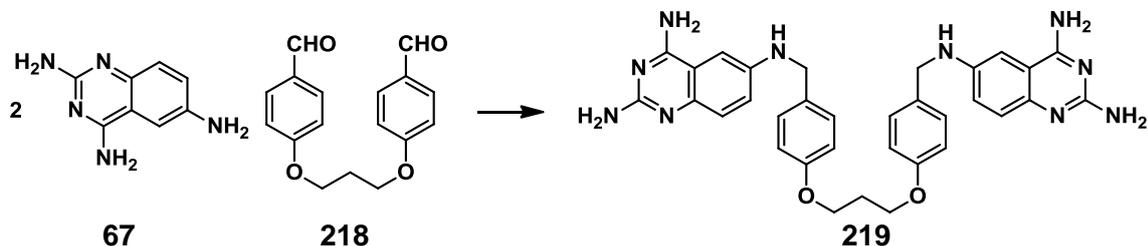
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 9.89 (s, 2H, CHO), 7.84 (m, 4H, Ar-H); 7.02 (m, 4H, Ar-H); 4.26 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H CH_2); 2.35 (p, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): δ / ppm = 190.8, 163.7, 132.0, 130.1, 114.7, 64.5, 28.9.

IR: $\tilde{\nu}$ = 3076 (w); 2954 (m); 2888 (w); 2844 (w); 2759 (w); 1899 (w); 1693 (m); 1596 (s); 1580 (s); 1509 (m); 1463 (m); 1428 (m); 1398 (m); 1383 (m); 1314 (m); 1303 (m); 1263 (m); 1243 (s); 1215 (s); 1154 (s); 1113 (m); 1096 (m); 1049 (m); 988 (m); 965 (m); 955 (m); 938 (m); 865 (m); 827 (s); 810 (s); 787 (m); 749 (m); 653 (m); 637 (m); 614 (s); 509 (s); 457 (m).

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (284,31 g/mol): C 71.82; H 5.67; gefunden: C 71.54; H 5.68.

11.92 Synthese von N⁶,N^{6'}-(((Propan-1,3-diylbis(oxy)))bis(4,1-phenylen))bis(methylen))-bis-(chinazolin-2,4,6-triamin) Dihydrochlorid **219**:



In einer Schutzgasatmosphäre wurden 100 mg (571 μmol) 2,4,6-Triaminochinazolin und 81,1 mg (285 μmol) des Dicarbaldehyds **218** wurden in 100 ml abs. Ethanol gelöst und mit 100 μl TFA versetzt. Man erhitzte das Gemisch 30 Minuten zum Rückfluss, kühlte es anschließend ab und versetzte mit 200 ml Cyclohexan, wobei ein brauner Niederschlag zu beobachten war. Der gelbe Feststoff wurde abfiltriert und in 100 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 54 mg (856 μmol) NaCNBH_3 und 100 μl Essigsäure rührte man die Reaktionsmischung 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wurden 327 mg (1,43 mmol) Pikrinsäure zugesetzt. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser und Diethylether gewaschen und getrocknet. Man löste das Pikratsalz in einer Mischung aus DMF und Methanol (2:1) und eluierte es durch eine Ionenaustauschersäule (Dowex-Cl). Anschließend versetzte man die Lösung mit 200 ml Diethylether und filtrierte den beige Niederschlag ab, wusch gründlich mit Diethylether und trochnete den Feststoff im Vakuum. Nach gründlichem Trocknen im Vakuum erhielt man 142 mg (74 %) eines gelben Pulvers. Ein Teil der Probe wurde mittels HPLC aufgereinigt (Reprosil AQ C18 250x20; 8 ml/min; 60/40 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; $R_T = 10$ min) und für die biologischen Tests eingesetzt.

HPLC (analytisch): Reprosil AQ; 0,8 ml/min; 57/43 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; $R_T = 3.00$ min).

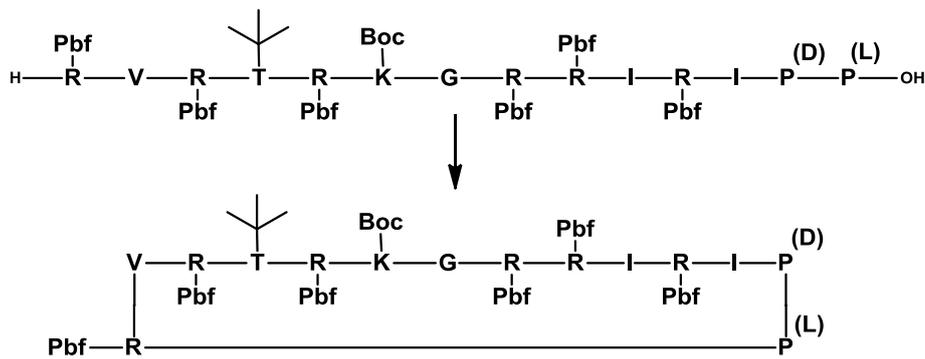
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 12.33 (s, 2H, NH); 8.73 (s, 2H, NH₂); 8.54 (s, 2H, NH₂); 7.44 (s, 4H, NH₂); 7.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, Ar-H); 7.22 (m, 6H, Ar-H); 6.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, Ar-H); 6.47 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, NH-CH₂); 4.23 (d, $J = 5.7$ Hz, 4H, CH₂); 4.09 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H, CH₂); 2.13 (m, 2H, CH₂). (Cl⁻-Salz)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ / ppm = 162.5, 157.4, 153.1, 145.9, 131.2, 130.1, 128.9, 124.1, 117.4, 114.2, 110.0, 101.4, 64.8, 64.1, 45.9, 28.6, 15.1. (Cl⁻-Salz)

IR: $\tilde{\nu}$ =3320 (w); 3159 (w); 1627 (s); 1588 (m); 1533 (m); 1510 (m); 1488 (m); 1415 (m); 1362 (w); 1302 (w); 1241 (m); 1174 (m); 1058 (w); 992 (w); 822 (m); 769 (m); 550 (s); 515 (s). (Cl⁻-Salz)

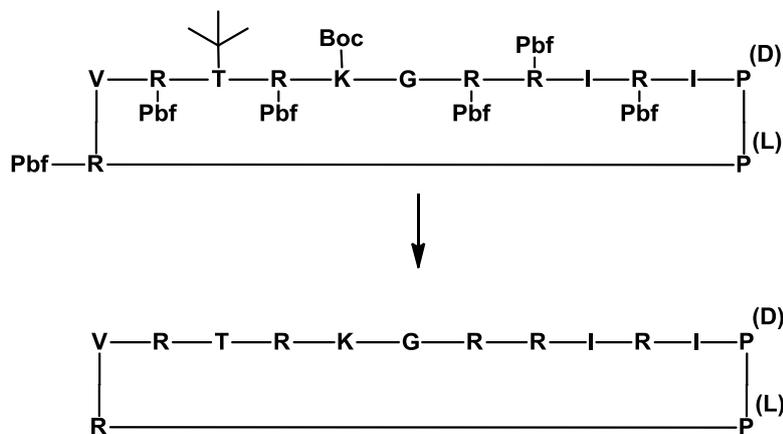
HRMS-MALDI: berechnet für C₃₃H₃₄N₁₀O₂+H⁺ [M+H⁺] 603.2939; gefunden: 603.2934.
(TFA-Salz)

11.93 Synthese von L-22:



Zu einer Lösung aus 10,5 mg (27,7 μmol) HATU und 4,7 μl (27,7 μmol) DIPEA in 1,00 ml abs. DMF wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Lösung aus 19 mg (5,54 μmol) des linearen geschützten Peptids in 1,00 ml abs. DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe rührte man das Gemisch weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur und entfernte das Lösemittel im Vakuum. Der Rückstand wurde mit 20 ml Diethylether versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad durchmischt. Die Suspension wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Der bräunliche Feststoff wurde getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

ESI ($M+H^+$) berechnet: 3414.3; gefunden: 3416.8.

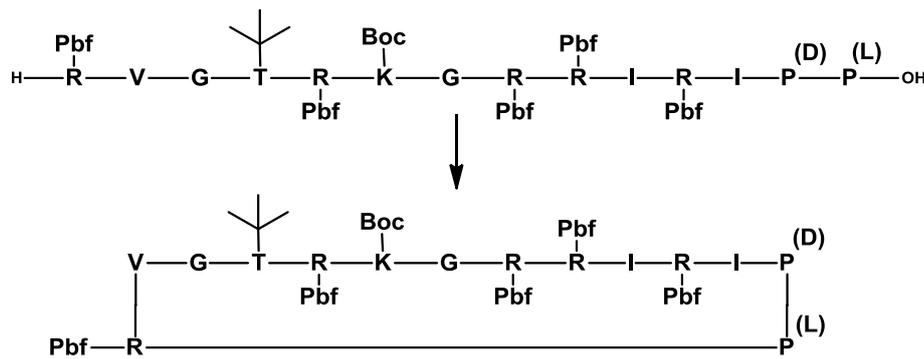


18 mg (5,27 μmol) des cyclischen geschützten Peptids wurden mit einer Mischung aus 1 ml (TFA/TIPS/ H_2O 95:2,5:2,5) versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei färbte sich die Lösung intensiv rot. Man entfernte das Lösemittel im Vakuum und versetzte mit 20 ml Diethylether. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Niederschlag abgetrennt. Das Rohprodukt wurde anschließend über HPLC aufgearbeitet (Reprosil AQ 250x20; 10 ml/min; 81/19 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; $R_T = 3,4$ min). HPLC: 9.15 mg (100 %)

ESI ($M+H^+$) berechnet: 1743.1; gefunden: 1743.3.

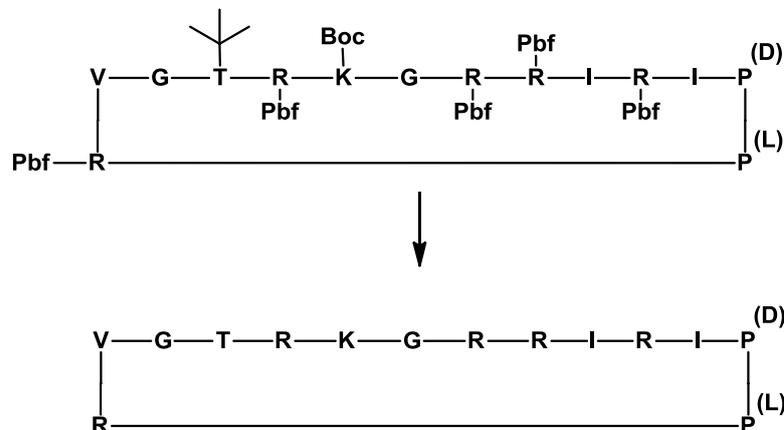
HPLC (analytisch): Reprosil AQ; 0,8 ml/min; 70/30 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; $R_T = 1,70$ min).

11.94 Synthese von L-22 (R3G):



Zu einer Lösung aus 10,5 mg (27,7 μmol) HATU und 4,7 μl (27,7 μmol) DIPEA in 1,00 ml abs. DMF wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Lösung aus 19 mg (5,54 μmol) des linearen geschützten Peptids in 1,00 ml abs. DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe rührte man das Gemisch weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur und entfernte das Lösemittel im Vakuum. Der Rückstand wurde mit 20 ml Diethylether versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad durchmischt. Die Suspension wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Der bräunliche Feststoff wurde getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

ESI ($M+H^+$) berechnet: 3061.6; gefunden: 3065,2.



18 mg (5,27 μmol) des cyclischen geschützten Peptids wurden mit einer Mischung aus 1 ml (TFA/TIPS/ H_2O 95:2,5:2,5) versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei färbte sich die Lösung intensiv rot. Man entfernte das Lösemittel im Vakuum und versetzte mit 20 ml Diethylether. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Niederschlag abgetrennt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgearbeitet (Reprosil AQ 250x20; 10 ml/min; 60/40 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 2,4 min). HPLC: 9.15 mg (100%).

ESI ($M+H^+$) berechnet: 1645.0; gefunden: 1644.8.

HPLC (analytisch): Reprosil AQ; 0,8 ml/min; 81/19 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ + 0,1 % TFA; R_T = 3,81 min).

12. Methoden zur biophysikalischen und biologischen Charakterisierung

12.1 FRET-Assay^[262]

Der FRET-Assay wurde in 96 Well Mikrotiterplatten (Corning 6860 und nicht-bindende Oberfläche) durchgeführt. Für die Messung verwendete man einem TK-Puffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.01 % Triton-X100) bei Volumen von 100 μ l pro Well und einem pH-Wert von 7.4 bzw. 6.0. Das gelabelte Tat-Protein (FtatRhd) (Thermo Electron Corporation, Ulm) und die die TAR-RNA (Biospring, Frankfurt am Main) wurden mit einer Konzentration von 10 nM vorgelegt. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte bei 37 °C (Tecan safire²; λ_{ex} = 489 nm, λ_{em} = 590 nm), wobei die Fluoreszenzenintensitäten von FtatRhd und des Tat/TAR-Komplexes bestimmt wurden. Auf diese Weise bestimmte man den Verstärkungsfaktor (Bereich: 2,5-2,7) und die Endpunkte der Titration. Die Titrationskurve (Fluoreszenz gegen Ligandenkonzentration) wurde aus 11 oder mehr Datenpunkten bestimmt. Das arithmetische Mittel aus der Fluoreszenz des Tat/TAR-Komplexes und des unkomplexierten FtatRhd wurde als IC₅₀-Wert des RNA-Liganden definiert.

12.2 Anti-HIV Aktivitätsassay (HIV-1 III_B und HIV-2 ROD)^[263, 264]

Die MT-4-Zellkulturexperimente wurden in der Arbeitsgruppe von C. Pannecouque (Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgien) unter Verwendung des MTT-Assays (3-(4,5-Dimethylthiatol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt.

Die Untersuchung der antiviralen Aktivität der Liganden gegen den HIV-1 Stamm III_B und HIV-2 Stamm ROD wurde an MT-4 Zellen in 96 Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung (10-fach der Endkonzentration) der zu untersuchenden Verbindungen angesetzt und in Volumina von 25 μ l in 2 Serien in 3-facher Ausführung durchgeführt. Zur Kontrolle wurden HIV-infizierten Zellen und nicht-infizierten Zellen in einer simultanen Messung ausgewertet. Eine Serie 5-facher Verdünnungen der Testsubstanzen wurden direkt in 96-Well-Mikrotiterplatten automatisch durchgeführt (Biomek 3000 robot, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

50 μ l der Stammlösungen von HIV-1 (III_B) sowie HIV-2 (ROD) bei 100-300 CCID₅₀ (50 % cell culture infection dose) bzw. Zellkulturmedium wurden zu den infizierten bzw. zur nicht-infizierten Zellen in die Mikrotiterplatte zutitriert. Dabei diente das Experiment mit nicht-infizierten Zellen zur Überprüfung der cytotoxischen Eigenschaften der

untersuchten Liganden. Die exponentiell wachsenden MT-4 Zellen wurden abzentrifugiert und erneut gelöst, so dass eine Konzentration von 6×10^5 Zellen/ml vorlag. Auf Mikrotiterplatten wurden 50 μ l der Lösungen 5 Tage inkubiert und anschließend unter Einsatz des MTT Assays spektroskopisch untersucht. Der Assay basiert auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiatol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch die mitochondriale Dehydrogenase zu blau-violetter Formazan. Die Anzahl der lebenden Zellen kann über diesen Mechanismus bestimmt werden, da dieser metabolische Prozess nur in lebenden Zellen möglich ist. Die spektroskopische Untersuchung wurde mittels acht-Kanal Computer-gesteuerten Photometer (Multiscan Ascent Reader, Labsystems, Helsinki, Finnland) bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (540 und 690 nm) durchgeführt. Die Ligandenkonzentration, bei der 50 % der HIV-infizierten MT-4 Zellen überlebten, wurde als EC_{50} -Wert definiert.

12.3 Cytotoxizitätsassay (MT-4)^[263, 264]

Der Cytotoxizitätsassay wurde mit MT-4 Zellen durchgeführt, wobei die nicht mit HIV-1 (III_B) bzw. HIV-2 ROD infizierten Zellen in einer Konzentrationsreihe mit der Testsubstanz versetzt wurden. Der CC_{50} -Wert (50 % cytotoxische Konzentration) bezeichnet die Konzentration, bei der 50 % der MT-4 Zellen abgetötet werden. Die Messung erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Anti-HIV Aktivitätsassay. Die Formazan Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt.

13. Anlagen

13.1 Abkürzungen

A	Adenin
acac	Acetylaceton
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
Äquiv.	Äquivalente
Arg	Arginin
ARM	Arginin-reiche Region vom Tat
p-TEFb	positive transcription elongation factor b
Bn	Benzly
Boc	tert-Butoxycarbonyl
br	breit (NMR)
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
C	Cytosin
CC	Cytotoxische Konzentration
CDK9	Cyclin-dependent kinase 9
CTD	Carboxy-Terminal Domain
Cy	cyclohexyl
d	Dublett (NMR)
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts (NMR)
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMA	Dimethylacetamid
DMB	2,4-Dimethoxybenzyl
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMEDA	Dimethylethylendiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Elementaranalyse
EE	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EIAV	Virus der equinen infektiösen Anämie
ESI	Elektronensprayionisation
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Floureszenz Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
G	Guanin
Gag	Group-specific antigen (Pr55)
HATU	(O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat)
HF	Hatree Fock
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOAt	Hydroxyazabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IC ₅₀	Halbe Inhibitionskonzentration
IR	Infrarot
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lit	Literatur
LTR	Long terminal repeats
Lys	Lysin
m	Multipllett (NMR); medium (IR)
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiatol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBS	N-Bromsuccinimid
pin	Pinacolyl
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuklear Magnetic Resonance

NOE	Nuclear Overhauser effect
Pol	Polymerase
py	Pyridin
q	Quartett (NMR)
qn	Quintett (NMR)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
Rev	Regulator der viralen Genexpression (p19)
s	Singulett (NMR), strong (IR)
Sdp	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt
snRNP	small nuclear ribonucleic particles
Sp1	Specificity protein 1
sx	Sextett (NMR)
t	Triplett (NMR)
T	Thymin
TAR	Trans-Activation Responsive Region
TARwt	Wildtyp-TAR-RNA
TARbl	Bulge-freie-TAR-RNA
TARII	Loop-freie-TAR-RNA
Tat	transcriptional transactivator
TATA	ATA-Box, Goldberg-Hogness-Box
TBAF	tert-Butylammoniumfluorid
Tf	Triflyl
TFA	Trifluoressigsäure/Trifluoracetyl
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFO	triplex forming oligonucleotide
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
Tos	Tosyl
U	Uracil
UV	Ultraviolett
w	weak (IR)
XPhos	Dicyclohexyl(2',4',6'-triisopropylbiphenyl-2-yl)phosphan

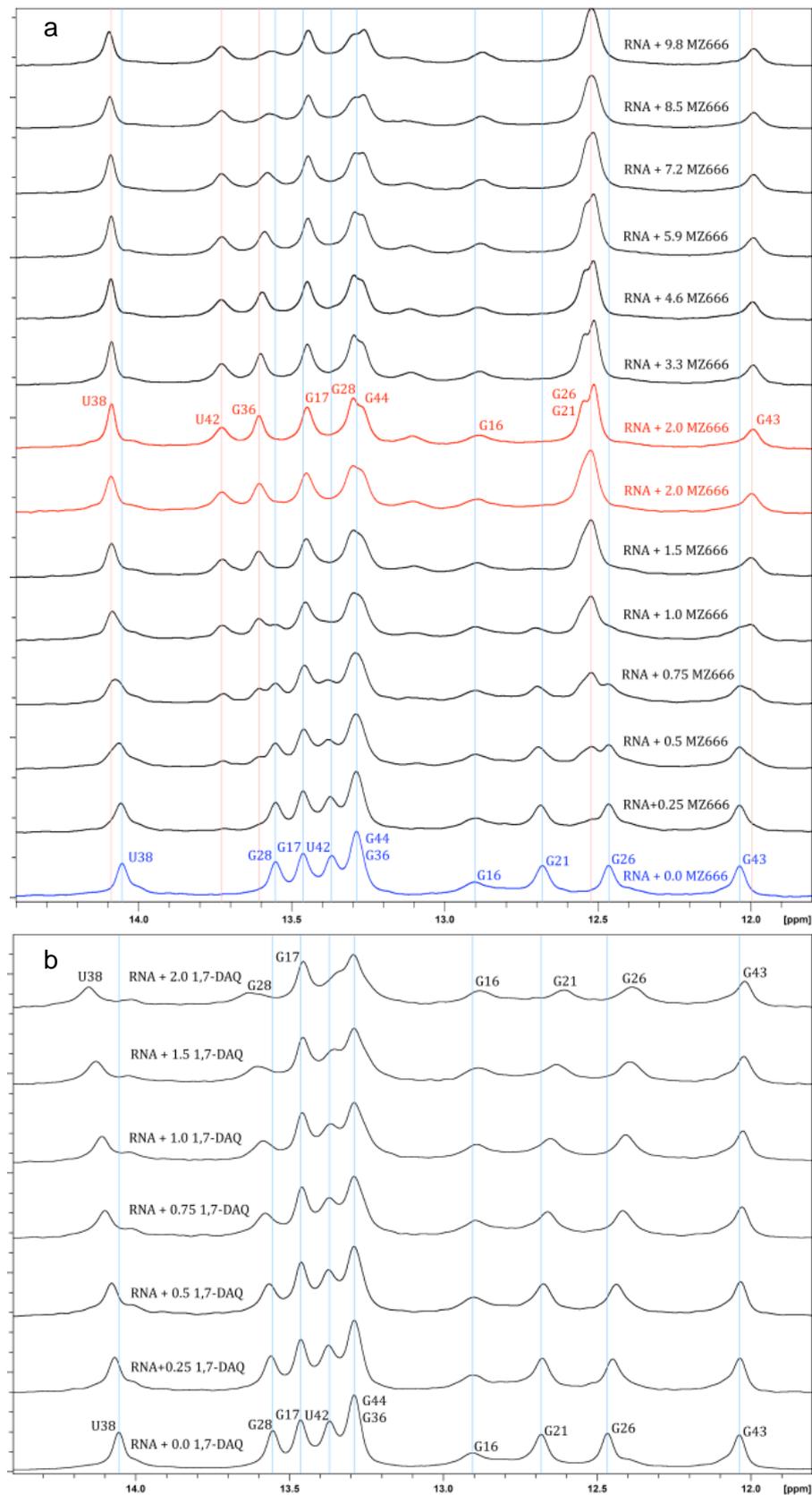


Abbildung 158: 1D-NMR Titrationsexperimente (AK Schwalbe). In Klammern: Austauschgeschwindigkeit.

a) 2,4,6-Triaminochinazolin **67**, U42(l), G21(l), G36(l)*, G28(l), G26(l-m), U38(s), G43(s)

b) 1,7-Diaminoisochinolin **60**, G26(m), U38(m), G21(m), G28(m), G43(l), G16(l)

*) starker Effekt ab 1eq Überschuss

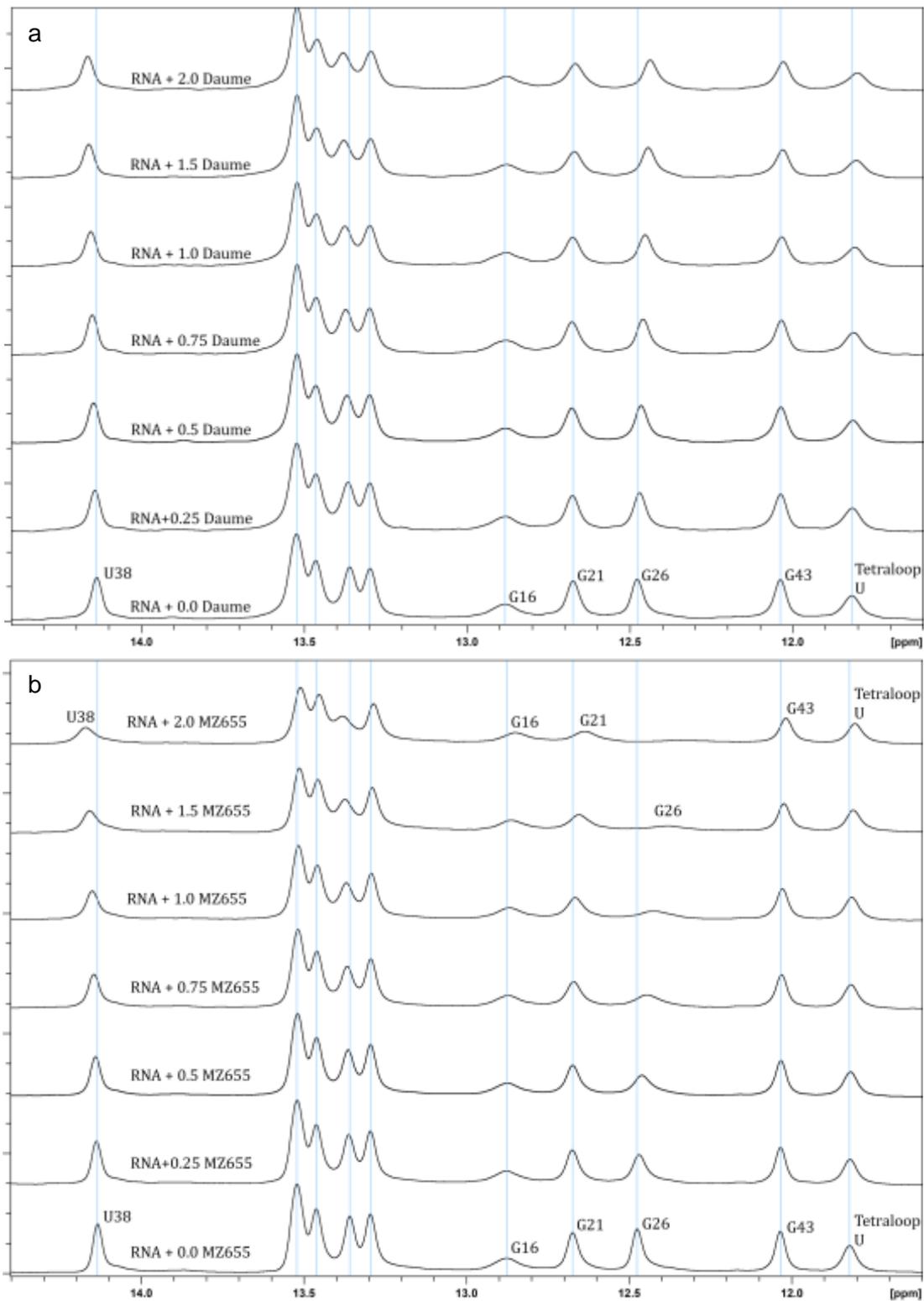


Abbildung 159: 1D-NMR Titrationsexperimente (AK Schwalbe). In Klammern: Austauschgeschwindigkeit.

a) 1-(3-(1H-imidazol-4-yl)phenyl)guanidine, G26(m), U38(m), G43(s), G16(s)

b) **80**, G26(m), U38(m), G21(s), G43(s), G16(s)

*) starker Effekt ab 1eq Überschuss

13.2 Literaturverzeichnis

- [1] C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1857-1861.
- [2] M. J. Fedor, J. R. Williamson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 399-412.
- [3] E. H. Bayne, R. C. Allshire, *Trends in genetics : TIG* **2005**, 21, 370-373.
- [4] M. Jovanovic, M. O. Hengartner, *Oncogene* **2006**, 25, 6176-6187.
- [5] G. L. Sen, H. M. Blau, *The FASEB Journal* **2006**, 20, 1293-1299.
- [6] F. H. Westheimer, *Nature* **1986**, 319, 534-536.
- [7] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2000**, 102, 615-623.
- [8] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. D. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, 292, 883-896.
- [9] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 905-920.
- [10] T. R. Cech, *Science* **2000**, 289, 878-879.
- [11] M. A. Batzer, P. L. Deininger, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, 3, 370-379.
- [12] G. J. HANNON, F. V. RIVAS, E. P. MURCHISON, J. A. STEITZ, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2006**, 71, 551-564.
- [13] G. Storz, *Science* **2002**, 296, 1260-1263.
- [14] S.-L. Lin, J. D. Miller, S.-Y. Ying, *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 2006.
- [15] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806-811.
- [16] A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1043-1049.
- [17] A. S. Mironov, I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov, E. Nudler, *Cell* **2002**, 111, 747-756.
- [18] W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, 419, 952-956.
- [19] W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 15908-15913.
- [20] F. J. Grundy, T. M. Henkin, *Mol. Microbiol.* **1998**, 30, 737-749.
- [21] J. Miranda-Ríos, M. Navarro, M. Soberón, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 9736-9741.
- [22] M. S. Gelfand, A. A. Mironov, J. Jomantas, Y. I. Kozlov, D. A. Perumov, *Trends Genet.* **1999**, 15, 439-442.
- [23] C. V. Franklund, R. J. Kadner, *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 4039-4042.
- [24] B. Berkhout, R. H. Silverman, K.-T. Jeang, *Cell* **1989**, 59, 273-282.

- [25] D. Haussecker, *Hum. Gene Ther.* **2008**, 19, 451-462.
- [26] H. Ledford, *Nature* **2010**, 487, 468.
- [27] K. Tiemann, J. J. Rossi, *EMBO Molecular Medicine* **2009**, 1, 142-151.
- [28] G. K. Alderton, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 313-313.
- [29] H. M. Al-Hashimi, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1506-1519.
- [30] A. L. Cunningham, H. Donaghy, A. N. Harman, M. Kim, S. G. Turville, *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, 13, 524-529.
- [31] UNAIDS, *UNAIDS Report* **2012**.
- [32] B. M. Peterlin, D. Trono, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 97-107.
- [33] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, 393, 648-659.
- [34] A. Bukrinskaya, B. Brichacek, A. Mann, M. Stevenson, *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 2113-2125.
- [35] M. D. Miller, C. M. Farnet, F. D. Bushman, *J. Virol.* **1997**, 71, 5382-5390.
- [36] S. Nisole, A. Saib, *Retrovirology* **2004**, 1, 9.
- [37] D. Warrilow, D. Harrich, *Curr. HIV Res.* **2007**, 5, 293-299.
- [38] W. C. Greene, B. M. Peterlin, *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)* **2002**, 8, 673-680.
- [39] B. G. Turner, M. F. Summers, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 1-32.
- [40] Y. Wu, *Retrovirology* **2004**, 1, 13.
- [41] A. Cimarelli, J. L. Darlix, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1166-1184.
- [42] E. Freed, *Somatic Cell Mol. Genet.* **2001**, 26, 13-33.
- [43] S. Modrow, B. Kattenbeck, A. Poblitzki, M. Niedrig, R. Wagner, H. Wolf, *Med Microbiol Immunol* **1994**, 183, 177-194.
- [44] S. Sierra, B. Kupfer, R. Kaiser, *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **2005**, 34, 233-244.
- [45] S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Kibler, H. Cao, A. Ali, Y.-H. Ping, K.-T. Jeang, T. M. Rana, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 39092-39103.
- [46] M. Stevens, E. De Clercq, J. Balzarini, *Med. Res. Rev.* **2006**, 26, 595-625.
- [47] D. Harrich, J. Garcia, F. Wu, R. Mitsuyasu, J. Gonazalez, R. Gaynor, *J. Virol.* **1989**, 63, 2585-2591.
- [48] S. N. Richter, G. Palu, *Current Medicinal Chemistry* **2006**, 13, 1305-1315.
- [49] M. C. Thomas, C.-M. Chiang, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, 41, 105-178.
- [50] S.-Y. Kao, A. F. Calman, P. A. Luciw, B. M. Peterlin, *Nature* **1987**, 330, 489-493.
- [51] K. Fujinaga, D. Irwin, Y. Huang, R. Taube, T. Kurosu, B. M. Peterlin, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 787-795.
- [52] M. K. Jang, K. Mochizuki, M. Zhou, H.-S. Jeong, J. N. Brady, K. Ozato, *Mol. Cell* **2005**, 19, 523-534.

- [53] Z. Yang, J. H. N. Yik, R. Chen, N. He, M. K. Jang, K. Ozato, Q. Zhou, *Mol. Cell* **2005**, *19*, 535-545.
- [54] D. C. Hargreaves, T. Horng, R. Medzhitov, *Cell* **2009**, *138*, 129-145.
- [55] Q. Zhou, J. H. N. Yik, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 646-659.
- [56] M. J. Pazin, P. L. Sheridan, K. Cannon, Z. Cao, J. G. Keck, J. T. Kadonaga, K. A. Jones, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 37-49.
- [57] T. H. Tahirov, N. D. Babayeva, K. Varzavand, J. J. Cooper, S. C. Sedore, D. H. Price, *Nature* **2010**, *465*, 747-751.
- [58] M. Barboric, J. H. N. Yik, N. Czudnochowski, Z. Yang, R. Chen, X. Contreras, M. Geyer, B. Matija Peterlin, Q. Zhou, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2003-2012.
- [59] S. A. Dames, A. Schönichen, A. Schulte, M. Barboric, B. M. Peterlin, S. Grzesiek, M. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 14312-14317.
- [60] B. J. Krueger, K. Varzavand, J. J. Cooper, D. H. Price, *PLoS One* **2010**, *5*, e12335.
- [61] I. D'Orso, A. D. Frankel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 815-821.
- [62] S. Biglione, S. Byers, J. Price, V. T. Nguyen, O. Bensaude, D. Price, W. Maury, *Retrovirology* **2007**, *4*, 47.
- [63] K. A. Jones, M. B. Peterlin, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 717-743.
- [64] A. Shilatifard, W. S. Lane, K. W. Jackson, R. C. Conaway, J. W. Conaway, *Science* **1996**, *271*, 1873-1876.
- [65] Z. Luo, C. Lin, A. Shilatifard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 543-547.
- [66] V. Brès, H. Tagami, J.-M. Péloponèse, E. Loret, K.-T. Jeang, Y. Nakatani, S. Emiliani, M. Benkirane, R. E. Kiernan, *EMBO* **2002**, *21*, 6811-6819.
- [67] T. Kurosu, B. M. Peterlin, *Current biology : CB* **2004**, *14*, 1112-1116.
- [68] B. Xie, C. F. Invernizzi, S. Richard, M. A. Wainberg, *J. Virol.* **2007**, *81*, 4226-4234.
- [69] R. Van Duyne, R. Easley, W. Wu, R. Berro, C. Pedati, Z. Klase, K. Kehn-Hall, E. Flynn, D. Symer, F. Kashanchi, *Retrovirology* **2008**, *5*, 40.
- [70] H. Sivakumaran, A. van der Horst, A. J. Fulcher, A. Apolloni, M.-H. Lin, D. A. Jans, D. Harrich, *J. Virol.* **2009**, *83*, 11694-11703.
- [71] K. Anand, A. Schulte, K. Vogel-Bachmayr, K. Scheffzek, M. Geyer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1287-1292.
- [72] S. Ruben, A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, C. A. Rosen, *J. Virol.* **1989**, *63*, 1-8.
- [73] T. M. Rana, K.-T. Jeang, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 175-185.
- [74] M. Ott, M. Geyer, Q. Zhou, *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 426-435.

- [75] M. G. Cordingley, R. L. LaFemina, P. L. Callahan, J. H. Condra, V. V. Sardana, D. J. Graham, T. M. Nguyen, K. LeGrow, L. Gotlib, A. J. Schlabach, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 8985-8989.
- [76] K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Cell* **1991**, *66*, 577-588.
- [77] B. J. Calnan, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Genes Dev.* **1991**, *5*, 201-210.
- [78] M. J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S. M. Green, A. D. Lowe, P. J. G. Butler, M. J. Gait, J. Karn, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 90-110.
- [79] B. Berkhout, K.-T. Jeang, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6169-6176.
- [80] M. Sumner-Smith, S. Roy, R. Barnett, L. S. Reid, R. Kuperman, U. Delling, N. Sonenberg, *J. Virol.* **1991**, *65*, 5196-5202.
- [81] F. Hamy, U. Asseline, J. Grasby, S. Iwai, C. Pritchard, G. Slim, P. J. G. Butler, J. Karn, M. J. Gait, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 111-123.
- [82] N. A. Naryshkin, M. A. Farrow, M. G. Ivanovskaya, T. S. Oretskaya, Z. A. Shabarova, M. J. Gait, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3496-3505.
- [83] Z. Wang, T. M. Rana, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6491-6499.
- [84] Z. Wang, T. M. Rana, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4235-4243.
- [85] P. Bayer, M. Kraft, A. Ejchart, M. Westendorp, R. Frank, P. Rösch, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 529-535.
- [86] I. Huq, Y.-H. Ping, N. Tamilarasu, T. M. Rana, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5172-5177.
- [87] B. Davis, M. Afshar, G. Varani, A. I. H. Murchie, J. Karn, G. Lentzen, M. Drysdale, J. Bower, A. J. Potter, I. D. Starkey, T. Swarbrick, F. Aboul-ela, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 343-356.
- [88] S. Baumli, G. Lolli, E. D. Lowe, S. Troiani, L. Rusconi, A. N. Bullock, J. E. Debreczeni, S. Knapp, L. N. Johnson, *The EMBO Journal* **2008**, *27*, 1907-1918.
- [89] Z. Wang, X. Wang, T. M. Rana, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16995-16998.
- [90] F. Kashanchi, M. R. Sadaie, J. N. Brady, *Virology* **1997**, *227*, 431-438.
- [91] R. Van Dyne, J. Cardenas, R. Easley, W. Wu, K. Kehn-Hall, Z. Klase, S. Mendez, C. Zeng, H. Chen, M. Saifuddin, F. Kashanchi, *Virology* **2008**, *376*, 308-322.
- [92] I. Choudhury, J. Wang, S. Stein, A. Rabson, M. J. Leibowitz, *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 777-782.
- [93] Y. F. Melekhovets, S. Joshi, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1908-1912.
- [94] M. R. Mautino, R. A. Morgan, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 946.
- [95] W. Huang, G. Varani, G. P. Drobny, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17643-17645.
- [96] S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Ryan, I. Huq, S. Richter, W. C. Still, T. M. Rana, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 12997-13002.

- [97] Y. Mu, G. Stock, *Biophysical Society* **2006**, 90, 391-399.
- [98] Y. Lee, S. Hyun, H. J. Kim, J. Yu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 134-137.
- [99] Y. Lee, S. Hyun, H. J. Kim, J. Yu, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 140-143.
- [100] N. Morgner, H.-D. Barth, B. Brutschy, U. Scheffer, S. Breitung, M. Göbel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, 19, 1600-1611.
- [101] M. Suhartono, *Dissertation, Frankfurt am Main* **2008**.
- [102] M. A. Gelman, S. Richter, H. Cao, N. Umezawa, S. H. Gellman, T. M. Rana, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3563-3565.
- [103] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94, 3548-3553.
- [104] V. Bonnard, S. Azoulay, G. A. Di, N. Patino, *ChemComm* **2009**, 2302-2304.
- [105] N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 505-507.
- [106] D. Wang, J. Iera, H. Baker, P. Hogan, R. Ptak, L. Yang, T. Hartman, R. W. Buckheit, Jr., A. Desjardins, A. Yang, P. Legault, V. Yedavalli, K.-T. Jeang, D. H. Appella, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6893-6897.
- [107] N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 971-974.
- [108] Z. Athanassiou, K. Patora, R. L. A. Dias, K. Moehle, J. A. Robinson, G. Varani, *Biochemistry* **2007**, 46, 741-751.
- [109] A. Davidson, T. C. Leeper, Z. Athanassiou, K. Patora-Komisarska, J. Karn, J. A. Robinson, G. Varani, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 11931-11936.
- [110] A. Davidson, K. Patora-Komisarska, J. A. Robinson, G. Varani, *Nucleic Acids Research* **2011**, 39, 248-256.
- [111] J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2008**, 108, 1171-1224.
- [112] H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1173-1184.
- [113] K. A. Sannes-Lowery, H.-Y. Mei, J. A. Loo, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, 193, 115-122.
- [114] S. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H.-Y. Mei, *Biochemistry* **1998**, 37, 5549-5557.
- [115] A. Ironmonger, B. Whittaker, A. J. Baron, B. Clique, C. J. Adams, A. E. Ashcroft, P. G. Stockley, A. Nelson, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1081-1086.
- [116] J. A. Bertrand, S. Thieffine, A. Vulpetti, C. Cristiani, B. Valsasina, S. Knapp, H. M. Kalisz, M. Flocco, *J. Mol. Biol.* **2003**, 333, 393-407.

- [117] D. Raghunathan, V. M. Sanchez-Pedregal, J. Junker, C. Schwiegk, M. Kalesse, A. Kirschning, T. Carlomagno, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3599-3608.
- [118] G. Ivanova, A. Arzumanov, M. J. Gait, S. Reigadas, J.-J. Toulme, M.-L. Andreola, D. Ittig, C. Leumann, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 747-750.
- [119] B. Bramlage, E. Luzi, F. Eckstein, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 434-438.
- [120] E. Puerta-Fernández, C. Romero-López, A. Barroso-delJesus, A. Berzal-Herranz, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 75-97.
- [121] J.-M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson, *Nature* **2002**, *418*, 435-438.
- [122] K. Yoshinari, M. Miyagishi, K. Taira, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 691-699.
- [123] G. Upert, M. Mehiri, G. A. Di, R. Condom, N. Patino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6026-6030.
- [124] G. Upert, G. A. Di, A. Upadhyay, D. Manvar, N. Pandey, V. N. Pandey, N. Patino, *J Nucleic Acids.* **2012**, *2012*, 591025.
- [125] A. Arzumanov, D. A. Stetsenko, A. D. Malakhov, S. Reichelt, M. D. Sørensen, B. R. Babu, J. Wengel, M. J. Gait, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 435-453.
- [126] J. J. Turner, S. Jones, M. M. Fabani, G. Ivanova, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 1-7.
- [127] B. Chaubey, S. Tripathi, J. Desire, I. Baussanne, J.-L. Decout, V. N. Pandey, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 302-313.
- [128] A. Kiviniemi, P. Virta, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1559-1566.
- [129] I. Das, J. Desire, D. Manvar, I. Baussanne, V. N. Pandey, J.-L. Decout, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6021-6032.
- [130] A. Kiviniemi, P. Virta, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1559-1566.
- [131] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3974-3981.
- [132] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, *253*, 313-332.
- [133] C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1460-1464.
- [134] L. Dassonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4487-4492.
- [135] H.-Y. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, A. W. Czarnik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14204-14212.
- [136] B. G. Feuerstein, L. D. Williams, H. S. Basu, L. J. Marton, *J. Cell. Biochem.* **1991**, *46*, 37-47.
- [137] N. Schmid, J. P. Behr, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4357-4361.
- [138] F. Hamy, V. Brondani, A. Flörsheimer, W. Stark, M. J. J. Blommers, T. Klimkait, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5086-5095.

- [139] C. Mischiati, K.-T. Jeang, G. Feriotto, L. Breda, M. Borgatti, N. Bianchi, R. Gambari, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **2001**, *11*, 209-217.
- [140] A. Filikov, V. Mohan, T. Vickers, R. Griffey, P. D. Cook, R. Abagyan, T. James, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 593-610.
- [141] K. E. Lind, Z. Du, K. Fujinaga, B. M. Peterlin, T. L. James, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 185-193.
- [142] Z. Du, K. E. Lind, T. L. James, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 707-712.
- [143] S. W. Pitt, Q. Zhang, D. J. Patel, H. M. Al-Hashimi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3412-3415.
- [144] M. Mayer, P. T. Lang, S. Gerber, P. B. Madrid, I. G. Pinto, R. K. Guy, T. L. James, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 993-1000.
- [145] S. N. Richter, B. Gatto, O. Tabarrini, A. Fravolini, M. Palumbo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4247-4251.
- [146] A. I. H. Murchie, B. Davis, C. Isel, M. Afshar, M. J. Drysdale, J. Bower, A. J. Potter, I. D. Starkey, T. M. Swarbrick, S. Mirza, C. D. Prescott, P. Vaglio, F. Aboul-ela, J. Karn, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 625-638.
- [147] D. Guianvarc'h, R. Benhida, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2001**, *0*, 1814-1815.
- [148] D. Guianvarc'h, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2751-2759.
- [149] Y. Wang, D. A. Rusling, V. E. C. Powers, O. Lack, S. D. Osborne, K. R. Fox, T. Brown, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5884-5892.
- [150] M. Duca, V. Malnuit, F. Barbault, R. Benhida, *ChemComm* **2010**, *46*, 6162-6164.
- [151] A. Davidson, D. W. Begley, C. Lau, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 984-996.
- [152] A. Davidson, D. W. Begley, C. Lau, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 984-996.
- [153] V. Peytou, R. Condom, N. Patino, R. Guedj, A.-M. Aubertin, N. Gelus, C. Bailly, R. Terreux, D. Cabrol-Bass, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4042-4053.
- [154] D. Yuan, M. He, R. Pang, S.-s. Lin, Z. Li, M. Yang, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 265-272.
- [155] M. He, D. Yuan, W. Lin, R. Pang, X. Yu, M. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3978-3981.
- [156] Y. Xu, H. Jin, Z. Yang, L. Zhang, Q. Wang, M. Li, L. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2103-2106.
- [157] S. Kumar, D. P. Arya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4788-4792.
- [158] S. Kumar, P. Kellish, W. E. Robinson, D. Wang, D. H. Appella, D. P. Arya, *Biochemistry* **2012**, *51*, 2331-2347.
- [159] H. Wang, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1951-1956.

- [160] K. Michael, H. Wang, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1361-1371.
- [161] A.-P. Wei, D. K. Blumenthal, J. N. Herron, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1500-1506.
- [162] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4676-4704.
- [163] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676-1683.
- [164] S. Kumar, P. Kellish, W. E. Robinson, D. Wang, D. H. Appella, D. P. Arya, *Biochemistry* **2012**, *51*, 2331-2347.
- [165] L. Huang, X. Yuan, C. Aiken, C. H. Chen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 663-665.
- [166] M. Zeiger, *Diplomarbeit, Frankfurt am Main* **2007**.
- [167] J. B. M. Rewinkel, H. Lucas, P. J. M. van Galen, A. B. J. Noach, T. G. van Dinther, A. M. M. Rood, A. J. S. M. Jenneboer, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 685-690.
- [168] C. E. Gutteridge, M. M. Hoffman, A. K. Bhattacharjee, L. Gerena, *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, *44*, 633-637.
- [169] S. Breitung, *Dissertation, Frankfurt am Main* **2009**.
- [170] J. Johnson, E. F. Elslager, L. M. Werbel, *J. Heterocycl. Chem.* **1979**, *16*, 1101-1104.
- [171] A. W. Czarnik, *PCT* **1999**, WO 99/25327.
- [172] J. Tao, A. D. Frankel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 2723-2726.
- [173] B. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. Frankel, *Science* **1991**, *252*, 1167-1171.
- [174] J. Puglisi, R. Tan, B. Calnan, A. Frankel, Williamson, *Science* **1992**, *257*, 76-80.
- [175] J. D. Puglisi, L. Chen, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 3680-3684.
- [176] R. Nifosi, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4944-4955.
- [177] SPARTAN'08. *Spartan'08, Wavefunction, Inc.*
- [178] V. Malnuit, M. Duca, R. Benhida, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 326-336.
- [179] S. Sasaki, S. Nakashima, F. Nagatsugi, Y. Tanaka, M. Hisatome, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9521-9524.
- [180] D. Lengeler, K. Weisz, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1479-1481.
- [181] Z. Xiao, K. Weisz, *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, *20*, 771-777.
- [182] S. C. Zimmerman, P. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10769-10770.
- [183] E. Mertz, S. Mattei, S. C. Zimmerman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2931-2934.
- [184] E. Mertz, S. Mattei, S. C. Zimmerman, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1517-1526.
- [185] W. Wang, M. G. M. Purwanto, K. Weisz, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1194-1198.
- [186] F. Wachowius, M. Rettig, G. Palm, K. Weisz, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7264-7267.

- [187] S. Kumar, D. P. Arya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4788-4792.
- [188] F. Gug, M. Blondel, N. Desban, S. Bouaziz, J.-M. Vierfond, H. Galons, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3725-3727.
- [189] M. H. Norman, J. L. Kelley, E. B. Hollingsworth, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3417-3423.
- [190] A. F. Littke, C. Dai, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4020-4028.
- [191] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.
- [192] J. Takagi, K. Takahashi, T. Ishiyama, N. Miyaura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8001-8006.
- [193] S. Jaroch, P. Hölscher, H. Rehwinkel, D. Sülzle, G. Burton, M. Hillmann, F. M. McDonald, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2561-2564.
- [194] D. Kahne, D. B. Collum, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5011-5014.
- [195] B. A. Keay, D. Rajapaksa, R. Rodrigo, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 1093-1098.
- [196] S. D. Dreher, P. G. Dormer, D. L. Sandrock, G. A. Molander, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9257-9259.
- [197] I. Sapountzis, P. Knochel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1610-1611.
- [198] T. Tobrman, D. Dvořák, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 273-276.
- [199] P. Gao, S. P. Cook, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3340-3343.
- [200] M. Shabangi, R. A. Flowers, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1137-1140.
- [201] R. H. Crabtree, M. W. Davis, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2655-2661.
- [202] A. H. Hoveyda, D. A. Evans, G. C. Fu, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1993**, *93*, 1307-1370.
- [203] Y.-Y. Yeung, E. J. Corey, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7567-7570.
- [204] O. Toussaint, P. Capdevielle, M. Maumy, *Synthesis* **1986**, *1986*, 1029-1031.
- [205] P. Yin, N. Liu, Y.-X. Deng, Y. Chen, Y. Deng, L. He, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2649-2658.
- [206] J. Westfal, *Bachelorarbeit, Frankfurt am Main* **2011**.
- [207] T. Furuya, J. E. M. N. Klein, T. Ritter, *Synthesis* **2010**, *2010*, 1804-1821.
- [208] T. Tomašić, N. Zidar, V. Rupnik, A. Kovač, D. Blanot, S. Gobec, D. Kikelj, L. P. Mašič, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 153-157.
- [209] A. Gangjee, A. P. Vidwans, A. Vasudevan, S. F. Queener, R. L. Kisliuk, V. Cody, R. Li, N. Galitsky, J. R. Luft, W. Pangborn, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3426-3434.
- [210] J. B. Hynes, R. F. Gratz, W. T. Ashton, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1332-1333.
- [211] W. Jiang, K. Nowosinski, N. L. Löw, E. V. Dzyuba, F. Klautzsch, A. Schäfer, J. Huuskonen, K. Rissanen, C. A. Schalley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *134*, 1860-1868.
- [212] N. V. Harris, C. Smith, K. Bowden, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 434-444.

- [213] J. Raushel, D. L. Sandrock, K. V. Josyula, D. Pakyz, G. A. Molander, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2762-2769.
- [214] F. Basargani, *Diplomarbeit, Frankfurt am Main* **2012**.
- [215] A. Rosowsky, J. L. Marini, M. E. Nadel, E. J. Modest, *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 882-886.
- [216] X. Yang, H. Liu, H. Fu, R. Qiao, Y. Jiang, Y. Zhao, *Synlett* **2010**, *2010*, 101-106.
- [217] F. W. Bergstrom, H. G. Sturz, H. W. Tracy, *J. Org. Chem.* **1946**, *11*, 239-246.
- [218] R. J. Lundgren, A. Sapping-Kumankumah, M. Stradiotto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1983-1991.
- [219] K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3027-3028.
- [220] W. Baik, S. Yun, J. U. Rhee, G. A. Russell, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1996**, *0*, 1777-1779.
- [221] J. Yin, B. Xiang, M. A. Huffman, C. E. Raab, I. W. Davies, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4554-4557.
- [222] H. Shinkai, T. Ito, H. Yamada, *US6903094 B2* **2005**.
- [223] R. Kuczniarz, F. Grams, H. Leinert, K. Marzenell, R. A. Engh, W. von der Saal, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4983-4994.
- [224] A. Krasovskiy, V. Krasovskaya, P. Knochel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3024-3027.
- [225] N. Xia, M. Taillefer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 337-339.
- [226] P. Molina, E. Aller, A. Lorenzo, *Synlett* **2003**, *2003*, 0714-0716.
- [227] C. Levallet, J. Lerpiniere, S. Y. Ko, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5291-5304.
- [228] K. Ramadas, N. Srinivasan, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2841-2844.
- [229] J. Li, in *Name Reactions*, Springer Berlin Heidelberg, **2009**, pp. 379-381.
- [230] Z.-X. Guo, A. N. Cammidge, D. C. Horwell, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2933-2943.
- [231] C. A. Maryanoff, R. C. Stanzione, J. N. Plampin, J. E. Mills, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1882-1884.
- [232] K. Ramadas, N. Janarthanan, R. Pritha, *Synlett* **1997**, *1997*, 1053-1054.
- [233] N. Srinivasan, K. Ramadas, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 343-346.
- [234] M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2263-2265.
- [235] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, J. C. Thoen, M. A. Lipton, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 53-56.
- [236] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804-3805.
- [237] W. Borsche, K. Diacont, H. Hanau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. (A and B Series)* **1934**, *67*, 675-686.

- [238] J. K. Kim, Y. H. Kim, H. T. Nam, B. T. Kim, J.-N. Heo, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3543-3546.
- [239] N. Yang, Q.-H. Wang, W.-Q. Wang, J. Wang, F. Li, S.-P. Tan, M.-S. Cheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 53-56.
- [240] L. C. Griffin, L. L. Kiessling, P. A. Beal, P. Gillespie, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7976-7982.
- [241] J. Daume, *Bachelorarbeit, Frankfurt am Main* **2009**.
- [242] K. Moehle, Z. Athanassiou, K. Patora, A. Davidson, G. Varani, J. A. Robinson, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 9101-9104.
- [243] W. L. Evans, B. T. Brooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1908**, *30*, 404-412.
- [244] J. Davoll, A. M. Johnson, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 997-1002.
- [245] X. Huang, H. Yang, H. Fu, R. Qiao, Y. Zhao, *Synthesis* **2009**, *2009*, 2679-2688.
- [246] N. V. Harris, C. Smith, K. Bowden, *Eur. J. Med. Chem.*, *27*, 7-18.
- [247] L.-P. Sun, W.-M. Dai, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7255-7258.
- [248] T. Masamune, S. Ohuchi, S. Shimokowa, H. Booth, *Tetrahedron* **1966**, *22*, 773-783.
- [249] R. den Heeten, L. J. P. van der Boon, D. L. J. Broere, E. Janssen, F. J. J. de Kanter, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 275-280.
- [250] M. Woźniak, A. Barański, K. Nowak, H. Poradowska, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, *1990*, 653-657.
- [251] M. S. Taylor, N. Tokunaga, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 6700-6704.
- [252] M. D. Potter, E. P. Taylor, *J. Chem. Soc.* **1953**, 1320-1321.
- [253] Y. Zhou, Y. Xiao, D. Li, M. Fu, X. Qian, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1571-1574.
- [254] M. Hoenig, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 3447-3454.
- [255] V. T. Abaev, A. S. Dmitriev, S. A. Podelyakin, A. V. Butin, A. V. Gutnov, *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 1195-1204.
- [256] J. G. Young, W. Onyebuagu, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2155-2159.
- [257] S. Binięcki, L. Rylski, *Ann. Pharm. Fr.* **1958**, *16*, 21-26.
- [258] R. N. Warrener, L. Liu, R. A. Russell, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7485-7496.
- [259] B. Raju, S. Anandan, S. Gu, P. Herradura, H. O'Dowd, B. Kim, M. Gomez, C. Hackbarth, C. Wu, W. Wang, Z. Yuan, R. White, J. Trias, D. V. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3103-3107.
- [260] A. Nakhai, B. Stensland, P. H. Svensson, J. Bergman, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 6588-6599.
- [261] G. A. Molander, D. L. Sandrock, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1597-1600.

- [262] V. Ludwig, A. Krebs, M. Stoll, U. Dietrich, J. Ferner, H. Schwalbe, U. Scheffer, G. Dürner, M. W. Göbel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1850-1856.
- [263] R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. De Clercq, *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309-321.
- [264] C. Pannecouque, D. Daelemans, E. De Clercq, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 427-434.

14 Publikationen:

Maya Tutughamiarso, Mirko Zeiger, Michael Bolte, Journal of Chemical Crystallography, **2011**, 41, 1150-1153. "Two Polymorphs of 1-(2-Methyl-3-oxoisoindolin-5-yl)urea"

15 Lebenslauf

16 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

„Entwicklung und Synthese von heterocyclischen RNA Liganden für TAR aus HIV-1“

selbstständig 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, 01. April 2014

Mirco Zeiger

