

Peptidomimetische Bausteine für synthetische RNA-Liganden

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften**

von
Sven Thomas Breitung
aus
Frankfurt am Main-Höchst

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

2009

(D30)

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

Dekan:	Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Michael W. Göbel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Joachim W. Engels
Datum der Disputation:	25.09.2009

Den Familien
Breitung, Eckermann und Scheff

Ανθρωπε, ἐπολιτεύσω ἐν τῇ μεγάλῃ ταύτῃ πόλει· τί σοι διαφέρει, εἰ πέντε ἔτεσιν ἢ τρισίν; τὸ γὰρ κατὰ τοὺς νόμους ἴσον ἑκάστῳ τί οὖν δεινόν, εἰ τῆς πόλεως ἀποπέμπει σε οὐ τύραννος οὐδὲ δικαστῆς ἄδικος, ἀλλ' ἡ φύσις ἢ εἰσαγαγοῦσα; οἷον εἰ κωμῳδὸν ἀπολύοι τῆς σκηνῆς ὁ παραλαβὼν στρατηγός. 'ἀλλ' οὐκ εἶπον τὰ πέντε μέρη, ἀλλὰ τὰ τρία.' καλῶς εἶπας· ἐν μέντοι τῷ βίῳ τὰ τρία ὅλον τὸ δρᾶμά ἐστι. τὸ γὰρ τέλειον ἐκεῖνος ὀρίζει ὁ τότε μὲν τῆς συγκρίσεως, νῦν δὲ τῆς διαλύσεως αἴτιος· σὺ δὲ ἀναίτιος ἀμφοτέρων. ἄπιθι οὖν ἴλεως· καὶ γὰρ ὁ ἀπολύων ἴλεως.

Ad se ipsum libri XII, 36
Marcus Aurelius (121-180)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2004 bis November 2008 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. 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 den Arbeitskreis, für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit, sowie für die hervorragende Betreuung und zahlreichen Anregungen danken.

Bedanken möchte ich mich bei der DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches RNA-Ligand-Wechselwirkungen (SFB 579) und die Möglichkeit der Teilnahme an Tagungen. Der Herrmann-Willkomm-Stiftung danke ich für die finanzielle Realisierung der Tagungsreise zum *8th Tetrahedron Symposium* in Berlin. Mein Dank gilt auch der GDCh für ein Reisestipendium zum *GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2007* in Ulm.

Herrn Dr. G. Dürner und seiner Mitarbeiterin G. Stracke möchte ich ganz besonders für die Aufreinigungen und die Analytik mittels HPLC danken. Darüber hinaus möchte ich Frau G. Stracke für die Bereitstellung von destillierten Lösungsmitteln danke sagen.

Meinen Dank möchte ich auch an Herrn Dr. J. G. Zimmermann und Herrn R. Olbrich richten für die Aufnahme von NMR-Spektren, an Frau M. Christof für die Anfertigung der Elementaranalysen, Dr. J. W. Bats für die Aufnahme der Röntgenstrukturen, Frau I. Prieß und Frau H. Brill für die Messung von Massenspektren und dem Werkstatt-Team um Herrn K. Müller für die Anfertigung und Wartung von Laborgeräten.

Der Arbeitsgruppe um Frau Dr. U. Dietrich, insbesondere Frau M. Stoll, Georg-Speyer-Haus (Frankfurt), und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. C. Pannecouque (Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgien) danke ich für die Durchführung der Zellkultur-experimente.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe und seinem Arbeitskreis für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Ligand-RNA Komplexen. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Chem. J. Ferner für die Durchführung der Experimente und bei S. Mensch für die Darstellung des 36mer Peptides bedanken.

Des Weiteren gilt Herrn Prof. Dr. G. Schneider und seinem Mitarbeiter Herrn Dipl.-Biochem. A. Schüller mein Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Für die Untersuchung der Verbindungen auf antibakterielle Eigenschaften danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Dr. T. Wichelhaus und Herrn Prof. Dr. M. Karas und Herrn Dr. T. Stein, besonders Frau Apothekerin D. Urbanek und Herrn Apotheker M. Weidlich.

Ein weiterer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Brutschy für die massenspektrometrischen Untersuchung von Tripeptiden durch Dr. N. Morgner mit Hilfe der dort entwickelten LILBID-Methode.

Für das kritische Lesen und wertvolle Anregungen der vorliegenden Arbeit danke ich Herrn Dipl.-Finanzwirt K. Breitung, Herrn Dr. M. Suhartono und Frau Dr. U. Scheffer.

Für die angenehme Arbeitskreisatmosphäre und gute Zusammenarbeit möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises herzlich danken. Ein besonderes Dankeschön geht hierbei an Herrn Dr. D. Akalay, Frau Dipl.-Chem. S. Brüß, Frau Dipl.-Chem. K. Dörr, Herrn Dr. C. Gnaccarini, Herrn Dipl.-Chem. C. Pinto Gomes, Herrn Dr. S. Peter, Frau T. Ruppenthal, Herrn Dr. G. Seifert, Herrn Dr. A. Spielmann, Frau T. Stark, Herrn Dr. C. Timm, Herrn Dipl.-Chem. S. Ullrich, Herrn Dipl.-Chem. M. Weimar und Herrn Dipl.-Chem. M. Zeiger für unzählige anregende Diskussionen nicht ausschließlich fachlicher Natur.

Frau Dr. U. Scheffer und Frau E. Kalden bin ich für die unzähligen FRET-Messungen, das Bereitstellen der RNA-Proben, die Unterstützung bei biochemischen Fragestellungen und für ihr offenes Ohr sehr dankbar.

Bei Herrn Dr. M. Suhartono möchte ich mich für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen der Peptidchemie bedanken. Darüber hinaus für die Freundschaft seit dem ersten Semester auch außerhalb der Universität.

Einen herzlichen Dank an alle meine Freunde möchte ich nicht vergessen, dass sie während dieser Zeit auf mich Rücksicht genommen und mir hilfsbereit zur Seite gestanden haben. Ganz besonders möchte ich mich dabei bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium erst in diesem Rahmen ermöglicht haben und immer als Ansprechpartner zur Verfügung standen. Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Miriam, dass sie mich die ganze Zeit liebevoll unterstützt hat.

Kurzfassung

Peptidomimetische Bausteine zur Synthese von RNA-Liganden

Sven Thomas Breitung

Ein bekanntes Beispiel für regulatorische RNA-Protein-Wechselwirkung stellt der Komplex der TAR-RNA von HIV-1 und dem viralen Protein Tat dar. Dieser Komplex ist wichtig für die effiziente Transkription des viralen Genoms. Essentiell für die Erkennung der Stem-Loop Struktur ist die Wechselwirkung des Tat-Proteins mit dem aus drei Nukleotiden bestehenden Bulge der TAR-RNA. Das Wissen über die Prinzipien der Erkennung von Tat zu TAR-RNA sollte es möglich machen, spezifische Liganden zu designen, die als antivirale Tat Antagonisten angreifen können. Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese von RNA Liganden für die Festphasenpeptidsynthese (FPPS) basierend auf heteroaromatischen Bausteinen. Als Strategie wurde gewählt, die heteroaromatischen Reste über Amid-Bindungen an ein Fmoc geschütztes (2-Aminoethyl)glycin-Rückgrat einzufügen. Die peptidomimetischen Bausteine X konnten in der FPPS zur Synthese von Tripeptiden mit der allgemeinen Struktur Arg-X-Arg und Modifikationen mit Lysin eingesetzt werden. Die Bindungsaffinitäten der Tripeptide und kleinen Moleküle zur TAR-RNA von HIV-1 wurden über einen fluoreszenzbasierten Assay bestimmt. Der Assay verwendet ein doppelt endmarkiertes Tat-Peptid mit Fluorescein und Rhodamin als Farbstoff. Durch Verdrängung des Tat-Peptides durch einen konkurrierenden Liganden kommt es zur Konformationsänderung des Peptides, die zur Löschung der Lichtemission führt. Dabei zeigen die Tripeptide $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Lactam}-(\text{D})\text{Arg-CONH}_2$ (**154**) und $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Amidin}-(\text{D})\text{Arg-CONH}_2$ (**158**) IC_{50} -Werte von 2-3 μM , die auch durch Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) bestätigt wurden. In massenspektrometrischen Untersuchungen von **158** bzw. Tat-Protein mit TAR-RNA konnten bei beiden Peptiden 1:1 und 1:2-Komplexe beobachtet werden. **158** zeigt antivirale Eigenschaften ($\text{IC}_{50} = 10\text{-}50 \mu\text{M}$) in HeLa P4-Zellassays. Durch NMR-Untersuchungen und molekulardynamische Berechnungen war es möglich, eine Konformationsänderung der TAR-RNA durch eine Wechselwirkung mit Guanidinium-Gruppen festzustellen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war daher ausgehend von den gewonnenen Daten die Untersuchung des Bindungskonzeptes von Diaminopyrazolen und Indazolen. Diaminopyrazole mit kleinen Resten und Triaminopyrazol übertreffen im protonierten Zustand den dikationischen Liganden Argininamid. In Übereinstimmung mit dem Bindungsmodell verhalten sich protonierte Aminopyrazole wie

„Super-Guanidine“ hinsichtlich der TAR-RNA. Das Einfügen des Triaminopyrazols in ein Phenazin-Grundgerüst führt zu Verbindungen, die im protonierten und reduzierten Zustand zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können und nicht planar, aber lipophil sind. Der Austausch von Stickstoff zu Sauerstoff im Phenazinring sollte den reduzierten Zustand stabilisieren. Die resultierende Struktur ist jedoch zersetzlich, so dass auf weitere Untersuchungen verzichtet wurde.

Abstract

Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands

Sven Thomas Breitung

A prominent example for regulatory RNA-protein interactions is the complex of HIV-1 TAR-RNA and the viral protein Tat. This complex is crucial for the efficient transcription of viral genes. Essential for the recognition of the RNA Stem-Loop structure is the interaction of Tat with the three-nucleotide bulge of TAR. Knowing the principles of the Tat-TAR recognition should allow to design specific ligands which may be useful as antiviral Tat antagonists. The aim of this work was to synthesize a broad scope of heteroaromatic building blocks for RNA-ligands. The heteroaromatic moieties could be attached to Fmoc-protected (2-aminoethyl)glycine-backbone via amide bonds. The peptidomimetic building blocks X were then used in SPPS to generate tripeptides of the general pattern Arg-X-Arg and variations with lysine. The binding affinities of tripeptides to the TAR RNA of HIV-1 were determined in fluorescence based experiments. The first assay applies a Tat peptide doubly labelled with fluoresceine and a quencher. Upon displacement from TAR by a competing ligand this peptide undergoes a conformational change leading to pronounced quenching of light emission. Tripeptides H₂N-(D)Arg-lactame-(D)Arg-CONH₂ (**154**) and H₂N-(D)Arg-amidine-(D)Arg-CONH₂ (**158**) exhibited IC₅₀ values in the range of 2-3 μM, which were approved by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). In mass spectroscopic studies of the tripeptide **158** and Tat respectively with TAR-RNA stoichiometries of 1:1 and 1:2 were observed. The HeLa P4 assay demonstrated the antiviral properties of **158** (IC₅₀ = 10-50 μM). NMR studies and molecular dynamics calculations exhibit a conformational change of TAR-RNA upon interaction with guanidinium groups. One further goal of this work was the synthesis of diaminopyrazoles and indazols to verify the binding concept, which is based on conformational studies of TAR-RNA. Protonated diaminopyrazoles with small residues and protonated triaminopyrazole surpass the dicationic ligand arginine amide. In accordance with the binding model, protonated aminopyrazoles behave as “super-guanidines” with respect to TAR-RNA. The reduced and protonated form of a triaminopyrazole embedded into the phenazine-like framework is not planar but lipophilic and should be able to form additional hydrogen bonds. The exchange of the nitrogen into oxygen in the ring system of

phenazine should stabilize the reduced form. Unfortunately the reduced phenazine derivative easily decomposes. Therefore no further investigations will take place.

1.	<i>EINLEITUNG</i>	1
2.	<i>DAS HUMANE IMMUNSCHWÄCHEVIRUS HIV</i>	4
2.1	Anti-HIV-Medikamente	8
2.1.1	Neues Target: Transaktivierung	9
3.	<i>EINFÜHRUNG RNA-LIGANDEN</i>	26
3.1	Welche Stellen durch kleine Moleküle adressiert werden	26
3.1.1	Antibakterielles Target: Das Ribosom.....	28
3.1.2	Antibakterielles Target: tRNA	29
3.1.3	Antibakterielles Target: T-Box	29
3.1.4	Antivirales Target: Trans Activating Response RNA	30
3.1.5	Antivirales Target: Rev Responsivelement RNA.....	30
3.2	Bindungsstelle: Doppelsträngige Bereiche	31
3.3	Interne Loops bindende Verbindungen	33
3.3.1	16S A-Site RNA.....	33
3.4	Bulge bindende Verbindungen	36
3.4.1	TAR-RNA	36
3.4.2	T-Box RNA	37
3.4.3	Iron response Element (IRE) RNA.....	37
3.5	Hairpin-Loop bindende Verbindungen	38
3.5.1	U1A snRNA Hairpin-Loop	39
3.5.2	GNRA Tetra-Loop	39
4.	<i>PEPTID-NUKLEINSÄURE (PNA)</i>	41
4.1	Monomere Bausteine für die Synthese von PNAs	42
4.1.1	Synthese eines geschützten N-Aminoethylglycin-Grundgerüsts	42
4.1.2	Synthese der Nukleobasen.....	43
4.1.3	Monomere mit basenlabiler N-Schutzgruppe	44
4.1.4	Monomere PNA-Bausteine mit modifiziertem Rückgrat	45
4.2	Chemische Stabilität	46
4.3	Löslichkeit	46
4.4	Bindungsaffinitäten	47
4.5	Struktur von PNA*RNA-Duplexen	47
4.5.1	Struktur von PNA*DNA-Duplexen	48
4.5.2	Struktur von (PNA) ₂ *DNA-Tripelhelices	49
4.5.3	Tripelhelix.....	49
4.6	Stabilität in biologischen Systemen	50
4.7	Zelluläre Aufnahme von PNAs	50
4.8	Inhibierung der Translation	51
4.9	Inhibierung der Transkription	51
4.10	Aktivierung der Transkription	52
4.11	Inhibierung des Tat/TAR-Komplexes durch PNA	52
5.	<i>ASSAYS FÜR DIE EVALUIERUNG VON RNA-LIGAND-WECHSELWIRKUNGEN</i>	54
5.1	Fluoreszenzbasierte Assays	54

5.2	Fluoreszierender Ligand Verdrängungs-Assay	55
5.3	NMR Methoden	58
5.4	ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) Methoden	59
5.5	MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry)	59
5.6	LILBID-MS (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption-Mass Spectrometry)	60
5.7	Selektivitätsassays	60
5.8	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)	61
5.9	Zellassays	62
6.	FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE (FPPS)	65
6.1	Boc- und Fmoc-Strategie	65
6.1.1	Scavenger für die Festphasensynthese	65
6.1.2	Lösungsmittel für die Festphasensynthese	66
6.1.3	Harze für die Festphasenpeptidsynthese	66
6.1.4	Kupplungsmethoden	68
7.	EIGENE ARBEITEN UND RESULTATE	70
7.1	Synthese kupplungsfähiger Bausteine für die FPPS	70
7.2	Darstellung von Tripeptiden mit Amidin und Lactam-Resten	75
7.2.1	Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der Tripeptide aus den PNA-Monomeren	77
7.2.2	Untersuchung der antiviralen Eigenschaften im Zell-Assay	77
7.3	Tripeptide aus kommerziell erhältlichen (D)- bzw. (L)-Aminosäuren	78
7.4	Darstellung von Tripeptiden mit 2-Pyrimidinyl-Rest	79
7.4.1	Untersuchung der Tripeptide aus (D)-Aminosäuren mit 2-Pyrimidinyl-Rest im Fluoreszenz-Kompetitions-Assay	80
7.4.2	Untersuchung der antiviralen Eigenschaften im Zell-Assay	81
7.5	Darstellung von Dabcyl-markierten Peptiden und Aufbau eines Quench-Assays	82
7.5.1	Versuche zum Aufbau eines Verdrängungs-Assays basierend auf Dabcyl-markierten Peptiden	84
7.6	Synthese von 3,5-Diaminopyrazolderivaten	86
7.6.1	Untersuchung der Bindungseigenschaften von Diaminopyrazol-Derivaten	88
7.7	Synthese von Indazolderivaten	89
7.7.1	Untersuchung der Bindungseigenschaften von Indazol-Derivaten	90
7.8	Versuche zur Synthese von 1,9-Dimethyl-4,9-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-b]-chinoxalin-3-amin (202)	91
7.9	Versuche zur Synthese von 4,9-Dihydro-4-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin (199)	94
7.10	Versuche zur Synthese von 1,7-Dihydro-benzo-pyrazolo[4,3-b][1,4]oxazin-3-amin (200)	95
7.10.1	Untersuchung der Bindungseigenschaften von Phenazin-Derivaten	98
7.11	Untersuchungen der synthetisierten RNA-Liganden auf Selektivität	99
7.12	Synthese von Liganden aus virtuellem Screening	101
7.13	Anwendung der Buchwald-Hartwig Reaktion	103
8.	ZUSAMMENFASSUNG	105

8.1	Tripeptide aus peptidomimetischen Bausteinen	105
8.2	2-Pyrimidinyl-haltige Tripeptide.....	106
8.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Peptide	107
8.4	Pyrazole und Indazole	107
8.5	Phenazinartige Verbindungen.....	109
8.6	Selektivitätsstudien.....	109
8.7	de novo Liganden Design	110
9.	AUSBLICK	111
10.	ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN	113
10.1	Liste der synthetisierten Verbindungen	117
10.2	Synthese.....	120
10.2.1	(E)-3-Ethoxy-2-propenylchlorid (133) ^[248]	120
10.2.2	(E)-3-Ethoxy-N-phenyl-acrylamid (134) ^[211, 212]	121
10.2.3	N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (139).....	123
10.2.4	1H-Chinolin-2-on (135) ^[211, 212]	124
10.2.5	6-Nitro-1H-chinolin-2-on (137) ^[213, 214, 249]	126
10.2.6	6-Amino-1H-chinolin-2-on Pikrat (261).....	128
10.2.7	6-Amino-1H-chinolin-2-on Hydrochlorid (138)	129
10.2.8	N-N-Diacetyl-6-amino-1H-chinolin-2-on (262)	131
10.2.9	6-Amino-1H-chinolin-2-on (140)	132
10.2.10	6-Amino-3,4-dihydro-1H-chinolin-2-on (263).....	134
10.2.11	2-Aminochinolin (71)	135
10.2.12	2-Chlor-6-nitro-chinolin (264).....	137
10.2.13	6-Nitro-chinolin-2-ylamin (143) ^[215]	138
10.2.14	Chinolin-2,6-diamin dihydrochlorid (145)	140
10.2.15	(6-Nitro-chinolin-2-yl)carbaminsäure-tert-butylester (265)	141
10.2.16	(6-Amino-chinolin-2-yl)carbaminsäure-tert-butylester (146).....	143
10.2.17	(2-tert-Butoxycarbonylamino-chinolin-6-ylamino)essigsäure-methylester (266).....	144
10.2.18	(tert-Butoxycarbonyl-(2-(bis-tert-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl)-amino)- essigsäuremethylester (267)	146
10.2.19	[tert-Butoxycarbonyl-(2-tert-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäure (147)	148
10.2.20	(2-Oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-ylamino)-essigsäuremethylester (141)	149
10.2.21	[tert-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäuremethylester (268)	151
10.2.22	[tert-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäure (142).....	152
10.2.23	{{2-[tert-Butoxycarbonyl-(2-tert-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9H- fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäuremethylester (152).....	154
10.2.24	{{2-[tert-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9H-fluoren-9- ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäuremethylester (150).....	156
10.2.25	{{2-[tert-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9H-fluoren-9- ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure (151) ^[224]	158
10.2.26	{{2-[tert-Butoxycarbonyl-(2-tert-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9H- fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure (153) ^[224]	160
10.2.27	(Amino-ethylamino)-essigsäure (270) ^[218, 251]	162
10.2.28	Methyl 2-(2-aminoethylamino)acetat dihydrochlorid (271) ^[218]	163
10.2.29	[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethylamino]-essigsäuremethylester-Hydrochlorid (149) ^[122, 222]	164
10.2.30	Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid (174) ^[225]	166
10.2.31	Malondiimidsäure-diethylester (175) ^[255]	168
10.2.32	3,5-Diaminopyrazol (176) ^[227]	169
10.2.33	3,5-Diaminopyrazol-Pikrat (272)	174

10.2.34	3,5-Diaminopyrazol-Hydrochlorid (273)	175
10.2.35	3,5-Diamino-4-brom-pyrazol (177) ^[227]	176
10.2.36	3,5-Diamino-4-brom-pyrazol-1-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (178)	177
10.2.37	Allylmalonsäuredinitril (181) ^[228, 257]	179
10.2.38	Benzylmalonsäuredinitril (183) ^[228]	180
10.2.39	Methylmalonsäuredinitril (179) ^[228]	182
10.2.40	4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (274)	183
10.2.41	4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Trifluoacetat (275)	188
10.2.42	4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (276)	189
10.2.43	4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Hydrochlorid (277)	191
10.2.44	4-Methyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (278)	192
10.2.45	4-Methyl-3,5-diaminopyrazol Hydrochlorid (279)	194
10.2.46	7-Nitro-indazol (192) ^[231]	195
10.2.47	7-Amino-indazol (195)	197
10.2.48	2-Methoxy-3-nitro-benzoesäure (186) ^[229, 261]	198
10.2.49	2-Methoxy-3-nitro-benzamid (187)	200
10.2.50	2-Methoxy-3-nitro-benzonitril (188)	201
10.2.51	7-Nitro-3-amino-indazol (189)	203
10.2.52	3,7-Diamino-indazol (190)	204
10.2.53	3,7-Diamino-indazol Dihydrochlorid (281)	206
10.2.54	4-Bromo-1 <i>H</i> -pyrazol (205) ^[234]	207
10.2.55	4-Bromo-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrazol (206) ^[234]	209
10.2.56	4-Bromo-1-methyl-3,5-dinitro-1 <i>H</i> -pyrazol (207) ^[234]	210
10.2.57	<i>N</i> -(2-Amino-phenyl)-acetamid (216)	212
10.2.58	<i>N</i> -(2-Methylamino-phenyl)-acetamid (208)	213
10.2.59	<i>N</i> ,1-Dimethyl-3,5-dinitro- <i>N</i> -phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-amin (220) ^[234]	215
10.2.60	<i>N</i> ,1-Dimethyl- <i>N</i> ⁴ -phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3,4,5-triamin Pikrat (283)	216
10.2.61	3-Oxo-3,4-dihydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (222) ^[235]	218
10.2.62	3-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (284)	219
10.2.63	1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (223)	221
10.2.64	3-Ethoxy-1-methyl-1,2-dihydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (285)	223
10.2.65	1,2,3,4-Tetrahydro-1-methyl-3-oxochinoxalin-2-carboxamid (224)	224
10.2.66	1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonitril (225)	226
10.2.67	3-Ethoxy-1-methyl-1,2-dihydro-chinoxalin-2-carbonitril (226)	227
10.2.68	2-(2-Nitro-phenoxy)-malonsäurediethylester (231) ^[271]	228
10.2.69	3-Oxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (232) ^[271]	230
10.2.70	3,4-Dihydro-3-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-2-carbohydrazid (238)	231
10.2.71	3-Ethoxy-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (236)	233
10.2.72	3-Thioxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (233) ^[239]	234
10.2.73	3-Methylsulfanyl-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (234) ^[239]	235
10.2.74	3-Oxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureamid (239)	237
10.2.75	3-Oxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (240)	238
10.2.76	3-Thioxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (241)	239
10.2.77	1,7-Dihydro-benzo-pyrazolo[4,3- <i>b</i>][1,4]oxazin-3-amin Pikrat (286)	241
10.2.78	5-Bromchinolin (246) ^[243, 244]	243
10.2.79	5,8-Dibromchinolin (248) ^[243, 244]	244
10.2.80	(4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (245)	246
10.2.81	(4-Chloro-phenyl)-(2-methoxy-ethyl)-chinolin-5-yl-amin (244)	248
10.2.82	2-Bromo-3-nitro-benzonitril (251) ^[273]	250
10.2.83	3-Nitro-2-phenylamino-benzonitril (252)	251
10.2.84	4-(4-Dimethylamino-phenylazo)-benzoesäure (DabcyI) (288)	253
10.2.85	DabcyI-NH(CH ₂) ₂ NH ₂ (289)	254
10.2.86	DabcyI-NH(CH ₂) ₂ N((CH ₂) ₂ NH ₂) ₂ (290)	256
10.3	Peptide	257
10.3.1	Allgemeines Verfahren der Festphasenpeptidsynthese (FPPS)	257
11.	METHODEN ZUR BIOPHYSIKALISCHEN UND BIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG	268

11.1	FRET-Assay^[167]	268
11.2	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)^[178, 246]	268
11.3	Selektivitätsstudien^[167]	269
11.4	Zellkulturexperimente	270
11.4.1	Zellkulturexperimente HeLa P4 ^[167]	270
11.4.2	Cytotoxizitätsassay (HeLa P4) ^[167]	270
11.4.3	Zellkulturexperiment MT-4 ^[5, 182]	271
11.4.4	Cytotoxizitätsassay (MT-4) ^[5, 182]	272
11.5	Antimikrobielle Untersuchungen	272
11.5.1	Zellfreier Transkriptions-/Translationsassay (CFTT-Assay) ^[278]	272
11.5.2	Aktivitätsbestimmung gegen Modellkeime <i>Bacillus subtilis</i> ^[278]	273
11.5.3	Aktivitätsbestimmung gegen pathogene Mikroorganismen ^[279]	273
12.	ANHANG	275
12.1	Abkürzungen	275
12.2	Literaturverzeichnis	278
12.3	Publikationsliste	287
12.4	Ausgewählte wissenschaftliche Vorträge	287
12.5	Posterbeiträge	288
12.6	Lebenslauf	290
12.7	Eidesstattliche Erklärung	291

1. EINLEITUNG

Die RNA wurde in früheren Zeiten als Überträger der Erbinformationen von der DNA zum Protein angesehen. Nach der Erkenntnis, dass die RNA außer der Übertragung von Informationen auch katalytische Eigenschaften und regulatorische Funktion besitzt, wurde in Viren das Enzym Reverse Transkriptase entdeckt. Sie schreibt die RNA in DNA um, überträgt also Informationen in entgegengesetzter Richtung, was bis dahin als unmöglich erachtet wurde. 1983 entdeckten Robert C. Gallo^[1] und die Gruppe um Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier^[2] (beide Nobelpreisträger für Physiologie oder Medizin 2008) unabhängig voneinander HIV-1 (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) als einen Virus des Lentivirus-Typs mit zylindrischem Kern als Auslöser von AIDS (**A**cquired **I**mmune **D**eficiency **S**yndrome) durch den Angriff an CD4⁺ T-Zellen.

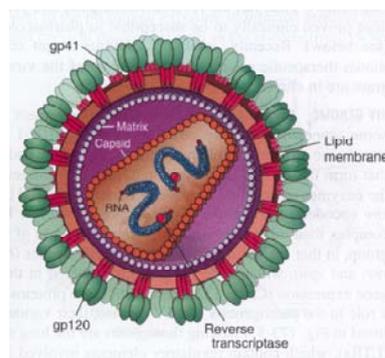


Abbildung 1: Aufbau des HIV-1.^[3]

Die Gesamtzahl von Menschen, die sich seit dem Beginn der Pandemie mit HIV-1 infiziert haben, übersteigt inzwischen 60 Millionen. 25 Millionen starben seither an den Folgen von AIDS. Die WHO rechnet damit, dass 2007 33.2 Millionen Menschen mit HIV-1 leben und 2.5 Millionen sich neu infiziert haben. Allein 2.1 Millionen Menschen starben 2007 an der Krankheit.^[4]

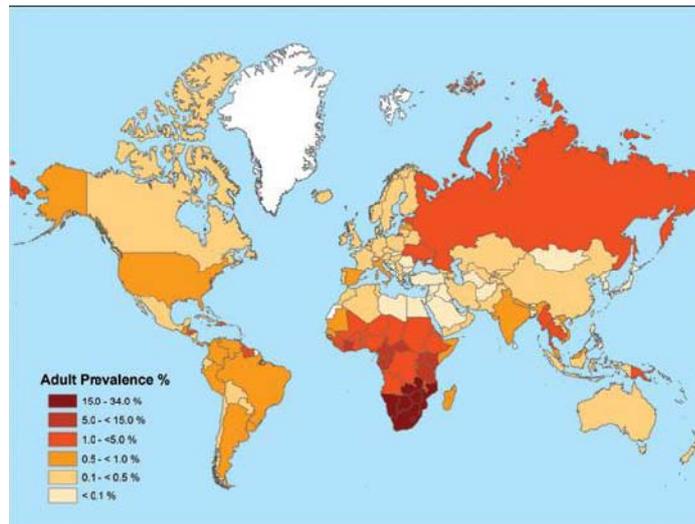


Abbildung 2: Das Diagramm veranschaulicht die Verbreitung der 33.2 Millionen HIV-1-Infizierten nach UNAIDS^[4]

Die Behandlung von Patienten mit HIV geht von einer Kombinationstherapie aus, bei der mehrere Medikamente in unterschiedlichen Replikationsprozessen des Virus eingreifen. Inhibitoren der Reverse Transkriptase, Protease und Integrase, sowie Entry-Inhibitoren, wie Fusionsinhibitoren und CCR5-Rezeptorantagonisten werden gleichzeitig eingesetzt. Es besteht immer die Gefahr, dass trotz Kombinationstherapie das Virus durch Mutation Resistenzen entwickelt.^[5] Daher wird nach neuen Angriffspunkten gesucht, denen sich der Virus durch Mutationen schwer entziehen kann. Durch genetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Abschnitte auf der RNA für die Transkription und Translation essenziell sind. Da die RNA im Gegensatz zur DNA keine Reparaturmechanismen besitzt, kommen Mutationen häufig vor. Mutationen führen in hoch konservierten Strukturen zu Fehlfaltungen der RNA, was schließlich zu Fehlfunktionen und Inaktivierungen führt. Dadurch wird die Ausbildung von Resistenzen gegen Inhibitoren minimiert. Eine solche konservierte Struktur stellt die TAR-RNA (**Trans-Activating Region**) dar, die eine ausgeprägte Bulge-Loop Sekundärstruktur, bestehend aus 59 Nukleotiden, besitzt. Die HIV-1 TAR RNA ist mit dem Ribosom und den tRNAs eine der am besten untersuchten Strukturen. Diese Region im LTR (**Long Terminal Repeat**) geht eine RNA-Protein-Wechselwirkung mit dem Tat (**Transactivator of transcription**)-Protein ein.^[6] Durch diese Wechselwirkung kommt es zum Prozess der Transaktivierung, die die erfolgreiche Replikation des Virus erhöht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aufbauend auf strukturbasiertem Design, Liganden mit hoher Affinität zur TAR-RNA zu entwickeln, die die Tat-TAR-Wechselwirkung inhibieren sollten. Interaktionen von kleinen Molekülen mit der RNA sollten eine Beeinflussung der

biologischen Funktion ermöglichen. Basierend auf dem Bindungsmodell von Argininamid (**21**) an die TAR-RNA,^[7-11] sollten guanidinanalogue Strukturen synthetisiert werden, die im protonierten Zustand Wechselwirkungen mit TAR-RNA eingehen. Potenzielle RNA-Liganden sollten Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können und basische Eigenschaften besitzen, da die resultierende positive Ladung im physiologischen Milieu anziehend auf das negativ geladene Phosphordiesterückgrat wirkt. Liganden mit aromatischen Strukturen bilden hydrophobe Wechselwirkungen aus, so dass diese mit Nucleobasen π - π -Interaktionen eingehen können.^[12] Da die Natur nur vier aromatische Aminosäuren (His, Trp, Phe und Tyr) besitzt,^[13] wurden heteroaromatische Seitenketten (Abbildung 3 und Abbildung 4) über PNA-analoge Chemie in peptidomimetische Bausteine inseriert, die anschließend in der FPPS eingesetzt werden konnten.

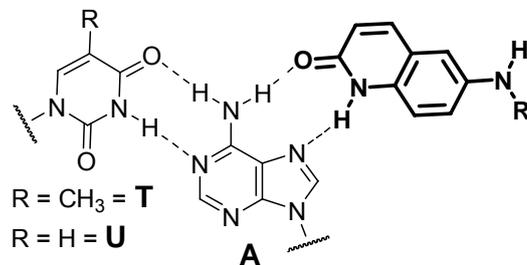


Abbildung 3: Bindungsmodell des Chinolins mit dem Basenpaar A(T/U)

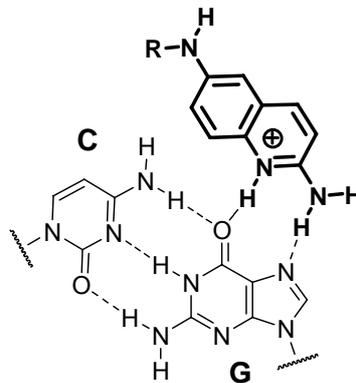


Abbildung 4: Bindungsmodell des Amidins mit dem Basenpaar GC

Die gewonnenen potenziellen RNA Liganden wurden in auf Fluoreszenz basierenden *In vitro* TAR-RNA Assays und verschiedenen Zellassays auf ihre antiviralen, antibakteriellen und cytotoxischen Eigenschaft untersucht. Vorhandene Stöchiometrien wurden massenspektrometrisch und durch NMR aufgeklärt.

2. DAS HUMANE IMMUNSCHWÄCHEVIRUS HIV

Das humane Immunschwächevirus (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) HIV gehört zu den lymphotropen menschenpathogenen Retroviren, dessen Hauptvertreter das HIV-1 und HIV-2 sind. HIV-1 wurde 1983 unabhängig von R. C. Gallo^[1] und L. Montagnier^[2] isoliert und als maßgeblicher Erreger der Immunschwächekrankheit AIDS (**A**cquired **I**mmune **D**eficiency **S**yndrome) identifiziert. HIV-2, das 1985 entdeckt wurde, kann ebenfalls AIDS auslösen, ist aber weniger pathogen als HIV-1. HIV-1 etabliert eine anhaltende Infektion im menschlichen Wirt, in der die CD4⁺ T-Lymphozyten infiziert und damit dezimiert werden, was zu einer Einschränkung der zellulären Immunität führt.^[13-15] Die CD4⁺ T-Lymphozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die mit den B-Lymphozyten an der erworbenen Immunantwort beteiligt sind. Die T-Lymphozyten sind nach ihren Rezeptoren in T-Killerzellen mit CD8-Rezeptoren und T-Helferzellen mit CD4-Rezeptoren zu unterscheiden. T-Killerzellen können eingedrungene Pathogene selbstständig bekämpfen. T-Helferzellen geben an ihre Umgebung lösliche Botenstoffe, die Zytokine (Glycoproteine), ab, die zusätzliche Immunzellen aktivieren und die Pathogene schließlich eliminieren.^[16] Zur Verschmelzung des HIV mit der Wirtszelle bindet das Oberflächenprotein gp120 an die CD4-Rezeptoren von T-Lymphozyten, wodurch es zu einer Konformationsänderung im Transmembranprotein gp41 kommt. Ebenfalls an der Bindung beteiligt sind die Co-Rezeptoren CXCR4 und der Chemokin-Rezeptor CCR5 der T-Zellen. Nach Verschmelzung des Viruspartikels mit der Plasmamembran der Wirtszelle gibt das Retrovirus seine RNA in das Cytoplasma.^[17] Wie alle Retroviren enthält das HI-Virus zwei identische RNA-Moleküle als Genträger, die am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz tragen. Die RNA-Moleküle beinhalten drei verschiedene Gen-Bereiche: *gag*, *pol* und *env*. Die *env*-Gensequenz codiert ein Polypeptid, das in zwei Proteine gespalten wird, die durch eine Disulfid-Brücke verknüpft bleiben. Fertige Viruspartikel entstehen durch das Anlagern des Viruskerns an die Innenseite der Cytoplasmamembran der Wirtszelle (Abbildung 7). Dabei kommt es zur Ausstülpung des Membranabschnitts, in den die *Env*-Proteine eingelagert sind, der den Viruskern vollständig umgibt und als neue Lipidhülle (envelope) des Virus dient. Auch die *gag*-Gensequenz codiert ein Polypeptid, das durch eine Protease in vier Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (p10, p12, p15 und p30) zerlegt wird, die auf die innere Virusstruktur entscheidenden Einfluss ausüben.^[13-15] Aus der Gensequenz *pol*

entstehen nach Translation eine Protease, eine Reverse Transkriptase mit RNA abbauendem Enzym RNase H und eine Integrase, die für den Einbau der Virus-DNA in das Zellgenom verantwortlich ist.^[15] Im Cytoplasma dient die RNA als Matrize für die viruseigene RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) zur Herstellung einer DNA-Kopie. Im Zellkern wird die doppelsträngige DNA, die beiderseits von direkten Sequenzwiederholungen (LTR, long terminal repeats) umgeben ist, in das Genom der Wirtszelle durch das viruseigene Protein Integrase eingebaut. Damit wird die Virus-DNA wie ein zelleigenes Gen von der RNA Polymerase II transkribiert, wobei Abschnitte im LTR als Promotor fungieren.^[13, 14] Allgemeine Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II TFII verhelfen der RNA Polymerase II zum genauen und effizienten Start. Der erste Schritt besteht in der Anlagerung des TFIID-Komplexes an die TATA-Box einer AT-reichen Konsensus-Sequenz (Abbildung 6 A). Der Komplex wird durch die Proteine TFIIA und TFIIB stabilisiert und bildet nun eine vollständige Plattform für die Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor, wohin sie durch das Protein TFIIIF geführt wird, welches mit der Polymerase in Verbindung tritt und diese zum Promotor leitet (Abbildung 6 B). Die carboxyterminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II wird durch die CDK-7 Kinase (cyclinabhängige Kinase) des TFIIF phosphoryliert, wodurch die Polymerase von der geschaffenen Plattform gelöst wird. TFIIF dient auch als DNA-Helikase, die den DNA-Doppelstrang am Transkriptionsstart entwindet, so dass die RNA-Polymerase II die Transkription von Transactivation responsive (TAR) RNA beginnen kann (Abbildung 6 B).^[15, 18] Die neu entstandene TAR-RNA (siehe Abbildung 5) bildet ihren charakteristischen aus sechs Nukleotiden bestehenden Loop und den aus drei Pyrimidin-Basen bestehenden Bulge (UCU) von Nukleotid +19 bis +42 am 5`-Ende aus, die an die RNA-Polymerase II bindet (Abbildung 6 C).^[19]

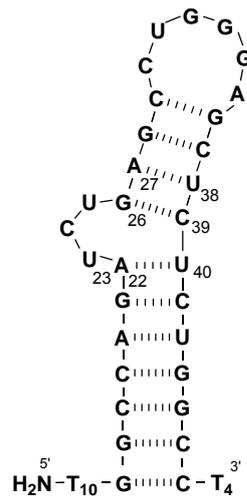


Abbildung 5: Modellabschnitt der HIV-1 TAR-RNA

In Abwesenheit des Tat-Proteins generiert der HIV-1 Promotor nur kleine oder unprozessierte Transkripte mit einer Nukleotidlänge von 60 Basen, die nach Prozessierung in die jeweiligen Peptide Tat und Rev am Ribosom translatiert werden (Abbildung 7). Die Bulge-Region erweitert die A-Form Helix, was die Bindung des Tat-Peptides erst ermöglicht (Abbildung 6 C). Die Komplexbildung zwischen Tat und TAR erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Der erste Schritt startet mit der Erkennung eines Arginin-Rests am U23 in der Bulge-Region, der das Umformen der TAR Major Groove anregt.^[20] Die Konformationsänderung führt zum Wechseln der Position der Phosphatgruppen von A22, U23 und U40 in die Major Groove, was zu weiteren Interaktionen mit Tat führt und wichtig für die hohe Affinität von Tat zu TAR ist. Durch Bindung von Tat an TAR-RNA findet eine spezifische Wechselwirkung zwischen Tat und humanem Cyclin T1 (hCycT1), einem regulierenden Faktor von CDK-9 im positiv wirkenden Elongationsfaktor (P-TEFb)-Komplex, statt (Abbildung 6 C). Der ausgebildete Tat/TAR-RNA/P-TEFb-Komplex am HIV Promotor aktiviert CDK-9, das zu Autophosphorylierung von P-TEFb und Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von RNA Polymerase II und damit zur Bildung eines Elongation-Komplexes führt, wodurch es zur Synthese von vollständiger HIV mRNA kommt (Abbildung 6 D).^[18, 21]

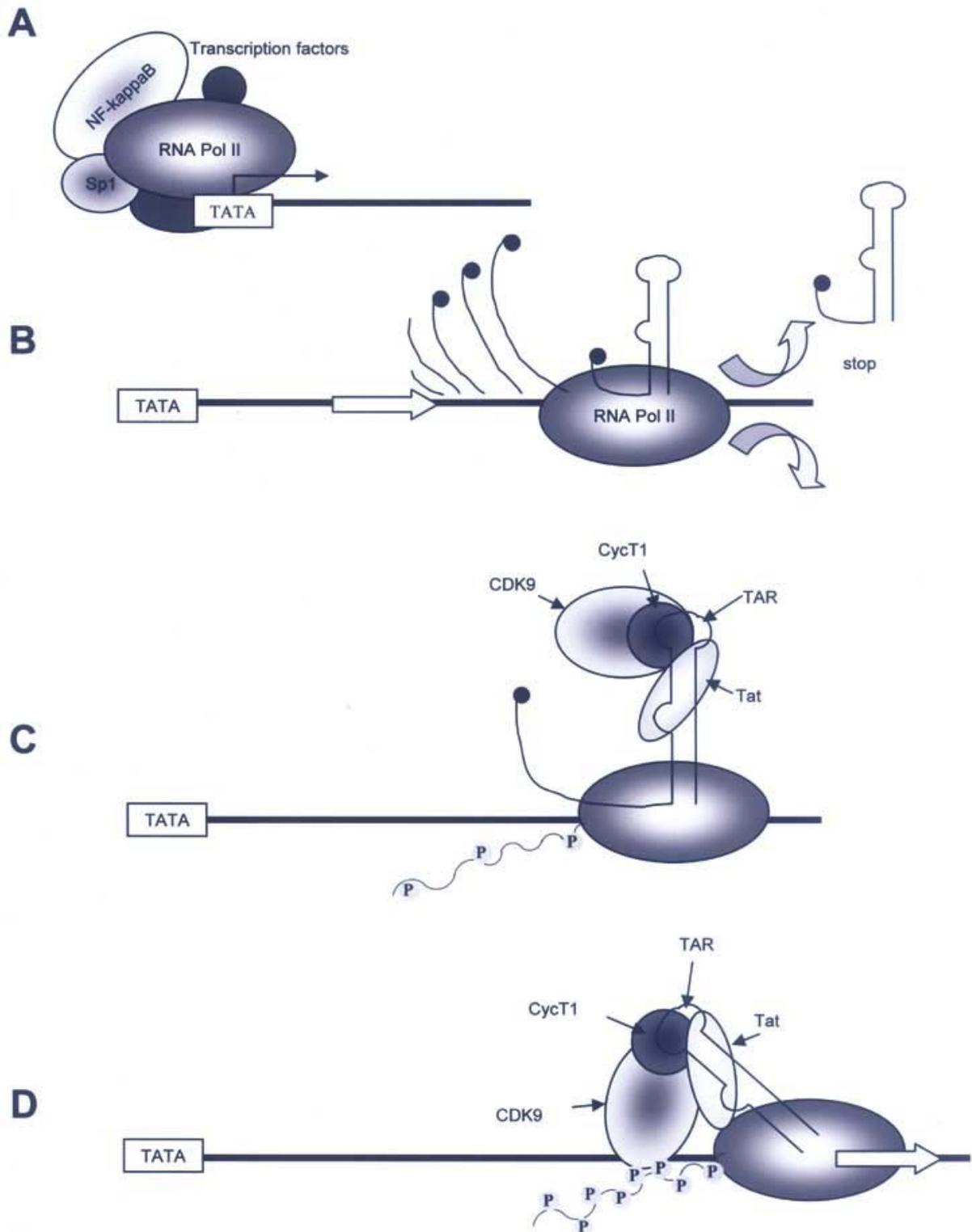


Abbildung 6: Modell der durch Tat vermittelten Transaktivierung.^[18]

Die Transkriptionsrate durch die Komplexbildung mit Tat erhöht sich um das Hundertfache. Durch Mutationsexperimente des Tat-Proteins fand man zwei wichtige Funktionsdomänen: Eine argininreiche Region (Reste 49-57), die notwendig und ausreichend für die Bindung an

TAR RNA ist und eine Aktivierungsdomäne, die die Wechselwirkung mit P-TEFb vermittelt.^[22, 23] Durch Bindung von Rev an das RRE (Rev Response Element) bildet sich ein Aggregat, das es der RNA ermöglicht, aus dem Zellkern auszutreten (siehe Abbildung 7) und vor der zelleigenen Prozessierung geschützt zu sein. Im Cytoplasma werden die viralen Proteine exprimiert und alle viralen Komponenten werden zum neuen Virus vereint.^[24]

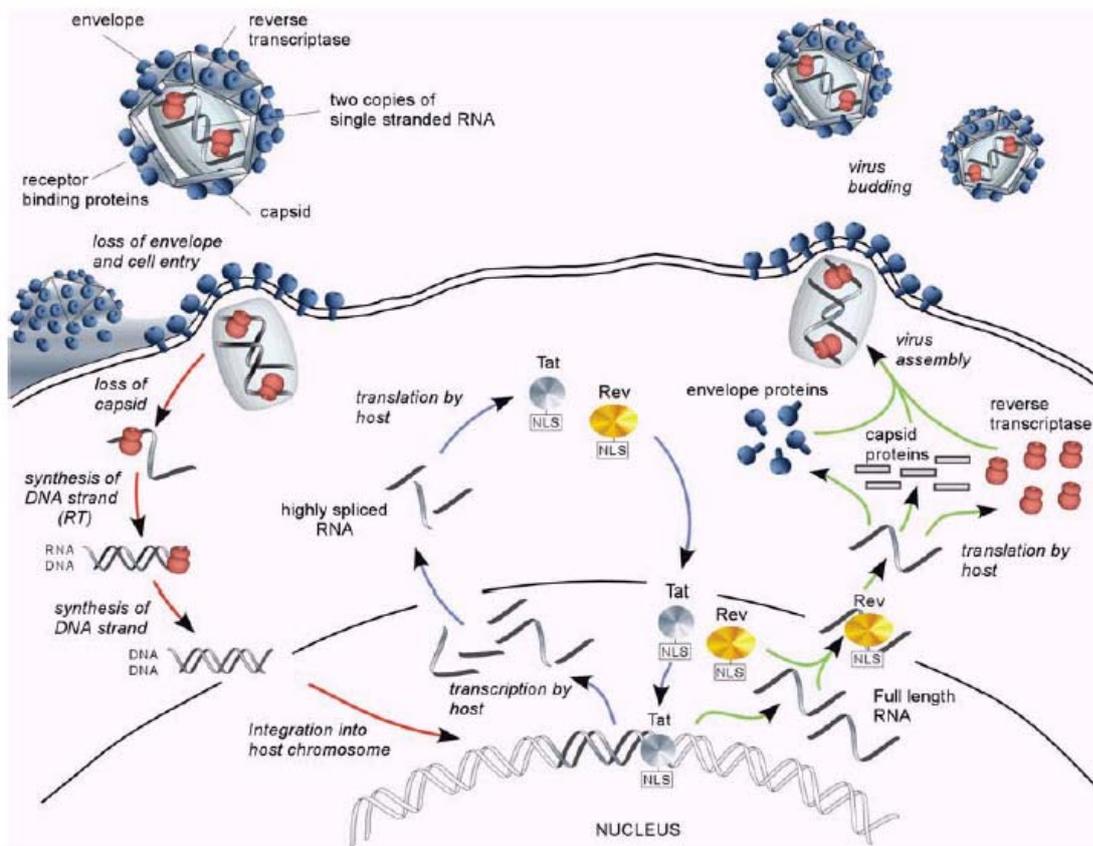


Abbildung 7: Lebenszyklus von HIV-1^[6]

2.1 Anti-HIV-Medikamente

Zurzeit gibt es 33 Anti-HIV-Medikamente, die von der FDA, der US Food and Drug Administration, zugelassen sind. Diese Arzneistoffe lassen sich in fünf Kategorien unterscheiden: (1) Nukleosidische, (2) bzw. Nicht-Nukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase, (3) Protease-Inhibitoren, (4) Fusions-Inhibitoren (Entry-Inhibitoren) und (5) Integrase-Inhibitoren.^[25] Durch die gleichzeitige Verabreichung von antiviralen Arzneistoffen aus unterschiedlichen Kategorien (Highly Active Anti-Retroviral Therapy, HAART) kommt es zur dramatischen Reduzierung der AIDS bezogenen Morbidität und Mortalität.^[26]

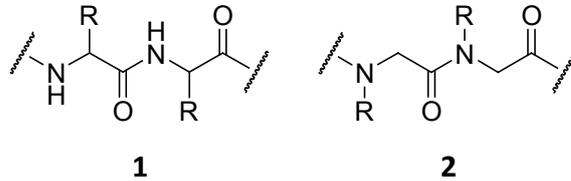
2.1.1 Neues Target: Transaktivierung

Eine der größten Herausforderungen der antiviralen Therapie bei HIV ist die sich ausbildende Resistenz des Virus gegenüber den verwendeten Medikamenten. Ein Grund für die Resistenzen besteht in der Reversen Transkriptase, da diese keine korrigierende Exonukleasefunktion besitzt und daher fehleranfällig bei der Darstellung der DNA-Kopie ist.^[27] Eine Möglichkeit der Problemlösung liegt in der Identifikation eines neuen Targets, das essenziell für die virale Replikation und damit weniger anfällig ist, da die Partner humane Proteine sind. Der durch Tat eingeleitete Transaktivierungsmechanismus ist ein besonders attraktives Target für die Entwicklung von neuen antiretroviralen Arzneistoffen, weil Tat für die virale Genexpression nicht nur während des exponentiellen Wachstums des Virus benötigt wird, sondern auch in der kritischen Phase der Aktivierung des integrierten proviralen Genoms.^[28] Die bisher entwickelten Inhibitoren kann man je nach molekularem Target in drei verschiedene Klassen unterscheiden: (1) Anti TAR-RNA, (2) Anti Tat-Protein und (3) Anti Tat/P-TEFb-Komplex

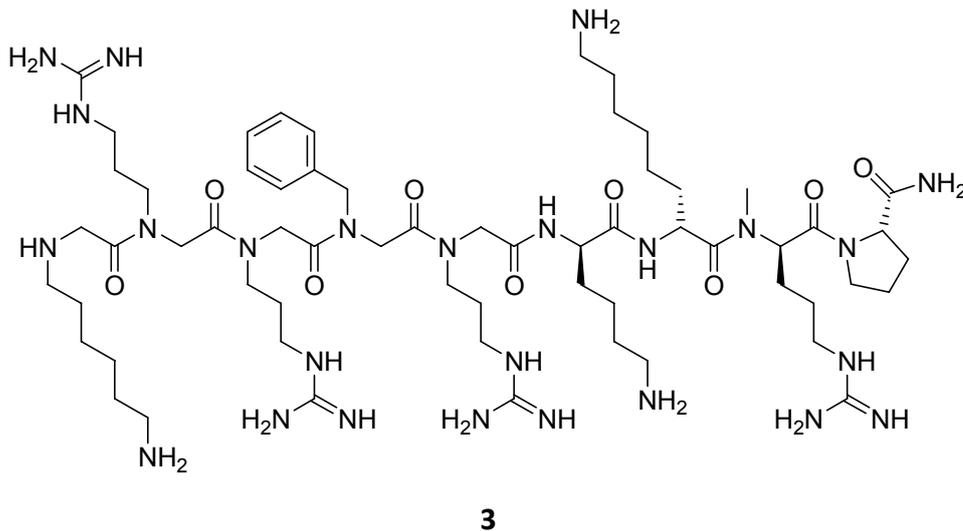
2.1.1.1 Peptidbasierende Inhibitoren

Die argininreiche Region (YGRKKRRQRRRP) des Tat-Peptides bindet an den aus drei Nukleotiden bestehenden Bulge der TAR-RNA. Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass synthetische Peptide, die die Bindungsdomäne des Tat-Peptides beinhalten, mit dem kompletten Tat-Peptid um die Bindungsstelle der TAR-RNA konkurrieren. Dabei erfolgt die Interaktion der TAR-RNA mit Tat über einen zweistufigen Mechanismus. Der erste Schritt erfolgt durch die Wechselwirkung der Seitenkette eines Arginins über die Hoogsteen-Seite an G26 und Stacking-Wechselwirkung mit U23. Dadurch kommt es zu konformationellen Änderungen der Phosphate von A22, U23 und U40, die wiederum mit Tat interagieren.^[29] Als peptidbasierende Inhibitoren benutzte man analoge Tat-Peptide, die eine ähnliche Affinität und Selektivität besitzen wie das vollständige Tat-Peptid und verband solche Analoga mit der RiboNuklease H Domäne der Reversen Transkriptase von HIV-1, so dass solche Chimären die TAR-RNA spezifisch erkennen und abbauen.^[30-34] Um resistent gegen die Gefahr des enzymatischen Abbaus von Peptiden **1** zu sein, behalf man sich durch den Einsatz von künstlichen Peptiden.

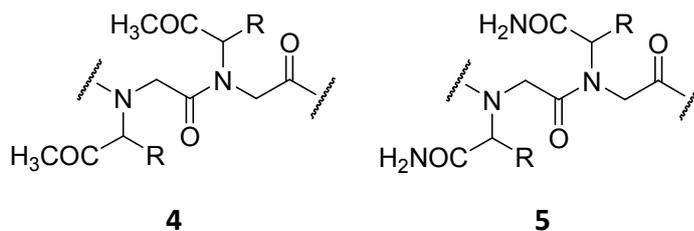
Peptide **2** sind Peptidomere, wobei alle Seitenketten an den Stickstoff des Peptidrückgrats gebunden sind, so dass der Abstand der Seitenkette zur Carbonylgruppe, wie beim natürlichen Peptid beibehalten wird.



Dabei zeigte das Peptoid CGP 64222 (**3**) mit neun Aminosäureanaloga, mit vier Argininen und zwei Lysinen bessere Affinitäten zu TAR-RNA ($IC_{50} = 12$ nM für die Inhibierung des Tat/TAR-RNA-Komplexes und 10-30 μ M im zellulären Assay) als das peptidische Analogon. Durch NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstelle des Peptoids **3** an der Bulge-Region der TAR-RNA liegt.^[35]

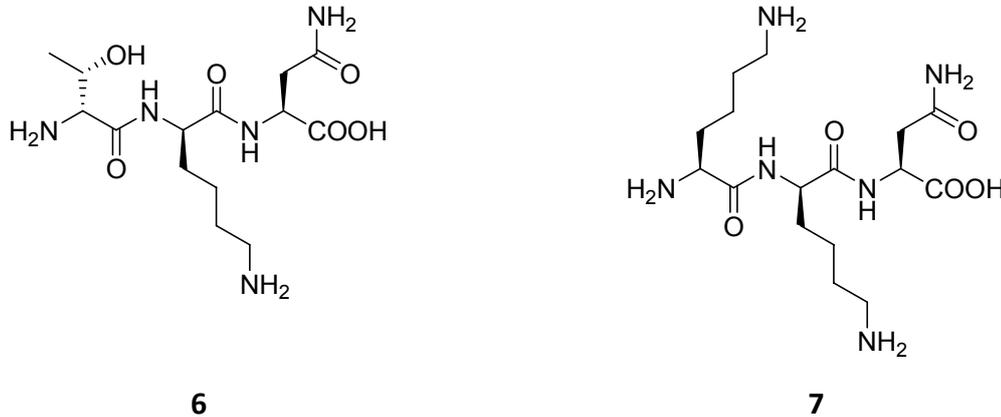


Modifikationen an der Seitenkette von Peptoiden durch die Einführung von Estern **4** und Amiden **5** verändern die chemischen und physikalischen Eigenschaften, so dass es zu einer höheren Bioverfügbarkeit und *in vivo* Stabilität kommt. Ester-Peptoide und Amid-Peptoide, die das Struktur-Motiv eines Tat-Segmentes (47-57) besitzen, zeigen in einem auf Fluoreszenzauslöschung basierenden Assay einen niedrigen K_D -Wert (~ 68 nM).^[36]

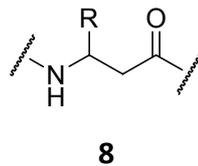


Den Einfluss der Stereochemie auf RNA-Bindung untersuchte man durch den Einsatz eines aus D- α -Aminosäuren hergestellten Tat-Peptids 37-72, das an TAR-RNA in der erweiterten

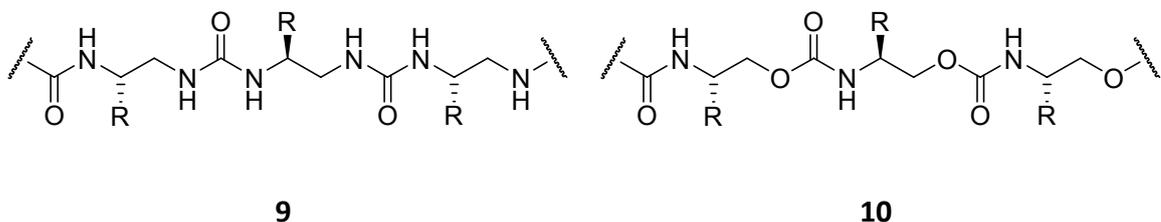
Major Groove mit der gleichen Gleichgewichtskonstante [D-Tat-Peptid ($K_D = 0.22 \mu\text{M}$)] bindet wie dasselbe Peptid aus L- α -Aminosäuren L-Tat-Peptid ($K_D = 0.13 \mu\text{M}$]). Durch eine kombinatorische Bibliothek, bestehend aus 24389 Tripeptiden, die aus D und L- α -Aminosäuren synthetisiert wurden, fand man acht vielversprechende Peptide mit dem Motiv X-Lys-Asn.



Die beiden Tripeptide mit der höchsten Affinität zur TAR-RNA waren $\text{H}_2\text{N}-(\text{L})\text{Lys}-(\text{D})\text{Lys}-(\text{L})\text{Asn}-\text{OH}$ (**6**) ($K_D = 420 \text{ nM}$) und $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Thr}-(\text{D})\text{Lys}-(\text{L})\text{Asn}-\text{OH}$ (**7**) ($K_D = 560 \text{ nM}$), wobei **6** in weiteren Untersuchungen in Zellkulturexperimenten die Tat-vermittelte Aktivierung der Transkription unterdrückte ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ nM}$).^[37] Zusätzlich ist bekannt, dass ein Analogon des Tat-Peptides (47-57), bestehend aus β -Aminosäuren **8**, das RNA-Element der Transaktivierung in nanomolaren Konzentrationen bindet.^[38]

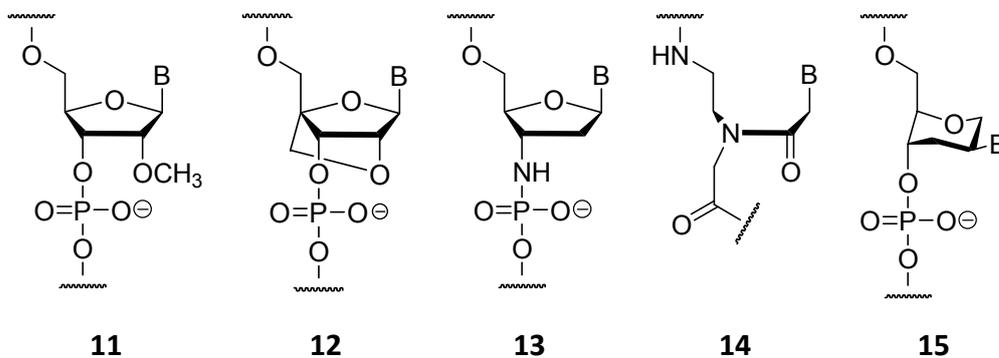


Weitere Peptidomimetika sind die von Tat abgeleiteten Oligocarbamide **9**, ein Harnstoffderivat und Oligocarbamate **10**, die stabil gegen Proteaseabbau *in vitro* sind und eine HIV-1 Replikation in Zellsystemen inhibieren können. Dabei kam man zu denselben Ergebnissen durch einen elektrophoretischen Mobilitätsassay. Oligocarbamide **9** ($K_D = 0.11 \mu\text{M}$) weisen höhere Bindungsaffinitäten auf als die Oligocarbamate **10** ($K_D = 1.1 \mu\text{M}$) und das ebenfalls natürliche L-Tat-Peptid ($K_D = 0.78 \mu\text{M}$) mit analogen Sequenzen.^[39]



2.1.1.2 Oligonukleotid Inhibitoren

Oligonukleotide wurden auf ihre Eigenschaft als potenzielle Inhibitoren der Transaktivierung untersucht, da sequenzspezifische Wechselwirkungen mit TAR-RNA dazu führen könnten, dass Tat und andere zelluläre Faktoren nicht mehr daran binden. Ein Ansatz war die Darstellung von kleinen Abschnitten von TAR-RNA, die als Köder für das Tat-Peptid eingesetzt werden sollten. Dabei wurden aber nur moderate Inhibierungen der HIV-1 Replikation beobachtet.^[40] Komplementäre Antisense-Oligonukleotide zur Stem-Loop-Struktur der TAR-RNA sollten in Lage sein die Transaktivierung zu inhibieren. Dazu wurde eine Antisense Domäne zum LTR des HIV-1 entwickelt, die mit sequenzspezifischen Ribonukleasen (Hammerkopf- und Hairpin-Ribozym) verknüpft wurde. Die HIV-1 Replikation in Eukaryonten konnte durch diesen Ansatz bis zu 90 % inhibiert werden.^[38, 41] Ein Problem beim Einsatz von Antisense Oligonukleotiden ist die Zersetzung durch Nukleasen, so dass 2'-O-Methyl (**11**), Locked Nucleic Acid (LNA) (**12**), N3'→P5' Phosphoramidat (**13**), Polyamide Nucleic Acids (PNA) (**14**) (siehe Kapitel 4) und Hexitol Nucleic Acid (HNA) (**15**) eingesetzt werden, da diese stabil gegenüber Nukleasen sind.^[42-44]



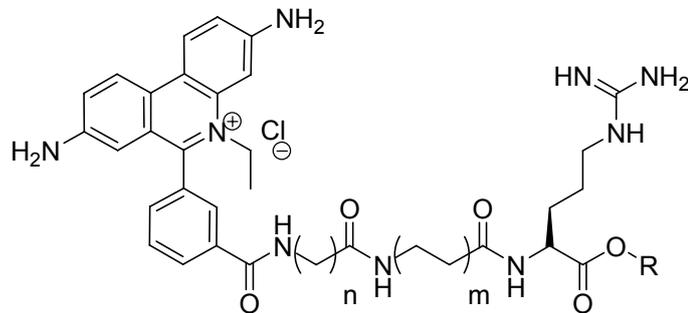
Selbst Mischungen (Chimären) zwischen den nukleasestabilen Nucleotiden und unmodifizierten Nucleotiden weisen erhöhte Stabilität gegenüber Nucleasen auf. Ein Nachteil der modifizierten negativ geladenen Oligonucleotiden ist, dass sie nicht zellgängig sind. Durch Komplexierung mit kationischen Lipiden kann eine Aufnahme in die Zellen ermöglicht werden. Weitere Methoden für die Aufnahme von modifizierten Oligonucleotiden in Zellen (auch im Sinne einer therapeutischen Anwendung) ist die Konjugation mit Cell-Penetrating Peptides (CCP), Transportan, Penetratin und Tat-Peptiden.^[45]

2.1.1.3 RNA Interference (RNAi)

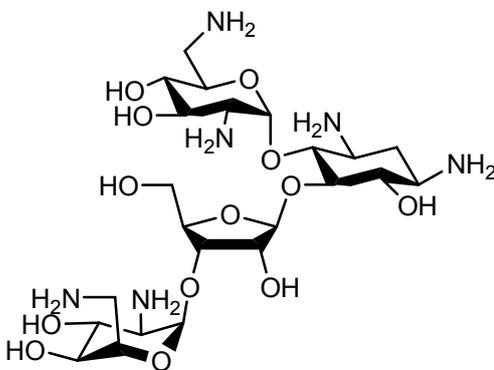
RNAi sind 21 bis 23mer Doppelstränge aus RNAs, die eine sequenzspezifische Zersetzung der mRNA einleiten. Die Untersuchung von antiviralen RNAi ist eine ganz neue Disziplin. Es konnte gezeigt werden, dass siRNAs, die auf TAR angesetzt wurden, zu einer Reduzierung der Virenproduktion führen.^[46, 47]

2.1.1.4 Kleine Moleküle

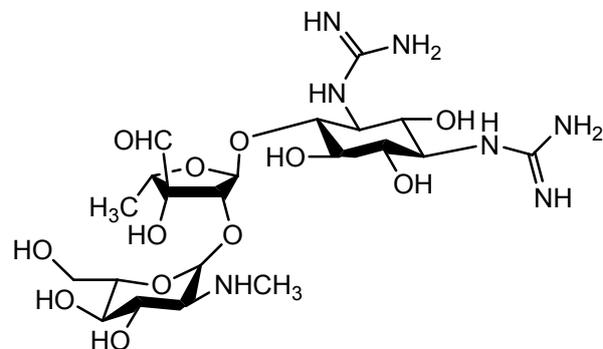
Ein erster Ansatz für die Darstellung von kleinen Molekülen, die TAR-RNA adressieren können, machte sich die Erkenntnis zu nutze, dass ein einzelner Arginin-Rest die Bindung von Tat zu TAR-RNA vermittelt. Man stellte verschiedene Konjugate mit Arginin-Resten her, z.B. Ethidium (**16**) (Interkalator), Aminoglycoside (Neomycin (**17**), Streptomycin (**18**), Kanamycin (**19**) und Gentamycin (**20**)), in deren Folge festgestellt wurde, dass die Bindungsstelle der Konjugate in der erweiterten Major Groove des UCU-Bulges und des flankierenden Stems lag, wo sich auch die Bindungsstelle des Tat-Peptides befindet.^[48, 49]



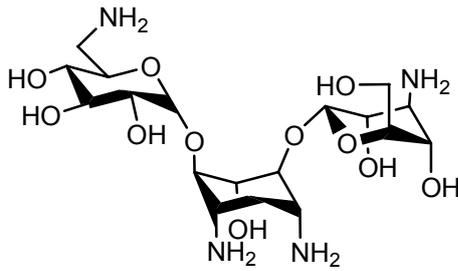
16



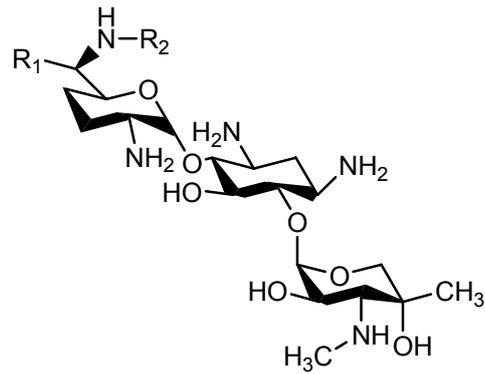
17



18



19



20

Aminoglycoside ohne Konjugation mit Arginin zeigen ebenfalls Hemmungen der Tat/TAR-Wechselwirkung. Durch Mobilitätsshift-Assays konnte nachgewiesen werden, dass die Affinität des Polykations nicht alleine von der Anzahl der positiven Ladungen abhängig ist. Streptomycin (**18**) weist mit drei positiven Ladungen eine fünffach höhere Affinität auf als Gentamycin (**20**) mit fünf positiven Ladungen. Zur Bestimmung der Bindungsstelle von Aminoglycosiden bediente man sich der Methoden der Footprint-Analyse, *in silico*-Experimenten und NMR-spektroskopischen Untersuchungen. Dabei fand man z.B. für das Aminoglycosid Neomycin (**17**) eine andere Bindungsstelle als für das Tat-Peptid. Durch Massenspektrometrie war es möglich, das Verhältnis zwischen der TAR-RNA und einem Liganden zu bestimmen, so binden z.B. bis zu drei Moleküle Neomycin (**17**) an die TAR-RNA. Durch die Zugabe des Tat-Peptides bildete sich ein Tat/Neomycin (**17**)/TAR-RNA-Komplex im Verhältnis 1:2:1.^[50] Neomycin (**17**) geht Wechselwirkungen noch mit weiteren RNAs, wie z.B. mit der 16S rRNA, 23S rRNA, Gruppe I Intron und Hammerhead Ribozym ein. Da keine gemeinsame Sequenz der Zielstrukturen erkennbar ist, nimmt man an, dass gemeinsame tertiäre Strukturen vorhanden sind, die einen vergleichbaren Erkennungsmechanismus für die Aminoglycoside darstellt.^[24, 51] Das am besten untersuchte Molekül, das einen Komplex mit der TAR-RNA eingeht, ist das Peptidmimetikum Argininamid (**21**). Basierend auf NMR-Experimenten und biochemischen Daten fand man heraus, dass das Argininamid (**21**) in strukturell gleicher Weise bindet und auch dieselben Konformationsänderungen der RNA einleitet wie das Tat-Peptid. Williamson et al. konnten durch NMR-Experimente zeigen, dass die Guanidiniumgruppe des Argininamids (**21**) eine Wechselwirkung in Form von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hoogsteen-Seite von G26 und den Phosphaten P22 und P23 eingeht (Abbildung 11) (Abbildung 8).^[8] Dieses „Arginin-fork-Modell“ wurde von Varani et al. widerlegt, die herausfanden, dass eine Bindung entweder zu G(26) oder zu den Phosphaten P(22) und P(23) ausgebildet wird.^[9] Zusätzlich kommt es zu Stacking-

Wechselwirkungen von Argininamid (**21**) zu U23, was zu Konformationsänderungen der Phosphat-Gruppen von A22, U23 und U40 führt (Abbildung 9).^[52]

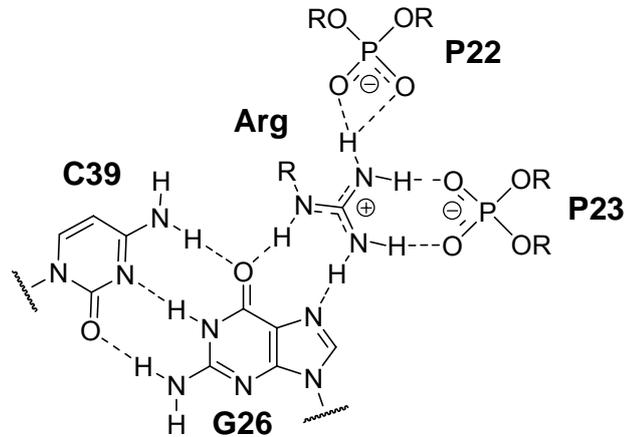


Abbildung 8: Wechselwirkung mit RNA und Arginin bzw. Argininamid (**21**) im „Arginin-fork-Modell“

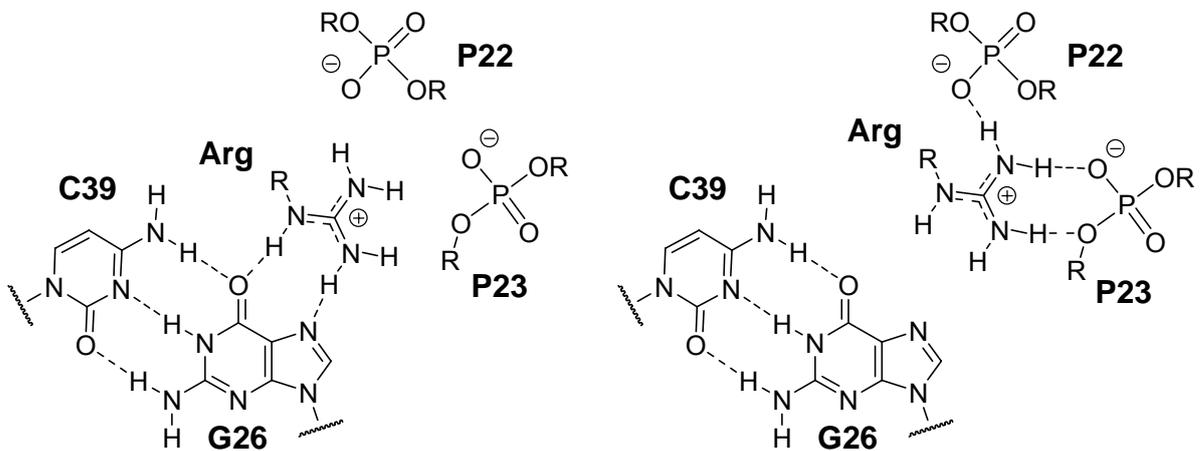


Abbildung 9: Wechselwirkung von RNA und Arginin bzw. Argininamid (**21**)

Vermutet wird dabei auch die Ausbildung eines Basentriplets (Abbildung 10) zwischen U23 und dem Basenpaar A27-U38, was durch Beobachtung von NOEs zwischen U23 und den Iminprotonen von A27 bestätigt wurde.^[53] Von F. Aboul-ela et al. stammt der Befund, dass nach der Bindung des Argininamids (**21**) C24 und C25 in das Solvens ragen, während U23 in Nachbarschaft zu A27 tritt. Aufgrund des Abstandes der Nukleobasen kommt es nicht zur Ausbildung eines Basentriplets, sondern nur zu einem Basentriplett ähnlichen Zustand.^[7, 9, 10, 54, 55]

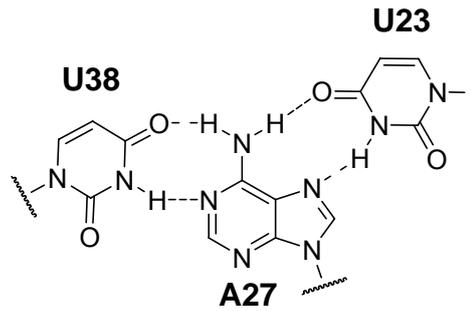
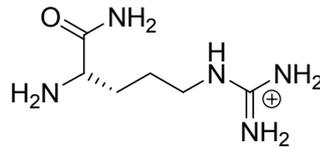


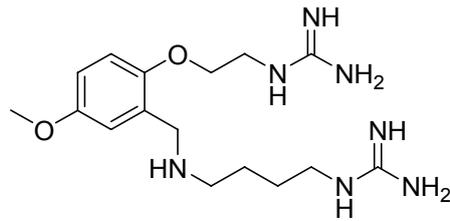
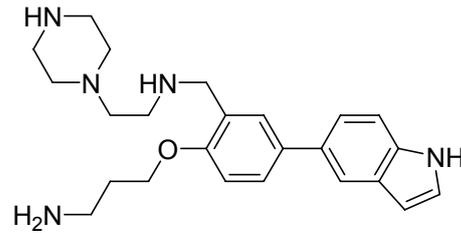
Abbildung 10: Basentriplett U38-A27-U23

Im Falle der HIV-2 TAR-RNA, die sich von der HIV-1 durch ein fehlendes Nukleotid im Bulge unterscheidet, ist die Ausbildung des Basentriplets (Abbildung 10) nach Wechselwirkung mit Argininamid (**21**) unbestritten. Das Argininamid (**21**) bildet zusätzlich mit U23 und A22 π - π -Wechselwirkungen aus.^[54]

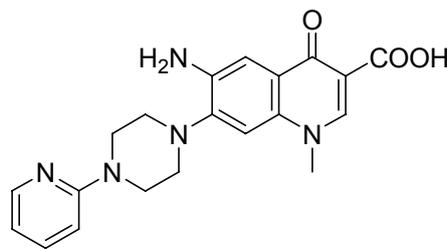
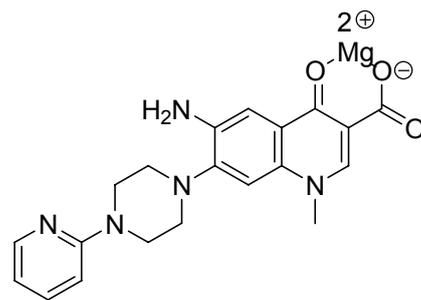


21

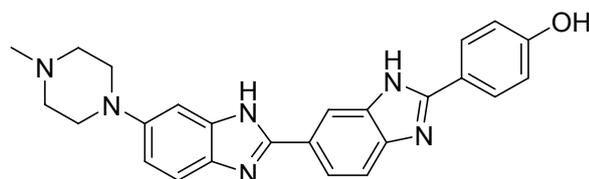
Basierend auf der Kenntnis, dass zwei elektrostatische Wechselwirkungen notwendig zum Stabilisieren der RNA-Konformation sind, wurden Bisguanidin-Verbindungen hergestellt, die einen IC_{50} im niedrigen μM -Bereich aufwiesen. Obwohl die Länge der Alkylkette variiert werden kann, ohne dass dies Konsequenzen für die Aktivität hat, ist nur eine minimale Länge erforderlich. Durch NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass Bisguanidin **22** dieselben Konformationsänderungen bewirkt wie Argininamid (**21**). Um das Bindungspotential zu erhöhen wurden die Guanidinium-Reste entfernt und eine Reihe von Substanzen hergestellt, die ein Indol als einen von drei Substituenten eines benzyliischen Grundgerüsts enthalten. Dabei weist das Indolderivat **23** ($K_i = 0.051 \mu M$) eine 25-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum Bisguanidin **22** ($K_i = 1.3 \mu M$) auf. Strukturbestimmungen von **23** zeigen, dass der Indol-Ring zwischen den Basenpaaren A22-U40 und G26-C39 interkaliert, während die Amin-Substituenten Wechselwirkungen mit dem Rückgrat eingehen.^[6, 56]

**22****23**

Es konnte gezeigt werden, dass Chinolin-4(1*H*)-on-Derivate antivirale Eigenschaften aufweisen, in deren Rahmen WM5 (**24**) die Tat vermittelte Transaktivierung im nM Bereich unterdrückt. Man fand heraus, dass der Wirkmechanismus der Substanz auf die Chelatisierung mit Magnesium-Ionen zurückzuführen ist, die besonders reichlich am UCU-Bulge zur Stabilisierung der Konformation der TAR-RNA vorhanden sind. Selektivitätsassays, die auf die Zugabe von tRNA und DNA setzen, zeigen keinerlei Abnahme der Affinität, trotz Überschuss an Kompetitor.^[57]

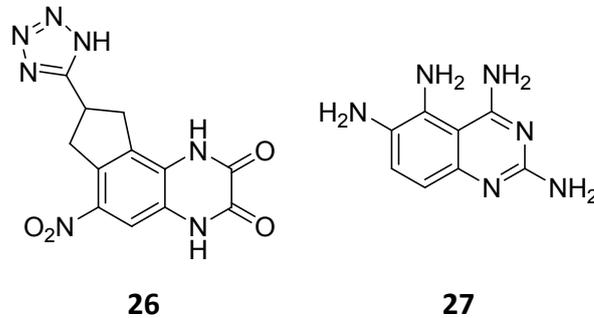
**24**

Bei der Substanz Hoechst 33258 (**25**) ermittelte man durch Footprint-Analyse, dass die GC-reiche Region (G36-U40) als bevorzugte Kontaktstelle dient (Abbildung 11). Durch die Vergleichsuntersuchung von Bulgeless TAR-RNA zu Wildtyp TAR-RNA fand man durch Zirkulardichroismus-Experimente heraus, dass Hoechst 33258 (**25**) eine höhere Affinität zur Wildtyp TAR-RNA besitzt.^[58, 59]

**25**

Durch ein *in vitro* High-Throughput-Screening von 150000 Substanzen fanden Mei et al. zwei Moleküle, die die Tat-TAR-Interaktion inhibieren: Chinoxalin **26** und Tetraaminochinoxalin **27**. Chinoxalin **26** bindet dabei an der Bulge-Region (Abbildung 11) nach ESI-MS mit einer

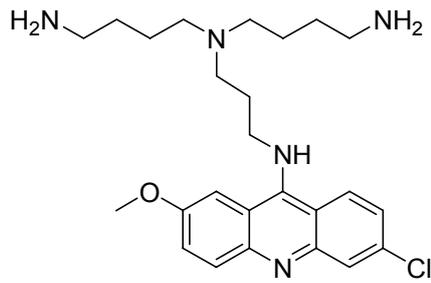
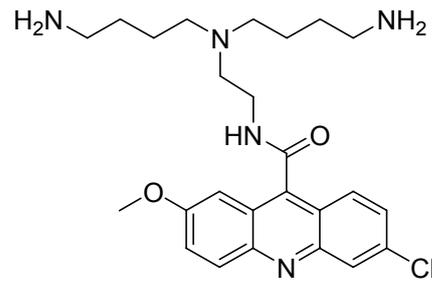
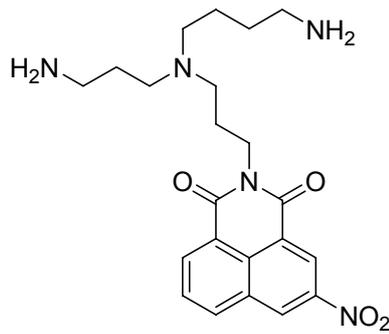
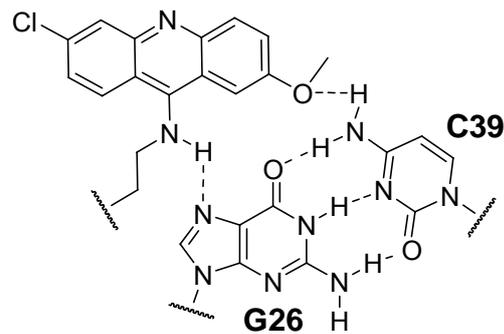
Stöchiometrie von 1:1. Bei Zugabe von tRNA und Kalbsthymus DNA in den Assays kommt es zu starker Abnahme der Affinität, was darauf hindeutet, dass Chinoxalin **26** nicht selektiv an TAR-RNA und RNA im Allgemeinen bindet. Tetraaminochinozalin **27** bindet sowohl am Bulge als auch am 3`-Ende des TAR-Loops (Abbildung 11).^[60]



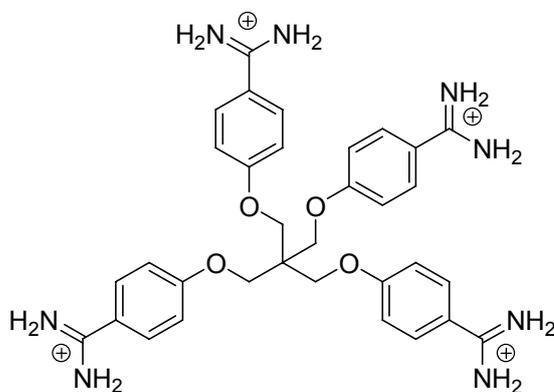
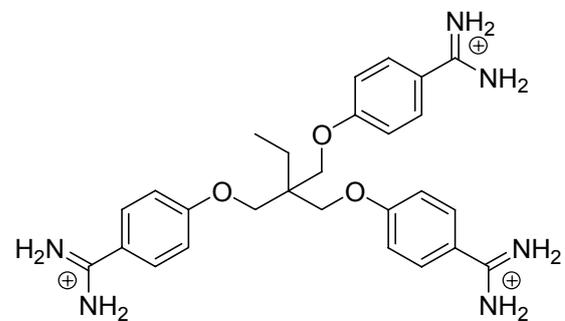
Hamy et al. synthetisierte eine Klasse von TAR-Antagonisten mit drei verschiedenen Substrukturen:

1. Einen aromatischen oder heteroaromatischen Rest mit der Möglichkeit der Stacking-Wechselwirkung im Bulge.
2. Kationische Reste, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der RNA eingehen können.
3. Ein Linker zwischen beiden Resten.

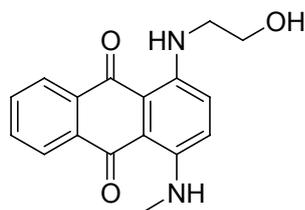
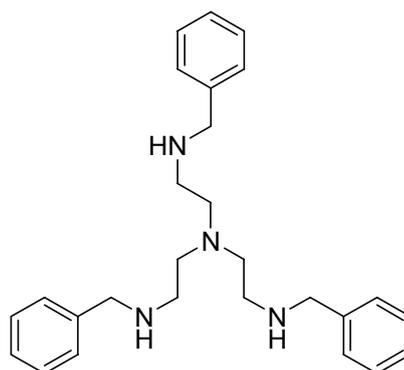
Der aktivste TAR-Antagonist ist die Verbindung CGP 40336A (**28**) (*in vitro*: IC₅₀ = 22 nM, Zellassay: IC₅₀ = 1.2 μM), die mit dem G26-C39-Basenpaar in Wechselwirkung tritt (**31**) (Abbildung 11) und zwischen der Acridin NH-Gruppe und dem N7 des Guanin-Restes eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird dabei zwischen der Methoxygruppe von CGP 40336A (**28**) und der Amino-Gruppe des Cytosin-Rests ausgebildet.^[61] Um die Allgemeingültigkeit dieser Substrukturen zu verdeutlichen, verband man das Spermidin mit Mitonafid. Die Verbindung **30** wies eine stärkere Inhibierung des Tat/TAR-RNA Komplexes als Mitonafid alleine auf. Durch Veränderung der Position des Linkers und dessen Zusammensetzung konnten Einflüsse auf die Wirksamkeit gezeigt werden. Zum Beispiel wird die 9-Position des Acridin-Systems als Linkerstelle toleriert und an der 4-Position kommt es zu einer verminderten Wirksamkeit der Verbindung. Den elektrostatischen Rest über eine Amidinbindung an den Heterocyclus zu knüpfen, führte in allen Fällen zu weniger aktiven Derivaten **29**.

**28****29****30****31**

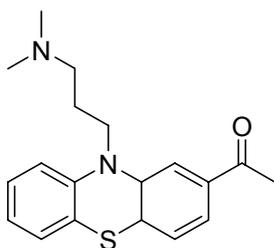
Aromatische Polyamidine wie TAPP (**32**) und TAPB (**33**) weisen in experimentellen Modellsystemen mit HL3T1-Zelllinien Hemmungen der HIV-1 Transkription bei einer Konzentration von 18 bzw. 22 μM auf. Durch den Einbau von Halogen-Atomen in den Benzamidin-Ring konnte die Aktivität der Verbindungen nochmals gesteigert werden.^[51]

**32****33**

Zur Identifikation von Peptid-Liganden werden schon seit längerem *in silico*-Methoden angewandt. Die Anwendung auf TAR-Liganden startete im Jahr 2000 die Gruppe um James et al. mit einem schnellen unbeweglichen Docking Schritt (DOCK) auf die TAR-RNA. Gefolgt von drei flexiblen Docking Schritten (ICM) konnten aus einer Bibliothek von 153000 Substanzen 350 Moleküle selektiert werden, die alle bekannten TAR-Liganden der Klasse der Aminoglycoside enthielten. Neue Strukturen, wie **34** und **35**, weisen einen IC_{50} von ungefähr 1 μM auf.^[62]

**34****35**

Aus einer Bibliothek von 181000 Substanzen wurden nach der gleichen Methode 500 potenzielle TAR-Liganden gefunden, von denen 50 Moleküle in einem *in vitro*-Assay analysiert wurden. Dabei zeigte Acetylpromazin (**36**) eine Substanz mit guter Bioverfügbarkeit und bekanntem pharmakologischen Profil nanomolare Bindungsaffinität. Eindimensionale NMR-Experimente wiesen eine Bindung mit dem Bulge auf, wobei der heteroaromatische Ring Stacking-Wechselwirkungen zwischen den Basenpaaren G26-C39 und A22-U40 einging (Abbildung 11).^[63] NMR-Experimente zeigten, dass Acetylpromazin (**36**) sowohl Wechselwirkungen mit TAR-RNA ($K_D = 270 \mu\text{M}$), als auch mit 16S A-Site RNA ($K_D = 360 \mu\text{M}$), mit einem aus zwei Nukleotiden bestehenden Bulge der Coxsackie Virus B3 RNA ($K_D = 330 \mu\text{M}$) und mit der Hairpin-Loop Region des Polio Virus ($K_D = 1800 \mu\text{M}$) eingeht. Al-Hashimi et al. stellten fest, dass es Acetylpromazin (**36**) nicht möglich ist die Flexibilität der RNA zu behindern, die wichtig für die Assoziation des Tat-Peptides an die RNA ist.^[64]

**36**

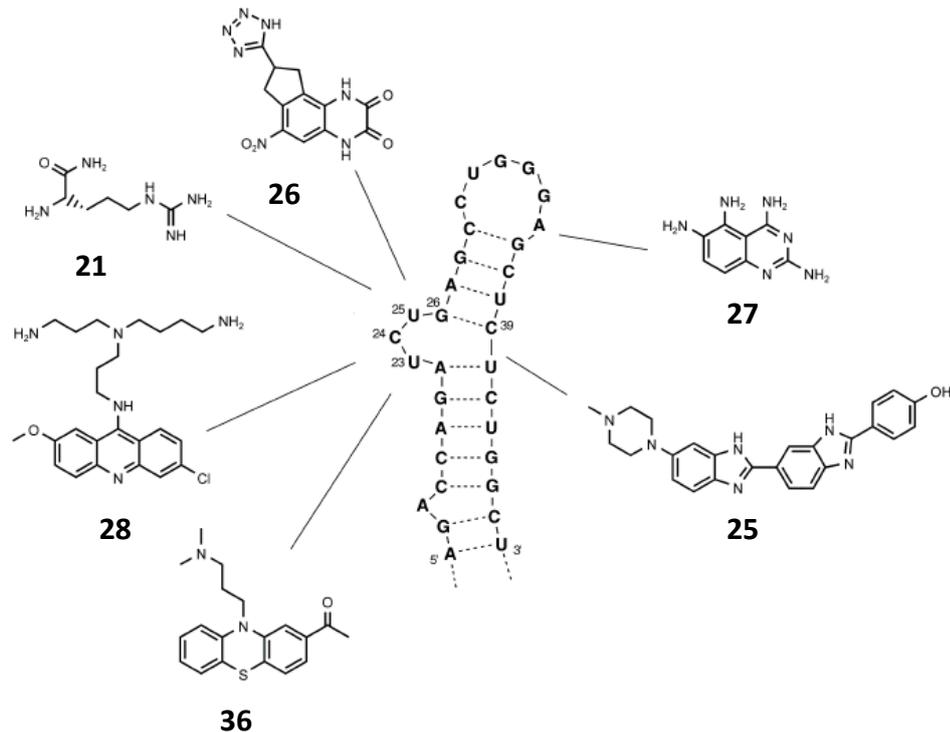
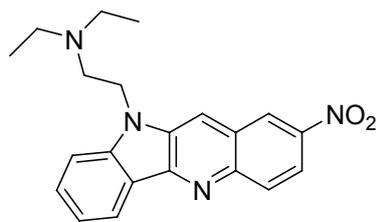
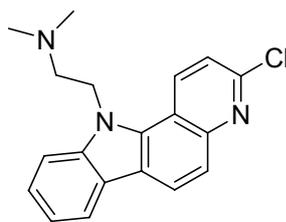
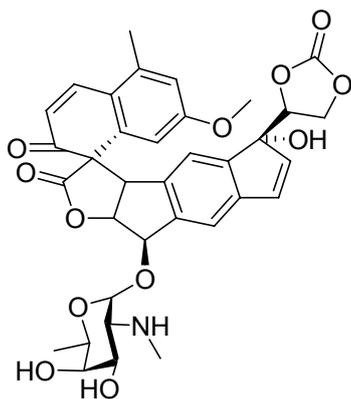
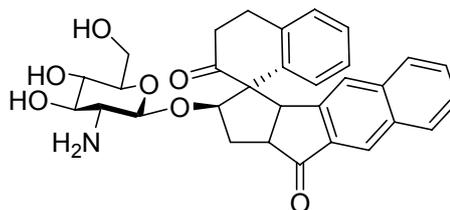


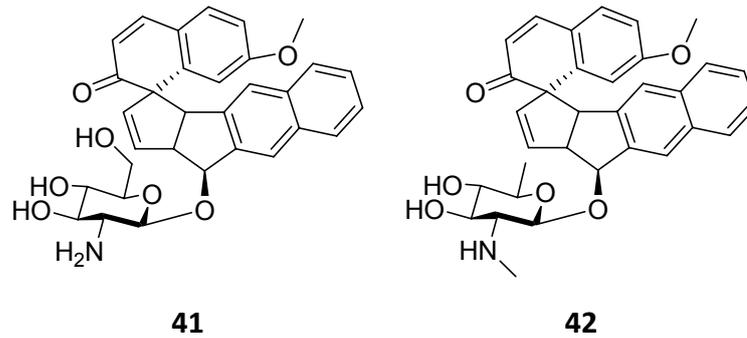
Abbildung 11: Wechselwirkungsorte der einzelnen RNA-Liganden^[51]

Neue Strukturen für TAR-RNA bindende Substanzen wurden über ein virtuelles Screening einer kommerziellen Datenbank aus 229659 Molekülen gewonnen. Dabei wurden 20000 Moleküle als mögliche Arzneistoffe über ein künstliches neutrales Netzwerk ausgesucht, die anschließend über einen unscharfen pharmokophoren Ansatz (SQUID) und einer ausrichtungsfreien pharmakophoren Methode (CATS3D) analysiert wurden. Für die Kalkulierung des SQUID und CATS3D-Modells verwendete man als Modell-Liganden Acetylpromazin (**36**) und CGP 40336A (**28**). Die neu gewonnenen 19 Strukturen wurden über einen auf FRET basierenden Assay auf ihre Eigenschaft als TAR-Ligand untersucht. Beide Modelle führten zu Molekülen, die vergleichbare TAR-Aktivitäten wie Acetylpromazin (**36**) und Chlorpromazin aufwiesen. Durch die CATS3D-Methode wurde das Molekül **37** gefunden, welches einen IC_{50} -Wert von 500 μ M aufwies. Die Struktur **38** basierend auf der SQUID-Methode zeigte die beste Bindungsaffinität zur TAR-RNA mit einem zehnfach besseren Bindungsverhalten ($IC_{50} = 46 \mu$ M).^[65]

**37****38**

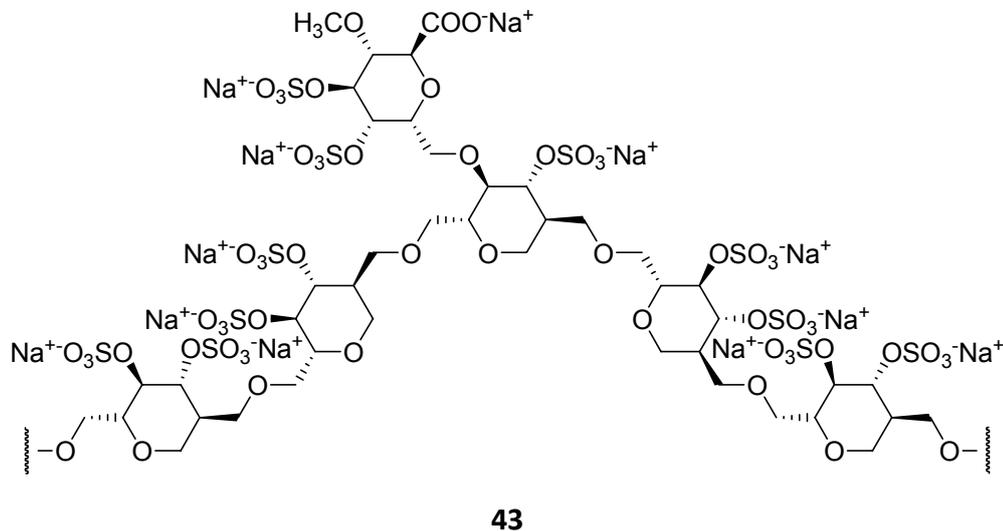
Die thiol-unabhängige Zersetzung des Neocarzinostatin Chromophors führt zu **39**, was zwei aromatische Systeme enthält, die über eine Spiro-Verbindung zusammengehalten werden. **39** ist bekannt für seine Wechselwirkungen mit Bulges von DNAs. Einige Derivate sogenannter Doppeldecker-Interkalatoren (**40-42**) (DDI) zeigen nanomolare Affinitäten zur TAR-RNA. Für die Messung der Affinität der Interkalatoren (**39-42**) machte man es sich zu nutze, dass spirocyclische Grundstrukturen eine eigene Fluoreszenz besitzen. Quenchen dieser Fluoreszenz ermöglicht daher K_D -Werte zu ermitteln. **40** erwies sich als der universellste RNA Bulge Binder, da er Bulges bestehend aus einem bis drei Nukleotiden mit einem durchschnittlichen K_D -Wert von 20 μM bindet. Verbindungen **41** und **42** zeigen die höchste Affinität zu Bulges, bestehend aus zwei Nukleotiden ($K_D = 1.3 \mu\text{M}$ und $K_D = 1.1 \mu\text{M}$). Beim Bulge von HIV-1 TAR-RNA wurde keine Bindung von **41** und **42** festgestellt und beim Bulge von HIV-2 TAR-RNA konnte eine Affinität von durchschnittlich 10 μM gemessen werden. Generell ist zu sagen, dass man aus dem DNA-Bindungsverhalten noch lange nicht auf das allgemeine Bindungsverhalten gegenüber RNA schließen kann.^[66]

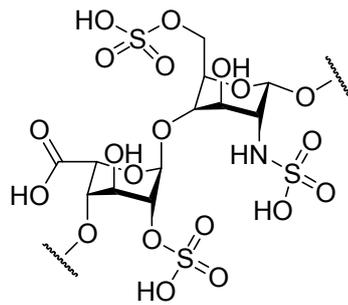
**39****40**



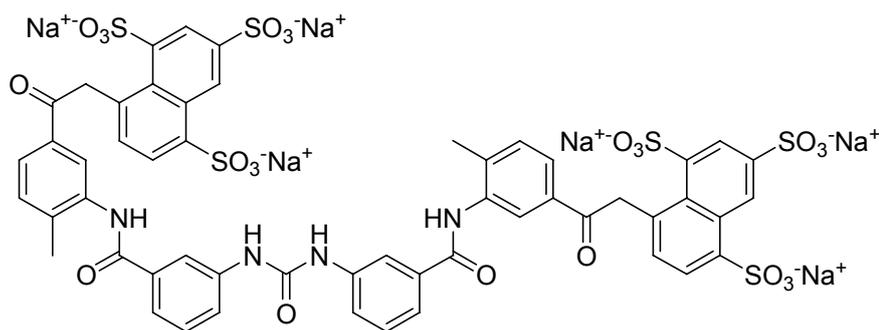
2.1.1.5 Anti-Tat-Protein Wirkstoffe

Eine weitere Methode, die Aktivität der HIV LTR Transaktivierung zu inhibieren, liegt im Einsatz von Anti-Tat-Protein Wirkstoffen. Hauptsächlich werden hierfür anionische Biopolymere eingesetzt, da extrazelluläres Tat eine hohe Affinität zu Polyanionen, wie Pentosanpolysulfat (**43**),^[67] Heparin (**44**), Suramin (**45**)^[68] und Polyacrylsäure (**46**) besitzt. Negativ geladene kleine Moleküle, wie Stilben-Derivat CGA137053 (**47**)^[69] und spezifische menschliche monoklonale Antikörper (HMABs) binden dabei direkt das Tat-Protein, aber nicht die TAR-RNA.^[70]

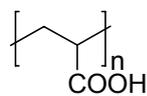




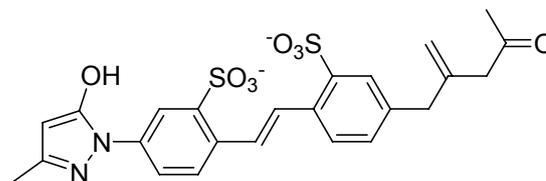
44



45

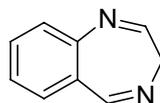


46



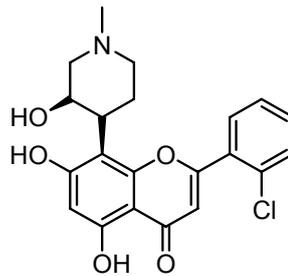
47

Kleine Moleküle, wie 1,4-Benzodiazepin (**48**), die die Grundstruktur für eine Reihe von Tranquilizern beinhaltet, und Epoxysteroide sind für ihre hemmende Wirkung auf die virale Replikation bekannt, wobei Wechselwirkungen nur zum Tat-Protein bestehen.^[71, 72]



48

Ein vielversprechender Ansatz ist die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen Tat und hCycT1, ohne dabei die Funktion des P-TEFb-Komplexes zu beeinträchtigen, der für die zelluläre Transkription essenziell ist. Eine Hemmung des Tat/P-TEFb-Komplexes wurde durch den Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor Flavopiridol (**49**) erzielt, das die Phosphorylierung der RNA Polymerase II verminderte.^[73]

**49**

Antikörper, wie der einkettige menschliche Anti-CycT1 Antikörper, führen zu einer Hemmung der HIV-1 Replikation.

Zwei intrazelluläre Proteine sind ebenfalls für ihre Hemmung des Tat/P-TEFb-Komplexes bekannt: HEXIM1 inhibiert die Kinaseaktivität von P-TEFb und Granulin/Epithelin Protagonist (GEP), das an Cyclin T1 bindet und dadurch die P-TEFb Funktion unterdrückt.

Durch die Fusion von humanen CycT1 mit mutiertem Cdk9-Protein, das seine Eigenschaft zur Autophosphorylierung verloren hat, konnte die Transaktivierung und damit die HIV-1 Genexpression unterdrückt werden.^[74]

Im Allgemeinen ist zu sagen, dass alle Klassen der vorgestellten Verbindungen zur Inhibierung der Transaktivierung keine ausreichende Spezifität und schwache pharmakokinetische Eigenschaften, z. B. Aufnahme in die Zelle und Stabilität aufweisen. Ein Grund für die eingeschränkte Aktivität der Inhibitoren liegt in der Tatsache begründet, dass das Wissen über die Struktur des TAR/Tat/P-TEFb-Komplexes noch nicht ausreichend verstanden ist. Obwohl die RNA die Eigenschaft besitzt sich in komplexe tertiäre Strukturen zu falten, variieren die Konformationen durch die Bindung des Tat-Peptides und anderer zellulärer Faktoren.^[75, 76]

3. EINFÜHRUNG RNA-LIGANDEN

Die moderne Suche nach pharmakologischen Wirkstoffen ist ein hoch industrialisierter Prozess, wobei die Wahrscheinlichkeit, einen Ansatz für mögliche Arzneimittel zu finden durch das Screenen einer hohen Zahl an Zielproteinen gegen eine große Ansammlung von synthetischen Molekülen erhöht werden soll. Um das Fehlerrisiko beim High-Throughput Screening (HTS) zu minimieren, beschränkte man sich bisher hauptsächlich auf bestimmte Familien von Proteinen als Zielstruktur, z. B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Kernrezeptoren, Ionenkanäle und Enzyme.^[77] Seit der Einführung von HTS in den frühen 90er Jahren ist die Ausbeute an neuen Arznei- und Wirkstoffkandidaten sehr gering.^[78] So dass vor etwa zehn Jahren die Pharmaindustrie und Biotech-Firmen die Adressierung auf Ebene der RNA als alternativen Ansatz gegenüber der Fokussierung auf Proteine erkannte. Da auch etwa die Hälfte aller bekannten Antibiotika ihre Wirkung durch Bindung an die ribosomale RNA entfalten. RNA wird durch Antisense-Oligonukleotide, small inhibitory RNAs (siRNA) oder RNA-Enzyme (Ribozyme) adressiert, wobei der sequenzspezifische Ansatz bisher auf ein von der FDA genehmigtes Medikament Vitravene[®] (Fomivirsen) von Isis Pharmaceuticals gegen Cytomegalovirus (CMV) Retinitis bei Patienten mit AIDS beschränkt ist.^[79] Ein entscheidendes Charakteristikum der RNA ist die Tatsache, dass die RNA sich in dreidimensionale komplexe Strukturen faltet, einschließlich Loops, Bulges, Pseudoknoten und Turns.^[80] Diese Strukturen sind verantwortlich für die unterschiedlichen Aktivitäten von RNA-Molekülen in Zellen. Unter diesem Gesichtspunkt ähnelt RNA eher den Peptiden als der DNA, die weniger flexible und unterschiedliche tertiäre Strukturen besitzt.^[81] Die einzigartige Gestalt verschiedener RNAs bieten potenzielle Bindungsstellen für kleine Moleküle.^[80] Jedoch ist der Ansatz der Adressierung der RNA von der Pharmaindustrie und Biotech-Firmen heute praktisch aufgegeben worden.

3.1 Welche Stellen durch kleine Moleküle adressiert werden

Optimal für die Adressierung der RNA sind Störungen in der A-Form-Helix der RNA, die zu Sekundärstrukturen, wie Hairpin-Loop „hairpin-Loop“, Strang-Loop „Stem-Loop“, Pseudoknoten „pseudoknots“ und Bulge „bulge“ führen. Die doppelhelicalen Domänen der Sekundärstrukturen werden über Watson-Crick-Basenpaarung gebunden. Anders als die Major und die Minor Groove von DNA, wo die Bindung von kleinen Molekülen ermöglicht

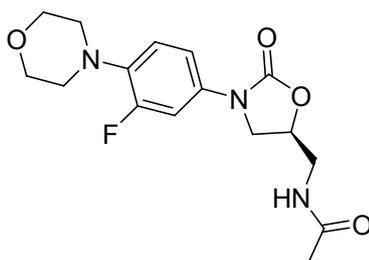
wird, bietet die Major und die Minor Groove von RNA keine optimale Bindungsstelle.^[82] In der A-Form-Helix sind die Nukleobasen von der Helixachse nach außen in die Minor Groove verschoben und zur Helixachse beträchtlich geneigt. Die Major Groove der RNA ist tief und schmal, während die Minor Groove eine flache und weite Struktur besitzt, so dass die RNA in ihrer einzigartigen Geometrie der A-Form-Helix für Bindung von kleinen Molekülen wenig förderlich ist. Die Anwesenheit der 2'-Hydroxygruppe im Pentose-Ring erlaubt der RNA eine C3'-*endo* Faltung der Ribose-Einheit, was zu einem gleichzeitigen Wechsel in der Neigung und Drehung der Basen und zu einem kurzen Abstand von ~ 5.9 Å zwischen zwei Phosphaten führt.^[13]

Die Major Groove von RNA ist reich an Informationen, da die Basenpaare ihre charakteristischen Ränder in die Major Groove projizieren.^[82, 83] Computerbasierte Studien haben gezeigt, dass positiv geladene Moleküle eher an der Major Groove binden, da diese eine größere Elektronendichte besitzt als die Minor Groove.^[84] Einer Studie zufolge ist die Major Groove der A-Form-Helix, nur 4 Å weit, was schon aus sterischen Gründen eine Bindung kleiner Moleküle ausschließt.^[82] Die einzigen definierten Funktionen in der flachen Minor Groove sind die 2'-Hydroxygruppen.^[85] Trotzdem binden einige Liganden an die Major Groove des RNA Duplex.^[86] Störungen durch Un- bzw. Fehlpaarung von Nukleobasen führen zu einem Aufweiten der Major Groove, das zu einer Entstehung einer Bindungstasche führt, das die Basis für die Adressierung der RNA mit Proteinen und kleinen Molekülen darstellt. Diese Bindungstaschen weisen unterschiedliche Grade an negativem Potenzialen auf. Dies stellt einen Unterschied zu den Bindungstaschen von Proteinen dar, wo negative und positive Potenziale verteilt sind.^[84]

Tertiärstrukturen innerhalb der RNA kommen durch nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen Nukleobasen, zwischen Nukleobasen und dem Phosphatrückgrat und zwischen Rückgratresten zustande.^[12]

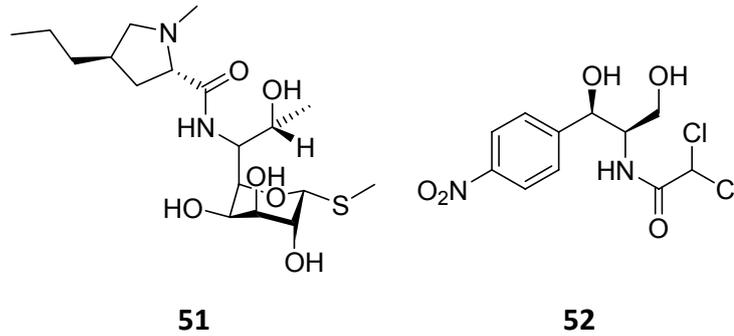
3.1.1 Antibakterielles Target: Das Ribosom

Das Ribosom besteht aus ribosomaler RNA (rRNA) und ribosomalen Proteinen. Prokaryontische 70S Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten. Die kleine Untereinheit (30S) ist dafür verantwortlich, dass nur die korrekte tRNA ihre zugehörige Aminosäure in das entstehende Polypeptid einbauen kann. Das Korrekturlesen findet an der 16S rRNA A- (Aminoacyl-) Site statt, einem Teil der 30S Untereinheit. Dabei führt die korrekte Codon-Anticodon-Paarung der mRNA mit der jeweiligen tRNA zu einer extrahelicalen Konformation der Reste A1492 und A1493. Nicht korrekte Paarung einer tRNA leitet keine Konformationsänderungen ein.^[87] Die große Untereinheit (50S) hat eine katalytische Funktion bei der Bildung von Peptidbindungen. Die jeweiligen Funktionen der Untereinheiten, wie korrekturlesen und katalysieren wurden durch rRNA bewirkt, kein ribosomales Peptid ist direkt an diesen Schritten beteiligt.^[88] Von etwa der Hälfte aller bekannten Antibiotika ist eine Affinität zum Ribosom bekannt, die am genauesten untersuchte Klasse sind die Aminoglycoside, eine Gruppe von Oligosaccharid-Antibiotika. Die größte Anzahl der Aminoglycoside, wie beispielsweise 4,5- und 4,6-substituierte Desoxystreptamine, bindet an die A-Site der 30S-Untereinheit und stört dort das Korrekturlesen und führt so zum fehlerhaften Einbau von Aminosäuren.^[89, 90] Linezolid (**50**) (Zyvoxid[®]) von Pfizer ist ein Antibiotikum der Oxazolidinon Klasse, die bei der Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Bakterien, wie Streptococcus und methicillinresistenten Staphylococcus aureus (MRSA) eingesetzt werden.^[88]



50

Ansatzpunkt dieses synthetischen Antibiotikums ist der Beginn der Proteinsynthese. Dabei verhindert es die Bindung der beiden Untereinheiten 30S und 50S. Linezolid (**50**) bindet an die 23S rRNA in der 50S Untereinheit, wo ebenfalls die Antibiotika Lincomycin (**51**) und Chloramphenicol (**52**) binden.^[91]



Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung von fMet-tRNA (Start-tRNA) an die P-Stelle der 50S ribosomalen Untereinheit durch Oxazolidinone verhindert wird, so dass der Aufbau der ersten Peptidbindung unterbleibt.^[92]

3.1.2 Antibakterielles Target: tRNA

Eine antibakterielle Strategie ist die Inhibierung von Aminoacyl-tRNA Synthetasen, die für die Kupplung („charging“) der Aminosäure zur jeweiligen tRNA verantwortlich ist. Nur durch diesen Prozess ist es der nun beladenen tRNA möglich, an den Initiations- und Elongationsprozessen der Protein-Biosynthese teilzunehmen.^[93] Als Beispiel ist das Aminoglycosid Neomycin zu nennen, das die Beladung von tRNA^{Phe} ($K_i \sim 300 \mu\text{M}$) inhibiert, wobei eine Bindungsstelle des Neomycins in der variablen Loop-Region liegt.^[94]

3.1.3 Antibakterielles Target: T-Box

Die T-Box ist ein regulatorisches RNA Element, das in der 5'-untranslatierten Region (UTR) angesiedelt ist. Die T-Box reguliert die Expression von Aminoacyl-tRNA Synthetase und anderer Proteine der Biosynthese von Aminosäuren. Die aus 14 Nukleotiden bestehende T-Box kann unterschiedliche Konformationen annehmen und bindet spezifisch durch vier Basenpaare mit dem 3'-Ende ungeladener tRNAs, das zur Stabilisierung der Antiterminatorstruktur der T-Box und damit zur Expression der regulierten Proteine führt.^[95] Die Sekundärstruktur der Antiterminatorstruktur beinhaltet einen aus sieben Nukleotiden bestehenden Bulge, der zwei helikale Segmente unterbricht. Die niedrige Verfügbarkeit von Aminosäuren führt zu einer hohen Anzahl an unbeladener tRNA, was durch T-Box/tRNA-Wechselwirkung zu einer Zunahme der für die Biosynthese von Proteinen benötigten

Enzymen führt.^[96] Eine antibakterielle Zielstruktur wäre daher die Inhibierung der T-Box/tRNA-Wechselwirkung. Durch NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Bulge Region statische und hochdynamische Reste beinhaltet. Affinität zur T-Box Antiterminator RNA weisen verschiedene Aminoglycoside auf, wobei Neomycin mit einer Dissoziationskonstante von 8.5 μM und Streptomycin mit 790 μM binden. Die Affinitäten der Aminoglycoside sind vergleichbar mit den tRNAs, die eine Wechselwirkung mit dem Bulge eingehen.^[97]

3.1.4 Antivirales Target: Trans Activating Response RNA

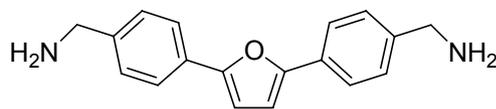
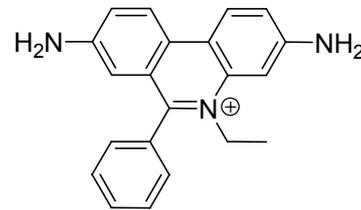
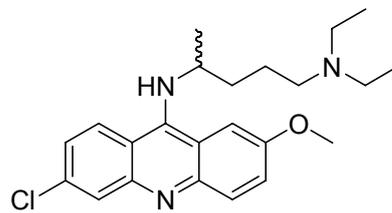
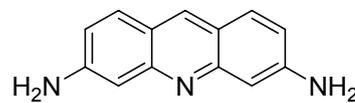
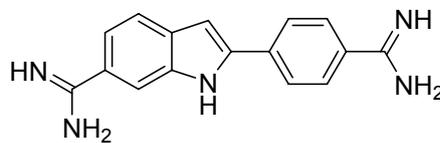
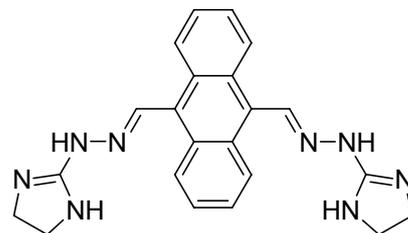
Siehe hierfür Kapitel 2.1.1..

3.1.5 Antivirales Target: Rev Responsivelement RNA

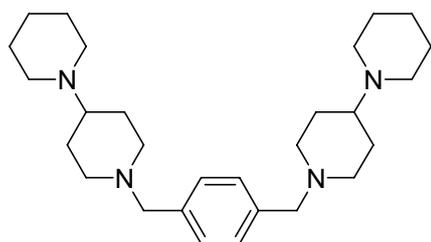
Das Rev-Protein ist verantwortlich für den Transport der viralen RNA vom Nukleus in das Cytoplasma. Dafür bindet das Peptid an ein hochstrukturiertes RNA-Segment, das als Rev Responsivelement (RRE) bezeichnet wird. Das aus einer Reihe von Strang-Loop-Strukturen bestehende RNA Segment in der *env* Codierungssequenz wird von einer argininreichen Region des Rev-Proteins am Strang IIB gebunden, so dass der RNA/Protein-Komplex aus dem Nukleus in das Cytoplasma gelangt, da das Rev-Protein im Bereich des Carboxyl-Terminus ein Kern-Exportsignal besitzt. Außerdem verhindert die Komplexbildung eine weitere Prozessierung der RNA.^[24, 98] Es konnte gezeigt werden, dass das Aminoglycosid Neomycin an RRE mit einem K_D -Wert von 100 nM und einer Stöchiometrie von 3:1 bindet und die Komplexbildung mit dem Rev-Protein mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 1 \mu\text{M}$ inhibiert wird. Im Verdrängungs-Assay bildet sich bei niedriger Konzentration von Neomycin ein Neomycin-Rev-RRE-Komplex, der erst mit höherer Konzentration von Neomycin in einen RRE-Komplex mit zwei Aminoglycosiden übergeht und das Rev-Protein verdrängt.^[99]

3.2 Bindungsstelle: Doppelsträngige Bereiche

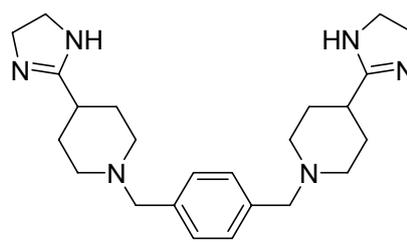
Es gibt verschiedene Proteine, die Wechselwirkungen mit doppelsträngiger RNA eingehen, wobei das Bindungsmotiv der Sekundärstruktur α - β - β - α immer vorkommt. Dabei verbinden sich die erste α -Helix und die Loop-Region mit dem β -Faltblatt, das verantwortlich für die Bindung zur Major und Minor Groove ist. Die Erkennung kommt durch die Bindung der 2'-Hydroxygruppe und dem Phosphatrückgrat zustande.^[100] Viele DNA-Interkalatoren, wie das Furanderivat **53**, Ethidium (**54**), Chinacrin (**55**), Proflavin (**56**), DAPI (**57**) und Bisantren (**58**) binden an doppelsträngige RNA. Die Assoziation zur DNA ist aber bei fast allen Molekülen bevorzugt.

**53****54****55****56****57****58**

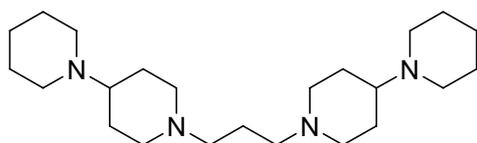
Bei der Suche nach Verbindungen, die die doppelsträngige RNA selektiv binden, aber keine Assoziation zur DNA eingehen, fand man Moleküle (**59-62**) mit flexiblem Grundgerüst und geladenen Zentren.^[101]



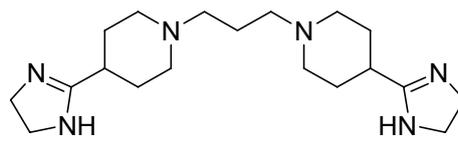
59



60

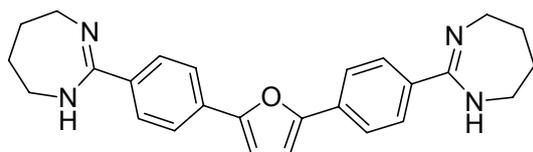


61

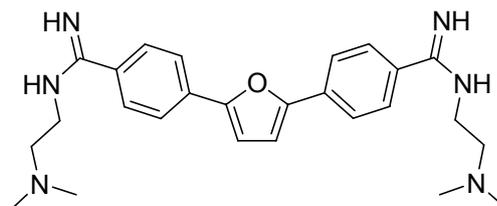


62

Durch den Einsatz von großen geladenen Substituenten (**63**, **64**) kommt es zu einer ionischen Bindungsweise, als auch zu einer interkalatorischen. (Man vergleiche **63** und **64** mit **53**).^[102]

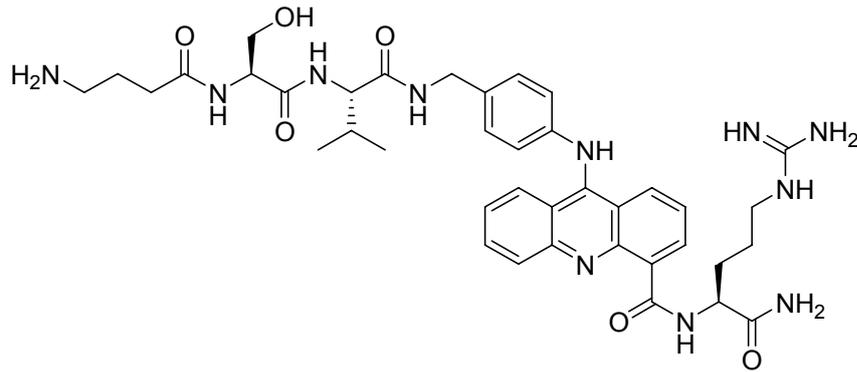


63



64

Eine Erkennung der doppelsträngigen Helix wird ermöglicht durch Störung des Duplexes, was zu einem besseren Zugang für Liganden führt. Es kommt in der Helix zu einer erhöhten Dynamik der Konformation, die Interkalationsverbindungen den Eintritt ermöglicht. Dabei kommt es zu „stacking“-Wechselwirkungen innerhalb der Helix, so dass die Substituenten des Interkalators an den entgegengesetzten Seiten des Duplex angeordnet sind. Ein Beispiel für ein solches „helix-threading“ Peptid (HTP) ist das auf einem 9-Anilinacridin-4-carboxamid-Grundgerüst aufgebaute Peptid Ser-Val-Acr-Arg (**65**), das über zwei Basenpaare bindet, die benachbart zu einem Bulge stehen.^[103]



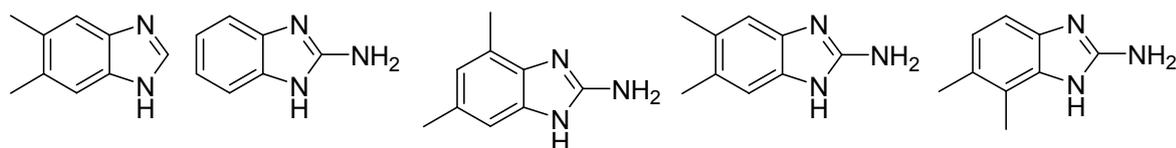
65

3.3 Interne Loops bindende Verbindungen

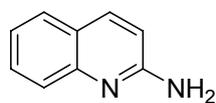
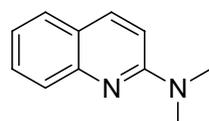
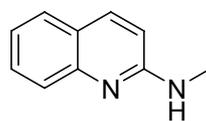
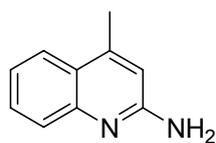
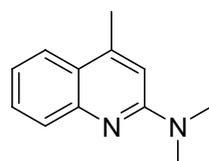
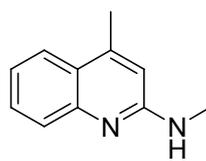
Die Stabilität von internen Loops ist sowohl sequenzabhängig, als auch abhängig von Symmetrie und Größe des Loops. Beispielstrukturen für interne Loops sind die 16S A-Site RNA, Rev response element (RRE) RNA und Thymidylat-Synthetase mRNA.

3.3.1 16S A-Site RNA

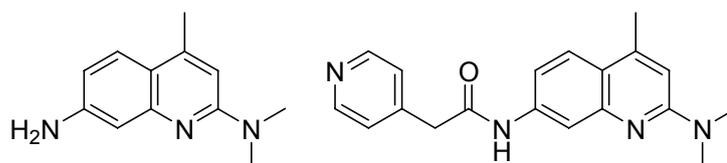
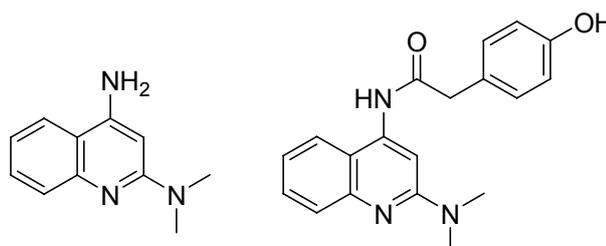
Bekannte Moleküle, die Wechselwirkungen mit 16S A-Site RNA eingehen, sind Aminoglycoside. Synthetische Analoga der Aminoglycoside wurden für die Untersuchung auf Wechselwirkungen hergestellt. Ziel der Untersuchungen waren außer dem Bindungsverhalten die Resistenz gegen Aminoglycosid modifizierende Enzyme, die Aminoglycoside acetylieren, phosphorylieren und ADP-ribosylieren. Die dazu verwendeten Substrukturen sind Neamin^[104]-, Paramycin^[105] - und heterocyclische 2-Deoxysteptamin (DOS)-Derivate.^[106] Auf der Suche nach neuen Grundstrukturen für die Wechselwirkung mit dem internen Loop der 16S A-Site RNA setzte man auf NMR-Experimente. Die Region der Imino-Protonen des internen Loops sind sehr gut durch NMR auflösbar. Daher konnte durch Zugabe eines potentiellen RNA-Liganden bei Veränderungen im Spektrum sowohl eine Wechselwirkung als auch der Ort der Wechselwirkung nachgewiesen werden. Einfache Benzimidazolderivate (**66-70**) zeigten, dass sie im μM -Bereich die 16S A-Site RNA binden. Die Einführung eines Amin-Substituenten an der 2-Position (**67**) führte zu einer vierfachen Erhöhung der Bindungsaffinität, wohingegen die Einführung von Methylsubstituenten (**68-70**) an unterschiedlichen Positionen keine Verbesserung bewirkt.^[107]

**66** $K_D = 810 \mu\text{M}$ **67** $K_D = 230 \mu\text{M}$ **68** $K_D = 260 \mu\text{M}$ **69** $K_D = 220 \mu\text{M}$ **70** $K_D = 160 \mu\text{M}$

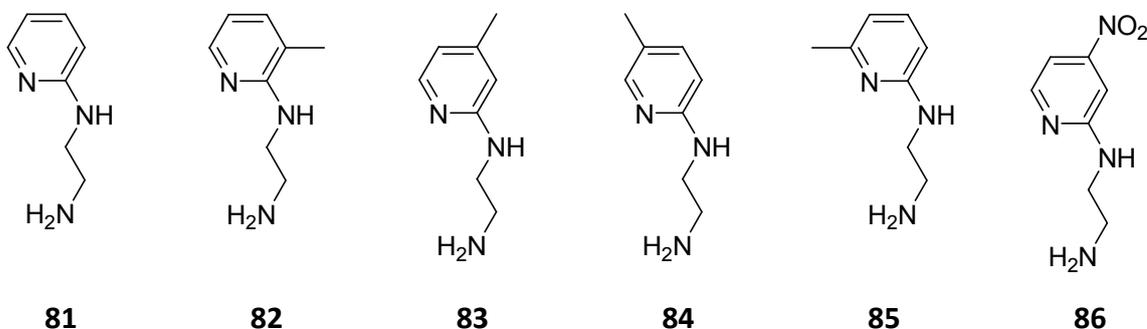
2-Aminochinoline (**71-76**) zeigen ebenfalls Affinitäten zu internen Loops mit K_D -Werten von 3180 μM bis 60 μM . Methylsubstituenten an der 4-Position von **74** erhöhen dabei die Bindung um das 35-fache und Methylierung am exocyclischen Amin **73** führen zu einer Affinitätssteigerung um das sechsfache im Vergleich zum 2-Aminochinolin (**71**).

**71** $K_D = 3180 \mu\text{M}$ **72** $K_D = 990 \mu\text{M}$ **73** $K_D = 490 \mu\text{M}$ **74** $K_D = 90 \mu\text{M}$ **75** $K_D = 170 \mu\text{M}$ **76** $K_D = 60 \mu\text{M}$

Auf der Grundlage von NMR-Experimenten gewonnenen Strukturinformationen des RNA/Ligand-Komplexes wurden an der 4- und 7-Position des 2-Aminochinolin-Gerüst Substituenten eingefügt. Das dargestellte 7-Amino-2-dimethylaminolepidin (**77**) and 4-Amino-2-dimethylaminochinolin (**79**) ermöglichen leichte Derivatisierung am Amino-Rest. Durch die Verschiebung der Imino-Protonen abhängig von der Konzentration fand man heraus, dass die Amine (**77** und **79**) höhere Bindungsaffinitäten im Vergleich zu den Analoga (**72** and **75**) haben. Weitere Amid-Substituenten (**78** und **80**) führten dabei zu Verbindungen mit Affinitäten im niedrigen μM -Bereich.

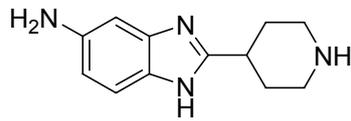
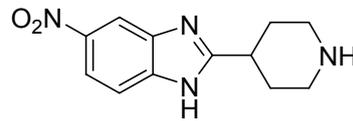
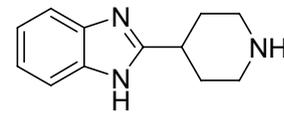
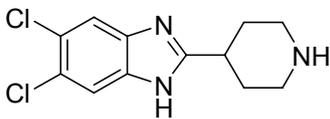
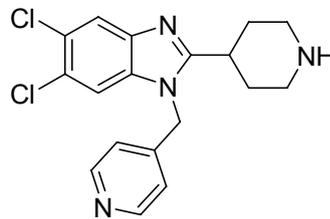
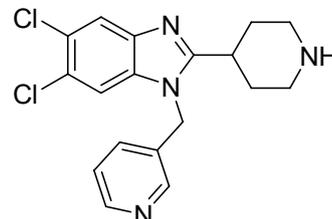
**77** $K_D = 35 \mu\text{M}$ **78** $K_D = 18 \mu\text{M}$ **79** $K_D = 60 \mu\text{M}$ **80** $K_D = 9 \mu\text{M}$

2-Aminopyridine (**81-86**) wurden ebenfalls als Grundstrukturen mit hoher Affinität durch Screening erkannt. Methylierung an der 2- (**82**) und 6-Position (**85**) führt zur Reduzierung der Affinität, wohingegen die Methylierung an der 4- (**83**) und 5-Position (**84**) zu einer verbesserten Bindung beiträgt.^[107]

**81** $K_D = 68 \mu\text{M}$ **82** $K_D = 600 \mu\text{M}$ **83** $K_D = 3 \mu\text{M}$ **84** $K_D = 22 \mu\text{M}$ **85** $K_D = 105 \mu\text{M}$ **86** $K_D = 10000 \mu\text{M}$

Um den Nachteil des NMR-Screenings, die hohe Konzentration und damit der hohe Verbrauch an RNA zu umgehen, setzte man bei der Suche nach weiteren interessanten Grundstrukturen auf das ESI-MS Verfahren, in dem die Komplexbildung durch eine Verschiebung des Massensignals im Vergleich zur freien RNA detektiert werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die Aufklärung der Verhältnisse von Ligand zu RNA. Keine Informationen werden jedoch über den Ort der Bindung gewonnen. Bei der Untersuchung von Komplexbindungen von verschiedenen Grundstrukturen auf 16S A-Site RNA fand man in Benzimidazolen (**87-92**) mit weiteren Verdrängungsassays im Vergleich mit Glucosamin die Bindungsstelle am internen Loop. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Substituenten am

Aromaten ermittelte man, dass der Einsatz einer Nitrogruppe die Affinität zwar erhöht (**88**), aber kein Substituent (**89**) oder zwei Halogene (**90**) bessere Affinitäten erzeugen. Weitere Substitutionen an N1 führten bei verschiedenen Derivaten zu einer schwächeren Bindung, wohingegen Pyridinylanaloga (**91** und **92**) im Vergleich zum unsubstituierten Derivat eine zweifache Verbesserung der Bindungsaffinität bewirkten.^[108]

**87** $K_D = 500 \mu\text{M}$ **88** $K_D = 308 \mu\text{M}$ **89** $K_D = 108 \mu\text{M}$ **90** $K_D = 174 \mu\text{M}$ **91** $K_D = 60 \mu\text{M}$ **92** $K_D = 67 \mu\text{M}$

3.4 Bulge bindende Verbindungen

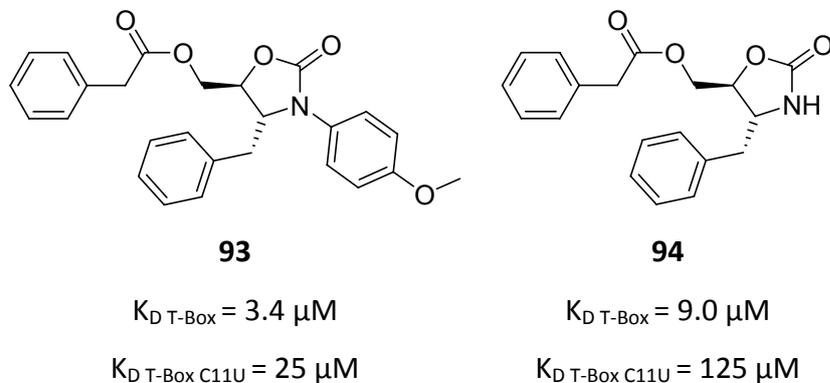
Eine Bulge-Region entsteht durch eine oder mehrere ungepaarte Nukleobasen, die nur auf einer Seite ausgebildet werden. Mit größer werdenden Bulges kommt es zu immer stärkerer Destabilisierung von Duplex-Bildungen in den angrenzenden Regionen des Bulges. Dabei besitzen die Bulges definierte Faltungen, die mit RNA-Liganden Wechselwirkung eingehen können. Dazu gehören die Bulges der TAR-RNA, T-Box-RNA und das iron response Element (IRE) RNA.

3.4.1 TAR-RNA

Siehe hierfür Kapitel 2.1.1..

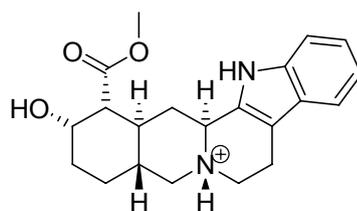
3.4.2 T-Box RNA

Eine Bibliothek aus 3,4,5-trisubstituierten Oxazolidinonen wurde auf ihr Bindungsverhalten gegenüber T-Box RNA und der Mutation T-Box C11U untersucht. Mit auf Fluoreszenz basierenden Assays konnten übereinstimmende Affinitäten bestimmt werden. Verglichen wurde ein Assay bei dem im Bulge A9 durch 2-Aminopurin ausgetauscht wurde mit einem Assay mit FRET-Paaren endmarkierter T-Box und T-Box C11U. T-Box RNA wies dabei im Gegensatz zu T-Box C11U eine sieben Mal höhere Affinität zu **93** auf. Durch die Entfernung des Methoxyphenyl-Substituenten **94** wurde zwar die Affinität um das dreifache schwächer, aber die Selektivität erhöhte sich.^[109]



3.4.3 Iron response Element (IRE) RNA

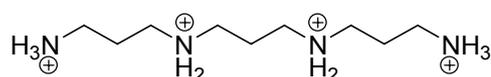
Ferritin ist ein Eisen-Speicher und Transportprotein aus dem Cytoplasma. Es ist ein wichtiges Bindeglied im Eisenhaushalt des menschlichen Organismus, da die benötigte Eisenmenge infolge der schlechten Löslichkeit von Eisen(III)-Salzen sonst ausflocken würde. Unter normalen zellulären Bedingungen bindet das Eisen-Responselement-bindende Protein (IRP) an das Eisen-Responselement (IRE) der Ferritin mRNA und unterdrückt dabei die Expression des Ferritins. Durch Bindung eines kleinen Moleküls an das Ferritin IRE (fIRE) wäre es möglich, die Wechselwirkung des IRP zu unterdrücken und damit die Anzahl des Ferritins zu erhöhen. Durch Footprinting konnte gezeigt werden, das Yohimbin (**95**) an die Reste oberhalb und unterhalb des Bulges des fIRE bindet. Durch Abnahme der Fluoreszenz des Yohimbins (**95**) konnte ein K_D -Wert von $3.9 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Yohimbin (**95**) zeigte auch zu weiteren RNAs Affinitäten, wie z.B. zu TAR-RNA, bei dem ein K_D -Wert von $9.1 \mu\text{M}$ bestimmt werden konnte.^[110]



95

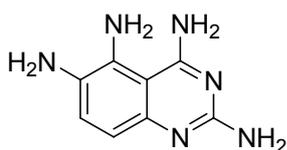
3.5 Hairpin-Loop bindende Verbindungen

Es kommt zur Bildung von Hairpin-Loops durch die Faltung einer Sequenz zu einem Duplex, der verbunden ist durch einen Einzelstrang. Hairpin-Loops sind beteiligt an RNA-Protein- und RNA-RNA-Wechselwirkungen. Das erste kleine Molekül, das als Hairpin-Loop bindendes Molekül identifiziert wurde, ist das Spermin (**96**). Das Polyamin **96** konnte im Kristall der tRNA^{Phe} röntgenspektroskopisch nachgewiesen werden. Eine der Bindungsstellen ist die Major Groove am Ende des Anticodons und eine weitere liegt im variablen Loop. Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Effekte des Polykations **96** sind für die Affinität verantwortlich. Durch NMR-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass das Spermin (**96**) die tertiäre Struktur der RNA stabilisiert und die Erkennung der Aminoacyl-tRNA Synthetasen unterstützt.^[12]



96

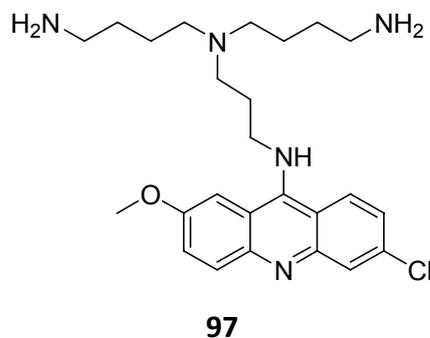
Ein Screening von 150000 Substanzen führte zu Tetraaminochinoxalin (**27**), das sowohl am Bulge, als auch am 3'-Ende des TAR-Loops bindet. Durch Gel-Shift-Assay und ESI-MS konnte die Wechselwirkung mit dem Loop nachgewiesen werden, jedoch konnten Footprint-Methoden nur Bindungen am Bulge nachweisen.^[60]



27

3.5.1 U1A snRNA Hairpin-Loop

Stem-Loop 2 der U1A snRNA bindet *in vivo* mit dem U1A-Protein und kontrolliert das Spleißen von eukaryontischer pre-mRNA. Es zeigte sich, dass für die Bindung das letzte GC-Basenpaar vor dem Loop essentiell ist. Bei der Suche nach Substanzen, die mit CG oder GC-Basenpaaren und mit den angrenzenden Sekundärstrukturen wechselwirken, fand man in der Literatur **27** und **97**. Mit Hilfe eines Gel-Shift-Assays konnte gezeigt werden, dass **97** die U1A snRNA-Wechselwirkung mit Stem-Loop 2 mit einem IC_{50} von 1 μ M unterdrückt. Substanz **27** zeigte keinerlei Wirkung bis zu einer Konzentration von 10 mM. Durch ein Titrationsexperiment, das auf der Eigenfluoreszenz von Acridin basierte, konnte ein 2:1 Stöchiometrie (**97**:U1A snRNA) ermittelt werden.^[111]

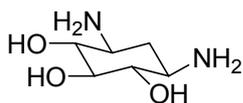
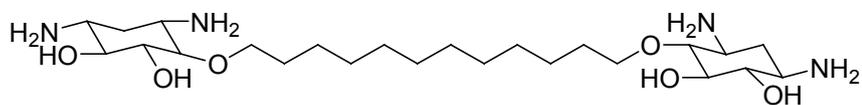
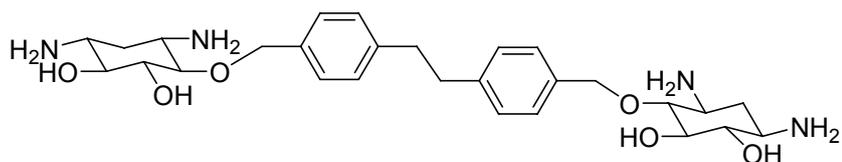
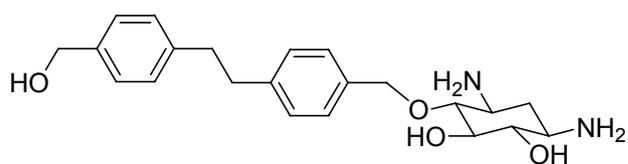
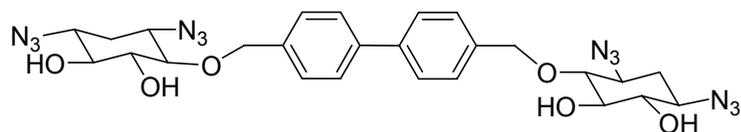


3.5.2 GNRA Tetra-Loop

In GNRA steht das R für eine Purin-Base. Die Struktur vermittelt die tertiären Kontakte, wie sie bei Gruppe I Introns, Ribozymen und Ribosomen vorkommen. Von getesteten Verbindungen wies wiederum nur Substanz **97** eine Affinität ($K_D = 1.6 \mu$ M) und eine Stöchiometrie von 1:1 auf.^[112]

2-Deoxystreptamin (**98**) (DOS) ist ein Ligand, der Hairpin-Loops mit millimolarer Affinität bindet. Durch die Einführung von verschieden langen Linkern jeglicher Art wurde versucht, moderate Bindungsaffinitäten zu erreichen. Dabei wurden DOS Dimere (**99** und **100**) auf ihre Affinitäten zu Tetra-, Hexa-, Hepta- und Octa-Hairpin-Loops untersucht. Affinitäten im unteren μ M-Bereich konnten bei Substanz **99** und **100** erreicht werden. In den Fällen, in denen Bindung zum Hairpin-Loop beobachtet werden konnte, wurden vergleichbare Affinitäten zur ganzen Bandbreite von Hairpin-Loops festgestellt, was die Klasse der DOS

Dimere (**99** und **100**) als generelle RNA Hairpin-Loops bindende Substanzklasse auszeichnet. Es zeigte sich, dass das Dimer **100** das Leistungsfähigste mit einem K_D -Wert von $6 \mu\text{M}$ ist, das auch an Hepta-Loops mit unterschiedlichen Sequenzen mit gleicher Affinität bindet. Dass der dimere Charakter und elektrostatische Wechselwirkungen notwendig sind, zeigte sich bei Verbindungen **101** und **102**, bei denen man keinerlei Wechselwirkungen mit Hairpin-Loop RNA nachweisen konnte.^[113]

**98****99****100****101****102**

4. PEPTID-NUCLEINSÄURE (PNA)

Auf der Suche nach neuen DNA-Diagnostika und Oligonukleotid-Therapeutika versuchte man, Oligonukleotide durch die Modifikationen im Zucker-Phosphat-Rückgrat oder der Nucleobasen zu optimieren. Die Peptid-Nucleinsäure (PNA) stellt eine solche Imitation der DNA dar, die mit Nucleinsäuren hybridisieren kann, was durch die Anwendung der komplementären Nucleobasen ermöglicht wird.

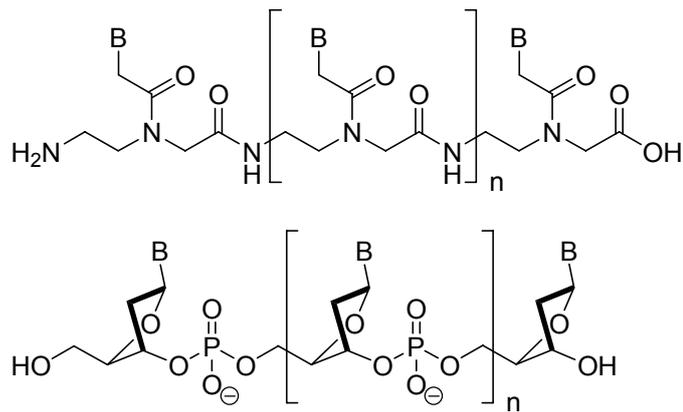


Abbildung 12: Strukturen von PNA und DNA. B = Nucleobase

Durch die Anwendung eines peptidähnlichen Grundgerüsts konnte eine neutrale Imitation der DNA geschaffen werden, so dass elektrostatische Abstoßungen zwischen dem Imitat und der negativ geladenen DNA bzw. RNA vermieden werden. Ein weiterer Vorteil der Peptid Chemie liegt auch in der Tatsache, dass die PNA Monomere durch bestehende Festphasensynthese zu Oligomeren verknüpft werden können.^[114] Dabei können Reportergruppen, Interkalatoren und weitere Reste an den N oder C-Terminus gekuppelt werden. PNA Oligomere sind stabil gegen Nucleasen und Proteasen und der achirale Charakter macht Aufreinigungen zur Enantiomerenreinheit unnötig.^[115]

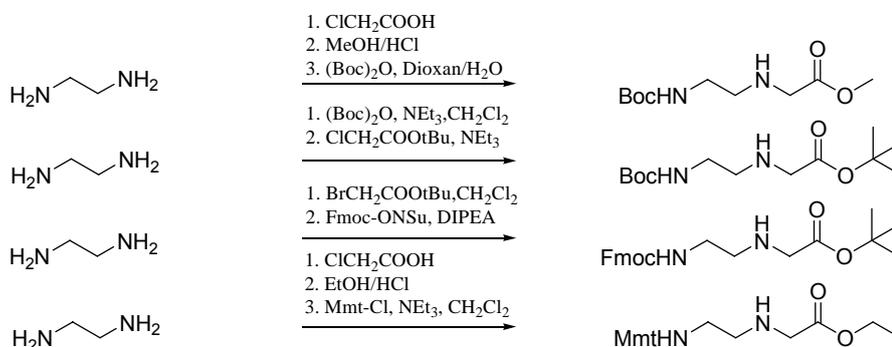
4.1 Monomere Bausteine für die Synthese von PNAs

4.1.1 Synthese eines geschützten N-Aminoethylglycin-Grundgerüsts

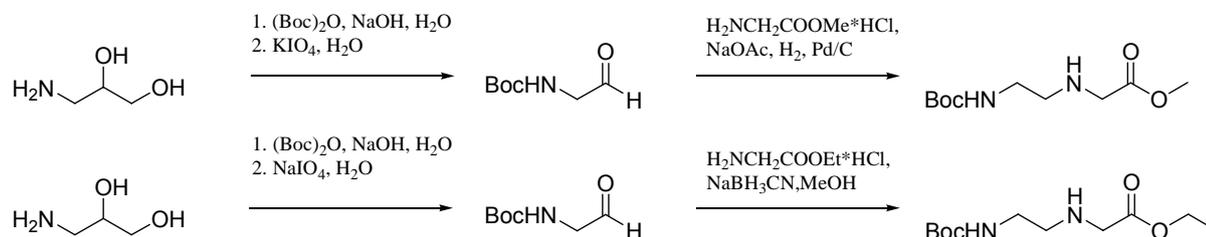
Die monomeren Bausteine zur Synthese von PNAs unterscheiden sich in der Art der Schutzgruppe der Aminogruppe, der Struktur des Grundgerüsts und/oder in der Nucleobase. Das klassische PNA Monomer besteht aus der Aminosäure N-(2-Aminoethyl)glycin, bei der die sekundäre Amino-Gruppe mit einem nucleobasetragenden Essigsäurederivat acyliert wurde. Säure oder basenlabile Schutzgruppen werden normalerweise für die primäre Amino-Gruppe verwendet. Die Darstellung der Monomere führt auf zwei Wegen zum Ziel: Zuerst die Synthese eines brauchbar geschützten N-Aminoethylglycins und des Weiteren die Darstellung eines Derivats der Nucleobasesessigsäure.^[116]

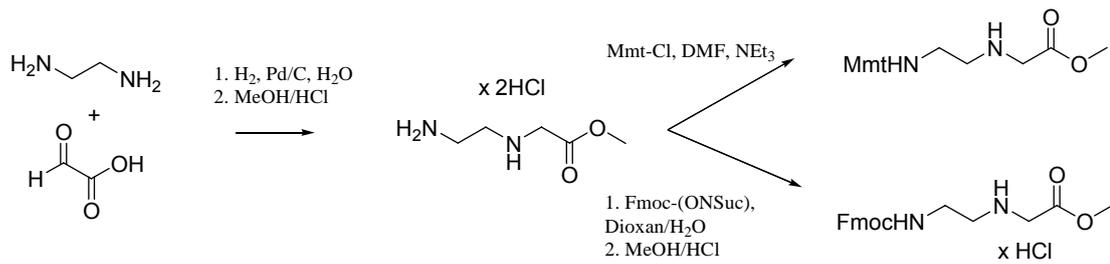
Die folgenden Abbildungen zeigen die drei wichtigsten Darstellungsverfahren zu Aminoethylglycin:

1. Alkylierung von Ethylendiamin mit Derivaten der Halogenessigsäure^[117-120]:



2. Reduktive Aminierung mit Glycinester und geschützten Aminoacetaldehyden^[121]:



3. Reduktive Aminierung mit Ethylendiamin und Glyoxylsäure^[122, 123]:

An das ungeschützte sekundäre Amin des synthetisierten Aminoethylglycinderivats können nun Nucleobasenessigsäurederivate gekuppelt werden.

4.1.2 Synthese der Nucleobasen

Für die Synthese der Nucleobasen Essigsäurederivate benötigt man zusätzliche Schutzgruppen in Form von Benzyloxycarbonyl, 4-*tert*-Butylbenzoyl, Anisoyl und Mmt für die Nucleobase oder keine zusätzliche Schützung, wie bei Thymin. Anschließend findet über Alkylierung eines Halogenessigsäureesters und Verseifung oder durch direkte Alkylierung mit Bromessigsäure die Einführung des Essigsäure-Linkers statt.^[124, 125]

In der ersten Synthese von PNA wurden Monomere mit Trifluoressigsäure-labiler Boc-Schutzgruppe an der primären Aminogruppe hergestellt (siehe Abbildung 13). Die *exocyclischen* Funktionsgruppen der Nucleobasen wurden durch Cbz- und/oder Benzylgruppen geschützt, die durch die Zugabe von Flußsäure oder durch Trifluormethansulfonsäure abgespalten werden können.^[124]

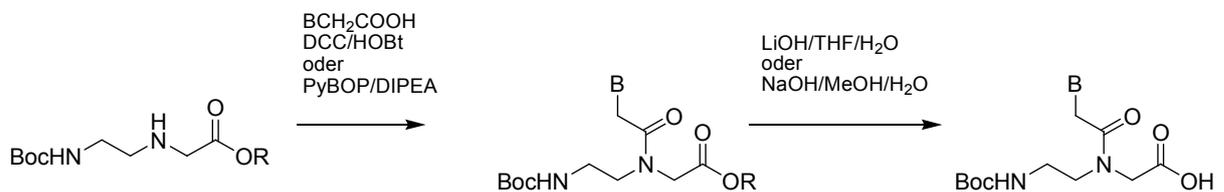


Abbildung 13: Synthese des Boc-geschützten PNA-Monomers

Standardmäßige Kupplungsreagenzien der Peptid-Synthese wie DCC/HOBt oder $\text{PyBOP}^{\text{®}}$ wurden für die Kupplung des Nucleobasenessigsäurederivats mit dem sekundären Amin des Boc-geschützten Aminoethylglycineresters verwendet. Ungeeignet sind diese Bausteine für die Synthese von PNA/DNA-Chimeren, da es unter den stark sauren Bedingungen (TFA/HF), die

für eine Entschützung notwendig wären, zur Depurination des DNA-Teils des Oligomers kommen würde. Da Mmt-geschützte Monomere unter milden Bedingungen (Trichloressigsäure) abgespalten werden, kommen sie bei der Synthese von Oligomeren wie PNA/DNA-Chimeren zur Anwendung.

Im Allgemeinen wurde durch den Einsatz von basenlabilen Schutzgruppen an den *exocyclischen* Aminogruppen der Nucleobasen Adenin, Cytosin und Guanin Kompatibilität mit Standard Oligonukleotidsynthesen gesucht.^[124]

4.1.3 Monomere mit basenlabiler N-Schutzgruppe

Die Synthese dieser monomeren Bausteine wird in Abbildung 14 dargestellt. S. A. Thomson et al.^[118] kombinierten die Fmoc-Schutzgruppe mit der Cbz-Schutzgruppenstrategie bei Nucleobasen von P. E. Nielsen et al.^[114] Die Monomere wurden durch die Kupplung von Nucleobasenessigsäurederivaten zum Fmoc-geschützten PNA-Grundgerüst dargestellt, wobei BOP oder EDC als Kupplungsreagenzien benutzt wurden. Die Verwendung von HCl/Dioxan oder TFA führen zur Abspaltung des *tert*-Butylesters. Die Zugabe von Triethylsilan in dieser Stufe ist nur notwendig, um die Cbz-Schutzgruppenabspaltung am Adenin-Baustein zu verhindern. Ebenfalls sind Kupplungen zum PNA-Monomer mit den Reagenzien TOTU oder PyBOP möglich. Die größere Schwierigkeit beim PNA-Monomer ist die Spaltung des Methylesters, ohne die Fmoc-Schutzgruppe anzugreifen. Die beobachtete teilweise Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bei der Hydrolyse des Methylesters kann durch eine geringe Menge von Fmoc(ONSu) vor der Aufarbeitung rückgängig gemacht werden.^[118, 122]

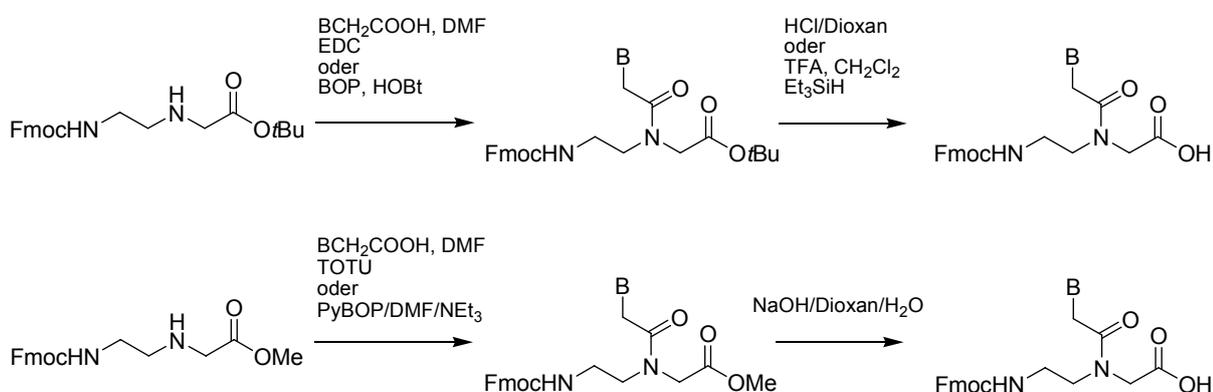
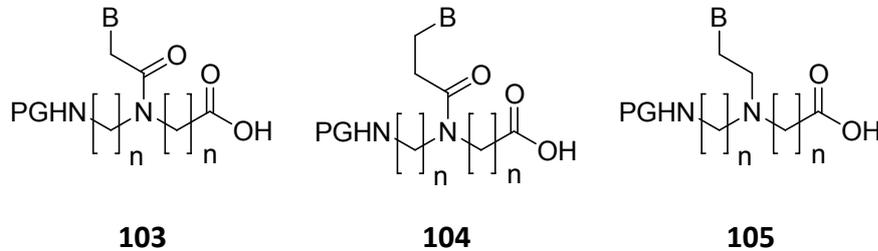


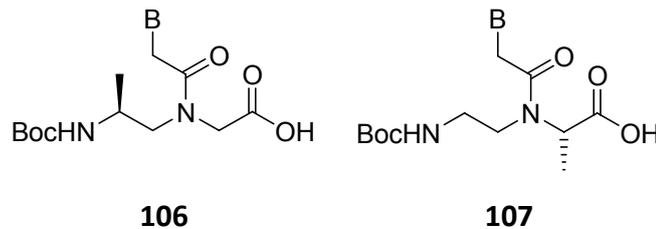
Abbildung 14: Synthese des Fmoc-geschützten PNA-Monomers

4.1.4 Monomere PNA-Bausteine mit modifiziertem Rückgrat

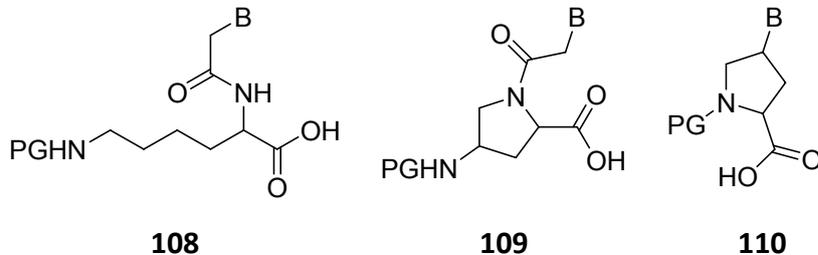
Es sind sowohl homologe, als auch modifizierte Strukturen des N-Aminoethylglycin-Rückgrates bekannt. Dabei gibt es Variationen in der Länge des Rückgrates (**103**) ($n = 1-3$), des Spacers (**104**) und der Art der Verknüpfung (**105**)^[126]:



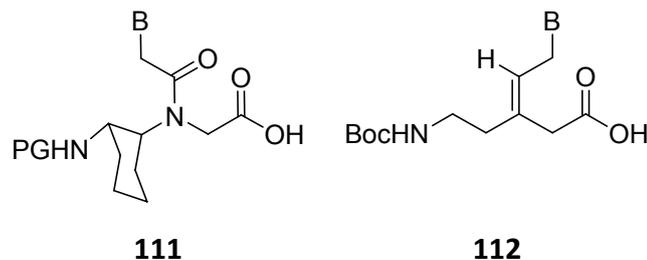
Ebenfalls bekannt sind Monomere mit chiralem Zentrum, die durch reduktive Aminierung von Boc-Alaninal mit Glycinmethylester (**106**) oder durch Boc-Glycinal mit Aminosäureestern (**107**) gefolgt durch Kupplung der Nukleinbasenessigsäurederivate dargestellt werden.^[127, 128]



Weitere Modifikationen basieren auf Ornithin (**108**), Prolin (**109**) (**110**) und



Diaminocyclohexan (**111**). Monomere von olefinischer PNA (**112**), bei welchen die zentrale Amid-Bindung durch eine konfigurationsbestimmte C-C-Doppelbindung ausgetauscht wurde, gehören ebenfalls zu den in der Oligomersynthese eingesetzten Monomeren.^[129-132]



Die Oligomersynthese ist eine Festphasensynthese, die nach Optimierungsversuchen mit dem Kupplungsreagenz HBTU und N1-Benzyloxycarbonyl-N3-methylimidazoltriflat als

Cappingreagenz, die größte Kupplungseffizienz aufweist. Als Nebenreaktionen der Oligomersynthese sind die N-Acyltransferreaktion (siehe Abbildung 15) unter basischen bzw. neutralen Bedingungen und die Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit (siehe Abbildung 16) bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin bekannt.^[118, 133]

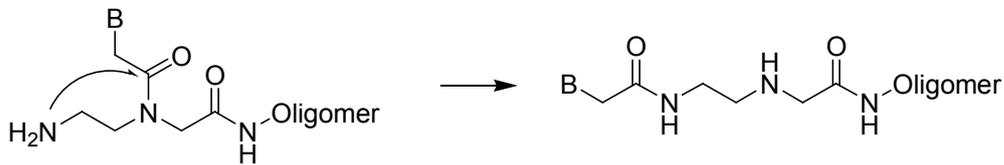


Abbildung 15: N-Acyltransferreaktion

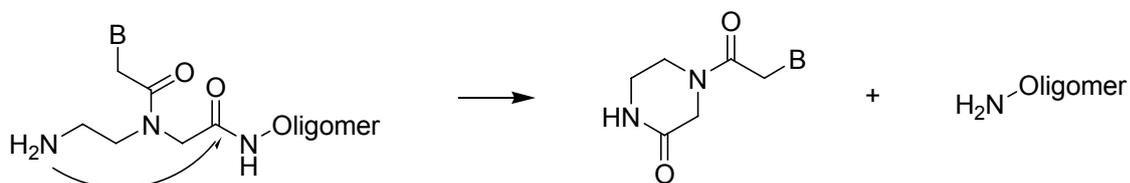


Abbildung 16: Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit

4.2 Chemische Stabilität

PNAs sind säurestabil, so dass Schutzgruppen, die durch wasserfreies HF oder Trifluormethansulfonsäure abgespaltbar sind in der PNA-Synthese eingesetzt werden können. Ebenfalls ist eine Stabilität unter schwach basischen Bedingungen gegeben, so dass auch Schutzgruppen, die durch Ammoniak abgespalten werden oder die durch Piperidin abspaltbare Fmoc-Schutzgruppe, angewandt werden können.^[118, 123] Instabil sind PNAs unter basischen Bedingungen, da dort die freie Amino-Gruppe, die oben genannten Nebenreaktionen, wie N-Acyltransferreaktion (Abbildung 15) und Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit (Abbildung 16) ermöglicht.^[118, 133] Die Nebenreaktionen können durch Capping der N-terminalen Amino-Gruppe durch die Acetyl-Gruppe unterdrückt werden.

4.3 Löslichkeit

Reine PNAs sind neutrale Verbindungen, die eine Tendenz zur Selbstaggregation und geringe Wasserlöslichkeit besitzen. Durch die Einführung von geladenen Gruppen, wie C-terminales

Lysinamid oder durch Modifikation des PNA-Rückgrats mittels Austausch von Glycin durch Lysin wird die Löslichkeit erhöht. Generell ist zu sagen, dass die Unlöslichkeit durch die Länge des PNA-Oligomers und durch das erhöhte Purin zu Pyrimidin Verhältnis zunimmt.^[115]

4.4 Bindungsaffinitäten

PNA binden mit komplementärer DNA und sogar noch besser mit komplementärer RNA. Die höchsten Bindungsaffinitäten werden jedoch bei komplementärer PNA gefunden. Aufgrund des ungeladenen Zustands von PNA sind diese prädestiniert, helikale Tripletstrukturen zu bilden. Stattdessen findet man bei Zugabe von PNA zu doppelsträngiger DNA aber häufig statt den berechneten $\text{PNA}^*(\text{DNA})_2$ -Strukturen, die nur bei machen Sequenzen zu beobachten sind, $(\text{PNA})_2^*\text{DNA}$ -Strukturen, die durch verdrängen des Doppelstrangs zustande kommen. Falls die Sequenz jedoch nicht für die Bildung von Triplet-Strukturen geeignet ist, dann kommt es zu PNA^*DNA bzw. PNA^*RNA oder PNA^*PNA -Strukturen. Abhängig ist die Stärke eines Duplexes von der Länge und der jeweiligen Ionenstärke, da einer Erhöhung der Salzkonzentration die Stabilität eines DNA^*DNA -Hybriden im Vergleich zu einem PNA^*DNA -Duplex zunimmt, bis die Stabilität bei beiden Duplexen gleich ist. Noch höhere Salzkonzentrationen haben keinen Effekt auf die Stabilität. Die Salzkonzentrationsabhängigkeit kann durch die Assoziation von Gegenionen im Fall von DNA^*DNA -Duplex-Bildung und durch Verschiebung von Gegenionen im Fall von PNA^*DNA -Duplexen erklärt werden. Beim Austausch von Glycin im Rückgrat durch eine andere Aminosäure ist die D-Konfiguration bevorzugt. Ansonsten ist die Stabilität abhängig von der jeweiligen Aminosäure. Kleine ungeladene Aminosäuren, wie D-Alanin oder D-Serin haben keinen Effekt auf die Duplexstabilität. Positiv geladene Seitenketten, wie D-Lysin, haben eine stabilisierende und negativ geladene Seitenketten, wie bei Glutaminsäure haben einen destabilisierenden Effekt.^[114, 116]

4.5 Struktur von PNA^*RNA -Duplexen

Eine NMR-Strukturbestimmung eines PNA^*RNA Hexamer Duplexes wurde mit ^{13}C und ^{15}N angereicherten Nukleobasen durchgeführt. Man konnte zeigen, dass alle Basen Standard

Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen eingehen und der glycosidische Torsionswinkel der RNA *anti* steht, kombiniert mit einer typischen C3'-*endo* Zuckerfaltung. Die Gesamtstruktur des RNA-Strangs ist dabei nahe an der helikalen Standardgeometrie der A-Form. Dies impliziert, dass die Carbonyl-Gruppe am tertiären Amid im Rückgrat der PNA isosterisch zur RNA C2'-Hydroxy-Gruppe positioniert ist, was die maximale Aussetzung des zusätzlichen Carbonylsauerstoffs am Rückgrat zum Lösungsmittel fördert. Die tertiäre Amid-Bindung der PNA ist ausschließlich *cis*-konfiguriert und es gibt keine Anzeichen für intramolekulare oder intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen der sekundären Amide.^[116, 126]

4.5.1 Struktur von PNA*DNA-Duplexen

Strukturinformationen wurden durch NMR-Spektroskopiestudien von zwei antiparallelen PNA*DNA-Duplexen (8-mer und 10-mer) erlangt. Konformationell ist der DNA-Strang ähnlich der B-Form mit einer glycosidischen *anti*-Konformation und der Desoxyribose in C2'-*endo* Form. Durch NOESY-Experimente konnte eine Watson-Crick-Basenpaarung gezeigt werden. Ebenso konnte durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen bei antiparallelen PNA*DNA-Duplexen sowohl Merkmale der A-Form (laterale Positionierung der Basenpaarung) als auch Merkmale der B-Form der DNA (Rückgratkrümmung, Neigung der Basenpaare und helicale Steigung) gefunden werden. Die rechtshändige Helix beinhaltet pro 360° etwa 13 Basenpaarungen, verglichen mit zehn Basenpaaren bei der B-Form der DNA. Die Major Groove ist aufgeweitet, die Minor Groove daher flach und eng. Die Basenstapelung variiert erheblich innerhalb der Sequenz. Die primären Amidbindungen des PNA-Grundgerüsts sind, ohne Ausnahme, in der *trans*-Konfiguration. Die Carbonylgruppe des Rückgrat-Nukleobase-Linkers zeigt in Richtung des C-Terminus des PNA-Strangs, während die Amid-Carbonylgruppen des Grundgerüsts, mit einigen Ausnahmen, nach außen zum Lösungsmittel zeigen. Im PNA*DNA-Duplex gibt es keine Anhaltspunkte, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amid und der Carbonylgruppe des Rückgrats kommt.^[116, 126]

4.5.2 Struktur von $(\text{PNA})_2^*\text{DNA}$ -Tripelhelices

Durch Röntgenstrukturanalysen einer $(\text{PNA})_2^*\text{DNA}$ -Tripel Helix konnte gezeigt werden, dass sich die Nukleobasen des PNA-Strangs durch Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarung an die DNA binden. Es kommt dabei zur Bildung einer „P-Helix“ mit 16 Nukleobasen pro 360° . Die DNA-Phosphatgruppen sind dabei durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amin des PNA-Rückgrats verbunden. Diese Wasserstoffbrückenbindungen, zusammen mit den zusätzlichen van-der-Waals-Kräften und der Abwesenheit von elektrostatischen Abstoßungen, sind die Hauptgründe, die für die enorme Stabilität von Tripel-Helices verantwortlich sind. Die Desoxyribose des DNA-Strangs ist, wie in der A-Form der DNA, in der $C3'$ -endo-Konformation (siehe Abbildung 25 und 26). Die Nukleobasen liegen fast senkrecht zu der Helixachse, was charakteristisch für die B-Form der DNA ist. Die Watson-Crick PNA-DNA-Interaktionen werden zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen des Lösungsmittels mit der Minor Groove stabilisiert.^[116, 126]

4.5.3 Tripelhelix

PNA Oligomere mit einem hohen Pyrimidin : Purin Verhältnis binden mit komplementärer DNA normalerweise zu einem stabilen $(\text{PNA})_2^*\text{DNA}$ Tripelhelix. Im Falle von C-reichen PNAs und GC-reichen DNA-Duplexen bilden sich $\text{PNA}^*(\text{DNA})_2$ Tripelhelices. Die Entstehung einer Tripelhelix ist abhängig von der Selektivität der PNA^*DNA -Duplex-Zwischenstufe. Ebenfalls ist die Bildung einer Tripelhelix, die Cytosin in der PNA enthält, pH-Wert abhängig, so dass die größte Stabilität bei einem pH-Wert von 5 (C^+GC) (Abbildung 17) beobachtet wird.

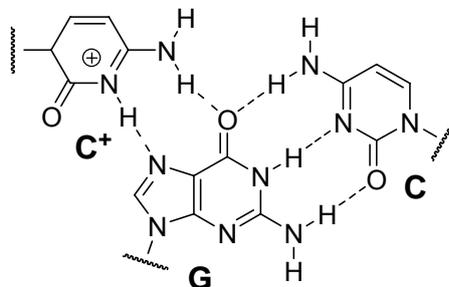


Abbildung 17: C^+GC -Basen-Triplett

Überraschend ist jedoch die Tatsache, dass auch bei pH 9 (CGC) ein stabiler Komplex vorhanden ist. Zu erklären ist dies dadurch, dass das Cytosin mit nur einer

Wasserstoffbrücke eine Hoogsteen-Basenpaarung eingeht oder der pK_a -Wert von Cytosin in der Tripelhelix erheblich erhöht wird, so dass eine partielle Protonierung möglich ist. Ebenfalls bildet PNA stabile $(PNA)_2$ *RNA Tripel-Helices mit RNA aus. Obwohl diese Bildungen weniger untersucht wurden wie Tripel-Helices von DNA, sind doch die T_m ähnlich. Bisherige Daten über die Bildungen von Tripelhelices mit RNA wurden hauptsächlich bei biologischen Experimenten gewonnen. Beispielsweise konnte die Translation der CAT-mRNA durch die Bildung einer Tripelhelix mit PNA inhibiert werden. Die Bildung eines Duplex mit PNA hatte hingegen keine inhibierende Eigenschaft.^[114, 115, 134-136]

4.6 Stabilität in biologischen Systemen

Für den Einsatz von PNAs als Antigen und Antisense-Therapeutika ist es zwingend notwendig, dass eine ausreichend hohe Stabilität im Serum und in der Zelle gegeben ist. Aufgrund der peptidähnlichen Struktur ist eine mögliche Zersetzung durch Peptidasen oder Proteasen denkbar. In Zellextrakten und Humanserum weisen jedoch PNA-Oligomere eine erhöhte Stabilität auf. In Vergleichsexperimenten konnte man feststellen, dass unmodifiziertes Oligonukleotid $(T)_8$ eine Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzt wohingegen ein PNA Oligomer $H-(t)_8\text{-Lys-NH}_2$ unter den gleichen Bedingungen eine Halbwertszeit von zwei Tagen besitzt.^[137]

4.7 Zelluläre Aufnahme von PNAs

Die zelluläre Aufnahme von PNAs ist sehr niedrig. Um eine Aufnahme von PNAs in die Zelle zu ermöglichen, wird die Permeabilität der Zellmembran durch die Zugabe von Lysolectin oder Detergentien wie Tween 20 erhöht. Eine andere Methode ist eine kovalente Knüpfung von Peptiden an PNAs, die selektiv an die Zelloberflächenrezeptoren binden oder selbst zellpermeables Peptid sind, was die zelluläre Aufnahme erhöht.

Mit Hilfe der hypotonischen Dialyse ist es möglich PNA in Erythrocyten einzuführen. Diese mit PNA beladenen Erythrocyten werden spezifisch von Rinder-Makrophagen phagocytosiert. Dabei kommt es zur Insertion der PNA in die gewünschten Makrophagen,

was ein System darstellt, mit dem es möglich ist, PNAs selektiv durch intakte Membranen zu insertieren.^[138-141]

4.8 Inhibierung der Translation

Die Inhibierung der Translation ist durch den Einsatz von Antisense-PNA auf mRNA möglich. Die PNAs besitzen jedoch eine langsame Kinetik in der Assoziation mit komplementärer RNA. Inhibierung der Translation wurde durch den Einsatz eines PNA Pentadecamers, welches der Translation Startregion einer mRNA komplementär war, erreicht. Unmodifizierte Oligonukleotide brauchten etwa eine 40-fach höhere Konzentration, um den gleichen Effekt der Inhibierung zu zeigen. Nach Untersuchungen von Knudsen und Nielsen findet eine spezifische Inhibierung statt, wenn PNAs auf das 5'-Ende nahe zum AUG Start-Codon adressiert werden, nicht jedoch, wenn PNAs auf die codierende Region adressiert werden. Wenn sich $(\text{PNA})_2$ *RNA-Tripel Helices bilden, ist es jedoch möglich, die Translation durch komplexieren der Codierungsregion zu inhibieren. Da die Effizienz der Inhibierung der Translation nicht einfach mit der Bindungsaffinität korreliert, sind Sequenzoptimierungen für jede neue Zielstruktur erforderlich.^[134, 135]

4.9 Inhibierung der Transkription

Die Inhibierung der Transkription kann durch die Tripel-Helix-Bildung, durch Einlagerung in den Strang oder Verdrängung des Stranges erfolgen. Die Art, wie PNAs mit doppelsträngiger DNA wechselwirken, ist abhängig von der Basenfolge der Sequenz. Solche Komplexe können eine sterische Blockade ausbilden, die die RNA-Polymerasefunktion einschränkt. PNAs, die komplementär zur Promotorregion der DNA sind, bilden stabile Komplexe, die den Zugang der Polymerase erschweren. Auch PNAs, die im kodierenden Bereich der DNA binden, können den Transkriptionsprozess inhibieren.^[142] Ein $(\text{PNA})_2$ *DNA-Triplex kann die Transkription *in vitro* inhibieren. Positiv geladene Lysinreste im PNA-Strang, können die Assoziationsraten mit dsDNAs drastisch erhöhen. M. Lee et al.^[143] konnten zeigen, dass die PNAs, die komplementär zum Primer des HIV-1-Genoms sind, *in vitro* die Initiation der Reversen Transkriptase (RT) blockieren. Oligomere PNAs, die auf verschiedene kritische

Regionen des viralen Genoms zielen, haben wahrscheinlich ein starkes therapeutisches Potenzial.

4.10 Aktivierung der Transkription

Durch Bindung der PNA an den Doppelstrang der DNA verdrängt die PNA einen DNA-Strang aus dem Duplex durch die Bildung einer $((\text{PNA})_2 \cdot \text{DNA})$ Triplex-Struktur. Dies führt beim verdrängten Strang zur Ausbildung eines D-Loops. Wenn es zur Bildung eines solchen $\text{DNA} \cdot ((\text{PNA})_2 \cdot \text{DNA})$ Komplexes am nicht codogenen Strang kommt, wird dieser von der RNA-Polymerase erkannt, so dass der Komplex als ein künstlicher Promotor angesehen werden kann.^[144]

4.11 Inhibierung des Tat/TAR-Komplexes durch PNA

Die Eigenschaften von PNA, energetisch stabile $\text{PNA} \cdot \text{RNA}$ -Komplexe zu bilden, Stabilität im humanen Serum und Zellextrakt, Sequenzspezifische Erkennung und die Antisense-Aktivität machen diese auch für die Inhibierung des Tat/TAR-Komplexes interessant. Inhibierung der Transaktivierung des HIV-1 LTR wurde durch ein PNA 15mer erreicht, das komplementär zur Loop und Bulge-Region ist. Die Stärke der Inhibierung hängt dabei von der Länge und der Sequenz der PNA ab.^[145] Durch den Gel Mobility Shift Assay konnte gezeigt werden, dass die Anti-TAR-PNA einen festen Komplex mit der TAR-RNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 bildet. Zugabe der Anti-TAR-PNA zum Tat/TAR-Komplex führt zur Verdrängung des gebildeten Komplexes. Die Inhibierung der Tat-TAR-RNA-Wechselwirkung bzw. der Replikation des HIV-1 konnte durch Zellassays bestätigt werden. Der Nachteil der geringen Bioverfügbarkeit von PNA wurde durch Konjugation einer 16mer Anti-TAR-PNA mit Membran-Transduktionspeptiden (MTD) Transportan, Aminoglycosid Neomycin B, Penetratin oder Tat-Peptid kompensiert. Dabei zeigte sich, dass die Konjugate mit Penetratin, Transportan-21 und mit Tat-Peptid am effektivsten als Anti-HIV Wirkstoffe sind. Der Mechanismus der Aufnahme ist weder rezeptorabhängig noch erfolgt er über Endozytose. Die konjugierten PNAs dringen sogar durch die Virushülle ein und deaktivieren HIV-1 vor der Fusion mit der Wirtszelle.^[146-149]

Bei der Untersuchung von cyclischen komplementären PNAs fand man heraus, dass die cyclische Antisense hexa-PNA im Gegensatz zur linearen keine Wechselwirkung mit der TAR-RNA zu einem „kissing complex“ eingeht. Man synthetisierte aufgrund von bekannten Sequenzen, die zur Bildung eines „kissing complex“ beitragen und Molekular Modelling cyclische Antisens octa-PNAs mit der Sequenz $[GTCCCAGA]_n$ ($n = 3-5$). Diese zeigten starke Wechselwirkungen mit TAR-RNA, so dass von einer Erzeugung eines aus sechs Basenpaaren bestehenden stabilen Komplexes am TAR-RNA-Loop, also einer Loop-Loop Wechselwirkung ausgegangen wird. Lineare PNAs mit der Sequenz Lys-GTCCCAGA-Gln zeigten in thermischen Denaturierungsstudien schwächere Affinitäten zur TAR-RNA als die cyclischen Derivate.^[150, 151]

5. ASSAYS FÜR DIE EVALUIERUNG VON RNA-LIGAND-WECHSELWIRKUNGEN

Um die Bindung zwischen kleinen Molekülen und der RNA zu bestimmen, kann man außer im Falle der ribosomalen Inhibitoren keinen enzymatischen Assay verwenden, da die untersuchten RNAs meist keine katalytische Aktivität besitzen.

5.1 Fluoreszenzbasierte Assays

Bei dieser Methode wird das RNA Oligonukleotid mit einem Fluorophor oder einer fluoreszierenden Version eines Nukleotides versetzt, wobei die kovalente Kupplung des Fluorophors entweder am Ende des Oligonukleotides oder nahe an bzw. an der Bindungsstelle des Liganden erfolgt. Durch Bindung eines kleinen Moleküls kommt es zu einer Konformationsänderung des RNA Oligonukleotides, woraus eine Änderung der Fluoreszenz resultiert, da die örtliche Umgebung des Fluorophors verändert wurde. Somit kann die Konformationsänderung mittels Fluoreszenz detektiert werden.^[152]

Als fluoreszierende Version eines Nukleotides werden häufig Nukleotide mit 2-Aminopurin eingesetzt, da diese eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Die Purinbasen Adenin und Guanin sind im Nukleotid durch 2-Aminopurin ausgetauscht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der selektiven Einführung des 2-Aminopurines in Sekundärstrukturen,^[99, 153, 154] wie Loops oder Bulges. Es ist daher möglich Wechselwirkungen von Liganden an ausgewählten Stellen zu untersuchen. In der Praxis wurde beobachtet, dass ebenfalls Interaktionen an Stellen beobachtet werden können, die entfernt vom Nukleotid mit 2-Aminopurin liegen.^[99, 154] Ein weiterer Vorteil sind die freien unmodifizierten Enden des Oligonukleotides, womit die Möglichkeit von weiteren Untersuchungsmethoden eröffnet wird.

Ein komplementärer Ansatz ist die Einführung eines Fluorophores am 3'- oder 5'-Ende der RNA. Bevorzugt findet die Bindung am 5'-Ende statt. Eine synthetische Darstellung der RNA ist dafür nicht zwingend nötig, da die Einführung des Fluorophores über einen *in vitro* Transkriptionsassay erfolgen kann. Dabei wird Guanosin 5'-monophosphorthioat (5'-GMPS)

enzymatisch eingefügt.^[155] Bei Vergleichsuntersuchungen mit 2-Aminopurin und endmarkiert RNA fand man dieselben Resultate. Die Untersuchung von neuen RNA-Zielstrukturen findet bevorzugt mit Markierungen am Ende der RNA statt.^[156, 157]

Die Änderung der Fluoreszenz ist abhängig vom Abstand zwischen Fluorophor und Bindungsstelle sowie vom Ausmaß der Konformationsänderung der RNA durch die Bindung mit dem Liganden.

Eine Methode, um ohne Modifikation eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung innerhalb einer Sequenz zu erreichen, ist das Markieren von Nukleotiden mit Pyren. Kommerziell erhältlich ist das Pyren-markierte Uracil, wobei das Pyren über flexible Alkyl-Linker an der 2'-Position gebunden ist. Zum erfolgreichen Einsatz kam diese Methode bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Aminoglycosiden mit TAR-RNA.^[158] Nachteilig ist jedoch, dass nicht alle Pyren-markierten Nukleotide kommerziell erhältlich sind und der hydrophobe Aromat die Bindungsstelle verändert.

5.2 Fluoreszierender Ligand Verdrängungs-Assay

Ein alternativer Ansatz zu markierter RNA ist die Verdrängung eines fluoreszenzmarkierten Referenzliganden. Die Methode hat den Vorteil, dass die untersuchte RNA und der verdrängende Ligand unmarkiert sind und ist geeignet für die Untersuchung von ganzen Bibliotheken von Verbindungen und zuverlässig für biochemische und biophysikalische Studien. Der Verdrängungsassay kann aber nur dann eingesetzt werden, wenn ein spezifischer markierbarer Ligand bekannt und verfügbar ist. Fluoreszenzmarkierte Aminoglycoside werden häufig als zu verdrängende Liganden bei internen Loops eingesetzt, jedoch nicht bei Hairpin-Loops, da diese Sekundärstruktur für Aminoglycoside nur eine schwache Bindestelle darstellt.^[159, 160] Fluoreszenz-Anisotropieassays wurden auch für die Suche nach Liganden zur Verdrängung von RNA-Protein-Komplexen eingesetzt.^[161-163] Man bedient sich **Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)** basierenden Methoden, für die Suche nach RNA-Liganden.^[164] Z.B. wurde in einem Assay die TAR-RNA an einem Ende mit einem Donor markiert, während das Tat-Peptid mit einem Akzeptor markiert wurde.^[37] Durch Wechselwirkung der RNA mit dem Protein und die daraus resultierende Annäherung der Chromophore kam es zum FRET-Effekt. Darunter versteht man die Anregung eines Donors mit Licht einer bestimmten Wellenlänge λ_{ex} . Diese Anregung wird nicht in Form von

Fluoreszenz abgegeben, sondern über eine strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) auf den Akzeptor. Dazu muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen und die beiden Chromophore parallele elektronische Schwingungsebenen besitzen. Die Effizienz des Energietransfers ist abhängig von der Entfernung des FRET-Paares:

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

E = Energietransfer im FRET-System

R = Abstand der Farbstoffe zueinander

R₀ = Abstand bei dem 50 % der Energie übertragen werden (Förster-Radius)

FRET kann sowohl über die Abnahme der Intensität der Donorfluoreszenz oder durch Zunahme der Intensität der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden.^[163]

Der in dieser Arbeit verwendete Assay (Abbildung 19) basiert ebenfalls auf diesem Effekt. Dabei wird ein 16mer Tat-Peptid (FtatRhd), das die Tat₄₉₋₅₇-Sequenz beinhaltet, verwendet (Abbildung 18).

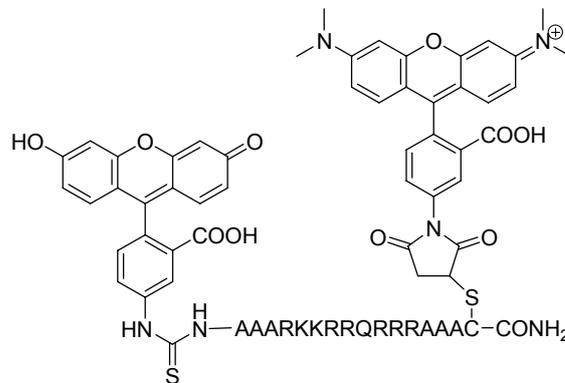


Abbildung 18: Struktur des 16mer Tat-Peptides (FtatRhd)

Weitere Aminosäuren als Linker, um Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen zu vermeiden, wurden in das Peptid eingefügt. Die beiden FRET-Paare befinden sich am N-Terminus (Fluorescein) und am C-Terminus (Tetramethylrhodamin) des Peptides. Durch Anregung des markierten Peptides FtatRhd in der Nähe des Absorptionsmaximums des Donor-Farbstoffes Fluorescein bei 489 nm findet ein FRET auf den Akzeptor statt. Das schließlich emittierte Licht vom Akzeptor bei 590 nm kann detektiert werden.

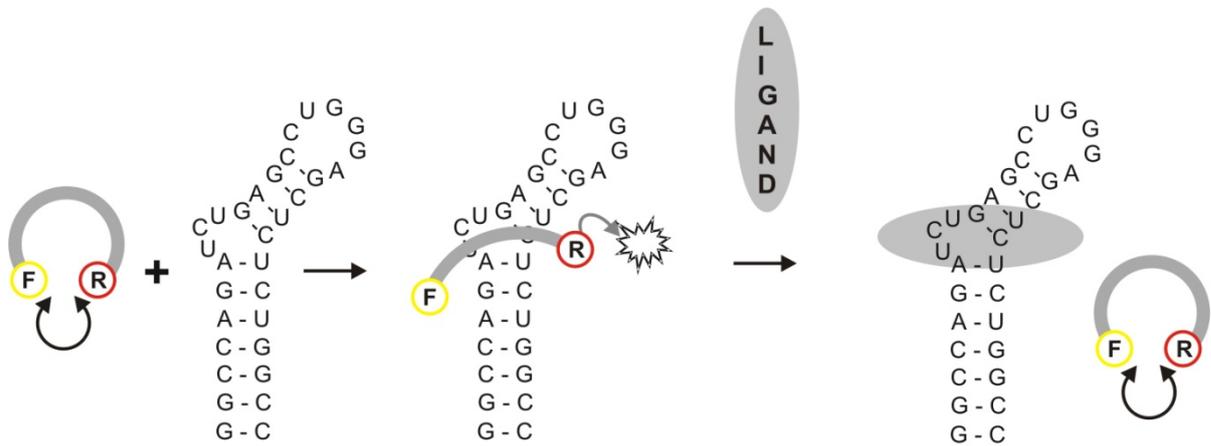


Abbildung 19: Modell des FRET-Assays nach Matsumoto et al.^[163]

Im freien Zustand des markierten Peptides nimmt dieses eine *random coil*-Konformation ein. Aufgrund des geringen Abstands der beiden Farbstoffe zueinander kommt es nach Anregung des Fluoresceins zu einem Quenchen der Fluoreszenz. Durch die Bindung an die TAR-RNA kommt es zu einer gestreckten Konformation des Peptides, wodurch die Distanz von Donor- zu Akzeptor-Farbstoff und damit die Quantenausbeute der Fluoreszenz vergrößert wird. Durch die Zugabe eines RNA-Liganden kommt es zu einer Verdrängung des Komplexes, so dass das Tat-Peptid wieder eine *random coil*-Konformation einnimmt. Damit ist die Abnahme des Tat/TAR-Komplexes durch Messung der Fluoreszenz quantifizierbar und die Bestimmung des IC_{50} -Wertes des RNA-Liganden möglich.^[163, 164]

Die Dissoziationskonstante K_D von FtatRhd und TAR-RNA kann aus der Auftragung der FRET-Emission des FtatRhd gegen die Konzentration der TAR-RNA bei konstanter Konzentration von FtatRhd ermittelt werden. Für den Fall einer 1:1-Stöchiometrie gilt folgende Gleichung:^[165]

$$I = I_0 + \frac{\Delta I}{2} ([RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D - \sqrt{([RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D)^2 - 4[RNA]_0 [FtatRhd]_0})$$

I = Fluoreszenzintensität von FtatRhd in Anwesenheit von RNA

I_0 = Fluoreszenzintensität von FtatRhd in Abwesenheit von RNA

ΔI = Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität von FtatRhd in Anwesenheit einer unendlichen Konzentration an RNA und der Abwesenheit von RNA

$[RNA]_0$ = Konzentration an RNA zu Beginn der Reaktion

$[FtatRhd]_0$ = Konzentration an FtatRhd zu Beginn der Reaktion

5.3 NMR Methoden

Über NMR-Spektroskopie ist es möglich, die genaue Bindungsstelle der Liganden zu bestimmen, selbst mit Affinitäten im mM-Bereich.^[166] Ebenfalls ist es möglich, die Konformationsänderungen, die durch die Bindung eines Liganden induziert werden, aufzuzeigen. NMR dient auch zur Entdeckung von neuen Protein-Liganden, wofür verschiedene NMR-Techniken entwickelt wurden, die helfen, die Beziehung zwischen Struktur und Aktivität aufzuklären. Dies führte zu Erzeugung von Fragmentbibliotheken.^[167] Direkte Bindungen von Liganden an der RNA kann man untersuchen über Iminoprotonen (1D) oder chemische Verschiebungen von Pyrimidin H5-H6 (2D), obwohl auch Standardexperimente (1D) herangezogen werden können.^[166] Im Falle der TAR-RNA verwendet man HIV-2 TAR, da diese nur einen aus zwei Nukleotiden bestehenden Bulge hat und damit eine bessere Auflösung aufgrund reduzierter Beweglichkeit möglich macht. Die Affinität des Liganden kann durch Titration erhalten werden, ebenso wie die Art der Bindung durch Vergleichsexperimente mit bekannten RNA-Liganden. Selbst die Verdrängung eines RNA/Ligand-Komplexes durch ein konkurrierendes Molekül ist durch Änderung der Signale der Iminoprotonen im NMR zu beobachten.^[167] Einblick in die Dynamik und Funktion von RNA mit atomarer Auflösung ist mit einem RNA-Liganden möglich, der mit einem auf einer bestimmten Wellenlänge sensitiven Linker gekuppelt ist. Durch Bestrahlung mittels Lasers kommt es zur Abgabe des Liganden, so dass die durch den Liganden induzierte Faltung der selektiv isotope markierten RNA zeitaufgelöst beobachtet werden kann.^[168] Bei anderen NMR-Experimenten benutzt man Messungen der Resonanz des freien Liganden gegenüber der Resonanz des Liganden in gebundener Form.^[107, 169-172] LOGSY (water-ligand observed via gradient spectroscopy) ist ein NMR-Experiment, das auf die Magnetisierung von Wasser aufbaut, das den Liganden umgibt. Es ist daher möglich, den freien vom gebundenen Liganden zu unterscheiden.^[169] Ein Nachteil von NMR-Experimenten ist der große Mengenbedarf von RNA oder isotope markierter RNA. Größere Mengen an RNA erhält man meist über Festphasensynthese, wobei ¹⁵N und ¹³C markierte RNAs hauptsächlich über *in vitro* Transkription erhältlich sind. Seitenspezifische ¹⁹F markierte RNA wird ebenfalls hauptsächlich über Festphasensynthese gewonnen, ist aber auch nicht immer einsetzbar.^[173]

5.4 ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) Methoden

Electrospray Ionisation **Mass Spectrometry** (ESI-MS) ist eine sanfte Ionisations-Methode, die es erlaubt, das Molekulargewicht von Rezeptor-Ligand-Komplexen in der Gasphase zu bestimmen. ESI-MS ist ein Assay, der unabhängig von Konformationsänderungen durch Komplexierung ist und ohne Markierung auskommt. Dabei ist es möglich die ungefähre Ligand-RNA-Assoziationskonstante und die Stöchiometrie durch die Zunahme des Molekulargewichts der RNA zu ermitteln.^[174] Bei Vergleichsexperimenten der Wechselwirkung von Aminoglycosiden mit der 16S A-Site mit auf Lösungsmitteln basierenden Assays wurde die Konsistenz der Daten gemessen.^[175] Die Aktivierung durch Kollisionen führt bei den Komplexen in der Gasphase zu Dissoziationen, so dass es möglich ist, aus den Fragmenten die Bindungsstelle des Liganden an der RNA zu ermitteln.^[174] ESI-MS wird im Screening von großen Substanzbibliotheken eingesetzt. Nachteil der Methode ist das für die Präparation notwendige Entfernen von Salzen aus den Proben, die normalerweise einen wichtigen Beitrag zur Bindungsenergie und Selektivität darstellen. Daher können sich die ermittelten Ligand-Wechselwirkungen aus der Gasphase von denen der ionischen Lösungsmittelphase unterscheiden.^[176]

5.5 MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry)

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS) beruht auf der Kokristallisation eines großen Überschusses an Matrix zu Analyt. Durch Anregung der Matrix-Moleküle mittels hochenergetischer Laserpulse kommt es zu explosionsartigen Teilchenablösung und damit zur Überführung des Analyts ins Vakuum des Massenspektrometers. Die durch die nichtkovalente spezifische Wechselwirkung der A-Site RNA mit Neomycin gebildeten Komplexe konnten sowohl mit ESI-MS, als auch mit MALDI-MS untersucht werden. Die gewonnenen Daten waren konsistent mit ESI-MS, obwohl es durch die harte Natur des MALDI-Prozesses und der heterogenen Morphologie in der Präparation zu einer größeren Dispersion in der Komplexbildung kam.^[177]

5.6 LILBID-MS (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption-Mass Spectrometry)

LILBID-MS (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption-Mass Spectrometry) stellt eine überaus sanfte Methode dar für die Massenanalyse unter anderem von Nukleinsäuren und deren Komplexen in Lösung. Wässrige Mikrotropfen werden dabei ins Vakuum injiziert und mit IR-Laser-Pulsen bestrahlt. Nach einer daraus folgenden Explosionsphase kommt es zur Emission der Ionen des gelösten Biomoleküls in das Vakuum. Eine Analyse erfolgt anschließend durch die Flugzeit-Massenspektrometrie. Aufgrund der sehr sanften Methode ist es möglich, spezifische nichtkovalente Komplexe zu untersuchen. Weitere Vorteile liegen in der hohen Toleranz von verschiedenen Puffern und Detergentien und darin, dass der Ladungszustand des untersuchten Ions derselbe ist, wie der in Lösungen, so dass die natürliche Umgebung fast imitiert wird. Die benötigten Mengen an zu analysierender Lösung von wenigen μL von μM -Konzentration erlaubt eine Analyse der zu untersuchenden Substanz im pmol Bereich. Im Vergleich zu den gängigen Methoden ESI und MALDI ist LILBID eine alternative Methode, die vorteilhaft sein könnte zur Untersuchung von nichtkovalenten Komplexen von Biopolymeren. Mit der Technik ist es möglich RNA/Ligand-Komplexe zu untersuchen und deren Stöchiometrie aufzuzeigen. Es konnte gezeigt werden, dass große makromolekulare Komplexe im m/z Bereich bis 1 MDa untersucht werden können. In diesem Bereich sind damit 50S Ribosomen von *thermus thermophilus* untersuchbar.^[178]

5.7 Selektivitätsassays

Die Ermittlung der Selektivität von kleinen Molekülen für verschiedene RNA-Zielstrukturen ist sehr nützlich, wenn konkurrierende zielstrukturferne RNAs bekannt sind. Nach Einschätzungen sind etwa 15 % aller RNAs in der Zelle tRNAs, so dass diese für Selektivitätsassays benutzt werden können.^[24] Man startet bei dieser Untersuchung nach Selektivität mit anderen Assays, wie z.B. Fluoreszenz-markierte RNAs, Verdrängung eines fluoreszierenden Liganden und Footprint-Assays und wiederholt das Experiment mit einem Überschuss an kommerziell erhältlichen *E. coli* tRNAs.^[179] Jede Abweichung von der vorher gemessenen Affinität des Liganden wird einer Bindung des Liganden zur nun hinzugegebenen tRNA zugesprochen, wodurch wenigstens eine schnelle Einschätzung über

mögliche Selektivitäten erfolgen kann. Trügerisch ist der Selektivitätsassay in Bezug auf einige Moleküle, wozu auch die Aminoglycoside gehören. Nach Zugabe von tRNA wich der IC_{50} -Wert nur minimal vom vorher gemessenen Wert ab, was aber nicht im Einklang mit den Erfahrungen mit Aminoglycosiden steht, die an viele verschiedene RNAs und Sekundärstrukturen mit gleicher Affinität binden.^[179, 180]

Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung von Selektivität ist die Durchführung von Bindungsassays von potentiellen Liganden gegen RNAs mit unterschiedlicher Länge und Sequenz. Ein Problem dieses Ansatzes ist, dass selbst bei kleinen RNA-Oligomeren die Anzahl der möglichen Variationen der Sequenz sehr hoch ist, um jede denkbare RNA-Sequenz individuell herzustellen und auf Wechselwirkung mit kleinen Molekülen zu untersuchen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Selektivitätsstudien erfolgten mit Wildtyp-TAR-RNA, Bulgefreie-TAR-RNA und Loopfreie TAR-RNA (Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40).^[179, 180]

5.8 Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)

FCS ist eine Einzelmolekül-Methode, die es erlaubt, Bindungskonstanten zu ermitteln. Die dynamischen Eigenschaften eines Moleküls in der Flüssigphase, wie die Mobilität des Moleküls oder dessen Diffusionsverhalten ist abgesehen von der Masse abhängig von der Form, welche stark geprägt ist durch ihre Umgebung und zum Teil von den Bindungspartnern. Im FCS-Experiment führt der Wechsel in der Mobilität eines kleinen spezifisch markierten Liganden, der an ein Makromolekül mit höherem Molekulargewicht bindet, zu einer Erhöhung der Diffusionskonstante. Diese kann durch die zeitaufgelöste laserinduzierte Emission des Fluorophors bestimmt werden. Im Falle des Tat-TAR-Komplexes werden beide Makromoleküle, aufgrund der vergleichbaren Masse mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Wenn beide Emissionen spektral unterscheidbar sind, dann ist die Funktion der Kreuzkorrelation bestimmbar, so dass sich daraus die Anzahl der gebundenen Moleküle und die Konzentration der ungebundenen Moleküle ergibt. Aus beiden Informationen ist es möglich, die Bindungskonstante und den Grad der Komplexbildung zwischen beiden Makromolekülen zu erhalten. Molekülen, die die Bindung des Tat-Proteins zur TAR-RNA stören, werden

antivirale Eigenschaften zugesprochen. Der Grad der Komplexierung bei vorliegender Tat TAR-Konzentrationen (25:25 nM), gemessen durch Analyse der Kreuzkorrelation, wurde aufgetragen gegen verschiedene Konzentrationen des Inhibitors, so dass aus diesen Kurven der IC_{50} -Wert des RNA-Liganden bestimmbar wird.^[181]

5.9 Zellassays

Die Mehrzahl der in dieser Arbeit verwendeten Zellassays basiert auf modifizierten HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), woraus die erste menschliche Zelllinie etabliert wurde. Der von Dietrich et al. verwendete Zellassay (Abbildung 20) basiert auf HeLa-P4-Zellen, die mit den für eine HIV-Infektion benötigten Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 ausgestattet sind. Das Gen *lacZ* für die β -Galactosidase befindet sich unter der Kontrolle des Promoters der LTR von HIV-1. Durch Infektion der Zelle mit HIV-1 kommt es zur Tat-vermittelten Transaktivierung und somit zur Expression der β -Galactosidase (Abbildung 21). β -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse der glykosidischen Bindung von β -Galactopyranosiden. Die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase kann dabei mittels Kolorimetrie bestimmt werden. Tat-Antagonisten blockieren diesen Mechanismus und verringern damit die Menge der β -Galactosidase.^[167]

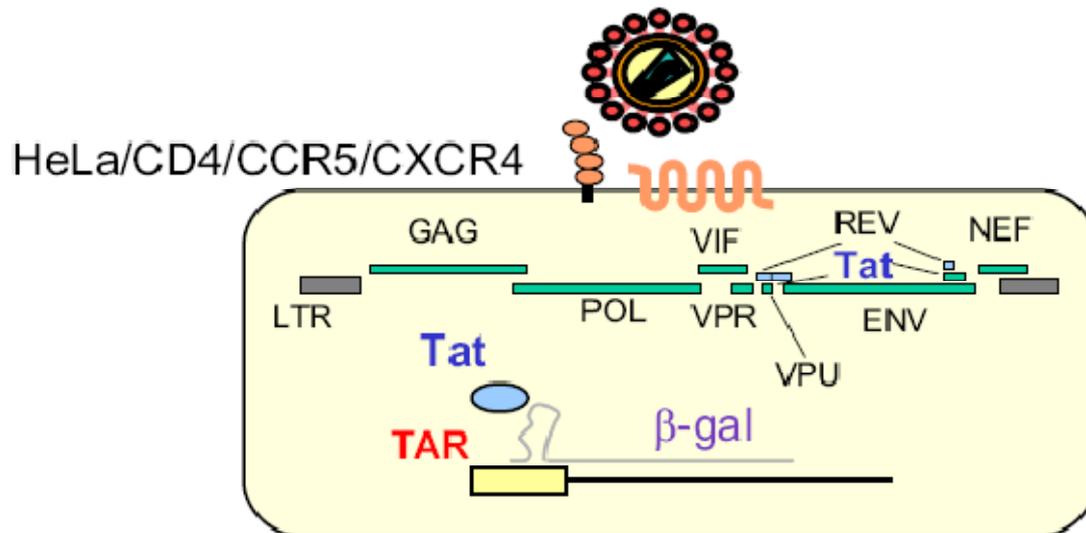


Abbildung 20: Schema des Reporterassays nach Dietrich et al.^[167]

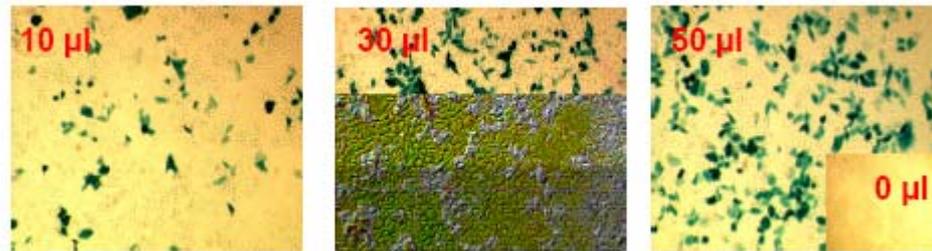


Abbildung 21: Infektion von HeLa P4 CD4/CCR5/CXCR4 mit HIV-1 (Lai). Die Zellen enthalten das Reportergen für β -Galactosidase (*lacZ*) unter Kontrolle von HIV-1 LTR. Durch Interaktion des Tat-Proteins mit TAR-RNA wird *lacZ* transkribiert, woraufhin die Zellen sich blau anfärben lassen und über Luminometer vermessen werden können.

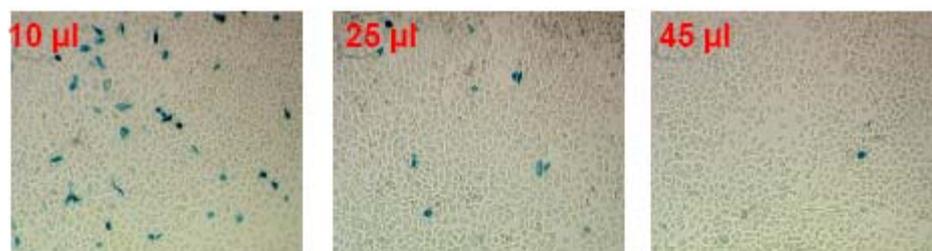


Abbildung 22: Inhibierung der Infektion durch zunehmende Konzentration von Tat 10mer. Die steigende Konzentration des Tat 10mers führt zu einer Inhibierung der Expression des Reportergen *lacZ* und damit der HIV-Produktion.

Mit Zugabe des synthetischen Referenzliganden bzw. Referenzinhibitors Tat 10 mer, kommt es zur Inhibierung der Genexpression und zur damit verbunden verminderten HIV-1-Produktion (Abbildung 22).

Um toxische Effekte des Antagonisten auszuschließen, schließt sich ein Toxizitätsassay an, der die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt.^[60, 167] Ein Beispiel hierfür ist der MTT-Test. Dabei wird den Zellen *in vitro* das farblose 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben, um deren Lebensfähigkeit bzw. den Anteil an lebender Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe zu ermitteln. Die Zellvitalität beruht auf der Reduktion des MTT zu blau-violetter Formazan.^[182]

Weitere Methoden, die in dieser Arbeit nicht zur Anwendung kamen, aber ebenfalls zur Untersuchung von RNA-Ligand-Wechselwirkungen beigetragen haben, sind Methoden, die auf radioaktiv markierte Proben aufbauen^[53, 60, 183], Mikroarrays^[184-188], die Methode der Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR)^[189], die Isothermale Titrations Kalorimetrie^[190, 191], das

Footprinting durch chemischen oder RNase-Abbau^[192-194] und die Untersuchung eingeführter Nitroxid-Spinlabel durch Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spektroskopie.^[195]

6. FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE (FPPS)

Die Festphasenpeptidsynthese (FPPS) basiert auf einer sequenziellen Addition von geschützten und ungeschützten Aminosäuren an einen unlöslichen Polymerträger. Nach Abspaltung der Schutzgruppe (Fmoc oder Boc) wird die nächste N-terminal geschützte Aminosäure hinzugegeben, wobei entweder ein Kupplungsreagenz oder ein voraktiviertes Aminosäurederivat die Kupplung vollzieht. Das resultierende Peptid ist am Harz über einen „Linker“ an seinem C-Terminus befestigt. Bei der Abspaltung vom Harz entsteht eine Peptidsäure oder ein Carboxamid, was vom Linker-Typ abhängt. Die Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren werden oft danach gewählt, dass sie simultan mit der Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz abgespalten werden. Vorteil der FPPS ist die einfache Aufreinigung nach den einzelnen Reaktionsschritten auf der festen Phase.^[196, 197]

6.1 Boc- und Fmoc-Strategie

Bei Anwendung der Boc-Strategie, der nach R. B. Merrifield durchgeführten Festphasenpeptidsynthese, erfolgt die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA, das zur Zersetzung von einigen sensiblen Peptid-Bindungen, sowie säurekatalysierten Nebenreaktionen führen könnte. Die Abspaltung des Peptides vom Harz nach der Boc-Strategie erfolgt über starke Säuren wie Fluorwasserstoff (HF) oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA).^[198]

Die Fmoc-Strategie von R. Sheppard et al. verwendet für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Piperidin, eine milde Base. TFA wird nur für die Abspaltung vom Harz und zur Entschützung einiger Peptid-Harze verwendet.^[196, 199, 200]

6.1.1 Scavenger für die Festphasensynthese

Falls Aminosäuren wie Arginin, Cystein, Tyrosin, Methionin und Tryptophan innerhalb der abzuspaltenden Peptidsequenz vorhanden sind, ist es nötig Scavenger wie Thioanisol oder Ethandithiol zuzugeben, damit abgespaltene Schutzgruppen keine Nebenreaktionen wie S_E -Reaktionen am Aromaten eingehen können.^[196]

6.1.2 Lösungsmittel für die Festphasensynthese

Die primären Solventien für die Festphasensynthese sind Dichlormethan (DCM), N-Methylpyrrolidon (NMP), N,N-Dimethylformamid (DMF) und dessen Analogon Dimethylacetamid (DMA).^[196]

6.1.3 Harze für die Festphasenpeptidsynthese

Wang-Harz (HMP-Harz) wird aus Chlormethylpolystyren, dem Merrifield-Harz, das durch 4-Hydroxybenzylalkohol modifiziert wurde, dargestellt. Nach Abspaltung des fertigen Peptides vom Harz liegt dieses als freie Säure vor.^[196, 201]

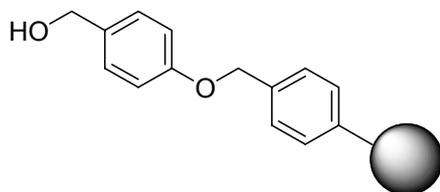


Abbildung 23: Wang-Harz

Das säurelabile Rinkamid-Harz wird erfolgreich bei der Synthese von Peptidamiden angewendet. Die Knüpfung zwischen dem Linker und der Aminosäure erfolgt über eine Amidbindung. Abspaltbedingung für das Harz ist 95 %ige TFA.^[196, 201]

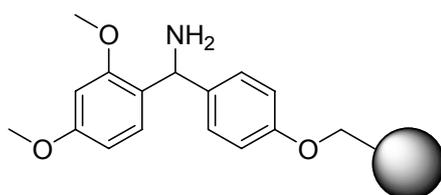


Abbildung 24: Rinkamid-Harz

Das Rinkamid-MBHA-Harz besteht aus 4-Methylbenzhydrylaminpolystyren, dabei dient Norleucin als Verbindung zwischen dem Polystyrenharz und dem modifizierten Fmoc-geschützten Rinkamid-Linker. Die Abspaltung dieser Festphase erfolgt mit TFA, wobei das synthetisierte Peptid als ein Peptidamid abgespalten wird.^[196, 201] Der Mechanismus für die Abspaltung eines Peptides von den Rinkamid-Harzen (Abbildung 24 und Abbildung 25) ist in Abbildung 26 wiedergegeben.

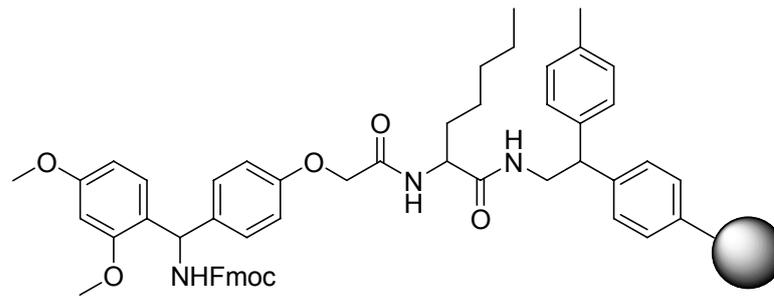


Abbildung 25: Rinkamid-MBHA-Harz

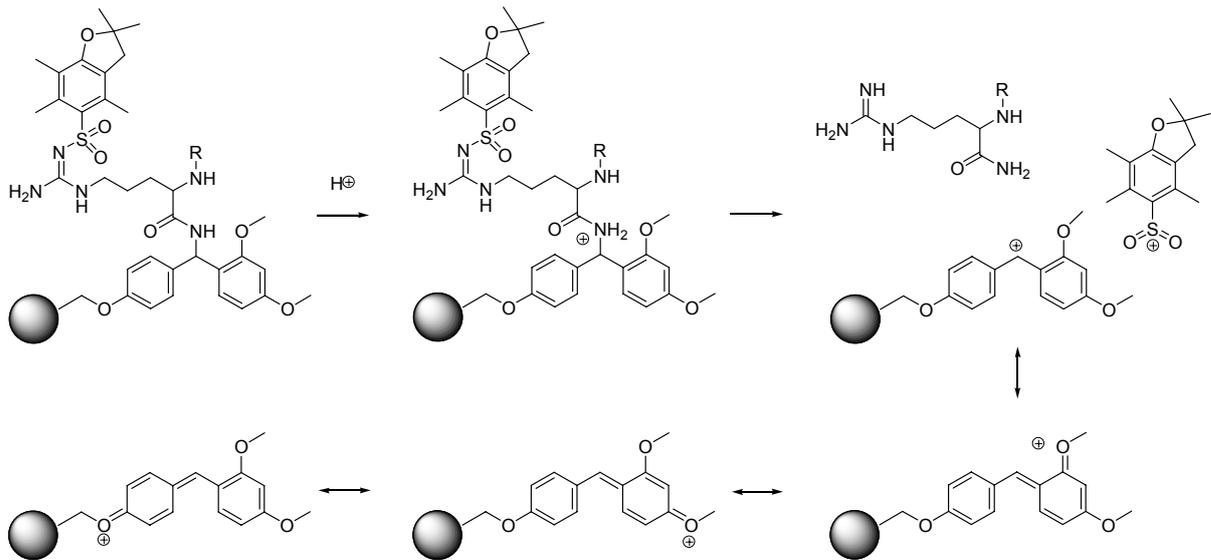


Abbildung 26: Mechanismus der Abspaltung eines Peptides, das ein Pbf-geschütztes Arginin enthält vom Rink-Amid-Harz. Nucleophile Scavenger sind in der Lage mögliche Nebenreaktionen der elektrophilen aromatischen Abgangsgruppe zu verhindern.

Das Rinksäure-Harz ist sehr säurelabil, so dass im sauren Milieu das Risiko besteht, dass es zum Verlust von Peptid kommt. Die Aminosäure wird über eine Esterfunktion an den Linker gekuppelt. Nach dem Abspalten des fertigen Peptides erhält man die freie Carbonsäure.^[196, 201]

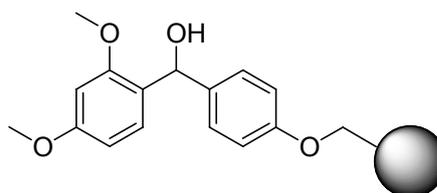


Abbildung 27: Rinksäure-Harz

Es sind ebenfalls Linker bekannt, bei denen durch Metallkatalyse, Photolyse, Ozonolyse oder Nucleophile das Peptid vom Harz abgespalten wird.^[201, 202]

6.1.4 Kupplungsmethoden

Vor der Kupplung der Aminosäure an den polymeren Träger muss diese aktiviert werden. *In situ* Aktivierung wird durch die Kupplungsreagenzien DCC (**117**), DIC/HOBt (**118/116**), EDC/HOBt (**119/116**), BOP (**113**), PyBOP[®] (**114**), TBTU (**120**)[®] T3P (**121**)^[203] und HBTU (**115**) ermöglicht. Als BOP-Ersatz wird PyBOP[®] (**114**) verwendet, da BOP (**113**) sich stöchiometrisch zu Hexamethyltriäminophosphin (HMPA), einem Mutagen, zersetzt, das in Deutschland nur unter Auflagen eingesetzt werden darf.^[196]

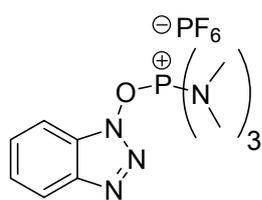
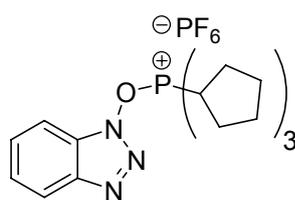
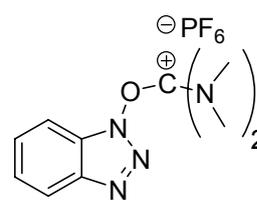
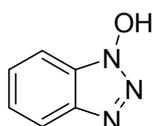
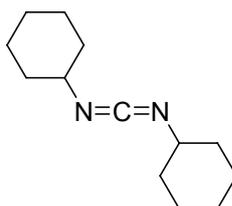
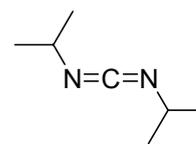
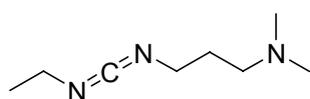
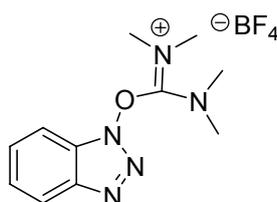
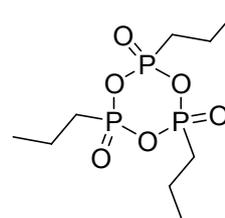
**113****114****115****116****117****118****119****120****121**

Abbildung 28: BOP (**113**), PyBOP[®] (**114**), HBTU (**115**), HOBt (**116**), DCC (**117**), DIC (**118**), EDC (**119**), TBTU (**120**),[®] T3P (**121**)

Beim Wang- oder Rinksäure-Harz wird die Aminosäure über eine Esterfunktion an den Linker gekuppelt. Dabei findet die Aktivierung meist über ein gemischtes Anhydrid statt. Dabei besteht die Gefahr einer partiellen Racemisierung, die mit der Stärke der Aktivierung zunimmt, da es dabei zu einem gesteigerten elektrophilen Charakter des Carbonyls kommt, so dass die CH-Acidität am Chiralitätszentrum steigt.^[204]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DIC/HOBt (**118/116**) als Kupplungsreagenz in der Festphasenpeptidsynthese verwendet. Dabei wird die Carbonsäure **127** *in situ* durch DIC (**118**) aktiviert. Dadurch entsteht ein O-Acylisoharnstoff **124**, der sich mit einem Nukleophil, im Falle der Peptidsynthese einem Amin **123**, zum Peptid **125** umsetzt. Um die Nebenreaktion der Umlagerung des O-Acylisoharnstoffs **124** zum inaktiven N-Acylharnstoff **122** zu vermeiden, wird HOBt (**116**) als Additiv der Reaktion zugesetzt (siehe Abbildung 29). Das HOBt (**116**) reagiert mit dem O-Acylisoharnstoff **124** zum Benzotriazolester **128**, der schließlich mit der freien Aminogruppe **123** der festen Phase reagiert.^[205]

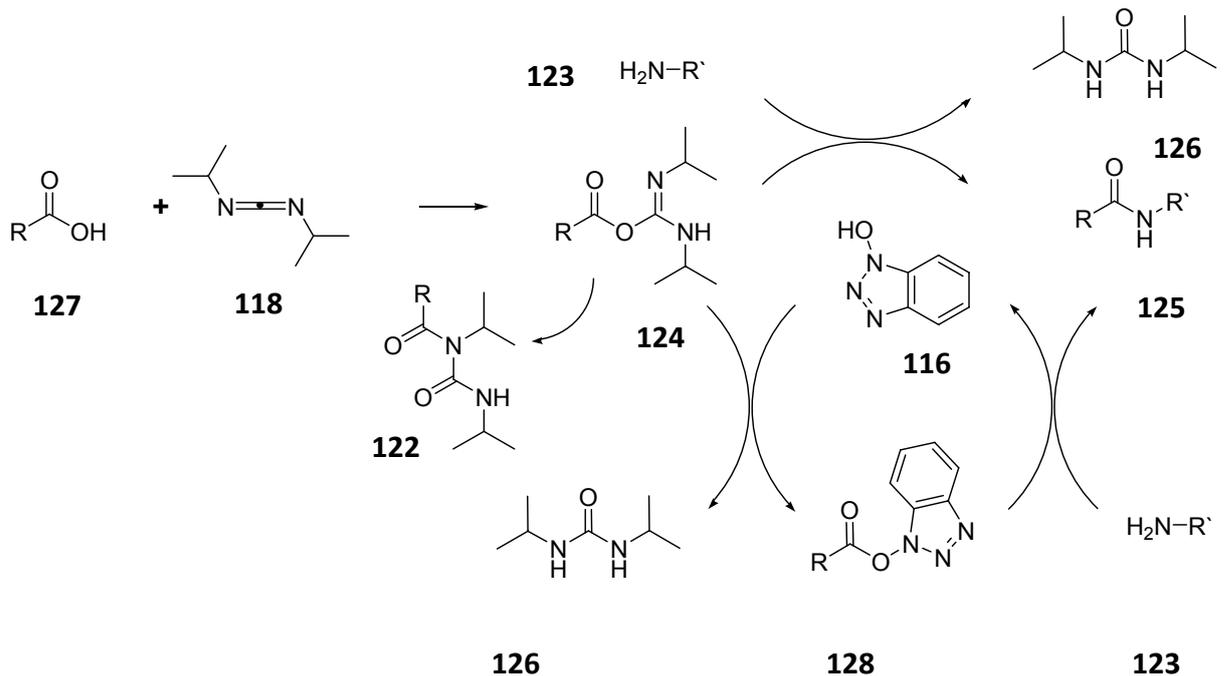
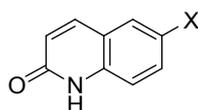
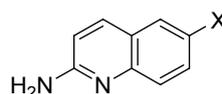


Abbildung 29: Carbonsäureaktivierung mit DIC (**118**) zum O-Acylisoharnstoff **124** und Umesterung des Aktivesters zum Benzotriazolester **128**, zur Vermeidung der Umlagerung des O-Acylisoharnstoff **124** zum inaktiven N-Acylharnstoff **122** wobei beide Wege zum Peptid **125** führen.^[205]

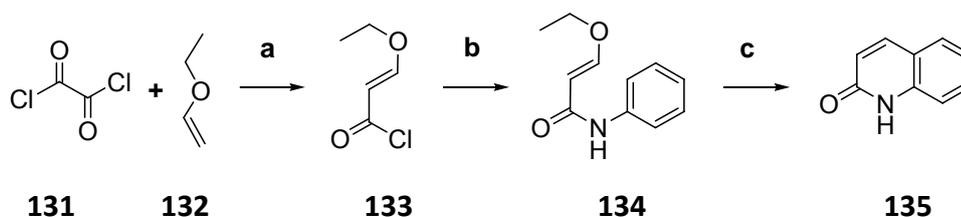
7. EIGENE ARBEITEN UND RESULTATE

7.1 Synthese kupplungsfähiger Bausteine für die FPPS

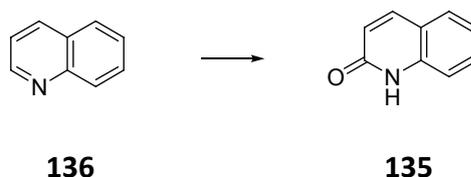
Potenzielle RNA-Liganden sollten elektrostatische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können. Ebenfalls sollten die Liganden leicht protonierbar sein, da die resultierende positive Ladung das negativ geladene Phosphordiesterückgrat anzieht. Aromatische Strukturen bilden hydrophobe Wechselwirkungen mit Nucleobasen aus.^[12] Da die Natur nur vier aromatische Aminosäuren (His, Trp, Phe und Tyr) besitzt,^[13] wurden heteroaromatische und aromatische Seitenketten in vorhergehenden Arbeiten^[206-210] durch Übergangsmetall-katalysierte C-C-Knüpfungsreaktionen, wie Heck-, Suzuki- und Negishi-Reaktion in Vorstufen von Aminosäuren eingefügt. Dabei besteht ein besonderes Interesse, funktionelle Aromaten einzubauen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). In verschiedenen Diplomarbeiten und Dissertationen wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Lactam **129** und das Amidin **130** in Aminosäurebausteine zur FPPS einzufügen.^[206-209] Amidin und Lactam bildet als Donor und Akzeptor zwei parallele Wasserstoffbrücken aus, so dass diese komplementär zu Purinbasen über Hoogsteen-Basenpaarung wechselwirken können (Abbildung 3 und Abbildung 4).

**129****130**

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, die Aromaten erfolgreich über PNA-analoge Chemie in peptidomimetische Bausteine einzufügen, die anschließend in der FPPS eingesetzt werden konnten. Die Darstellung der Bausteine begann mit der Synthese des Säurechlorid **133**, das aus Oxalylchlorid (**131**) und Ethylvinylether (**132**) gewonnen werden konnte. Das Säurechlorid **133** wurde mit Anilin zum Amid **134** umgesetzt, das durch Säure quantitativ in das Chinolin-2(1*H*)-on (**135**) überführt werden konnte.^[211, 212] Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung von Chinolin-2(1*H*)-on (**135**) geht von Chinolin (**136**) aus, das bei 235 °C mit Kaliumhydroxid zur Reaktion gebracht wurde. Aufgrund des niedrigen Umsatzes wurde der Weg über das Säurechlorid bevorzugt.

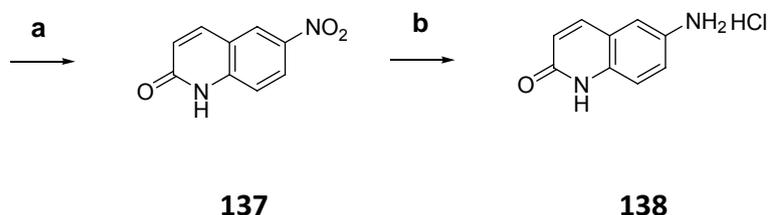


a) 1. 5.5 h, 0 °C; 2. 12 h, RT; 3. 120 °C, 30 min; 4. 70 °C, 10 mbar, 75 %; b) 1. Anilin (2 Äquiv.), CHCl₃, -5 °C; 2. 1 h, Rückfluss, 80 %; c) konz. HCl, RT, 1 h 70 % oder 15 h quantitativ.



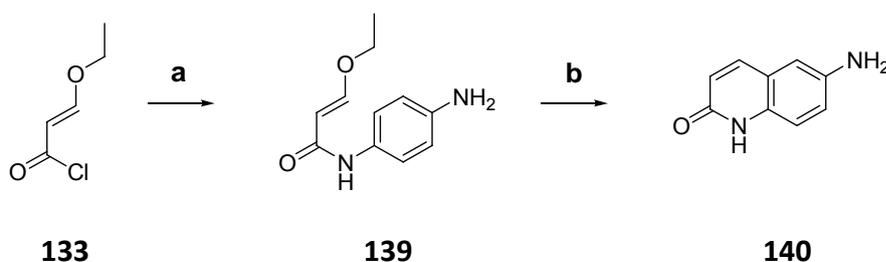
KOH, 235 °C, 10 %

Die Nitrierung von Chinolin-2(1H)-on (**135**) erfolgte mit Nitriersäure und Schwefelsäure als Lösungsmittel. Bei Temperaturen unter -10 °C kommt es zur selektiven Nitrierung an der 6-Position.^[213] In der anschließenden Reduktion wurde nach Wegen gesucht, die Nebenreaktion der Reduktion der Doppelbindung zu vermeiden. Zinn als Reduktionsmittel erwies sich als optimales Reagenz zur Darstellung des Amin **138**.



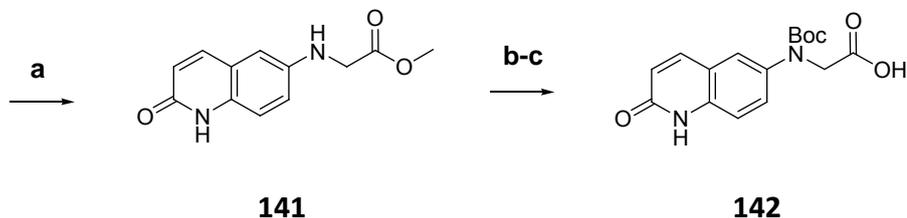
a) HNO₃ (1 Äquiv.), H₂SO₄, -10 °C, 79 %; b) Sn (2.9 Äquiv.), konz. HCl, 3 h, Rückfluss, 83 %.

Eine alternative Darstellung für 6-Amino-1H-chinolin-2-on **140** geht ebenfalls vom Säurechlorid **133** aus, das mit *p*-Phenylendiamin zum Amid **139** reagiert, das durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure in das Chinolin **140** cyclisiert wird.



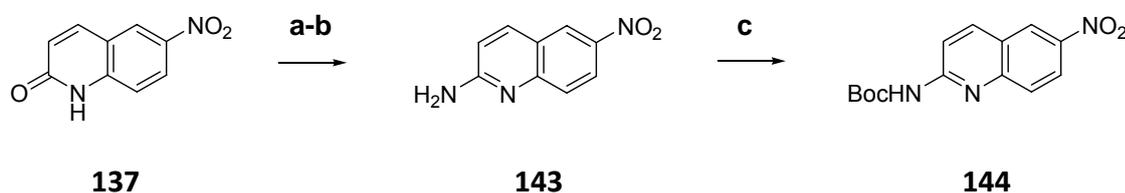
a) *p*-Phenylendiamin (2.5 Äquiv.), Et₃N (2 Äquiv.), abs DCM, RT, 78 %; b) konz H₂SO₄, RT, 12 h, 35 %.

Die Alkylierung erfolgte durch Bromessigsäuremethylester, die Schützung des sekundären Amins **141** wurde mit Boc-Anhydrid und DMAP als Base durchgeführt. Eine anschließende Verseifung mit LiOHxH₂O führte zur Carbonsäure **142**, die mit Amin-Gruppen durch Kupplungsreagenzien kondensiert werden kann.

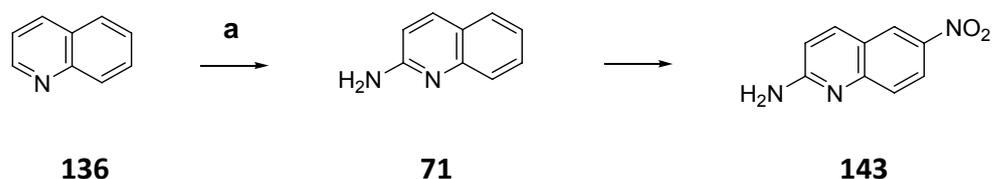


a) Bromessigsäuremethylester (1.1 Äquiv.), DIPEA (1.17 Äquiv.), RT, 15 h, 82 %; b) (Boc)₂O (4 Äquiv.), DMAP (4 Äquiv.), DMF, RT, 21 h, 80 %; c) LiOHxH₂O (10 Äquiv.), MeOH, H₂O, RT, 15 h, 78 %

Das Amidin **143** wurde ausgehend von 6-Nitrochinolin-2(1H)-on (**137**) durch Chlorierung^[214] und anschließender Umsetzung mit Ammoniak unter Druck und hoher Temperatur hergestellt.^[215] Die Darstellung von 6-Nitrochinolin-2-amin (**143**) ist nach der Literatur auch aus Chinolin (**136**) durch eine Tschitschibabin Aminierungsreaktion mit Natriumamid möglich.^[216] Aufgrund des geringen Umsatzes der Aminierungs-Reaktion wurde dieser Weg zur Darstellung des Amidin **143** verworfen.



a) POCl₃ (10 Äquiv.), PCl₅ (2 Äquiv.), Rückfluss, 3 h, 67 %; b) NH_{3(g)}, 150 °C, 75 bar, 20 h, 92 %; c) (Boc)₂O (3 Äquiv.), Et₃N (3 Äquiv.), DCM, 91 %.

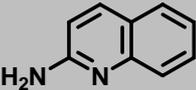
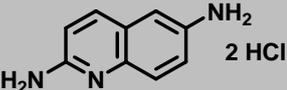
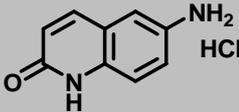


a) NaNH₂ (1.1 Äquiv.), *o*-Xylol, 100 °C, 0.7 %.

Zur Konzentrationsbestimmung von Amidin- und Lactam-haltigen Peptiden wurde von den elementaranalysenreinen Heterocyclen **145** und **138** der Extinktionskoeffizient ϵ bestimmt. Die Heterocyclen **71**, **145** und **138** wurden auf ihre Eigenschaft als Inhibitoren der Tat-TAR-Wechselwirkung in einem fluorimetrischen Verdrängungs-Assay (Abbildung 19) untersucht. Dabei zeigte sich bei Chinolin-2-amin (**71**) keine Aktivität. Bei Chinolin-2,6-diamin (**145**), das

durch Reduktion von **143** mit Wasserstoff und Pd/C als Katalysator hergestellt wurde, konnte ein IC₅₀-Wert von 0.5 mM festgestellt werden. Das Lactam **138** zeigte einen IC₅₀-Wert von 3-4 mM. 6-Aminochinolin-2(1H)-on (**138**) und Chinolin-2,6-diamin (**145**) wiesen in hohen Konzentrationen von 0.5-1 mM antivirale Effekte auf, die jedoch auf cytotoxische Eigenschaften der Verbindungen zurückzuführen sind.

Tabelle 1: Untersuchung der Heterocyclen **71**, **145** und **138** auf Affinität zu HIV-1 TAR-RNA, pK_a-Wert und Extinktionskoeffizient ε.

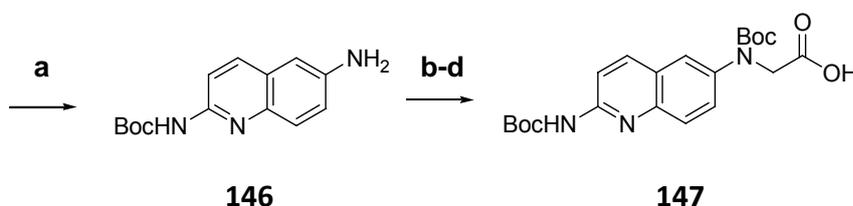
		
71	145	138
IC ₅₀ = keine Aktivität ^[a]	IC ₅₀ = 0.5 mM	IC ₅₀ = 3-4 mM
pK _a = 7.0-7.17	pK _a = 7.8	pK _a (Diäcetyliert(262)) = 10.0
	ε ^{[b][d][e]} (246 nm) = 29600	ε ^{[c][d][e]} (239 nm) = 37400
	ε ^{[b][d][e]} (370 nm) = 4800	ε ^{[c][d][e]} (359 nm) = 5000

[a] inaktiv bis 50 mM [b] bestimmt in H₂O [c] 50 mM TrisHCl pH 7.4 [d] L/(cm x mol) [e] Fehler ± 5 %

Tabelle 2: Untersuchung der Heterocyclen auf antivirale und cytotoxische Eigenschaften durch den HeLa P4 (Lai)- und MT-4 (IIIB)-Zellassay.

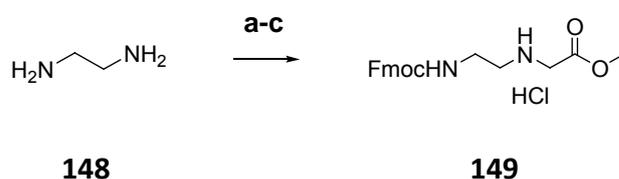
Verbindung	HeLa P4 (Lai)		MT-4 (IIIB)	
	Inhibierung IC ₅₀ [μM]	Toxizität CC ₅₀ [μM]	Inhibierung IC ₅₀ [μM]	Toxizität CC ₅₀ [μM]
6-Aminochinolin-2(1H)-on (138)	1000	n.b.	n.b.	n.b.
Chinolin-2,6-diamin (145)	500	500	>261	> / = 261

Die Einführung des Amidins als heteroaromatischen Rest über die Carbonsäure **147** erfolgte analog zum Lactam in einer dreistufigen Synthese.



a) Pd/C (30 Massen-%), H₂, EtOH, 40 °C, 1 h, 81 %; b) Bromessigsäuremethylester (3 Äquiv.), DIPEA (3 Äquiv.), DMF, RT, 15 h, 85 %; c) (Boc)₂O (5 Äquiv.), DMAP (5 Äquiv.), DMF, RT, 15 h, 82 %; d) LiOHxH₂O (6 Äquiv.), MeOH, H₂O, RT, 1 h, 86 %.

Die beiden kupplungsfähigen Carbonsäuren **142** und **147** wurden mit dem aus der PNA-Chemie bekannten Rückgrat **149** kondensiert, das ausgehend von Ethylendiamin **148** durch eine dreistufige Synthese entwickelt wurde.^[123, 217-222]



a) 1. Chloressigsäure (0.1 Äquiv), 4 °C; 2. RT, 48 h, 79 %; b) 1. HCl_(g), MeOH, 2. Rückfluss, 88 %; c) FmocONSu (1 Äquiv.), NaHCO₃ (3 Äquiv.), 1,4-Dioxan, RT, 15 h, 62 %

Als Kupplungsreagenzien mit der höchsten Ausbeute von 69 % mit der Lactam-Carbonsäure **142** erwiesen sich HBTU und NMM. Durch Austausch der Base NMM mit Et₃N konnte die Ausbeute der Kupplung der Amidin-Carbonsäure **147** von 32 % auf 71 % erhöht werden. Das Einführen der Boc-Schutzgruppe am sekundären Amin verhindert die mögliche Nebenreaktion der Kupplung zweier Carbonsäuren untereinander.

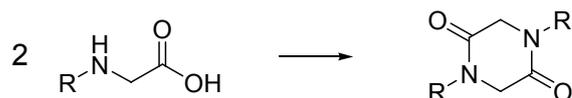
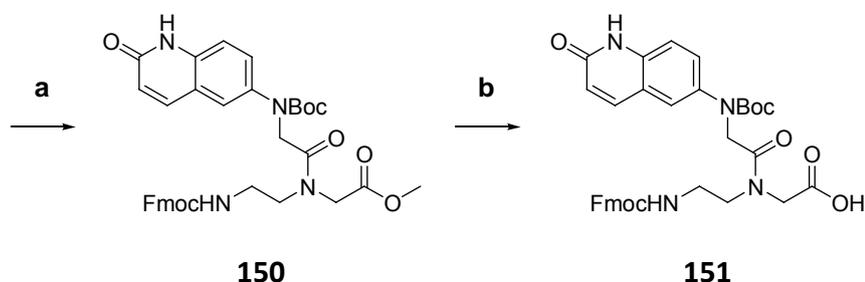


Abbildung 30: Mögliche Nebenreaktionen der Carbonsäuren **142** und **147** bei ungeschütztem Amin

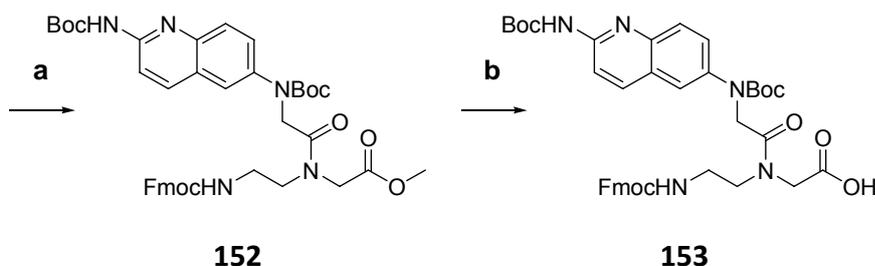
Kupplungen ohne diese Schutzgruppe wurden in der Diplomarbeit^[223] durchgeführt. Dabei konnten Ausbeuten im einstelligen Prozentbereich gewonnen werden. Die anschließende Verseifung zum kupplungsfähigen Baustein für die FPPS **151** und **153** erfolgte unter Erhalt der Schutzgruppen mit Trimethylzinnhydroxid, einem milden selektiven Verseifungsreagenz, mit hoher Ausbeute.^[224]



a) Carbonsäure **142** (1 Äquiv.), PNA-Rückgrat (1.2 Äquiv.), HBTU (3 Äquiv.), NMM (2 Äquiv.), DMF, RT, 3 h, 69 %; b) (CH₃)₃SnOH (8.6 Äquiv.), 1,2-Dichlorethan, 2 h, 60-80 °C, 85 %.

Tabelle 3: Kupplungsbedingungen für **142** und **149**

Kupplungs-Reagenz	Ausbeute [%]
HBTU/NMM	69
DIC/HOBt/DIPEA	30
EDC*HCl	40
T3P®/DIPEA	60



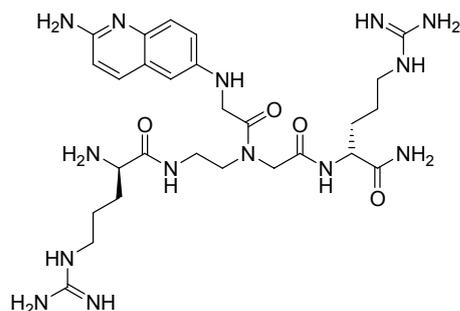
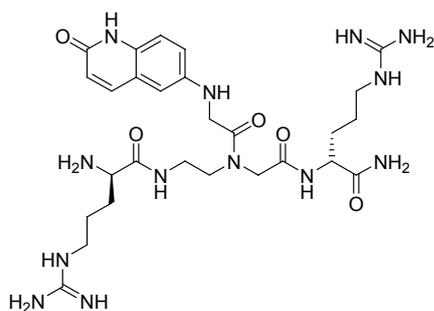
a) Carbonsäure **147** (1 Äquiv.), PNA-Rückgrat (1.1 Äquiv.), HBTU (1.3 Äquiv.), Et₃N (2.3 Äquiv.), CH₃CN, RT, 3 h, 71 %; b) (CH₃)₃SnOH (7.7 Äquiv.), 1,2-Dichlorethan, 2.5 h, 70 °C, 83 %.

Tabelle 4: Kupplungsbedingungen für **147** und **149**

Kupplungs-Reagenz	Ausbeute [%]
HBTU/NMM	32
DIC/HOBt/DIPEA	51
EDC*HCl	36
HBTU/Et ₃ N	71
T3P®/DIPEA	41

7.2 Darstellung von Tripeptiden mit Amidin und Lactam-Resten

Die peptidomimetischen Bausteine **151** und **153** wurden mittels Fmoc-Strategie der FPPS mit DIC/HOBt als Kupplungsreagenzien in Peptide eingebaut. Als flankierende Aminosäure der Tripeptide wurde Arginin gewählt, da die Bindungsstelle des Tat-Peptides an die TAR-RNA argininreich ist. Im physiologischen Milieu ist die Guanidiniumgruppe protoniert, so dass eine Affinität zur negativ geladenen RNA besteht. Ebenfalls positiv geladen ist die Aminosäure Lysin, deren Einbau zu größerer Diversität führt. Durch die Wahl von (D)-Aminosäuren kann der Abbau durch Proteasen verlangsamt werden.



H₂N-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH₂ (**154**) H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**158**)

Die Tripeptide mit dem Lactam-Baustein und dem Amidin-Baustein wurden mittels FRET-Assay auf ihre Fähigkeit, als RNA-Ligand der TAR-RNA zu fungieren, untersucht. Die IC₅₀-Werte der Bis-Arginin Tripeptide **154** und **158** lagen im Bereich von 2-3 μM. Durch den Austausch der Arginine durch Lysine kam es zu einer herabgesetzten Affinität zur TAR-RNA. Bei Tripeptiden mit Lactam und Amidin als Rest führte der Austausch von einem Arginin gegen ein Lysin zu keinen ausgeprägten Unterschieden in der Affinität. Eine deutliche schwächere Affinität konnte beobachtet werden durch den Austausch von beiden Argininen durch Lysin. Besonders deutlich zeigte sich diese Eigenschaft beim Tripeptid **157** mit Lactam als Rest. Die TAR-Bindung der Peptide **154** und **158** wurde durch Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) bestätigt. Dabei ist es möglich, durch Messung der dynamischen Eigenschaften von Einzelmolekülen in Lösung Inhibitionskonstanten zu ermitteln.

Tabelle 5: Untersuchung der synthetisierten Tripeptide aus den peptidomimetischen Bausteinen **151** und **153** auf Affinität zur HIV-1 und HIV-2 TAR-RNA durch FRET-Assay und FCS.

H ₂ N-(D)X-Amidin/Lactam-(D)X-CONH ₂	Molekül	FRET IC ₅₀ [μM] HIV-1	FRET IC ₅₀ [μM] HIV-2	FCS IC ₅₀ [μM]
H ₂ N-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH ₂	154	2.5	2.1	5
H ₂ N-(D)Arg-Lactam-(D)Lys-CONH ₂	155	1-1.5	0.5-1	
H ₂ N-(D)Lys-Lactam-(D)Arg-CONH ₂	156	1.1-1.5	1.5-2	
H ₂ N-(D)Lys-Lactam-(D)Lys-CONH ₂	157	14	~25	
H ₂ N-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH ₂	158	2	1.5-2	3.2
H ₂ N-(D)Arg-Amidin-(D)Lys-CONH ₂	159	4-6	~1	
H ₂ N-(D)Lys-Amidin-(D)Arg-CONH ₂	160	2-4	1.4	
H ₂ N-(D)Lys-Amidin-(D)Lys-CONH ₂	161	6-7	~2	

Ebenfalls wurden mit den Molekülen **154** und **158** massenspektrometrische Untersuchungen durch LILBID mit dem endmarkierten Tat-Peptid des FRET-Assays durchgeführt. Komplexbildung mit HIV-1 TAR-RNA und Tat führte zu beobachtbaren 1:1 und 1:2

Komplexen. Die gleichen Stöchiometrien wurden bei Komplexen der TAR-RNA und **158** beobachtet. Der Tat-TAR-Komplex konnte durch **158** verdrängt werden, so dass 1:1 und 1:2 Komplexe mit dem Tripeptid **158** entstanden und ebenfalls die Bildung eines TAR-Tat-**158**-Komplexes beobachtet werden konnte. Somit besteht die Annahme, dass zwei verschiedene räumlich getrennte Bindungsstellen an der TAR-RNA für argininreiche Peptide bestehen. Diese Beobachtung könnte zu einem peptidischen TAR-Liganden führen, der mit beiden Bindungsstellen gleichzeitig wechselwirkt. Untersuchungen des Komplexes von Peptid **158** mit TAR-RNA durch NMR werden in nächster Zeit durchgeführt. Analyse der Tripeptide auf Selektivität durch Vergleich von Affinitäten zu HIV-1 bzw. HIV-2 TAR-RNA werden in Kapitel 7.11 (Untersuchungen auf Selektivität der synthetisierten RNA-Liganden) behandelt.

7.2.1 Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der Tripeptide aus den PNA-Monomeren

Zur Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften wurden die Tripeptide **154** und **158** einem zellfreien Transkriptions-/Translationsassay (CFTT-Assay) unterzogen. Der Assay verwendet das Plasmid pIVEX2.3-GFP, so dass die Menge des entstandenen GFPs mittels Fluoreszenzspektrometer bestimmt werden kann. Dies führt zu einer Aussage über die Inhibierung der Transkription und Translation durch die Tripeptide **154** und **158**. Die verwendeten Wellenlängen des Fluoreszenzspektrometers ($\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$) zur Bestimmung des GFPs lagen jedoch bei den Eigenfluoreszenzen der Tripeptide **154** und **158** ($\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$), so dass der CFTT-Assay keine Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften ermöglichte.

Bei anschließender Inkubation mit einem Modellkeim (*B. subtilis* 168) konnte keine Aktivität der Tripeptide **154** und **158** festgestellt werden.

7.2.2 Untersuchung der antiviralen Eigenschaften im Zell-Assay

Die aus den Monomeren hergestellten Bis-Arginin-Tripeptide $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Lactam}-(\text{D})\text{Arg-CONH}_2$ (**154**) und $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Amidin}-(\text{D})\text{Arg-CONH}_2$ (**158**) wurden sowohl im Reporter-Gen-Assay mit HeLa P4 (Lai) als auch im MT-4 (IIIB)-Assay untersucht. Dabei zeigte **154** keine

Aktivität, was auf die cytotoxischen Eigenschaften der Verbindung zurückzuführen war. Bei $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg}-\text{Amidin}-(\text{D})\text{Arg}-\text{CONH}_2$ (**158**) sind ebenfalls cytotoxische Effekte ab einer Konzentration von 150 μM zu beobachten. Die antivirale Aktivität bei 10-50 μM ist nicht auf cytotoxische Effekte zurückzuführen. Im MT-4 (IIIB)-Assay zeigten die beiden Verbindungen und deren Modifikationen keine Aktivität.

Tabelle 6: Untersuchung der Tripeptide auf antivirale und cytotoxische Eigenschaften durch den HeLa P4 (Lai)- und MT-4 (IIIB)-Zellassay.

Verbindung	HeLa P4 (Lai)		MT-4 (IIIB)	
	Inhibierung IC_{50} [μM]	Toxizität CC_{50} [μM]	Inhibierung IC_{50} [μM]	Toxizität CC_{50} [μM]
$\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg}-\text{Amidin}-(\text{D})\text{Arg}-\text{CONH}_2$ (158)	10-50	150	>104	>104
$\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg}-\text{Amidin}-(\text{D})\text{Lys}-\text{CONH}_2$ (159)	n.b.	n.b.	>106	>106
$\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Lys}-\text{Amidin}-(\text{D})\text{Arg}-\text{CONH}_2$ (160)	n.b.	n.b.	>21	>21
$\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Lys}-\text{Amidin}-(\text{D})\text{Lys}-\text{CONH}_2$ (161)	n.b.	n.b.	>21	>21
$\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg}-\text{Lactam}-(\text{D})\text{Arg}-\text{CONH}_2$ (154)	>150	150	>23	>23

7.3 Tripeptide aus kommerziell erhältlichen (D)- bzw. (L)-Aminosäuren

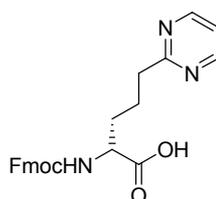
Zum Vergleich mit den aus peptidomimetischen Bausteinen hergestellten Tripeptiden wurden weitere Tripeptide aus kommerziell erhältlichen D- und L-Aminosäuren hergestellt und mit dem von V. Ludwig hergestellten Tripeptid $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg}-(\text{D})\text{Arg}-(\text{D})\text{Arg}-\text{CONH}_2$ (**164**) im FRET-Assay untersucht. Die IC_{50} -Werte der Verbindungen zeigen, dass die Affinität von der Anzahl der Arginine abhängt, aber unabhängig von der jeweiligen Konfiguration ist. Tripeptide, die nur Lysin bzw. Histidin enthalten, zeigen schwache Eigenschaften als RNA-Ligand.

Tabelle 7: Untersuchung der Tripeptide auf Affinität zur HIV-1 TAR-RNA durch FRET-Assay

H ₂ N-(L/D)X-(L/D)X-(L/D)X-CONH ₂	Molekül	IC ₅₀ [μM] HIV-1
H ₂ N-(D)Arg-(D)Lys-(D)Arg-CONH ₂	162	2-3
H ₂ N-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH ₂	163	4
H ₂ N-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-CONH ₂	164	4
H ₂ N-(L)Lys-(L)Arg-(L)Lys-CONH ₂	165	14
H ₂ N-(L)Lys-(L)Lys-(L)Lys-CONH ₂	166	70
H ₂ N-(L)His-(L)His-(L)His-CONH ₂	167	400-500

7.4 Darstellung von Tripeptiden mit 2-Pyrimidinyl-Rest

Die künstliche D-Aminosäure mit 2-Pyrimidinyl als aromatischem Rest **168**, wurde durch eine in der Dissertation von V. Ludwig ausgearbeitete Auxiliar-vermittelte Synthese hergestellt. Dabei wurde die stereoselektive Synthese von Myers als Ausgangspunkt gewählt, der das chirale Reagenz Pseudoephedrin als Auxiliar verwendet hatte. Das daraus hergestellte Peptid H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**169**) zeigte im FRET-Assay einen IC₅₀-Wert von 2 μM bei TARwt und einen IC₅₀-Wert von 150 μM bei TARbl. Auch bei Zellkultur-Studien im Reporter-gen-Assay wies das Tripeptid antivirale Eigenschaften (IC₅₀ = 40 μM) auf. Durch Strukturanalyse mit Hilfe von NMR sollte der Komplex von TAR-RNA und **169** aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass ein Arginin an den Bulge bindet. Die Datenlage legte die Vermutung nahe, dass das Peptid in zwei verschiedenen Orientierungen bindet, so dass in Zusammenarbeit mit M. Suhartono aus (D)-konfigurierter 2-Pyrimidinyl-haltiger Aminosäure mit C3-Linker (**168**) Tripeptidvarianten mit Lysin und Arginin an unterschiedlichen Positionen hergestellt wurden, die anschließend zur weiteren Strukturaufklärung beitragen sollten. **168** wurde aus (D)-Glutaminsäure als chiraler Ausgangsverbindung und einer Negishi-Kupplung als Schlüsselschritt für die Einführung des aromatischen Restes hergestellt.

**168**

$$\epsilon^{[a][b][c]} (248 \text{ nm}) = 3400$$

[a] bestimmt in EtOH/H₂O 2:1 (v:v) [b] L/(cm x mol) [c] Fehler ± 5 %

Beim Abspalten des Peptides vom Harz kam es durch das Einwirken der üblichen Reagenzien (TFA/PhSMe/PhOH/H₂O/EDT 82.5:5:5:5:2.5) im Zeitraum von fünf Stunden zur Bildung eines einzelnen Produktes, das in der Massenspektrometrie eine Masse besitzt, die 138 g/mol höher liegt als das gewünschte Tripeptid. Nebenprodukte mit dem gleichen Massenzuwachs wurden unter den gleichen Bedingungen bei der Abspaltung des Peptides H₂N-(D)Arg-(D)5Pyrim-(D)Arg-CONH₂ beobachtet.^[209] Durch Modifikation der Abspaltreagenzien (TFA/PhSMe/PhOH/H₂O/EDT/TIS 81.5:5:5:5:2.5:1) und verkürzte Einwirkzeit (90 min) konnten die gewünschten Peptide gewonnen werden:

Tabelle 8: Synthetisierte Tripeptide aus D-Aminosäure **168**.

H₂N-(D)X-(D)2Pyrim-(D)X-CONH₂
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂ (169)
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂ (170)
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂ (171)
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂ (172)

7.4.1 Untersuchung der Tripeptide aus (D)-Aminosäuren mit 2-Pyrimidinyl-Rest im Fluoreszenz-Kompetitions-Assay

Nach Aufreinigung und Reinheitsbestimmung durch HPLC, Analytik über ESI-MS bzw. NMR, sowie Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektrometer wurde ein IC₅₀-Wert von ~ 30 µM im Fluoreszenz-basierenden Assay für **169** erhalten. Dieser Wert wich von früher gefundenen Werten (2 µM) ab. Eine alte Probe von **169** wurde auf ihre Konzentration, Reinheit und den IC₅₀-Wert überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Probe nach HPLC sauber war und einen IC₅₀-Wert von 2 µM aufwies. Eine erneute Trennung über HPLC führte schließlich zu einem IC₅₀-Wert von ~30 µM. Es wird daher angenommen, dass die frühere Trennung unzureichend war. Tripeptid **171** bindet interessanterweise stärker an die TAR-RNA, als das Bis-Arginin-Analogon **169**.

Tabelle 9: Untersuchung der Tripeptide mit 2-Pyrimidinyl-Aminosäure **168** auf Affinität zur HIV-1 und HIV-2 TAR-RNA durch FRET-Assay.

H ₂ N-(D)X-(D)2Pyrim-(D)X-CONH ₂	Molekül	IC ₅₀ [μM] HIV-1	IC ₅₀ [μM] HIV-2
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂	169	~30	~17
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂	170	35	~26
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂	171	5-6	4-5
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂	172	43	50-55

Die Komplexierung von HIV-2 TAR-RNA mit der Verbindung **169** bzw. **171** wurde von J. Ferner (Arbeitskreis Schwalbe, Universität Frankfurt) mittels 1D-Titrationsexperiment im NMR durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein Arginin am Bulge die erste und stärkste Wechselwirkung eingeht. Der 2-Pyrimidinyl-Rest scheint nach den NMR-Daten nicht direkt an der Bindung an der TAR-RNA beteiligt zu sein. Bindungen des Tripeptids **169** finden von Nukleobase A27 bis zu G43 statt. Da ein einziges Tripeptid zu klein ist um gleichzeitig die beiden entfernten Nukleotide zu berühren, werden höhere Komplexe als 1:1 angenommen. Das Tripeptid **171** besitzt sogar eine noch höhere Affinität an die TAR-RNA als das Bisarginin-Tripeptid **169**. Durch NMR konnte dieser Affinitätsunterschied zwischen **169** und **171** bestätigt werden. Die höheren Komplexe von **169** mit TAR-RNA konnten ebenfalls mit massenspektrometrischen Daten bestätigt werden. Die Messungen des RNA/**169**-Komplexes durch LILBID zeigten ebenfalls Komplexe aus mehreren Tripeptiden an einer RNA.

7.4.2 Untersuchung der antiviralen Eigenschaften im Zell-Assay

Tripeptide mit 2-Pyrimidinyl-Rest wiesen keine antiviralen Eigenschaften sowohl beim HeLa P4-Assay als auch im MT-4-Assay auf. Die zuvor gefundenen Aktivitäten für H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**169**) wurden damit nicht bestätigt und sind möglicherweise durch Verunreinigungen zu erklären, die die Aussagen des Reporter-Gen-Assays stören.

Tabelle 10: Untersuchung der Tripeptide auf antivirale und cytotoxische Eigenschaften durch den HeLa P4 (Lai)- und MT-4 (IIIB)-Zellassay.

Verbindung	HeLa P4 (Lai)		MT-4 (IIIB)	
	Inhibierung IC ₅₀ [μM]	Toxizität CC ₅₀ [μM]	Inhibierung IC ₅₀ [μM]	Toxizität CC ₅₀ [μM]
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂ (169)	150	n.b.	>147	>147
H ₂ N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂ (171)	>150	n.b.	>152	>152
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂ (170)	>100	>100	n.b.	n.b.
H ₂ N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH ₂ (172)	>100	>100	n.b.	n.b.

Fehlerbreite: ± 30 %

7.5 Darstellung von Dabcyl-markierten Peptiden und Aufbau eines Quench-Assays

Da 2-Pyrimidinyl-haltige Peptide keine Eigenfluoreszenz und Lactam- und Amidin-haltige Peptide keine Fluoreszenzänderung bei Komplexierung aufweisen, ist es nicht möglich, die Dissoziationskonstante des unmodifizierten Peptides zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Quench-Assay (Abbildung 31) entwickelt, der auf Fluorescein-markierter TAR-RNA aufbaut. Die Peptide werden über einen Linker mit dem Farbstoff Dabcyl-markiert. Fluorescein und Dabcyl dienen als Fluorophor-Quencher Paar. Durch Komplexierung von Fluorescein-markierter TAR-RNA mit Dabcyl-markiertem Peptid verringert sich dessen Fluoreszenz. Daher besteht die Möglichkeit, den K_D -Wert von Dabcyl-markierten Peptiden zu bestimmen. Der Vorteil des Assays liegt darin, dass nur der Rezeptor, die Fluorescein-markierte RNA, bekannt sein muss.

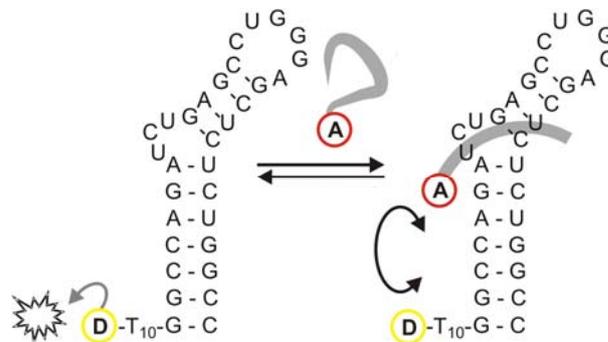


Abbildung 31: Modell des Quench-Assays

Da es sich bei der Fluoreszenzlöschung um einen reversiblen Prozess handelt, steigt die Fluoreszenz an, wenn der gebildete Komplex verdrängt wird. Dies kann durch die Zugabe

eines Liganden erfolgen, der mit dem Dabcyl-markiertem Peptid um die Bindungsstelle an der TAR-RNA konkurriert. Um auszuschließen, dass nur Dabcyl und positiv geladene Reste für die Bindung an die TAR-RNA verantwortlich sind, wurde Ethylendiamin und TREN mit Dabcyl gekuppelt, so dass Moleküle mit einer Dabcyl-NH(CH₂)₂NH₂ (**289**) bzw. zwei positiven Ladungen Dabcyl-NH(CH₂)₂N((CH₂)₂NH₂)₂ (**290**) untersucht werden konnten. Dabei wurde ein Löschen der Fluoreszenz im Quench-Assay im unteren mikromolaren-Bereich festgestellt.

Tabelle 11: Dabcl markiertes Ethylendiamin und TREN

Dabcyl-X	K _D -Wert
Dabcyl-NH(CH ₂) ₂ NH ₂ (289)	50 μM
Dabcyl-NH(CH ₂) ₂ N((CH ₂) ₂ NH ₂) ₂ (290)	4 μM

Folgende Tripeptide wurden über einen Glycin-Linker als Abstandshalter mit Dabcyl markiert und auf deren Eigenschaft als Fluoreszenzquencher hin untersucht. Das 36mer Tat-Peptid wurde im Arbeitskreis Schwalbe von S. Mensch hergestellt und im Rahmen dieser Arbeit mit Dabcyl gekuppelt, vom Harz abgespalten und aufgereinigt.

Tabelle 12: Dabcyl-markierte Tripeptide mit Glycin als Linker.

Dabcyl-Gly-[(L/D)X] _n -CONH ₂	K _D -Wert
Dabcyl-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH ₂ (299)	20±10 μM
Dabcyl-Gly-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH ₂ (297)	1.8±0.1 μM
Dabcyl-Gly-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH ₂ (298)	10 ± 1 μM
Dabcyl-Gly-(L)Arg-(D)2Pyrim-(L)Arg-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH ₂ (300)	2.1 ± 0.1 μM
Dabcyl-KSFTTKALGISYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQ-CONH ₂ (301)	7 ± 1 nM

In Untersuchungen von V. Ludwig wurde festgestellt, dass das Tripeptid H₂N-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ (**167**) eine höhere Affinität zur TARbl besitzt als zu TARwt. H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**169**) zeigte bei Selektivitätsstudien eine Präferenz zur Bulge-Region, so dass Loop und Bulge bindende Peptidabschnitte durch das Dabcyl-markierte Octapeptid **300** in einem Molekül vereint wurden. Der interne Vergleich der Affinitäten zu Fluorescein-markierter TAR-RNA zeigt eine höhere Affinität des Dabcyl-markierten Octapeptid **300** gegenüber den Dabcyl-markierten Peptiden **298** und **299**, die Teilabschnitte des Octapeptides beinhalten, was zum größten Teil auf mehr Ladungen zurückzuführen ist.

7.5.1 Versuche zum Aufbau eines Verdrängungs-Assays basierend auf Dabcyl-markierten Peptiden

Das 36mer Tat-Peptid wurde zunächst am N-Terminale Ende mit Dabcyl markiert. Von dem Dabcyl-markierten 36mer Tat-Peptid **301** versprach man sich höhere Selektivität als bei dem zuvor eingesetzten 9mer Tat-Modell. Durch das Quenchen der Fluorescein-Emission ist es möglich, den K_D -Wert des Systems zu bestimmen. Da der Prozess der Fluoreszenzlöschung reversibel sein sollte, kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz, wenn eine Komponente aus dem Komplex verdrängt wird. Dies kann durch die Zugabe eines Liganden erfolgen, der mit dem Dabcyl-markierten Peptid um die Bindungsstelle an der TAR-RNA konkurriert. So kann über die Verdrängung die Affinität eines Liganden ermittelt werden.

Eine vollständige Verdrängung des Liganden war nur durch die Zugabe von Polyarginin und BSA möglich. Da das Verhalten des Assays gegenüber bekannten RNA-Liganden nicht eindeutig war, wurde von der Bestimmung des neuen TAR-RNA-Liganden über diesen Verdrängungs-Assay Abstand genommen.

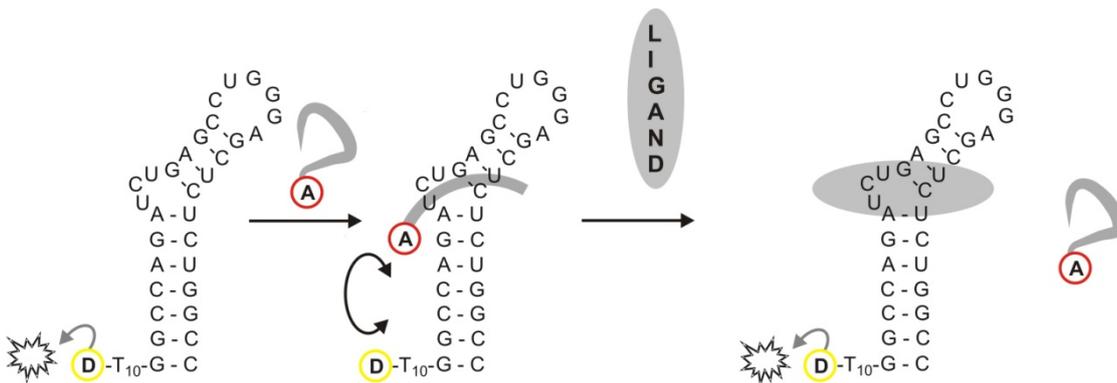


Abbildung 32: Modell der Verbindung des Quench-Assays mit Verdrängung des Komplexes durch RNA-Liganden

Wenn Glycin als Linker eingesetzt wird, geht eine positive Ladung verloren. Um einen Vergleich mit bestehenden Daten zu erhalten wurde Fmoc-Glycin durch N_{α} -Boc- N_{ϵ} -Fmoc-(L)-Lysin in der FPPS als Linker ersetzt. Dadurch erhält man Dabcyl-markierte Peptide mit gleicher Anzahl von Ladung wie bei den nicht markierten Peptiden.

Tabelle 13: Dabcyl-markierte Tripeptide mit N_{α} -Boc- N_{ϵ} -Fmoc-(L)-Lysin als Linker.

$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(L/D)Arg-X-(L/D)Arg-CONH_2$	K_D -Wert
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH_2$ (296)	$0.3 \pm 0.1 \mu M$
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-CONH_2$ (295)	$0.4 \pm 0.1 \mu M$
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH_2$ (291)	$2.8 \pm 0.1 \mu M$
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH_2$ (292)	$0.3 \pm 0.1 \mu M$
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH_2$ (293)	$2.1 \pm 0.1 \mu M$
$H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-(L)2Pyrim-(D)Arg-CONH_2$ (294)	$3.2 \pm 0.1 \mu M$

Für Formelbilder siehe Kapitel 10.3

Unter der Voraussetzung, dass sich 1:1 Komplexe bilden, lässt sich die Dissoziationskonstante ermitteln, wenn man die Zunahme der Komplexbildung gegen die Konzentration des zugegebenen Dabcyl-markierten Peptides aufträgt (Abbildung 33). Die Auswertung der Daten zeigte Abweichungen von der theoretischen Titrationskurve von der experimentell bestimmten, was auf höhere Komplexe hindeutet. Eine exakte Bestimmung von K_D -Werten ist auf diesem Weg nicht möglich.

Die ermittelten Werte erlauben dennoch eine relative Bewertung untereinander.

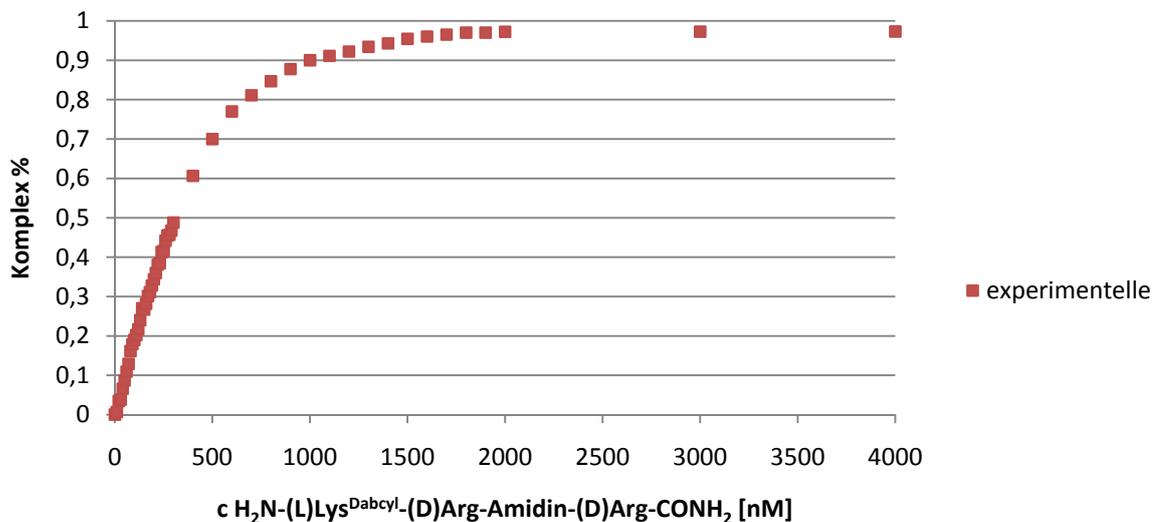


Abbildung 33: Experimentell ermittelte Titrationskurve von $H_2N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH_2$ (**292**) gegen Fluorescein-markierter Wildtyp TAR-RNA.

7.6 Synthese von 3,5-Diaminopyrazolderivaten

Wie in Kapitel 2.1.1.4 erwähnt, wurde ein Bindungsmodell von Arginin bzw. Argininamid (**21**) an TAR-RNA basierend auf Untersuchungen per NMR^[9] und MD-Studien^[55] aufgestellt. Dabei bindet die Guanidiniumgruppe nicht G26 und die beiden Phosphate simultan, sondern entweder an die beiden Phosphate oder an das Guanosin (Abbildung 8 und Abbildung 9).^[9] Durch Überlagerung der beiden Bindungsschemata kommen Derivate des 3,5-Diaminopyrazol als mögliche Inhibitoren des Tat-TAR-RNA Komplexes in Betracht (Abbildung 34). Da der Protonierungsgrad für die Bindung wichtig ist, wurden die pK_a -Werte bestimmt, die anzeigen, dass alle Diaminopyrazole Werte unter 7.0 aufweisen. Damit liegen die Diaminopyrazole im Assay gering protoniert vor. Um die Protonierung zu erhöhen wurden die Untersuchungen im FRET-Assay zusätzlich auch bei pH 6.0 vorgenommen.

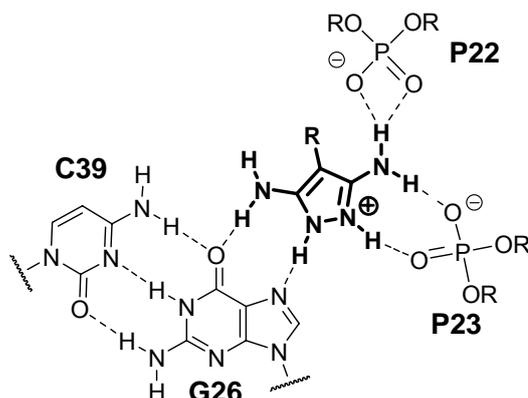
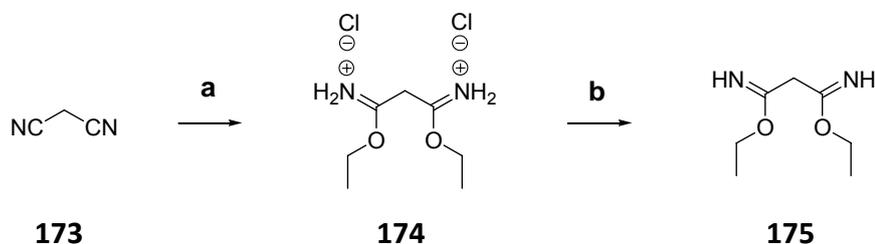
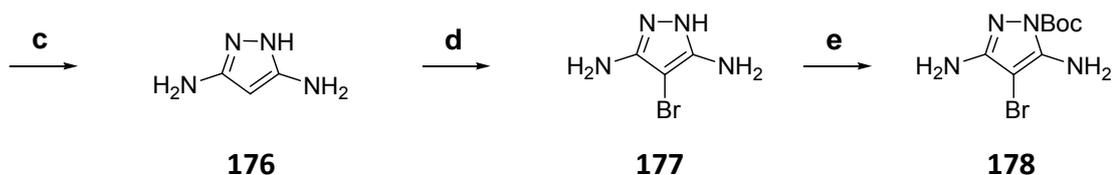


Abbildung 34: Bindungsmodell von Derivaten des 3,5-Diaminopyrazols an die TAR-RNA

Zu Beginn wurde das unsubstituierte 3,5-Diaminopyrazol (**176**) ausgehend von Malonsäuredinitril (**173**) dargestellt.^[225, 226] Zugabe von Brom führte dabei zu 3,5-Diamin-4-brompyrazol (**177**).^[227]



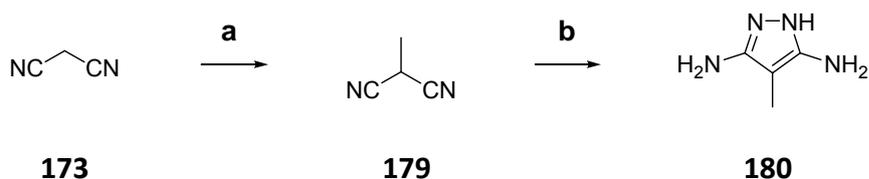
a) EtOH (2.2 Äquiv.), 1,4-Dioxan, $HCl_{(g)}$, 12 h, 92 %; b) K_2CO_3 , Et_2O , 88 %.



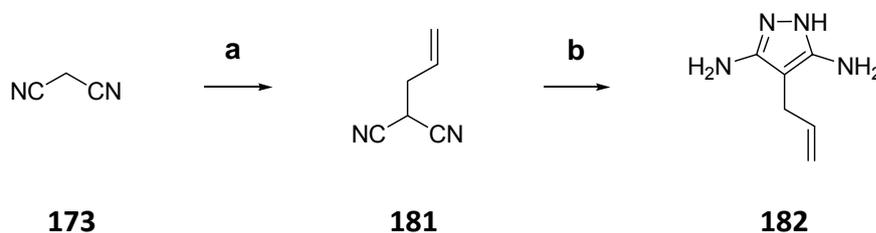
c) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss, 66 %; d) Br_2 (1 Äquiv.), H_2O , 58 % e) $(\text{Boc})_2\text{O}$ (2.5 Äquiv.), Et_3N (2.5 Äquiv.), THF, 15 h, RT, 40 %.

Eine C-C-Kreuzkupplung nach Sonogashira ist mit Brompyrazol **177** und dem Boc-geschützten 3,5-Diamin-4-brompyrazol (**178**) nicht möglich.

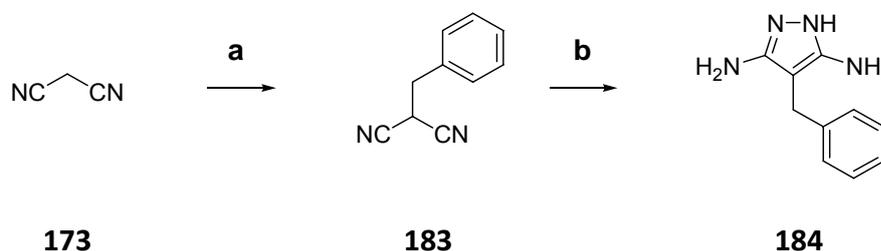
Weitere Derivate von 3,5-Diaminopyrazol wurden ebenfalls ausgehend von Malonsäuredinitril (**173**) hergestellt. Dazu wurde Malonsäuredinitril (**173**) alkyliert^[228] zu R = Allyl **181**, Benzyl **183** und Methyl **179** und anschließend mit Hydrazin-Monohydrat in der Siedehitze versetzt, so dass dadurch die Derivate von 3,5-Diaminopyrazol **180**, **182** und **184** entstanden.



a) Iodmethan (1 Äquiv.), TBAB (4 mol%), K_2CO_3 (1 Äquiv.), RT, 2 h; b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss, 5 h, 48 %.



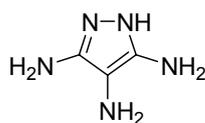
a) Allylbromid (1 Äquiv.), TBAB (4 mol%), K_2CO_3 (1 Äquiv.), RT, 13 h; b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss, 15 h, 21 %.



a) Benzylbromid (1 Äquiv.), TBAB (4 mol%), K_2CO_3 (1 Äquiv.), RT, 11 h; b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss, 15 h, 20 %.

7.6.1 Untersuchung der Bindungseigenschaften von Diaminopyrazol-Derivaten

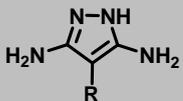
Die durch das Modell der Fusion von zwei Guanidinen entstandenen cyclischen Verbindungen wurden auf ihre Eigenschaft als Tat-TAR Inhibitor in einem auf Fluoreszenz basierten Assay untersucht. Dabei zeigten die Diaminopyrazole **176**, **178**, **180**, **182** und **184** IC₅₀-Werte bei pH 7.4 zwischen 8 und 12 mM. Durch die Einführung einer dritten Amino-Gruppe zum Triaminopyrazol **185** wird die Verbindung basischer (pK_a = 5.9) und liegt bei pH 7.4 protoniert vor.



185

Das resultierende Kation besitzt eine höhere Affinität (IC₅₀ = 2-3 mM) im Gegensatz zu den unprotonierten Diaminopyrazolen **176**, **178**, **180**, **182** und **184**. Um die Affinitäten der Kationen der Diaminopyrazole **176**, **178**, **180**, **182** und **184** untersuchen zu können, wurde der Assay bei pH 6.0 durchgeführt. Dabei zeigten die Diaminopyrazole mit großen Substituenten an der 4-Position **182** und **184** IC₅₀-Werte zwischen 1.5 und 1.8 mM. Diaminopyrazole mit keinem oder kleinem Substituenten **176** und **180** wiesen dabei dieselben IC₅₀-Werte (0.7-0.8 mM) wie Triaminopyrazol **185** auf. Damit übertreffen die Verbindungen **176**, **180** und **185** den dikationischen Liganden Argininamid (**21**), der bei pH 7.4 und 6.0 einen IC₅₀-Wert von 1.5 mM aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Bindungsmodell, so dass protonierte Diaminopyrazole sich in Bezug zur TAR-RNA als „Super-Guanidine“ verhalten.

Tabelle 14: Untersuchung der Diaminopyrazolderivate auf antivirale und antibakterielle Eigenschaften durch FRET-Assay bei pH 7.4 und pH 6.0 und Bestimmung des MIC-Wertes für *S. aureus*, *E. coli* und *E. faecalis*.

Molekül 		IC ₅₀ pH 7.4 [mM]	IC ₅₀ pH 6.0 [mM]	pK _a	MIC (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>)
R = H	176	10-12	0.7-0.8	6.1 ^b	>40 μM
R = CH ₃	180	11	0.75-0.8	6.3 ^b 5.4 ^a	
R = CH ₂ CHCH ₂	182	10-11	1.5-1.7	6.1 ^b 5.35 ^a	
R = CH ₂ C ₆ H ₅	184	8	1.5-1.8	6.2 ^b	
R = NH ₂	185	2-3	0.7-0.8	3.3 ^a 5.9 ^a	
R = Br	178	8	-	-	

a) Die Messungen wurden potentiometrisch von Infraseriv Knapsack durchgeführt und unterliegen der Qualitätssicherung nach DIN EN ISO 9001 und DIN EN ISO/IEC 17025. b) UV-spektroskopisch ermittelt.

7.7 Synthese von Indazolderivaten

Ausgehend von den gewonnenen Ergebnissen der Diaminopyrazole wurde ein mögliches Bindungsmodell für 3,7-Diamino-indazol (**190**) vorgeschlagen.

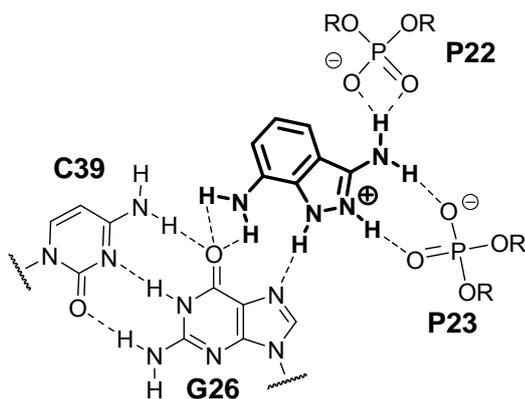
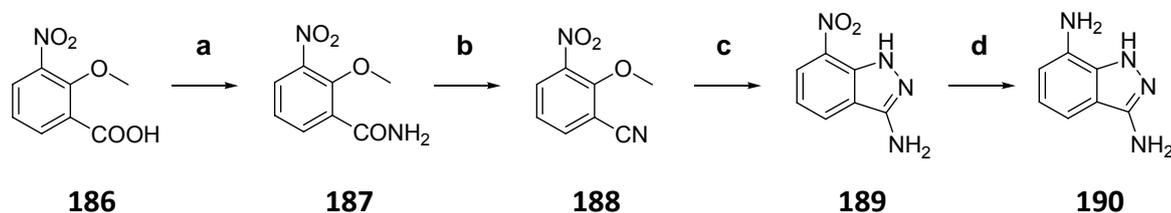


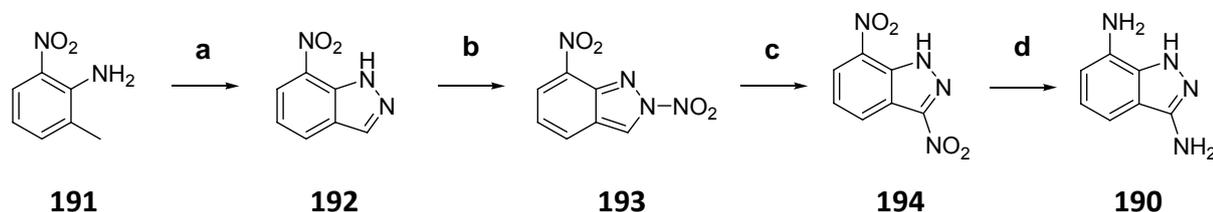
Abbildung 35: Bindungsmodell von 3,7-Diamino-indazol (**190**) an die TAR-RNA

Ausgehend von 2-Methoxy-3-nitrobenzoesäure (**186**)^[229, 230] wurde das Nitril **188** hergestellt, das durch Hydrazin-Monohydrat zu **189** und anschließende Reduzierung mit Wasserstoff in das 3,7-Diamino-indazol (**190**) übergeführt wurde. Die Reduktion mit Zinn in 6 N HCl führte direkt zum Dihydrochlorid des 3,7-Diamino-indazols **190**. Ein literaturbekannter Weg^[231, 232] führte zum 3,7-Dinitro-indazol (**194**), der nach der erfolgreichen Synthese des 3,7-Diamino-

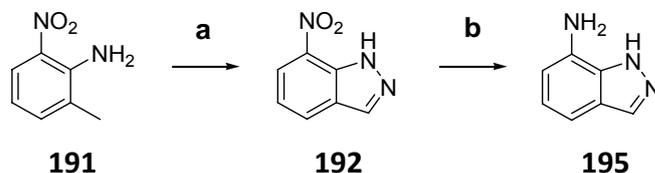
indazol (**190**) abgebrochen wurde. Die Reduktion des Zwischenprodukts **192** mit Wasserstoff ergab als Endprodukt 7-Amino-indazol (**195**). Sowohl 3,7-Diamino-indazol (**190**) als auch 7-Amino-indazol (**195**) zeigten bei pH 7.4 und pH 6.0 im FRET-Assay keine Aktivität als Inhibitor der Tat-TAR Wechselwirkung.



a) 1. PCl_5 (1.5 Äquiv.), $80\text{ }^\circ\text{C}$; 2. NH_3 61 %; b) 1. POCl_3 (1.3 Äquiv.), Pyridin, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; 2. H_2O , 67 %; c) MeOH , Rückfluss, $\text{H}_4\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5 Äquiv.), 0.5 h, 83 %; d) Pd/C (33 Massen-%), H_2 , MeOH , $40\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h, 90 %.



a) 1. Ac_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2. NaNO_2 ; H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3. 15 h RT, 18 %; b) HNO_3 ; Ac_2O , $15\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$; c) $140\text{ }^\circ\text{C}$, 9 h; d) Pd/C (33 Massen-%), H_2 , MeOH , $40\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h.



a) 1. Ac_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2. NaNO_2 ; H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3. 15 h RT, 18 %; b) Pd/C (30 Massen-%), H_2 , MeOH , RT, 30 min, 85 %.

7.7.1 Untersuchung der Bindungseigenschaften von Indazol-Derivaten

Die Pyrazolderivate 3,7-Diamino-indazol **190** und 7-Amino-indazol **195** wiesen bei pH 7.4 und 6.0 bis 8 mM keine Affinität zur TAR-RNA auf. Tests auf antibakterielle Eigenschaften durch T. A. Wichelhaus (Universitätsklinikum Frankfurt am Main) zeigten für **190** und **195** durch Inkubation mit *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), multiresistente *Enterococcus faecalis* (VRE) und multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) keine Aktivität bis $160\text{ }\mu\text{M}$.

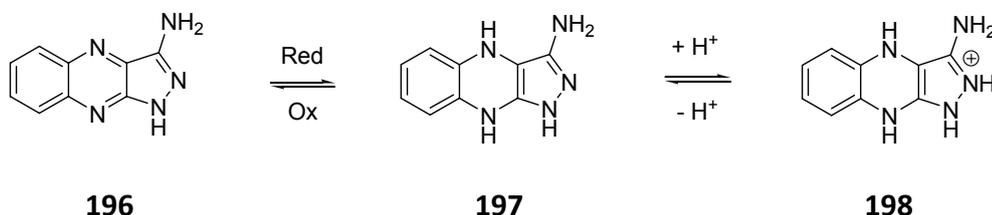
Tabelle 15: Untersuchung der Indazolderivate auf Affinität zur TAR-RNA durch den FRET-Assay bei pH 7.4 und pH 6.0 und Bestimmung des MIC-Wertes für *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, multiresistente *E. faecalis* und *S. aureus*.

Molekül	IC ₅₀ pH 7.4 mM	IC ₅₀ pH 6.0 mM	pK _a	MIC (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> multiresistente <i>E. faecalis</i> und <i>S. aureus</i>)
190	inaktiv ^a	inaktiv ^a	-	>160 µM
195	inaktiv ^a	inaktiv ^a	-	>160 µM

a) keine Aktivität bis 8 mM

7.8 Versuche zur Synthese von 1,9-Dimethyl-4,9-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]-chinoxalin-3-amin (202)

Die Einführung der Struktur des Triaminopyrazols (**185**) in ein Phenazin-artiges Grundgerüst führt zu Verbindung **196**. Die reduzierte Form des 1*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]chinoxalin-3-ylamin (**197**) sollte es ermöglichen, im protonierten Zustand **198** zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und damit eine höhere Affinität mit den Nucleobasen der RNA zu entwickeln (Abbildung 36).



Die reduzierte Form **197** ging jedoch sehr schnell in die oxidierte Form **196** über. Die Reduktion erfolgte im Assay durch die Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit. Die anschließende unerwünschte Oxidation der reduzierten Form im Assay erfolgte umgehend und das Reduktionsmittel behinderte zusätzlich das Messverfahren.

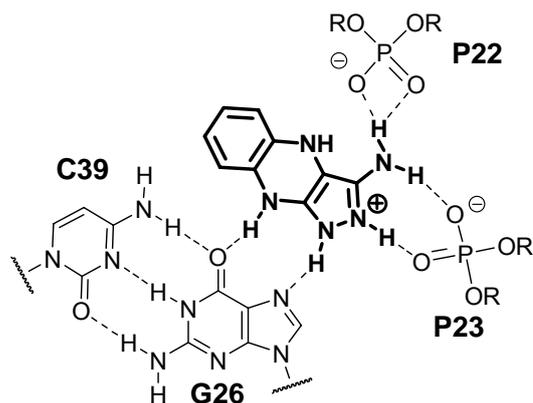
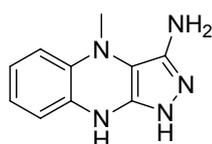
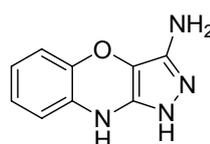


Abbildung 36: Bindungsmodell der reduzierten Form von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin (**198**)

Der Prozess der Rückoxidation ist nach Messungen des Redoxpotenzials von -1.377 V gegen eine Standard Kalomel-Elektrode reversibel. Durch die Alkylierung des Phenazins **199** oder durch Austausch eines Stickstoffatoms des Phenazins in ein Sauerstoffatom **200** sollte es möglich sein, ein Redox-Potenzial nahe 0 V zu erreichen.



199



200

Ausgehend von den möglichen Syntheserouten zum 1-Methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-3-amin (**202**) (Abbildung 37) wurde versucht, 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol (**207**) mit **208-219**^[233] zu verknüpfen. Es kam nur zur Reaktion mit **216-219**. Die weitere Einführung der Methylgruppe über Alkylierung scheiterte jedoch.

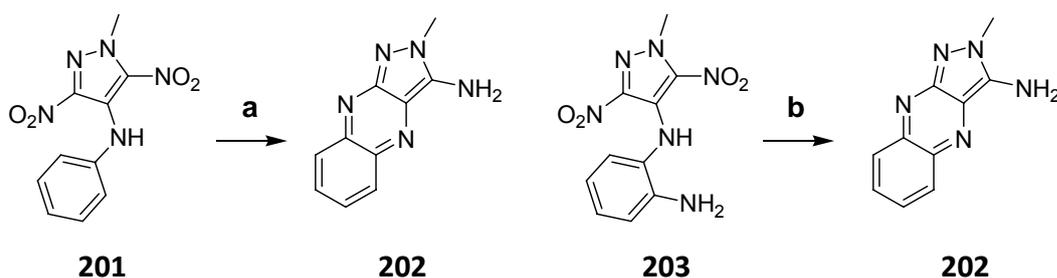
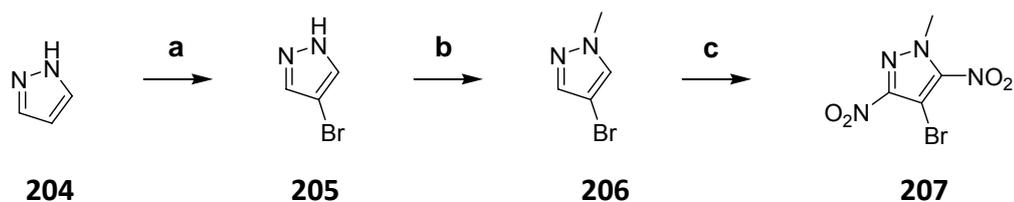
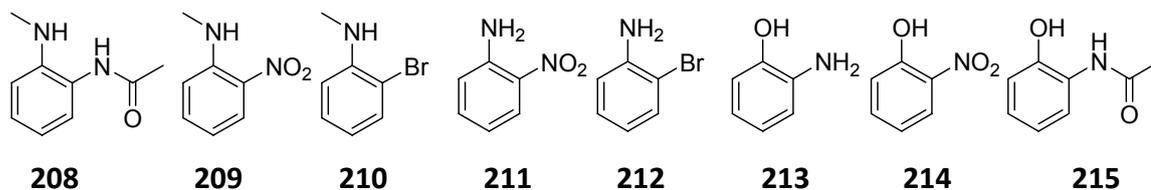


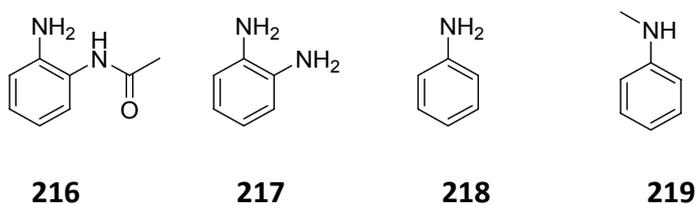
Abbildung 37: Syntheserouten zu 1-Methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-3-amin (**202**) a) H₂, Pd/C, EtOH, 56 % b) NaBH₄, 2 N NaOH, Rückfluss, 59 %



a) Br₂ (1 Äquiv.), H₂O, Rückfluss, 1 h, 88 %; b) KOH (1.5 Äquiv.), TEAB (0.15 Äquiv.), MeI (1 Äquiv.), 15 h, RT, 81 %; c) HNO₃, H₂SO₄ (25:1), Rückfluss, 2 h, 65 %

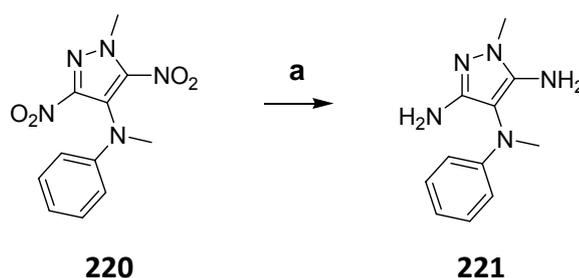


1) 100 °C, DMSO; 2) NaH, THF, 60 °C; 3) Pd(dppf)Cl₂, 1,4-Dioxan



1) 100 °C, DMSO

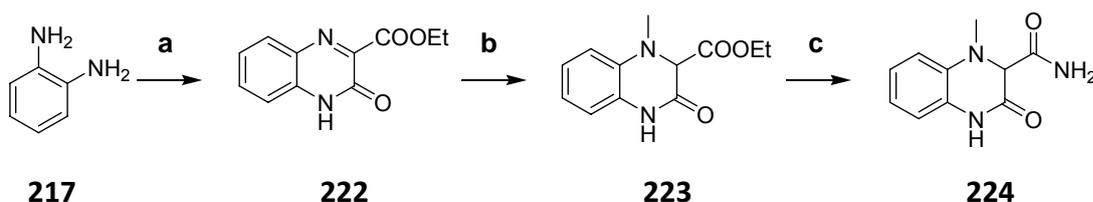
Die erfolgreiche Reaktion von Brompyrazol **207** mit dem Anilinderivat **219** führte zum Produkt **220**. **220** wurde in der Dissertation von G. Seifert mit Natriumborhydrid reduziert.^[234] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Reaktion wiederholt und das Produkt **221** konnte isoliert werden. Es wurden anschließend andere Wege zur Synthese des methylierten Phenazins eingeschlagen.



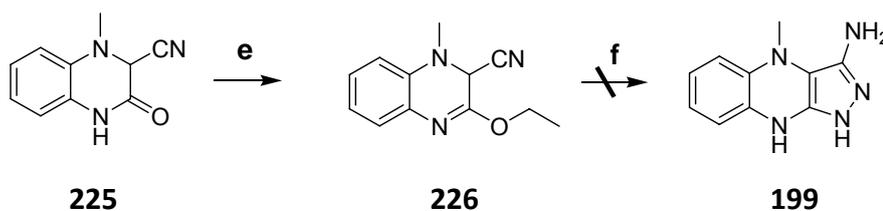
a) NaBH₄, 2 N NaOH, Rückfluss, 41 %

7.9 Versuche zur Synthese von 4,9-Dihydro-4-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]chinoxalin-3-amin (199)

Beginnend mit *o*-Phenylendiamin (**217**) wurde durch Reduktion zu **222** und durch anschließende Methylierung der Ethylester **223** gewonnen. Ein alternativer Weg liegt in der direkten reduktiven Methylierung von **217** zum Ethylester **223**. Dieser konnte anschließend mit Ammoniak unter Druck aminiert werden. Das Amid **224** wurde in Pyridin gelöst und mit POCl₃ versetzt. Nach Aufarbeitung durch Hydrolyse erhielt man das Nitril **225**, das mit Meerwein-Salz alkyliert wurde. Nachfolgende Reaktionen des Ethers **226** mit Hydrazin-Monohydrat führten nicht zum gewünschten methylierten Phenazin **199**. Dünnschichtchromatographie der Reaktion zeigte vollständige Umsetzung des Edukts und die Entstehung des vermeintlichen Produktes, das sich nach Sauerstoffkontakt schnell zu Gemischen zersetzte. Eine Aufreinigung und Analyse war daher nicht möglich.

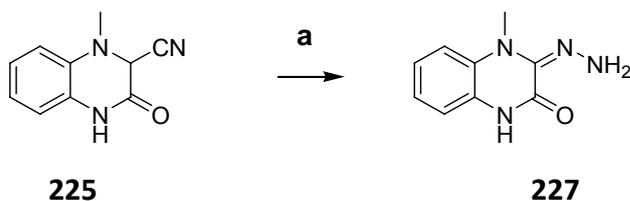


a) EtOH, Ethylketomalonat (1 Äquiv.), 1 h, Rückfluss, 77 %^[235]; b) 1. Pd/C, MeOH, 3 h, RT, 2. H₂CO (2 Äquiv.), H₂, 12 h, RT, 90 %; c) NH₃, 48 h, 120 °C, 50 bar, 78 %.



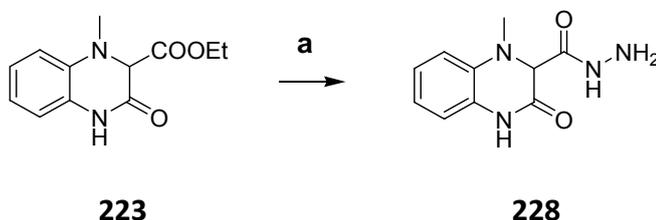
d) Pyridin, 0-5 °C, POCl₃ (3 Äquiv.), 10 min, 84 %; e) Triethyloxoniumtetrafluoroborat (1 Äquiv.), DCM, 20 h, RT, 92 %; f) N₂H₄xH₂O, EtOH

Mit der Zugabe von Hydrazin-Monohydrat zum Nitril **225**^[236] sollte eine Darstellung von **199** möglich sein. Es konnte jedoch nur das Hydrazinderivat **227** isoliert werden.

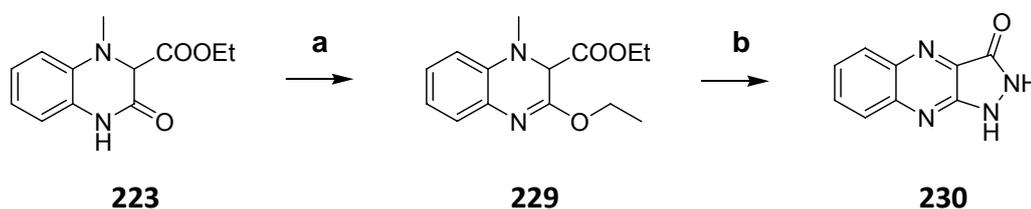


a) N₂H₄xH₂O, EtOH

Für weitere Versuche zur Cyclisierung wurde der Ethylester **223** mit Hydrazin-Monohydrat zur Reaktion gebracht. Dies führte zu Produkt **228**. **223** wurde anschließend mit Meerweinsalz zu **229** alkyliert, um die Elektrophilie zu erhöhen. Dabei konnte in geringer Ausbeute das cyclisierte Produkt **230** isoliert werden, das durch Eliminierung die Methylgruppe verlor.



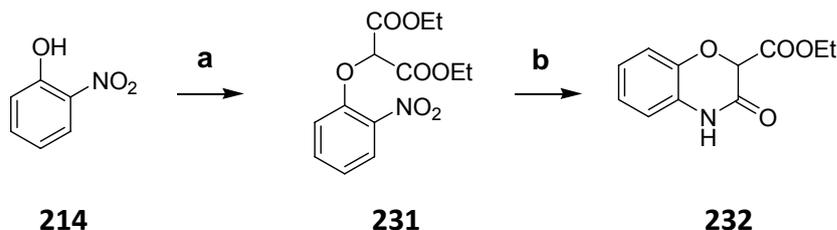
a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$, EtOH



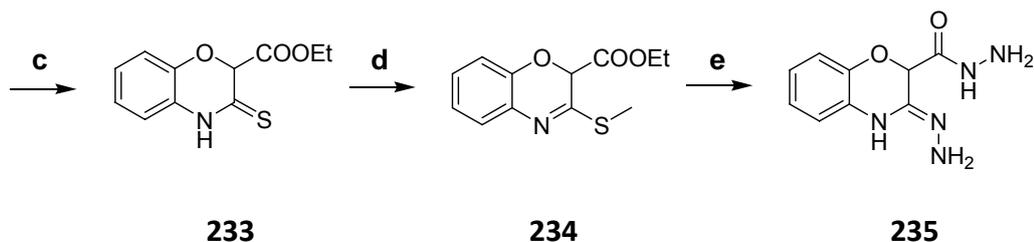
a) Triethylxoniumtetrafluoroborat (1 Äquiv.), DCM, 20 h, RT, 79 %; b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$, EtOH

7.10 Versuche zur Synthese von 1,7-Dihydro-benzo-pyrazolo[4,3-b][1,4]-oxazin-3-amin (**200**)

Für die Synthese von 1,7-Dihydro-benzo-pyrazolo[4,3-b][1,4]oxazin-3-amin (**200**) geht man von 2-Nitrophenol (**214**) aus. Nach Zugabe von Diethyl-2-brommalonat wurde der resultierende Diethylester **231** zum Ethylester **232** reduziert. Dieser wurde durch Lawesson's Reagenz^[237] in das Thiolactam **233** übergeführt.^[238] Methylierung mit Methyljodid führte zum Thiomethylether **234**,^[239] der nach der schnellen oder langsamen Zugabe von Hydrazin-Monohydrat bei RT oder in der Siedehitze in das Hydrazinderivat **235** überging, das sogleich als farbloses Pulver ausfiel.

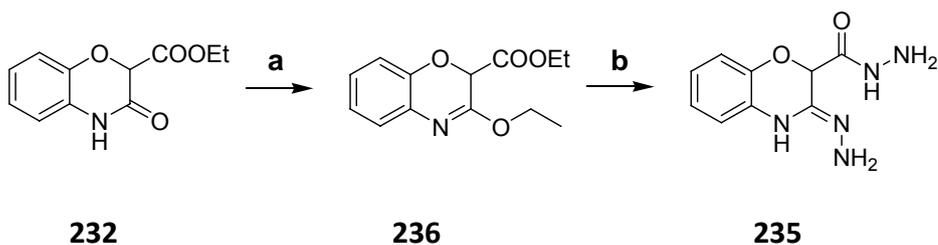


a) 1. KF (2.5 Äquiv.), DMF, RT, 2. Diethyl-2-brommalonat, 6 h, 60 °C, 87 %; b) H_2 , Pd/C (10 Massen-%) EtOH, 3 h, 60 °C, 56 %.



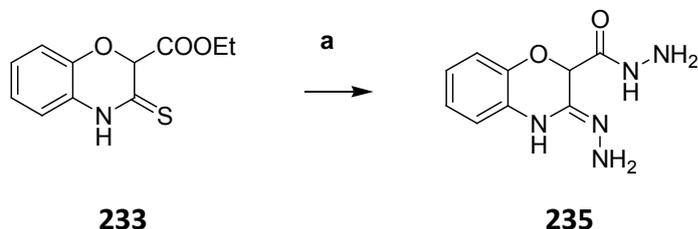
c) Lawesson's Reagent (1 Äquiv.), THF, 24 h, RT, 89 %; d) NaH (1.1 Äquiv.), MeI (1 Äquiv.), THF, RT, 87 %; e) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, RT oder $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss

235 fiel ebenfalls nach Reaktion von Hydrazin-Monohydrat mit dem Ethylether **236** aus.



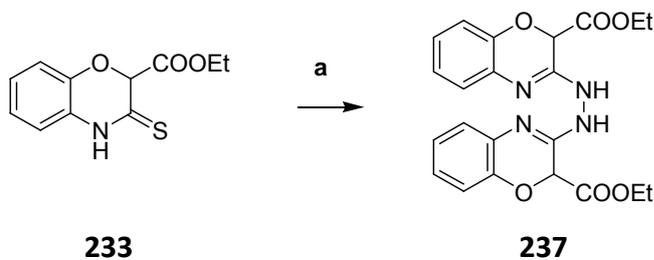
a) Triäthylxoniumtetrafluoroborat (1 Äquiv.), DCM, 24 h, RT, 69 %; b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH

Bei tropfenweiser Zugabe einer Lösung von Thiolactam **233** in eine konzentrierte Hydrazin-Monohydrat-Lösung fiel ebenfalls das Hydrazinderivat **235** aus.



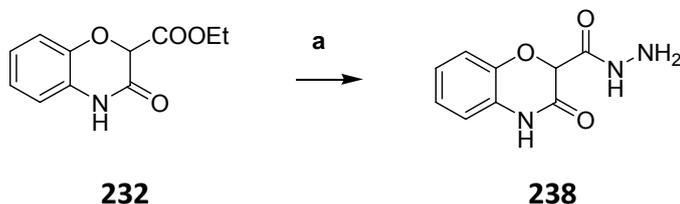
a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, RT oder $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss

Bei langsamer Einleitung von Hydrazin-Monohydrat-Lösung in eine konzentrierte Lösung von Thiolactam **233** entstand das Hydrazinderivat **237**.



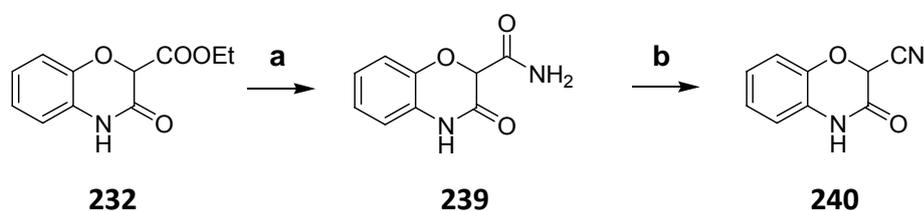
a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, RT oder $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.1 Äquiv.), EtOH, Rückfluss

Wie beim Ethylester **233** kommt es durch Reaktion mit Hydrazin-Monohydrat zur Isolierung des Lactam **238**. Weitere Aktivierung mit Meerwein-Salz, Lawesson's Reagenz^[237] und P₂S₅ führten zu untrennbaren Mischungen.



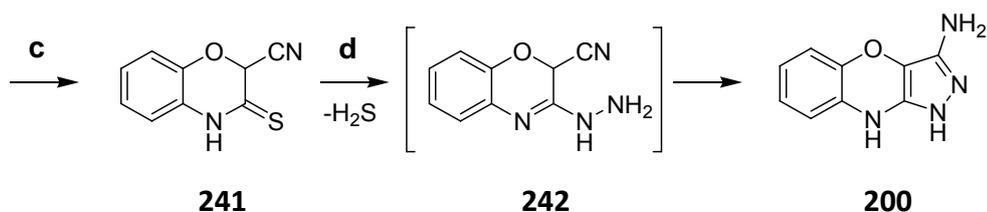
a) N₂H₄·H₂O (1.1 Äquiv.), EtOH, 1 h, Rückfluss, 94 %

Das Nitril **240** konnte durch die bekannte Reaktionssequenz (Ammoniak unter Druck und POCl₃ in Pyridin) ausgehend vom Ethylester **232** hergestellt werden.



a) NH₃, 5 h, 120 °C, 45 bar, 85 %; b) Pyridin, 0-5 °C, POCl₃ (3 Äquiv.), 5 min, 87 %.

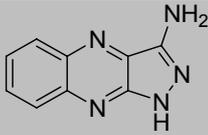
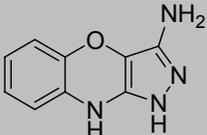
Das Nitril **240** wurde durch Lawesson's-Reagenz^[237] in das Thiolactam **241** übergeführt und anschließend mit Hydrazin-Monohydrat versetzt. Der in der Cyclisierung austretende Schwefelwasserstoff konnte nachgewiesen werden und nach vollständigem Verbrauch des Thiolactams **241** wurde die Reaktionslösung mit Pikrinsäure-Lösung versetzt, so dass das Pikrat von **200** sauber aus der Lösung ausfiel. Zur Untersuchung des Produkts auf seine Eigenschaft als Inhibitor der Tat-TAR Wechselwirkung erfolgte die Überführung des Pikrats in das jeweilige Hydrochlorid. Durch HPLC wurde die Stabilität des sich schnell zersetzenden Hydrochlorids während des Tausches des Salzes und der Messungen des FRET-Assays überwacht.



c) Lawesson's Reagenz (1 Äquiv.), THF, 2 h, 50 °C, 35 %; d) 1. N₂H₄·H₂O (1.2 Äquiv.), EtOH, 5 min, RT, 2. Pikrinsäure, MeOH, 92 %

7.10.1 Untersuchung der Bindungseigenschaften von Phenazin-Derivaten

Das Triaminopyrazol-Gerüst eingefügt in ein Phenazin-ähnliches Grundgerüst **196** sollte ebenfalls nur in der protonierbaren reduktiven Form **197** eine Affinität zur TAR-RNA aufweisen. Die Darstellung, Stabilisierung und Analyse der reduzierten Verbindung gestaltete sich schwierig. Bei Vermessung der oxidierten **196** und der reduzierten Form **197** (Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in den Assay) im FRET-Assay konnte keine Affinität zur TAR-RNA festgestellt werden. Zur Stabilisierung des reduzierten Zustands wurde Sauerstoff statt Stickstoff in das Phenazin-ähnliche Grundgerüst **200** eingefügt. Das Pikrat der reduzierten Form wurde zur Analyse im FRET-Assay in das Hydrochlorid übergeführt. Die Stabilität der Verbindung **200** nach dem Tausch des Salzes wurde durch HPLC überwacht und die Analyse durch den auf Fluoreszenz basierenden Assay erfolgte umgehend. Dabei zeigte **200** keine Aktivität bei pH 7.4 und einen IC_{50} -Wert von 850 μM bei pH 6.0. Ein Grund für die geringe Aktivität von **200** könnte in dessen Instabilität liegen, weswegen auch auf weitere Analysen verzichtet wurde.

 196	 200
Keine Aktivität, weder im oxidierten noch im reduzierten Zustand ^[a]	IC_{50} (pH 7.4) = keine Aktivität ^[b] IC_{50} (pH 6.0) = 850 μM

a) Keine Aktivität bis 400 μM wegen Löslichkeitsgrenze b) Keine Aktivität bis 1 mM

7.11 Untersuchungen der synthetisierten RNA-Liganden auf Selektivität

Untersuchungen auf Selektivität fanden mit Dabcyl-Gly-(L)Arg-(D)2Pyrim-(L)Arg-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ (**300**) und H₂N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**292**) statt. Obwohl keine 1:1 Komplexe gebildet wurden und somit die Dissoziationskonstante nicht exakt bestimmbar war, bestand trotzdem die Möglichkeit, aus den Bindungsdaten der synthetisierten Peptide gegen verschiedene Mutanten der TAR-RNA bevorzugte Affinitäten zu bestimmten Strukturmustern zu erhalten. Für diese Untersuchung wurden folgende mit Fluorescein-markierte RNAs verwendet: Wildtyp-TAR-RNA (TARwt) (Abbildung 38), Bulge-freie-TAR-RNA (TARbl) (Abbildung 39), und Loop-freie-TAR-RNA (TARll) (Abbildung 40).

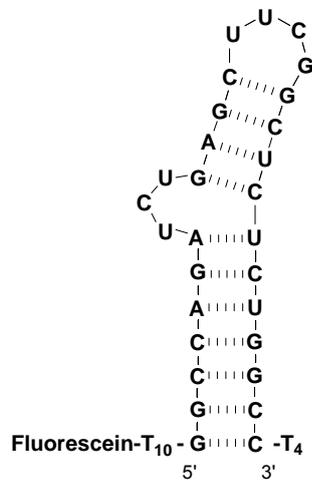


Abbildung 38: Wildtyp-TAR-RNA (TARwt)

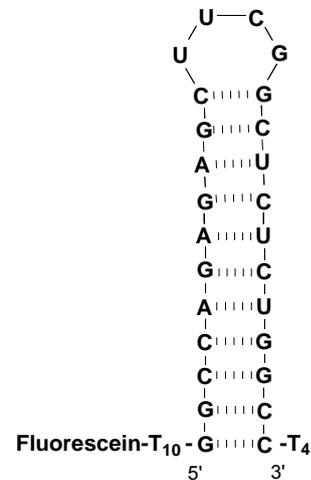


Abbildung 39: Bulge-freie-TAR-RNA (TARbl)

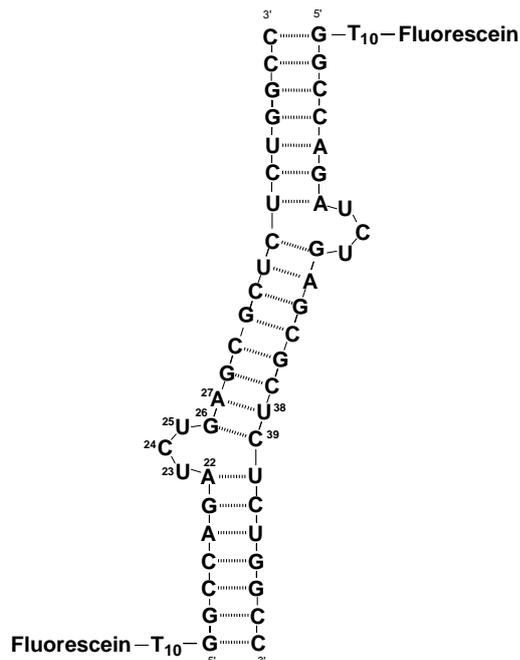


Abbildung 40: Loop-freie-TAR-RNA (TARll)

Die Selektivitätsuntersuchung der TAR-RNA Mutanten mit **292** erfolgte mit Zugabe von 1 mM Magnesium-Salz und alternativ ohne diesen Zusatz. Die Zuführung des Magnesiums diente der Einstellung physiologischer Bedingungen. Durch die zweifach positiv geladenen Ionen sollte die Möglichkeit geschaffen werden, durch Herabsetzen der Affinität die Selektivität zu erhöhen. In keinem der Experimente mit **300** und **292** konnten allerdings bevorzugte Bindungsstellen nachgewiesen werden.

Weitere Analysen auf Selektivität wurden mit allen künstlichen Tripeptiden durch Verwendung des FRET-Assays mit unmarkierter HIV-1 und HIV-2 TAR-RNA vorgenommen (Tabelle 5 und Tabelle 9).

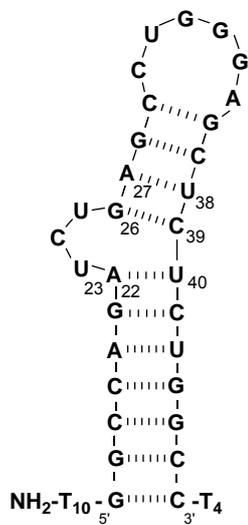


Abbildung 41: Modell der HIV-1 TAR-RNA

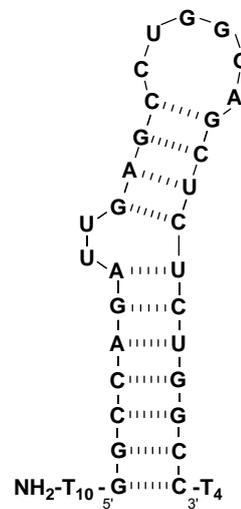
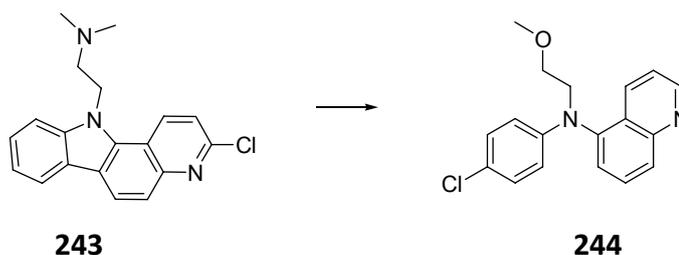


Abbildung 42: Modell der HIV-2 TAR-RNA

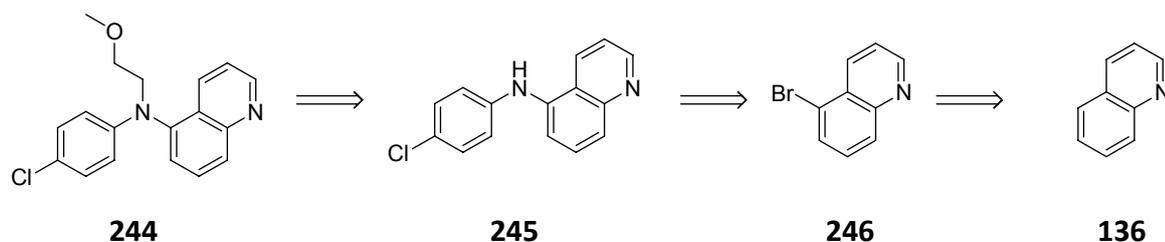
Die Tripeptide mit Lactam und 2-Pyrimidinyl als heteroaromatischem Rest zeigen die Tendenz, dass geringfügig bessere Affinitäten zu HIV-2 TAR-RNA bestehen. Die beiden Bis-Lysine **157** und **161** weisen eine höhere Affinität zu HIV-1 TAR-RNA auf. Tripeptide mit Amidin als Rest besaßen vergleichbare Bindungsdaten zu den beiden TAR-RNAs. Generell zeigte sich, dass Tripeptide mit mindestens einem Arginin höhere Affinitäten zu unterschiedlichen TAR-RNAs aufweisen als Tripeptide mit nur Lysin in den flankierenden Positionen. Allgemein ist zu sagen, dass alle Klassen von TAR-RNA-Liganden geringe Selektivitäten aufweisen, was daran liegen dürfte, dass die Komplexierung der TAR-RNA mit zellulären Faktoren und Liganden zu unterschiedlichen Konformationen führt, das ein allgemeines Prinzip für Bindungen kleiner Moleküle erschwert.

7.12 Synthese von Liganden aus virtuellem Screening

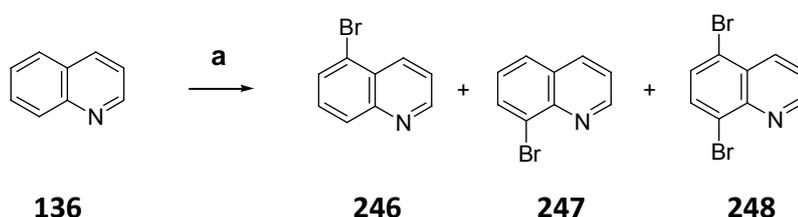
Auf Liganden basiertes virtuelles Screening wurde von G. Schneider et al.^[65] angewandt, um neue Grundgerüste für RNA bindende Moleküle zu generieren. Diese sollten fähig sein, die für die HIV-Replikation essenzielle Tat-TAR Wechselwirkung zu inhibieren. Dabei bediente man sich der pharmakophoren (SQUID) und der ausrichtungsfreien Methode (CATS3D) zum virtuellen Screenen einer kommerziellen Substanzbibliothek. Mit Acetylpromazin (**36**) und CGP 40336A (**28**) wurden literaturbekannte Verbindungen mit starker Affinität zur Bulge-Region der TAR-RNA als Referenzliganden eingesetzt. Die Ringsysteme der Referenzliganden bilden Stacking-Wechselwirkungen und die flexibel geladenen Reste Ladung- π Wechselwirkungen aus. Die gewonnenen Verbindungen wurden mit dem FRET-Assay von Hamasaki et al.^[163] auf ihre Eigenschaft als TAR-RNA Ligand untersucht. Dabei wurde durch SQUID eine Substanzbibliothek gescreent. Die daraus gewonnene Verbindung **243** wies einen IC_{50} -Wert von 46 μ M auf, was eine stärkere Inhibierung als die des Referenzliganden Acetylpromazin (**36**) ($IC_{50} = 500 \mu$ M) bedeutet. Der neue RNA-Ligand **243** wurde durch fragmentbasiertes Moleküldesign in Teilstrukturen zerlegt und automatisch in ein neues Molekül angeordnet.^[65] Die verwendete *de novo* Design Software Flux besitzt einen evolutionären Algorithmus für das Anordnen und Optimieren von Fragmenten zu neuen Grundstrukturen^[240] wie das Chinolinderivat **244**, das aus den Daten von RNA-Liganden **243** gewonnen wurde.



In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schneider wurde nach retrosynthetischen Überlegungen die Synthese der Verbindung **244** von der Bromierung von Chinolin (**136**) ausgehend begonnen. Weitere Schritte waren die Buchwald-Hartwig-Reaktion^[241, 242] mit 5-Bromchinolin (**246**)^[243, 244] und 4-Chloranilin und anschließende N-Alkylierung mit 2-Bromethylmethylether.

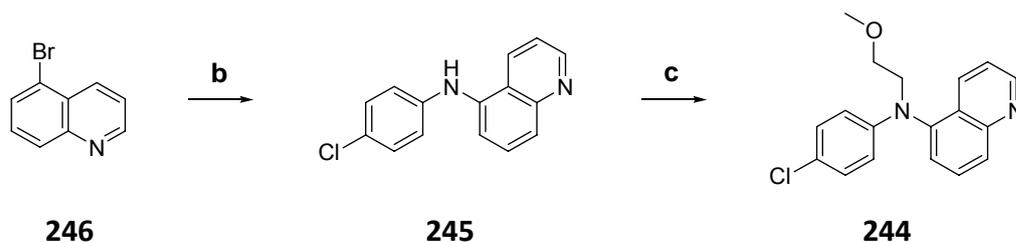


Die Bromierung des Chinolins (**136**) mit NBS in 95 %iger H_2SO_4 führte zu einer Mischung.^[243, 244] Die säulenchromatographische Aufreinigung ergab ein Gemisch aus **246** und **247**. Dibromchinolin **248** konnte als Reifraktion gewonnen werden. Anschließende Aufreinigung über HPLC ermöglichte die Isolierung von 5-Bromchinolin (**246**)

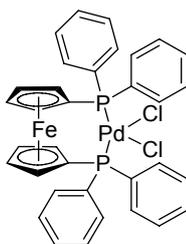


a) NBS H_2SO_4 (95 % ig), 3 h, RT, **246** 21 %, **248** 12 %.

Die Pd-katalysierte ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$) (**249**) Buchwald-Hartwig-Reaktion^[241, 242] zwischen 5-Bromchinolin (**246**) und 4-Chloranilin konnte durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung optimiert werden. Die anschließende N-Alkylierung mit 2-Bromethylmethylether wurde mit verschiedenen Basen (NaH , LiHMDS , Cs_2CO_3 und K_2CO_3) durchgeführt. Nur die Zugabe von K_2CO_3 führte zum gewünschten Produkt **244**.



b) 4-Chloranilin (1.1 Äquiv.), NaOt-Bu (1.5 Äquiv.), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (**249**) (2.5 mol%), 1,4-Dioxan, 15 h, Rückfluss, 18 % oder 4-Chloranilin (1.1 Äquiv.), NaOt-Bu (1.5 Äquiv.), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (**249**) (2.5 mol%), Toluol, MW, 100 W, Rückfluss, 20 min, 60 %; c) 2-Bromethylmethylether (1.6 Äquiv.), K_2CO_3 (6 Äquiv.), MeCN, 36 h, Rückfluss, 41 %.

**249**

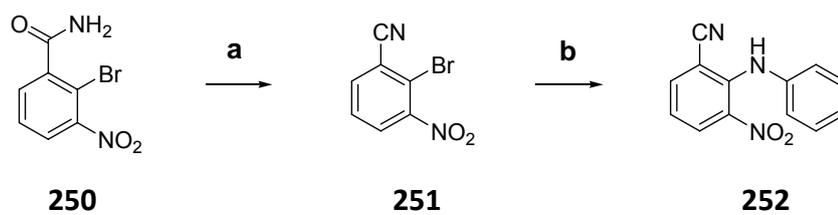
Im FRET-Bindungsassay zeigte der Ligand **244** keine Affinität zu TAR-RNA. Anschließende Untersuchungen ergaben eine Löslichkeitsgrenze von 100 μM .

Ein Ansatz mit Acetylpromazin (**36**) als Templatstruktur zeigte die Anwendbarkeit des fragmentbasierten *de novo* Designs, was jedoch nur als ein Ansatzpunkt für weitere Leitstrukturen angesehen werden kann.^[240]

Im antibakteriellen Test wurde die Verbindung **244** mit *B. subtilis* 168 inkubiert und durch die optische Dichte wurde die Aktivität bestimmt. Dabei konnte eine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden, aber die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) war nicht möglich. Auch weitere antimikrobielle Tests mit *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), multiresistente *Enterococcus faecalis* (VRE) und multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) wiesen keine Aktivität auf.

7.13 Anwendung der Buchwald-Hartwig Reaktion

Aufgrund der Optimierung der Buchwald-Hartwig Reaktion^[241, 242] durch Bestrahlung mit Mikrowellen wurden diese Bedingungen auch an einem Schlüsselschritt in der Synthese von N-arylierten Benzimidazolonderivaten angewandt, die weiterverarbeitet als axial-chirale Amidiniumverbindungen in der Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen eingesetzt werden können.^[245] Dazu wurde 2-Brom-3-nitro-benzonitril (**251**) aus dem Amid **250** hergestellt und mit Anilin in einer Mikrowellen-assistierten Buchwald-Hartwig Reaktion^[242] erfolgreich zu **252** umgesetzt. In vorausgegangenen Arbeiten wurden verschiedene Wege für die direkte Umsetzung gesucht. Durch die erfolgreiche Produktgewinnung könnten damit zwei Schritte eingespart werden, aber mit einer Ausbeute von 18 % besteht noch Optimierungsbedarf.

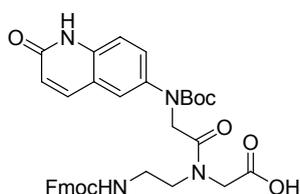
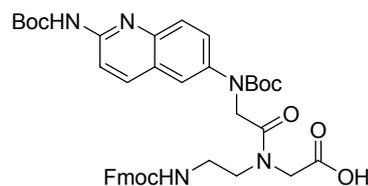


a) POCl_3 (1.2 Äquiv.), Pyridin, 0-5 °C, 1 h, 73 %; b) Anilin (1.1 Äquiv.), NaOt-Bu (1.5 Äquiv.), Pd(dppf)Cl₂ (**249**) (2.5 mol%), Toluol, MW, 100 W, Rückfluss, 1 h, 18 %.

8. ZUSAMMENFASSUNG

8.1 Tripeptide aus peptidomimetischen Bausteinen

Da in der Natur nur vier aromatische Aminosäuren (His, Trp, Phe und Tyr)^[13] vorhanden sind, besteht ein besonderes Interesse Peptide mit weiteren heteroaromatischen Resten zu untersuchen. Einige Heteroaromaten sind potentielle RNA-Ligand, da diese elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können. Durch Übergangsmetall-katalysierte C-C-Knüpfungsreaktionen, wie die Heck-, Suzuki- und Negishi-Reaktion, wurde in vorausgegangenen Projekten versucht, heteroaromatische Reste an Vorstufen von Aminosäuren zu kuppeln. Heteroaromatische Reste, die nicht über diese Schlüsselschritte eingefügt werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer 13- bzw. 16-stufigen Synthese erfolgreich über PNA-analoge Chemie in peptidomimetische Bausteine **151** und **153** über Amid-Bindung eingefügt, die anschließend in der FPPS eingesetzt werden konnten.

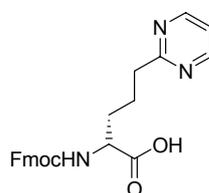
**151****153**

Zum Erhöhen der Diversität der Sequenz der Tripeptide wurden Lysin und Arginin als flankierende Aminosäuren eingebaut. Die Eigenschaft der Peptide als Inhibitoren des Komplexes von HIV-1 bzw. HIV-2 TAR-RNA zu Tat wurde mittels fluoreszenzbasiertem Assay untersucht. Die Tripeptide H₂N-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH₂ (**154**) und H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**158**) wiesen dabei IC₅₀-Werte von 2-3 μM auf, die durch Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) verifiziert wurden.^[246] Der Austausch von Arginin durch Lysin bei Tripeptiden mit Lactam als heteroaromatischem Rest führte zu herabgesetzten Affinitäten. Die Inhibierungseigenschaften bei Amidin-Tripeptiden änderten nur wenig durch den Austausch von Lysin. In einem Reporter-Gen-Assay, in dem HeLa P4 Zellen mit den für die HIV-Infektion wichtigen Rezeptoren und einem β-Galactosidasegen, das unter der Kontrolle der HIV-1 TAR-RNA steht, ausgestattet sind, wurde ein IC₅₀-Wert für **158** von 10-50 μM bestimmt. Dieser Effekt ist nicht auf Cytotoxizität zurückzuführen. In massenspektrometrischen Untersuchungen von **158** und Tat durch LILBID konnten bei

beiden Peptiden 1:1 und 1:2-Komplexe mit HIV-1 TAR beobachtet werden. In Verdrängungsexperimenten eines Tat-TAR-Komplexes durch **158** konnten die jeweiligen 1:1 und 1:2-Komplexe und zusätzlich ein **158**-Tat-TAR-Komplex beobachtet werden.^[246] Untersuchungen auf antibakterielle Eigenschaften zeigten keine Aktivitäten der Tripeptide.

8.2 2-Pyrimidinyl-haltige Tripeptide

In Zusammenarbeit mit M. Suhartono wurden aus (D)-konfigurierten 2-Pyrimidinyl-haltigen Aminosäuren mit C3-Linker^[208] **168** Tripeptide mit (D)-Arginin und (D)-Lysin am C und am N-Terminus hergestellt.



168

Die gewonnenen Tripeptide wiesen dabei IC₅₀-Werte im Bereich von 30 µM auf. H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH₂ (**171**) zeigte hingegen eine Inhibierung bei 5-6 µM, das für den 2-Pyrimidinyl-Rest, der unter den Bedingungen des Assay unprotoniert vorliegt, beachtlich ist. Tripeptide mit 2-Pyrimidinyl-Rest wiesen keine antiviralen Eigenschaften sowohl beim HeLa P4-Assay als auch im MT-4-Assay auf. Durch ein 1D-Titrationsexperiment konnte die Komplexierung von HIV-2 TAR-RNA mit der Verbindung **169** bzw. **171** untersucht werden. Nach bisherigen Daten scheint es, dass eine der Arginin-Seitenketten im Bulge-Bereich mit G26 den größten Einzelbeitrag zur Bindungsaffinität an TAR leistet. Der 2-Pyrimidinyl-Rest scheint nach den NMR-Daten nicht direkt an der Bindung der TAR-RNA beteiligt zu sein. Kontakte des Tripeptids **169** zur RNA finden sowohl oberhalb (A27) bis zur Nukleobase G43, welche unterhalb des Bulges liegt, statt. Da ein einziges Tripeptid solche Bindungen nicht eingehen kann, werden höhere Komplexe als 1:1 angenommen. Das Tripeptid **171** besitzt eine noch höhere Affinität zur TAR-RNA als das Bisarginin-Tripeptid **169**. Diese Affinitätsunterschiede konnten durch NMR bestätigt werden. Auch hier kam es zur Bildung höherer Komplexe, die mit den massenspektrometrischen Daten übereinstimmten.

8.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Peptide

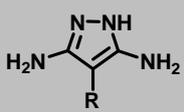
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Quench-Assay basierend auf einer Fluorescein-markierten TAR-RNA zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten der Lactam-, Amidin- und 2-Pyrimidinyl-haltigen Peptide angewandt. Aufgrund fehlender Eigenfluoreszenz der 2-Pyrimidinyl-haltigen Peptide und keiner Fluoreszenzänderung bei Lactam und Amidin-haltigen Peptiden bei Komplexierung mit TAR-RNA war eine direkte K_D -Bestimmung für diese Peptide nicht möglich. Daher wurden die Peptide über einen Glycin- bzw. Lysin-Linker mit dem Akzeptorfarbstoff Dabcyl gekuppelt. Fluorescein und Dabcyl dienen dabei als Fluorophor-Quencher Paar. Durch Komplexbildung der Peptide mit markierten TAR-RNA verringert sich deren Fluoreszenz. Unter Annahme eines 1:1-Komplexes ist aus der Fluoreszenzänderung die Dissoziationskonstante ermittelbar. Durch Vergleiche der theoretischen Kurven mit den experimentell bestimmten Kurven konnten keine reinen 1:1 Stöchiometrien festgestellt werden, so dass von den Dabcyl-markierten Peptiden keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden konnten. Nichtsdestotrotz sind die ermittelten Werte für die relative Bewertungen der Peptide untereinander geeignet.

8.4 Pyrazole und Indazole

Ausgehend von Untersuchungen der Konformationsänderung durch Bindung von Argininamid (**21**) an TAR-RNA durch NMR^[9] und MD-Studien^[55] wurde ein Bindungsmodell aufgestellt. In diesem wurden zwei Guanidinium-Gruppen übereinandergelegt, so dass protonierte Diaminopyrazol-Derivate als geeignete Liganden in Frage kommen. Bei Untersuchungen der Inhibierung des Tat-TAR-Komplexes durch den FRET-Assay wiesen die synthetisierten Diaminopyrazole **176**, **178**, **180**, **182** und **184** IC_{50} -Werte zwischen 8 und 12 mM bei pH 7.4 auf. Durch die Einführung einer dritten Amino-Gruppe zum Triaminopyrazol **185** wird die Verbindung basischer ($pK_a = 5.9$) und liegt bei pH 7.4 etwas stärker protoniert vor, was zu einer erhöhten Affinität ($IC_{50} = 2-3$ mM) führt. Bei pH 6.0 liegen die Diaminopyrazole protoniert vor. Dabei führen große Substituenten **182** und **184** zu IC_{50} -Werten zwischen 1.5 und 1.8 mM. Diaminopyrazole mit kleinen Substituenten **176** und **180** weisen dabei denselben IC_{50} -Wert (0.7-0.8 mM) wie Triaminopyrazol **185** auf. Damit übertreffen die Verbindungen **176**, **180** und **185** den dikationischen Liganden Argininamid

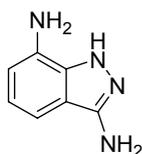
(21), der bei pH 7.4 und 6.0 einen IC_{50} -Wert von 1.5 mM aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Bindungsmodell, so dass protonierte Diaminopyrazole sich in Bezug zur TAR-RNA als „Super-Guanidine“ verhalten.

Tabelle 16: Untersuchung der Diaminopyrazolderivate auf Affinität zur TAR-RNA durch FRET-Assay bei pH 7.4 und pH 6.0 und Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften durch den MIC-Wert für *S. aureus*, *E. coli* und *E. faecalis*.

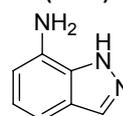
Molekül 		IC_{50} pH 7.4 [mM]	IC_{50} pH 6.0 [mM]	pK_a	MIC (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>)
R = H	176	10-12	0.7-0.8	6.1 ^b	>40 μ M
R = CH ₃	180	11	0.75-0.8	6.3 ^b 5.4 ^a	
R = CH ₂ CHCH ₂	182	10-11	1.5-1.7	6.1 ^b 5.35 ^a	
R = CH ₂ C ₆ H ₅	184	8	1.5-1.8	6.2 ^b	
R = NH ₂	185	2-3	0.7-0.8	3.3 ^a 5.9 ^a	
R = Br	178	8	-	-	

a) Die Messungen wurden potentiometrisch von Infraseriv Knapsack durchgeführt und unterliegen der Qualitätssicherung nach DIN EN ISO 9001 und DIN EN ISO/IEC 17025. b) UV-spektroskopisch ermittelt.

Die Erweiterung des Bindungsmodells führt zu 3,7-Diamino-indazol (**190**).



190

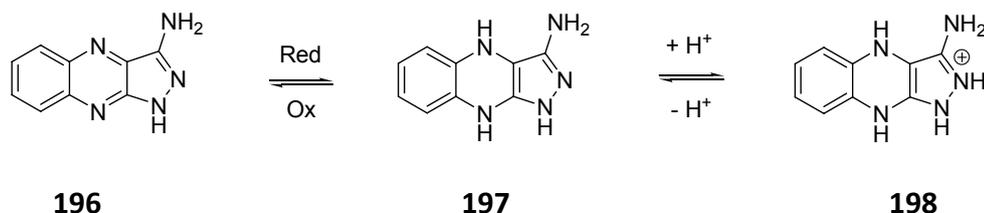


195

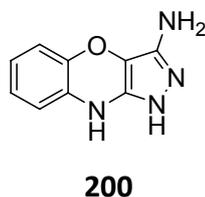
Die Indazole **190** und **195** zeigen keinerlei Affinität zur TAR-RNA bei pH 7.4 und 6.0. **190** und **195** zeigten keine Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* und gegen die multiresistenten Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis*.

8.5 Phenazinartige Verbindungen

Die Struktur des Triaminopyrazols **185** wurde in ein phenazinartiges Grundgerüst eingebettet. Dabei sollte die reduzierte Form des 1*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]chinoxalin-3-ylamin (**197**) es ermöglichen, im protonierten Zustand **198** zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen und damit eine höhere Affinität mit den Nucleobasen der RNA einzugehen.



Die Verbindung **198** konnte aufgrund der schnellen Rückoxidation zu **196** nicht vermessen werden. Der Ersatz von Stickstoff gegen Sauerstoff im Phenazin-Ring sollte die reduzierte Form stabilisieren. Verbindung **200** wurde in einer sechsstufigen Synthese hergestellt und zeigte keine Affinität zur TAR-RNA bei pH 7.4 auf. Bei pH 6.0 konnte ein IC₅₀-Wert von 850 μM bestimmt werden. Die Verbindung **200** erwies sich als instabil, so dass auf weitere Untersuchungen verzichtet wurde.

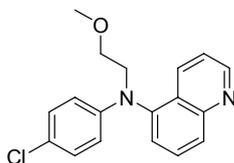


8.6 Selektivitätsstudien

Untersuchungen auf Selektivität gegenüber HIV-1 und HIV-2-TAR-RNA zeigten keine Affinitätsunterschiede der Lactam-, Amidin- und 2-Pyrimidinyl-haltigen Tripeptide. Affinitäten von unterschiedlichen Peptiden zu Mutationen der TAR-RNA (TARwt, TARbl, TARll) waren einander sehr ähnlich, so dass von Selektivität kaum gesprochen werden kann. Allgemein ist zu sagen, dass alle Klassen von TAR-RNA-Liganden geringe Selektivitäten aufweisen. Aufgrund der großen Flexibilität der TAR-RNA ist das Strukturdesign erschwert, so dass kleine Moleküle mit mehr struktureller Variabilität auf kleinem Raum dort Erfolgsaussichten haben.

8.7 *de novo* Liganden Design

Durch das *de novo* Design mit Hilfe der Software Flux^[240] wurde ein bekannter RNA Ligand^[65] optimiert. Der durch das Design generierte potenzielle RNA-Ligand **244** konnte innerhalb dieser Arbeit in einer dreistufigen Synthese dargestellt werden.



244

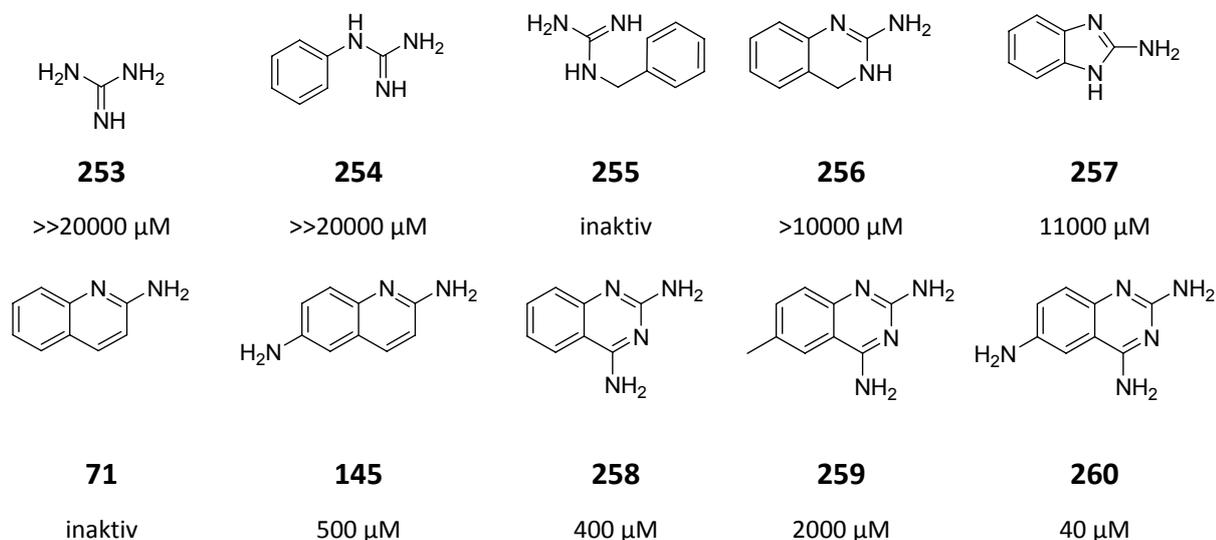
Im FRET-Bindungsassay zeigte der Ligand (**244**) keine Aktivität aufgrund geringer Löslichkeit. Untersuchungen auf antibakterielle Eigenschaften zeigten keine Wirkung bei *B. subtilis* 168, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, multiresistente *Enterococcus faecalis* (VRE) und multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).

9. AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit war das Ziel die Synthese von RNA-Liganden, die eine hohe Affinität und Selektivität zur TAR-RNA aufweisen sollten. Dazu wurden peptidomimetische Bausteine mit heteroaromatischen Resten dargestellt, die die Möglichkeit haben, zwei parallele Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und mit Purinbasen über Hoogsteen-Basenpaarung (Abbildung 3 und Abbildung 4) wechselzuwirken. Die aus den peptidomimetischen Bausteinen gewonnenen Tripeptide weisen hohe Affinitäten zur TAR-RNA auf und gehören zu den besten RNA-Liganden der Arbeitsgruppe. Zur Untersuchung auf Selektivitäten wurde die Affinität der Tripeptide gegenüber verschiedenen unmarkierten Mutanten der TAR-RNA im FRET-Assay (Abbildung 19) vermessen. Weitere Analysen fanden mit Fluorescein-markierten TAR-RNA-Mutanten statt, die mit Dabcyl-markierten Peptiden Komplexierungen (Abbildung 31) eingehen. In der Dissertation von M. Suhartono wurde die Methode der kombinatorischen Chemie für die Selektivitätsbestimmung eingesetzt.^[208] All diese Methoden zeigten für peptidische Liganden keine Selektivitäten, so dass die Arbeit an Peptiden schlußendlich eingestellt wurde. Kleine heterocyclische Liganden bieten auf kleinem Raum mehr strukturelle Variabilität als peptidische RNA-Liganden, so dass aufbauend auf den Bindungsdaten für Argininamid (**21**) mit der TAR-RNA ein Bindungsmodell erstellt (Abbildung 8 und Abbildung 9) wurde. Die daraus gewonnenen Liganden bestätigten die Grundannahmen. Das Ausweiten der strukturellen Variabilität führte zu Liganden, die unter Assaybedingungen leider instabil sind.

Ausgehend von Beobachtungen dieser Arbeit, dass die Verbindung **71** im Tat-TAR-Verdrängungsassay inaktiv ist und das Amidin **145** einen IC_{50} -Wert von 500 μ M aufweist, wurde für das weitere Vorgehen ein Ansatz gewählt, der nicht von einem vorgegebenem Strukturmodell ausgeht. Die Grundlage basiert auf den Tatsachen, dass die Guanidinium-Gruppe von Arginin an die TAR-RNA bindet und Stacking-Wechselwirkungen für die Erkennung von Nukleinsäuren wichtig sind. In der Diplomarbeit von M. Zeiger wurden daher die Guanidine **253-255** und cyclischen Derivate **256** und **257** auf ihre Affinität zur TAR-RNA untersucht. Die Einführung einer weiteren Amino-Gruppe in **256** führt zum Chinazolinderivat **258**, das einen IC_{50} -Wert von 400 μ M aufweist. Diese Senkung der Inhibierungskonstanten wurde ebenfalls bei **71** zu **145** beobachtet. Die Kombination der beiden Strukturen **145** und

258 führte zum Chinazolin **260**, das den in dieser Zeile besten heterocyclischen Inhibitor (IC_{50} = 40 μM) darstellt.^[247]



Ausgehend von den Daten dieser Dissertation und der Diplomarbeit von M. Zeiger ließ sich eine neue Bindungshypothese (Abbildung 43) postulieren, mittels derer neue Liganden vorgeschlagen wurden, für die experimentell hohe TAR-Affinitäten nachgewiesen werden konnten.

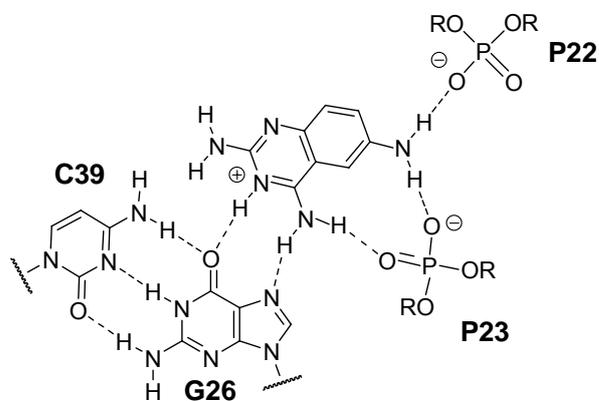


Abbildung 43: Bindungsmodell des Tat-TAR-RNA Inhibitors **260**.

10. ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN

NMR-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Geräte DPX 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) oder DMSO (Septett, 39.43 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 wurde das Gerät 420 Series der Firma *Jasco* oder das Gerät 1600 Series der Firma *Perkin Elmer* verwendet, der mit einem *Hewlett-Packard* Color Plotter und einem Drucker *Epson* LQ 850 verbunden war. Die Messungen wurden an KBr-Preßlingen bzw. NaCl-Fenstern 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) verwendet. Für MALDI-MS wurde das Gerät VG TOFSpec der Firma *Fisons* verwendet. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heitzschmikroskop 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 *Heracus* CHN Rapid 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 KMnO₄, 20.00 g K₂CO₃ in 300 mL dest. Wasser + 5 ml 5 %iger NaOH-Lösung) verwendet. 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.

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.

Semipräparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Es wurden folgende Geräte verwendet: Programmierbare *Waters* Pumpe 590, Differentialrefraktometer R 401, Einkanalpotentiometerschreiber BBC Metrawatt *Servogor* 120, Fraktionssammler *Isco* Foxy, *Waters* UV-Detektor Modell 440, Refraktometer-Detektor *Waters* 410, *Servogor* Zweikanalschreiber und *Knauer* Eurochrom 2000 Integration Package. Die Retentionszeit wurde isokratisch bestimmt.

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. EtOH wurde von der Firma *Roth* gekauft.

Druckapparatur:

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

Mikrowelle:

Für Mikrowellenexperimente wurde ein *CEM* Discover Mikrowellenreaktor verwendet.

UV/Vis-Spektroskopie:

Die UV/Vis-Spektren wurden mit dem Gerät *Varian* Cary 1E erstellt. Die Quarzküvetten hatten ein Volumen von 1 ml und eine Schichtdicke von 1.00 cm.

Zentrifugen:

Zum Abzentrifugieren der Peptide und Herstellung der RNA wurden folgende Zentrifugen benutzt: Kühlbare Tischzentrifugen Eppendorf 5417R und Hettich EBA 12 R.

Lyophilisierung:

Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden die Verbindungen mit dem Gerät *Christ* Alpha 2-4 über Nacht getrocknet.

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.

Steriles Arbeiten:

Zur Vorbeugung einer Kontamination mit RNasen wurden alle Experimente mit RNA mit sterilen Einmalgeräten oder autoklavierten Plastikerzeugnissen durchgeführt. Durch Behandlung von Milipore-Wasser mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht bei Raumtemperatur und anschließendes Autoklavieren (30 Minuten bei 121 °C) wurde steriles Wasser generiert. Für RNA-Lösungen, Reaktionspuffer und Peptid-Lösungen wurde steriles Wasser (DEPC behandelt) verwendet. Bei der Durchführung dieser Experimente wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen.

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.

10.1 Liste der synthetisierten Verbindungen

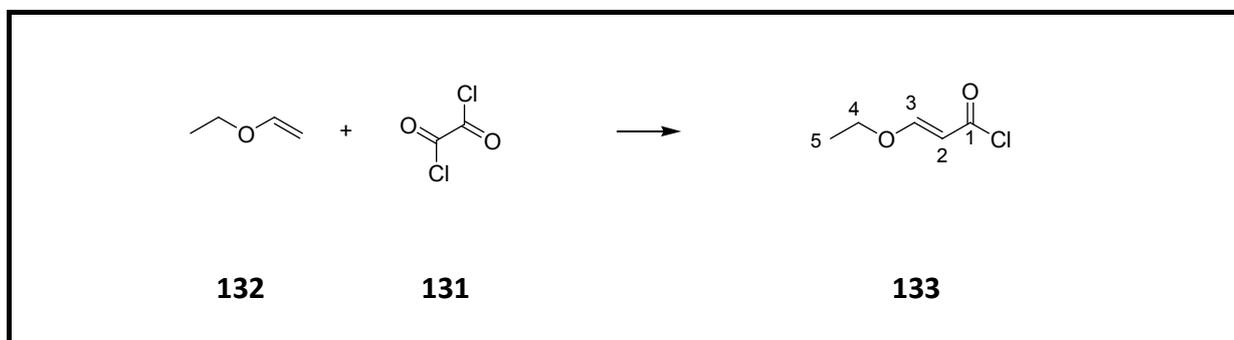
1. (E)-3-Ethoxy-2-propenylchlorid (**133**)
2. (E)-3-Ethoxy-N-phenyl-acrylamid (**134**)
3. N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (**139**)
4. 1*H*-Chinolin-2-on (**135**)
5. 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**)
6. 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on Pikrat (**261**)
7. 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on Hydrochlorid (**138**)
8. N-N-Diacetyl-6-amino-1*H*-chinolin-2-on (**262**)
9. 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on (**140**)
10. 2-Aminochinolin (**71**)
11. 2-Chlor-6-nitro-chinolin (**264**)
12. 6-Nitro-chinolin-2-ylamin (**143**)
13. Chinolin-2,6-diamin dihydrochlorid (**145**)
14. (6-Nitro-chinolin-2-yl)carbaminsäure-*tert*-butylester (**265**)
15. (6-Amino-chinolin-2-yl)carbaminsäure-*tert*-butylester (**146**)
16. (2-*tert*-Butoxycarbonylamino-chinolin-6-ylamino)essigsäure-methylester (**266**)
17. (*tert*-Butoxycarbonyl-(2-(*bis-tert*-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl)-amino)-essigsäuremethylester (**267**)
18. [*tert*-Butoxycarbonyl-(2-*tert*-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl]-amino]-essigsäure (**147**)
19. [*tert*-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäuremethylester (**268**)
20. [*tert*-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäure (**142**)
21. {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäuremethylester (**152**)
22. {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäuremethylester (**150**)
23. {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure (**151**)
24. {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure (**153**)
25. (Amino-ethylamino)-essigsäure (**270**)
26. Methyl 2-(2-aminoethylamino)acetat dihydrochlorid (**271**)
27. [2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethylamino]-essigsäuremethylester-Hydrochlorid (**149**)
28. Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid (**174**)
29. Malondiimidsäure-diethylester-(**175**)
30. 3,5-Diaminopyrazol-(**176**)

31. 3,5-Diaminopyrazol-Pikrat (**272**)
32. 3,5-Diaminopyrazol-Hydrochlorid (**273**)
33. 3,5-Diamino-4-brom-pyrazol (**177**)
34. 3,5-Diamino-4-brom-pyrazol-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**178**)
35. Allylmalonsäuredinitril (**181**)
36. Benzylmalonsäuredinitril (**183**)
37. Methylmalonsäuredinitril (**179**)
38. 4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (**274**)
39. 4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Trifluoracetat (**275**)
40. 4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (**276**)
41. 4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Hydrochlorid (**277**)
42. 4-Methyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (**278**)
43. 4-Methyl-3,5-diaminopyrazol Hydrochlorid (**279**)
44. 7-Nitro-indazol (**192**)
45. 7-Amino-indazol (**195**)
46. 2-Methoxy-3-nitro-benzoesäure (**186**)
47. 2-Methoxy-3-nitro-benzamid (**187**)
48. 2-Methoxy-3-nitro-benzonitril (**188**)
49. 7-Nitro-3-Amino-indazol (**189**)
50. 3,7-Diamino-indazol (**190**)
51. 3,7-Diamino-indazol Dihydrochlorid (**281**)
52. 4-Bromo-1*H*-pyrazol (**205**)
53. 4-Bromo-1-methyl-1*H*-pyrazol (**206**)
54. 4-Bromo-1-methyl-3,5-dinitro-1*H*-pyrazol (**207**)
55. N-(2-Amino-phenyl)-acetamid (**216**)
56. N-(2-Methylamino-phenyl)-acetamid (**208**)
57. N,1-dimethyl-3,5-dinitro-N-phenyl-1*H*-pyrazol-4-amin (**220**)
58. N,1-dimethyl-N4-phenyl-1*H*-pyrazol-3,4,5-triamin Pikrat (**283**)
59. 3-Oxo-3,4-dihydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (**222**)
60. 3-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (**284**)
61. 1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (**223**)
62. 3-Ethoxy-1-methyl-1,2-dihydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (**285**)
63. 1,2,3,4-Tetrahydro-1-methyl-3-oxochinoxalin-2-carboxamid (**224**)
64. 1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonitril (**225**)
65. 3-Ethoxy-1-methyl-1,2-dihydro-chinoxalin-2-carbonitril (**226**)
66. 2-(2-Nitro-phenoxy)-malonsäurediethylester (**231**)
67. 3-Oxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**232**)
68. 3,4-Dihydro-3-oxo-2*H*-benzo[b][1,4]oxazin-2-carbohydrazid (**238**)
69. 3-Ethoxy-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**236**)
70. 3-Thioxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**233**)
71. 3-Methylsulfanyl-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**234**)
72. 3-Oxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureamid (**239**)

73. 3-Oxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (**240**)
74. 3-Thioxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (**241**)
75. 1,7-Dihydro-benzo-pyrazolo[4,3-*b*][1,4]oxazin-3-amin Pikrat (**286**)
76. 5-Bromchinolin (**246**)
77. 5,8-Dibromchinolin (**248**)
78. (4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (**245**)
79. (4-Chloro-phenyl)-(2-methoxy-ethyl)-chinolin-5-yl-amin (**244**)
80. 2-Bromo-3-nitro-benzonitril (**251**)
81. 3-Nitro-2-phenylamino-benzonitril (**252**)
82. 4-(4-Dimethylamino-phenylazo)-benzoesäure (DabcyI) (**288**)
83. DabcyI-NH(CH₂)₂NH₂ (**289**)
84. DabcyI-NH(CH₂)₂N((CH₂)₂NH₂)₂ (**290**)
85. H₂N-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH₂ (**154**)
86. H₂N-(D)Arg-Lactam-(D)Lys-CONH₂ (**155**)
87. H₂N-(D)Lys-Lactam-(D)Arg-CONH₂ (**156**)
88. H₂N-(D)Lys-Lactam-(D)Lys-CONH₂ (**157**)
89. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH₂ (**291**)
90. H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**158**)
91. H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Lys-CONH₂ (**159**)
92. H₂N-(D)Lys-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**160**)
93. H₂N-(D)Lys-Amidin-(D)Lys-CONH₂ (**161**)
94. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ (**292**)
95. H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**169**)
96. H₂N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**170**)
97. H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH₂ (**171**)
98. H₂N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH₂ (**172**)
99. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**293**)
100. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(L)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**294**)
101. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-CONH₂ (**295**)
102. H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ (**296**)
103. DabcyI-Gly-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ (**297**)
104. DabcyI-Gly-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ (**298**)
105. DabcyI-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ (**299**)
106. DabcyI-Gly-(L)Arg-(D)2Pyrim-(L)Arg-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ (**300**)
107. DabcyI-KSFTTKALGISYGRKKRRRPPQGSQTHQVLSKQ-CONH₂ (**301**)
108. H₂N-(L)Lys-(L)Lys-(L)Lys-CONH₂ (**166**)
109. H₂N-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ (**163**)
110. H₂N-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ (**167**)
111. H₂N-(L)Lys-(L)Arg-(L)Lys-CONH₂ (**165**)
112. H₂N-(L)Arg-(L)Lys-(L)Arg-CONH₂ (**162**)

10.2 Synthese

10.2.1 (E)-3-Ethoxy-2-propenylchlorid (**133**)^[248]



In einem 250 mL Dreihalskolben wurden unter Argon-Atmosphäre 120.00 mL Oxalylchlorid (**131**) (1.39 mol, 177.4 g, 1.3 Äquiv.) vorgelegt und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Über ein Septum wurden 102.30 mL Ethylvinylether (**132**) (1.07 mol, 77.00 g, 1 Äquiv.) mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 3.5 Stunden hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch weitere zwei Stunden auf 0 °C gekühlt und dann für zwölf Stunden bei RT gerührt. Danach wurde über eine Vigreuxkolonne das überschüssige Oxalylchlorid (**131**) aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert (30 Minuten, 120 °C). Nach beendeter Gasentwicklung (CO) wurde das Produkt bei 70 °C unter Vakuum (10 mbar) abdestilliert. (E)-3-Ethoxy-2-propenylchlorid (**133**) wurde als farblose Flüssigkeit gewonnen.

Ausbeute: 102.90 g (75 %) Theorie: 143.97 g

Siedetemperatur: 80-83 °C bei 15 mbar Lit.: 60-61 °C bei 5 mbar^[248]

Brechungsindex (n^{20}): 1,4880-1,4882

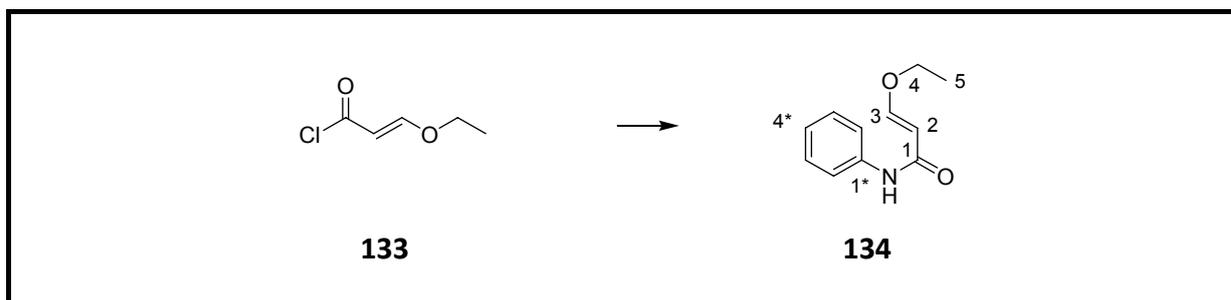
¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃-d₁):
 7.76 (d, 1H, J = 12.25, C³-H), 5.48 (d, 1H, J = 12.25, C²-H), 4.04 (q,
 2H, J = 7.0, C⁴-H₂), 1.37 (t, 3H, J = 7.0, C⁵-H₃),

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$):
168.26 ($\text{C}^3\text{-H}$), 164.64 ($\text{C}^1\text{(=O)-Cl}$), 102.89 ($\text{C}^2\text{-H}$), 68.90 ($\text{C}^4\text{-H}_2$),
14.43 ($\text{C}^5\text{-H}_3$)

IR (Film): 2993 (m), 2953 (s), 2895 (s), 1684 (w), 1618 (w), 1603 (w), 1474 (m), 1427 (w), 1306 (w), 1220 (w), 1184 (w), 1112 (s), 1013 (m), 963 (w), 932 (w), 844 (w), 822 (m), 730 (m)

Elementaranalyse: $\text{C}_5\text{H}_7\text{ClO}_2$ (134.56)
berechnet C: 44.63 H: 5.24
gefunden C: 44.63 H: 5.32

10.2.2 (E)-3-Ethoxy-N-phenyl-acrylamid (**134**)^[211, 212]



In einem 1 L Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Thermometer und Tropftrichter wurden 108.00 mL Anilin (1.18 mol, 110.38 g, 2 Äquiv.) in 400 mL Chloroform gelöst vorgelegt. Mittels Aceton/Eis-Bad wurde die Lösung bei -5 °C gehalten. Man tropfte 79.40 g (E)-3-Ethoxy-2-propenylchlorid (**133**) (0.59 mol, 1 Äquiv.) gelöst in 150 mL Chloroform hinzu. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt und anschließend der ausgefallene Niederschlag über eine Fritte abgesaugt. Der abgetrennte Niederschlag wurde mit Chloroform gewaschen und verworfen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingedunstet und umkristallisiert (MeOH). Als Ergebnis konnte das Ethoxy-N-phenylacrylamid (**134**) als gelbes Pulver gewonnen werden.

Ausbeute:	91.50 g (81 %)	Theorie: 112.80 g		
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.16		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 5:1	R _f = 0.09		
Schmelzpunkt:	141-142 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆):			
	9.70 (s, 1H, NH), 7.60 (dd, 2H, J = 1.25, J = 7.5, C ^{2*} -H), 7.48 (d, 1H, J = 12.25, C ³ -H), 7.28 (tt, 2H, J = 2.0, J = 7.5, C ^{3*} -H), 7.00 (tt, 1H, J = 1.25, J = 7.5, C ^{4*} -H), 5.53 (d, 1H, J = 12.25, C ² -H), 3.94 (q, 2H, J = 7.0, C ⁴ -H ₂), 1.26 (t, 3H, J = 7.0, C ⁵ -H ₃),			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆):			
	164.49 (C ¹ =O), 159.34 (C ³ -H), 139.55 (C ^{1*}), 128.55 (C ^{3*} -H), 122.57 (C ^{4*} -H), 118.85 (C ^{2*} -H), 99.77 (C ² -H), 66.37 (C ⁴ -H ₂), 14.39 (C ⁵ -H ₃)			
IR (KBr):	3296 (s), 3253 (s), 3196 (s), 3133 (s), 3082 (s), 2981 (s), 2935 (s), 2882 (m), 2796 (w), 2536 (w), 2396 (w), 2097 (w), 1938 (w), 1860 (w), 1795 (w), 1665 (s), 1600 (s), 1541 (s), 1499 (s), 1471 (s), 1439 (s), 1395 (s), 1357 (s), 1325 (s), 1294 (s), 1245 (s), 1159 (s), 1107 (s), 1078 (s), 1012 (s), 962 (m), 898 (m), 856 (s), 812 (s), 792 (s), 752 (s), 688 (s)			
Elementaranalyse:	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂ (191.23)			
	berechnet	C: 69.09	H: 6.85	N: 7.32
	gefunden	C: 69.33	H: 6.81	N: 7.36

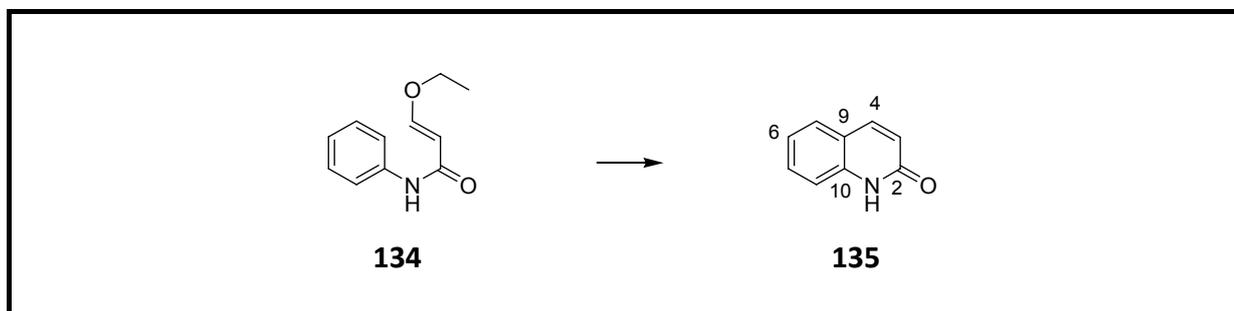
^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 163.57 ($\text{C}^1=\text{O}$), 158.24 ($\text{C}^3\text{-H}$), 144.32 ($\text{C}^4\text{-NH}_2$), 128.78 ($\text{C}^1\text{-NH}$),
 120.58 ($\text{C}^2\text{-H}$), 113.74 ($\text{C}^3\text{-H}$), 100.08 ($\text{C}^2\text{-H}$), 66.11 ($\text{C}^4\text{-H}_2$), 14.42 ($\text{C}^5\text{-H}_3$)

IR (KBr): 3404 (w), 3271 (m), 2981 (w), 2359 (w), 1871 (w), 1658 (s), 1608 (s),
 1515 (s), 1242 (m), 1153 (s), 1012 (w), 960 (w), 815 (m), 767 (w), 700
 (w), 535 (w), 517 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (206.24)

berechnet	C: 64.06	H: 6.84	N: 13.58
gefunden	C: 64.06	H: 6.88	N: 13.32

10.2.4 1H-Chinolin-2-on (**135**)^[211, 212]



In einem 100 mL Rundkolben befanden sich 10 mL konzentrierte Salzsäure. 2.00 g Ethoxy-N-phenyl-acryamid (**134**) (10 mmol) wurden portionsweise unter Rühren hinzugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Portionen nacheinander erst dann hinzugegeben wurden, wenn die vorherige Portion gänzlich aufgelöst war. Anschließend blieb die Lösung zwölf Stunden bei RT stehen. Die Säure wurde von den ausgefallenen Kristallen abdekantiert und der Rückstand wurde mit dest. Wasser (20 mL) versetzt und bis zum Sieden erhitzt. Die Filtration fand bei Siedehitze statt. Bei RT wurden die ausgefallenen Kristalle abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 1H-Chinolin-2-on (**135**) als weiße lange Kristalle.

Alternative Methode^[216]

In einem 100 mL Rundkolben mit Blaugel befülltem Trockenrohr wurde 7.30 mL (8 g, 62 mmol, 1 Äquiv.) frisch destilliertes Chinolin (**136**) portionsweise mit 13.00 g (231 mmol, 3.7 Äquiv.) fein gepulvertem Kaliumhydroxid versetzt und durch Erwärmung auf 235 °C zur Reaktion gebracht. Nach vier Stunden entstand aus einer zähflüssigen Reaktionsmischung eine feste Masse, die zur Aufarbeitung auf RT abgekühlt wurde. Durch die Zugabe von 50 mL Wasser löste sich der Feststoff auf. Die tropfenweise Zugabe von 6 N Salzsäure führte zur Bildung eines Niederschlages, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Nach zwei Umkristallisationen (Wasser) konnte 932 mg (10 %) 1*H*-Chinolin-2-on (**135**) in Form von langen weißen Kristallen gewonnen werden.

Ausbeute: 932 mg (10 %) Theorie: 8.99 g

DC: EtOAc $R_f = 0.27$

EtOAc/*n*-Hex 2:1 $R_f = 0.22$

EtOAc/*n*-Hex 1:1 $R_f = 0.16$

Schmelzpunkt: 199-200 °C

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO-*d*₆):
11.75 (s, 1H, NH), 7.89 (d, 1H, $J = 9.5$, C⁴-H), 7.64 (dd, 1H, $J = 1.25$, $J = 8.0$, C⁸-H), 7.48 (ddd, 1H, $J = 1.3$, $J = 7.3$, $J = 8.5$, C⁷-H), 7.30 (d, 1H, $J = 8.25$, C⁵-H), 7.16 (ddd, 1H, $J = 1$, $J = 7.5$, $J = 8.5$, C⁶-H), 6.49 (d, 1H, $J = 9.75$, C²-H)

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO-*d*₆):
161.83 (C¹=O), 140.12 (C⁴-H), 138.79 (C¹⁰), 130.24 (C⁷-H), 127.76 (C⁹), 121.82 (C⁵-H), 121.63 (C⁶-H), 119.01 (C⁸-H), 115.02 (C³-H)

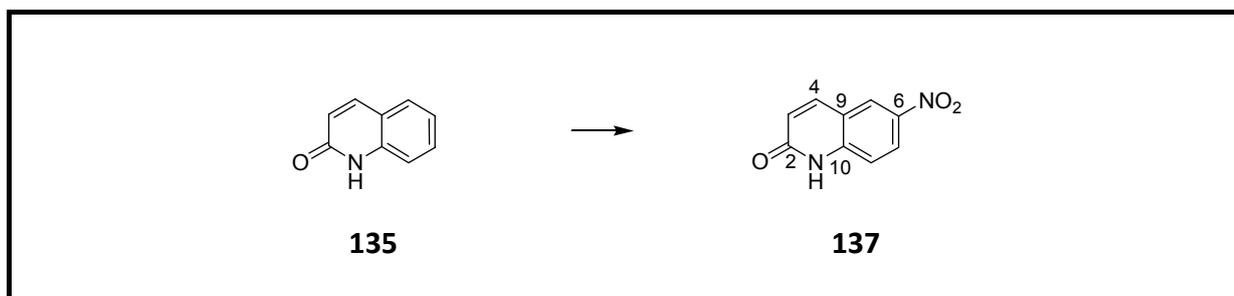
IR (KBr): 3441 (m), 3253 (w), 3126 (m), 3093 (m), 3063 (m), 3043 (m), 3012 (m), 2960 (m), 2933 (m), 2886 (m), 2847 (m), 1955 (w), 1891 (w),

1808 (w), 1652 (s), 1599 (s), 1556 (s), 1500 (m), 1468 (m), 1427 (s),
 1396 (m), 1350 (m), 1283 (m), 1262 (m), 1213 (m), 1153 (m), 1134
 (m), 1119 (m), 1027 (m), 984 (w), 946 (m), 924 (w), 757 (s), 729 (m),
 697 (w), 618 (m), 532 (m), 506 (m)

Elementaranalyse: C₉H₇NO (145.16)

berechnet	C: 74.47	H: 4.86	N: 9.65
gefunden	C: 74.33	H: 4.76	N: 9.50

10.2.5 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**)^[213, 214, 249]



In einem 100 mL Rundkolben wurden 1.51 g 1*H*-Chinolin-2-on (**135**) (10 mmol, 1 Äquiv.) bei RT in 5.30 mL konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mittels Aceton/Eis-Bad auf -10 °C heruntergekühlt. Dann erfolgte eine tropfenweise Zugabe einer vorgekühlten Mischung von 735 µL (10 mmol, 1 Äquiv.) konzentrierter Salpetersäure (65 %ig) und 5.30 mL konzentrierte Schwefelsäure zur Reaktionslösung. Im Anschluss daran ließ man die Reaktionsmischung für eine weitere Stunde bei -10 °C rühren. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung auf Eis gegossen, der ausgefallene Feststoff abgesaugt und mit dest. Wasser gewaschen. Die Trocknung des Rohproduktes erfolgte im Vakuum und die Umkristallisation in Eisessig führte zu 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**) in Form von farblosen Kristallen.

Ausbeute: 1.49 g (79 %) Theorie: 1.90 g

DC: EtOAc R_f = 0.36
 EtOAc/*n*-Hex 1:1 R_f = 0.05

Schmelzpunkt: 287 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
12.29 (s, 1H, NH), 8.69 (d, 1H, $J = 2.5$, $\text{C}^5\text{-H}$), 8.32 (dd, 1H, $J = 2.5$, $J = 9.0$, $\text{C}^7\text{-H}$), 8.12 (d, 1H, $J = 9.75$, $\text{C}^4\text{-H}$), 7.42 (d, 1H, $J = 9.0$, $\text{C}^8\text{-H}$), 6.67 (dd, 1H, $J = 1.75$, $J = 9.75$, $\text{C}^3\text{-H}$),

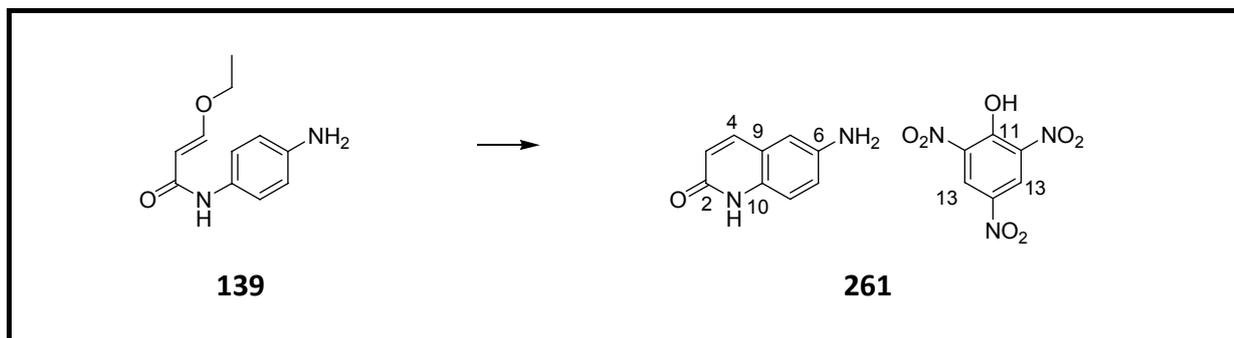
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
161.87 ($\text{C}^2\text{=O}$), 143.19 ($\text{C}^6\text{-H}$), 141.38 (C^{10}), 140.06 ($\text{C}^4\text{-H}$), 125.00 (C^9),
124.24 ($\text{C}^7\text{-H}$), 123.76 ($\text{C}^5\text{-H}$), 118.45 ($\text{C}^8\text{-H}$), 115.98 ($\text{C}^3\text{-H}$)

IR (KBr): 2820 (m), 1830 (w), 1656 (s), 1624 (m), 1559 (m), 1540 (m), 1483 (m), 1427 (m), 1379 (w), 1339 (s), 1283 (m), 1255 (m), 1215 (m), 1138 (m), 1126 (m), 1088 (w), 918 (m), 875 (m), 843 (w), 824 (m), 765 (w), 741 (m)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$ (190.16)

berechnet	C: 56.85	H: 3.18	N: 14.73
gefunden	C: 57.13	H: 3.03	N: 14.86

10.2.6 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on Pikrat (**261**)



5.31 g N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (**139**) (25 mmol, 1 Äquiv.) wurden portionsweise zu 15 mL konzentrierter Schwefelsäure gegeben und für zwölf Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz auf 300 mL Eis gegeben und anschließend der pH-Wert mit 6 N NaOH auf 9 eingestellt. Die wässrige Lösung engte man zur Trockene ein und extrahierte den Rückstand mit siedendem Methanol. Das Extrakt wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der verbleibende Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (MeOH/EtOAc 1:9 + 1 % NH₃). Zur weiteren Aufreinigung wurde das Rohprodukt in MeOH aufgelöst und unlösliche Bestandteile durch Filtration entfernt. 1.40 g (35 %) 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on (**140**) erhielt man als gelben Feststoff. Eine analysenreine Probe fiel nach Kristallisation des Pikrats **261** aus. Über eine Ionenaustauschsäule wurde das Pikrat **261** in das Hydrochlorid **138** überführt.

Ausbeute: 1.40 g (35 %) 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on (**140**) Theorie: 4.00 g

DC: EtOAc/MeOH = 9:1 R_f = 0.4
EtOAc R_f = 0.08

Schmelzpunkt: Zersetzung bei 239 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):
11.9 (s, 1H, NH), 9.6 (sehr breites s, 3H, C⁶-NH₃⁺), 8.59 (s, 2H, 2 x C¹³-H), 7.97 (d, 1H, J = 9.5, C⁴-H), 7.59 (d, 1H, J = 2.25, C⁵-H), 7.44 (dd, 1H, J = 2.25, J = 8.75, C⁷-H), 7.38 (d, 1H, J = 8.75, C⁸-H), 6.58 (d, 1H, J

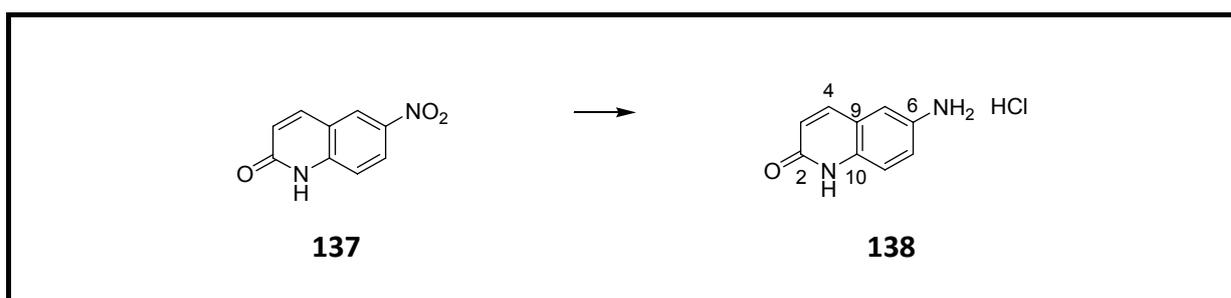
= 9.5, C³-H)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d₆):
 161.57 (C²=O), 160.67 (C¹¹-O⁻), 141.73 (C¹⁴-NO₂), 139.42 (C⁴-H),
 137.79 (C¹⁰), 126.17 (C⁶-NH₃⁺), 125.06 (2xC¹³-H), 124.79 (C⁷-H),
 124.10 (2xC¹²-NO₂), 123.16 (C³-H), 121.08 (C⁵-H), 119.24 (C⁹), 116.42
 (C⁸-H)

IR (KBr): 3318 (m), 3080 (m), 2884 (s), 1660 (s), 1610 (s), 1567 (s), 1540 (s),
 1498 (s), 1418 (m), 1364 (s), 1332 (s), 1266 (s), 1158 (m), 1123 (m),
 1078 (m), 961 (w), 940 (w), 924 (w), 904 (m), 892 (w), 828 (m), 800
 (w), 787 (m), 767 (w), 741 (m), 711 (m), 680 (w), 596 (w), 564 (w)

Elementaranalyse: C₁₅H₁₁N₅O₈ (389.28)
 berechnet C: 46.28 H: 2.85 N: 17.99
 gefunden C: 46.53 H: 3.01 N: 18.24

10.2.7 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on Hydrochlorid (138)



5.50 g 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**) (28.9 mmol, 1 Äquiv.) wurde in konz. HCl (70 mL) aufgelöst und mit 10.00 g pulverisiertem Zinn (84.2 mmol, 2.9 Äquiv.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Stunden auf 100 °C erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionslösung 1.00 g Zinn (8.42 mmol, 0.29 Äquiv.) zugegeben und für weitere zehn Minuten bei 100 °C weitergerührt. Die Abtrennung des überschüssigen Zinns erfolgte über eine Nutsche mit Fritte. Durch Destillation konnte die überschüssige Salzsäure entfernt

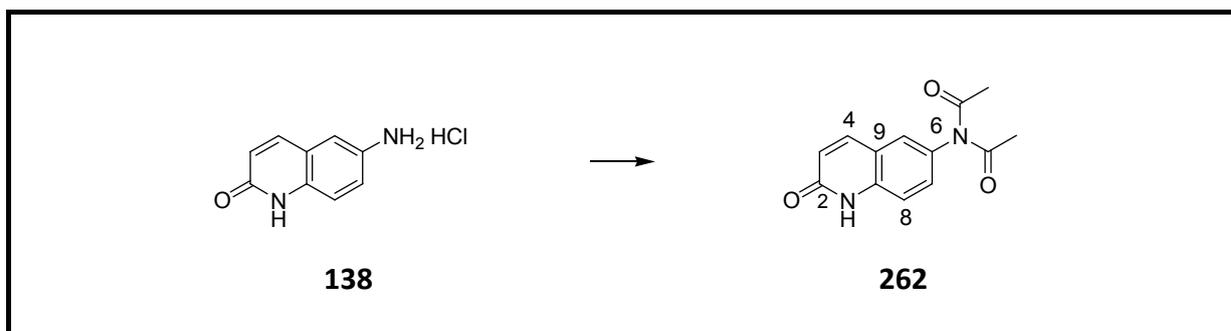
werden und durch Abkühlen auf RT kam es zur Kristallisation eines farblosen Feststoffes. Der farblose Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. 4.80 g 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on Hydrochlorid (83 %) (**138**) konnten gewonnen werden.

2.00 g 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on hydrochlorid (**138**) wurde in dest. Wasser (150 mL) gelöst, so dass eine konzentrierte Lösung entstand. Durch die Zugabe von NaOH (6 N) erfolgte die Einstellung des pH-Werts der Lösung auf 8.0. Der gelbe ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und umkristallisiert (DMF). 1.52 g (94 %) 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on (**140**) konnte als gelbe Kristalle gewonnen werden.

Ausbeute:	4.80 g (83 %)	Theorie: 5.74 g
DC:	EtOAc/MeOH = 9:1 EtOAc	R _f = 0.4 R _f = 0.08
Schmelzpunkt:	249-250 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 11.9 (bs, 1H, N-H), 9.8 (sehr breites s, 3H, -NH ₃ ⁺), 7.97 (d, 1H, J = 9.6, C ⁴ -H), 7.58 (bs, 1H, C ⁵ -H), 7.44 (dd, 1H, J = 2.4, J = 8.7, C ⁷ -H), 7.37 (d, 1H, J = 8.7, C ⁸ -H), 6.57 (d, 1H, J = 9.6, C ³ -H)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 162.14 (C ² =O), 140.15, 136.25, 130.24, 123.99, 122.97, 119.89, 118.94, 116.76	
IR (KBr):	3492 (w), 3020 (s), 2549 (m), 1817 (w), 1705 (s), 1636 (s), 1602 (s), 1566 (s), 1495 (s), 1431 (s), 1387 (m), 1284 (m), 1267 (s), 1168 (m), 1127 (m), 1098 (m), 1060 (m), 958 (m), 899 (m), 834 (s), 819 (s), 680 (m), 601 (m), 553 (m)	

Elementaranalyse:	C ₉ H ₉ ClN ₂ O (196.63)			
	berechnet	C: 54.97	H: 4.61	N: 14.25
	gefunden	C: 54.76	H: 4.61	N: 14.17

10.2.8 N-N-Diacetyl-6-amino-1H-chinolin-2-on (262)



100 mg Lactam Hydrochlorid **138** (0.51 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit 637 μ L Essigsäureanhydrid (629 mg, 6.78 mmol, 13.3 Äquiv.) und 71 μ L Triethylamin (0.51 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten der Lösung wurde der Niederschlag durch Filtration gewonnen, mit Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EtOAc) aufgereinigt, wobei 106 mg (84 %) Diacetyl **262** als farbloser Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 106 mg (84 %) Theorie: 124.56 mg

DC: DCM/MeOH = 9:1 R_f = 0.51
 EtOAc R_f = 0.24

Schmelzpunkt: 246-248 °C

¹H-NMR: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO-d₆):
 11.88 (s, 1H, N-H), 7.86 (d, 1H, J = 9.6, C⁴-H), 7.59 (d, 1H, J = 2.1, C⁵-H), 7.40 (dd, 1H, J = 2.1, 8.8, C⁷-H), 7.35 (d, 1H, J = 8.7, C⁸-H), 6.54 (d, 1H, J = 9.6, C³-H), 2.19 (s, 6H, 2x N(CO)C-H₃)

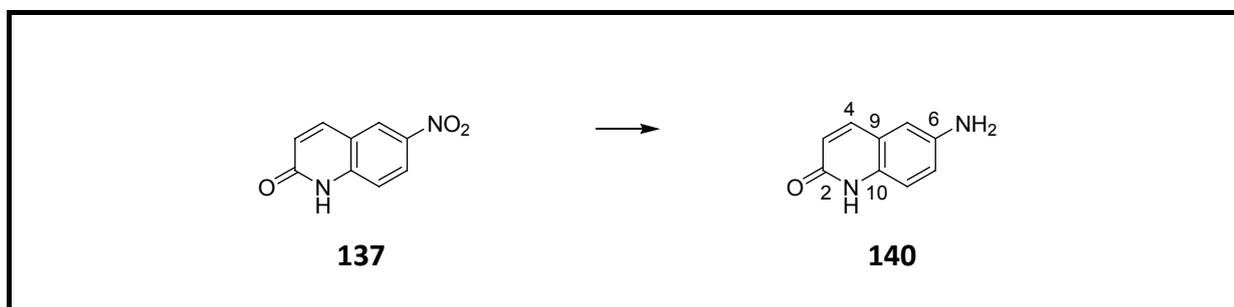
^{13}C -NMR: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 172.35 (2x N(CO)CH $_3$), 161.71 (C 2 =O), 139.60 (C 4 -H), 138.42 (C 6 -N),
 132.97 (C 10), 130.89 (C 9), 127.84 (C 3 -H), 122.45 (C 8 -H), 119.27 (C 7 -H),
 115.94 (C 5 -H), 26.49 (2x N(CO)CH $_3$)

IR (KBr): 3567 (w), 3421 (w), 3147 (w), 3007 (w), 2891 (w), 1707 (s), 1560 (w),
 1499 (w), 1434 (m), 1361 (m), 1293 (m), 1243 (s), 1216 (s), 1173 (m),
 1133 (w), 1024 (w), 966 (w), 950 (w), 887 (w), 839 (m), 818 (w), 765
 (w), 699 (m), 661 (w), 639 (w), 607 (m), 573 (w)

Elementaranalyse: C $_{13}$ H $_{12}$ N $_2$ O $_3$ (244.24)

berechnet	C: 63.93	H: 4.95	N: 11.47
gefunden	C: 63.73	H: 5.02	N: 11.27

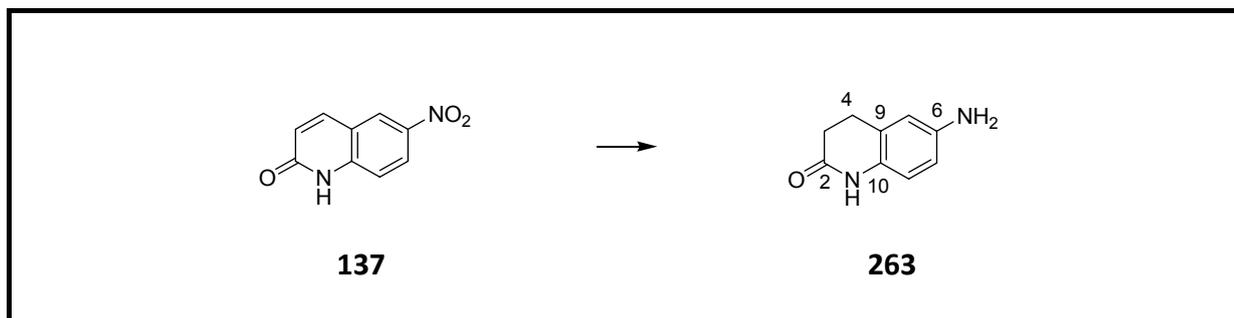
10.2.9 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on (**140**)



342 mg 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**) (1.79 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. EtOH (5 mL) unter Argonatmosphäre suspendiert und auf 40 °C erhitzt, um dann 35 mg Pd/C (10 Massen-%) zuzusetzen. Nach einem Austausch von Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde die Suspension bei 40 °C weitergerührt. Durch Analyse per Dünnschichtchromatographie (EtOAc/MeOH 9:1) wurde eine vollständige Umsetzung des 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**) nach 30 Minuten festgestellt. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgte durch Zugabe von MeOH (50 mL), einer Erwärmung der Mischung auf 60 °C, Filtration über Celite[®], Verdampfung des Lösungsmittelgemisches, Adsorption auf Kieselgel, säulenchromatographische Aufreinigung (Laufmittelgradient: EtOAc/MeOH 9:1 → EtOAc/MeOH 1:1) und Umkristallisation (DMF). 153.8 mg (53 %) 6-Amino-1*H*-chinolin-2-on

(**140**) fiel als gelbe Plättchen aus. 72 mg (25 %) 6-Amino-3,4-dihydro-1*H*-chinolin-2-on (**263**) wurde als farbloses Nebenprodukt erhalten.

Ausbeute:	153.8 mg (53 %)	Theorie: 288 mg		
DC:	EtOAc	R _f = 0.06		
	EtOAc/MeOH 9:1	R _f = 0.3		
	EtOAc/MeOH 1:1	R _f = 0.67		
	DCM/MeOH 19:1	R _f = 0.08		
Schmelzpunkt:	Zersetzung bei 297-298 °C	Schwarzfärbung bei 245 °C		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 11.40 (bs, 1H, N-H), 7.66 (d, 1H, J = 9.5, C ⁴ -H), 7.05 (d, 1H, J = 8.5, C ⁸ -H), 6.84 (dd, 1H, J = 2.25, J = 8.75, C ⁷ -H), 6.72 (d, 1H, J = 2.25, C ⁵ -H), 6.37 (d, 1H, J = 9.5, C ³ -H), 4.99 (s, 2H, C ⁶ -NH ₂)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 161.12, 143.44, 139.48, 130.41, 121.54, 119.95, 119.14, 115.66, 109.44			
IR (KBr):	3377 (m), 3301 (w), 2923 (m), 2840 (m), 1660 (s), 1613 (s), 1504 (s), 1429 (s), 1370 (s), 1292 (s), 1255 (m), 1180 (m), 1114 (m), 957 (m), 910 (m), 872 (s), 826 (s), 684 (m)			
Elementaranalyse:	C ₉ H ₈ N ₂ O (160.17)			
	berechnet	C: 67.49	H: 5.03	N: 17.49
	gefunden	C: 67.63	H: 5.18	N: 17.62
Masse:	ESI+ (berechnet für M+H ⁺):			
	berechnet	161.06		
	gefunden	160.8 (100), 161.9 (13.9), 162.9 (5.85)		

10.2.10 6-Amino-3,4-dihydro-1H-chinolin-2-on (263)

342 mg 6-Nitro-1H-chinolin-2-on (**137**) (1.79 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. EtOH (5 mL) unter Argonatmosphäre suspendiert und auf 40 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur erfolgte eine Zugabe von 35 mg Pd/C (10 Massen-%). Im Anschluss daran konnte die Argonatmosphäre gegen eine Wasserstoffatmosphäre (1 bar) getauscht werden. Die Suspension wurde bei 40 °C für 30 Minuten weitergerührt. Nach Analytik (DC: EtOAc/MeOH 9:1) erfolgte die Aufarbeitung der Reaktionsmischung durch Zugabe von MeOH (50 mL), Erwärmen der Mischung auf 60 °C, Filtrieren über Celite®, Verdampfen des Lösungsmittelgemisches, Adsorption auf Kieselgel, säulenchromatographische Aufreinigung (Laufmittelgradient: EtOAc/MeOH 9:1 → EtOAc/MeOH 1:1). 72 mg (25 %) 6-Amino-3,4-dihydro-1H-chinolin-2-on (**263**) wurde als farbloses Pulver erhalten. 153.8 mg (53 %) des gewünschten 6-Amino-1H-chinolin-2-on (**140**) wurden als gelbe Plättchen nach Umkristallisation (DMF) gewonnen.

Ausbeute: 72 mg (25 %) Theorie: 288 mg

DC:	EtOAc	R _f = 0.25
	EtOAc/MeOH 9:1	R _f = 0.46
	EtOAc/MeOH 1:1	R _f = 0.74
	DCM/MeOH 19:1	R _f = 0.22

Schmelzpunkt: 176 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 9.65 (s, 1H, N-H), 6.54 (d, 1H, $J = 8.25$, $\text{C}^8\text{-H}$), 6.38 (s, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 6.34 (dd, 1H, $J = 8.25$, $\text{C}^7\text{-H}$), 4.69 (s, 2H, $\text{C}^6\text{-NH}_2$), 2.70 (t, 2H, $J = 7.0$, $\text{C}^4\text{-H}_2$), 2.34 (t, 2H, $J = 7.0$, $\text{C}^3\text{-H}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 169.32 ($\text{C}^2\text{=O}$), 143.57 ($\text{C}^6\text{-NH}_2$), 127.96 (C^9), 124.20 (C^{10}), 115.59 ($\text{C}^8\text{-H}$), 113.43 ($\text{C}^5\text{-H}$), 112.35 ($\text{C}^7\text{-H}$), 30.64 ($\text{C}^3\text{-H}_2$), 25.17 ($\text{C}^4\text{-H}_2$)

IR (KBr): 3373 (s), 3305 (m), 3195 (s), 3044 (s), 2949 (m), 2898 (m), 1865 (w), 1657 (s), 1507 (s), 1431 (s), 1396 (s), 1295 (m), 1259 (s), 1202 (s), 1164 (m), 1023 (w), 937 (m), 822 (s), 763 (s), 725 (s)

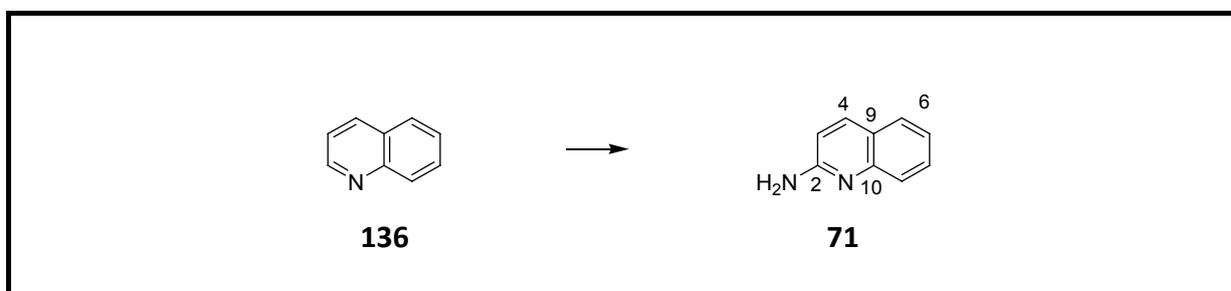
Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (163.19)

berechnet	C: 66.65	H: 6.21	N: 17.27
gefunden	C: 66.44	H: 6.24	N: 17.35

Masse: ESI+ (berechnet für $\text{M}+\text{H}^+$):

berechnet	163.1
gefunden	162.8 (100), 163.9 (11.44)

10.2.11 2-Aminochinolin (71)



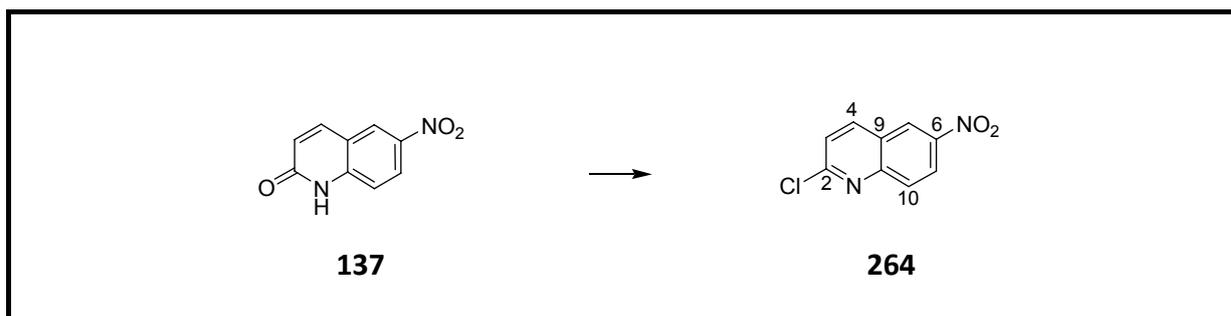
15.6 mL Chinolin (**136**) (17 g, 0.132 mol, 1 Äquiv.) wurde in 300 mL abs. *o*-Xylol gelöst. Nach der Zugabe von 5.7 g pulverisiertem Natriumamid (0.145 mol, 1.1 Äquiv.) wurde die

Reaktionslösung auf 100 °C erhitzt. Über einen Blasenähler konnte die Wasserstoffentwicklung beobachtet werden. Nach beendeter Gasentwicklung wurde die Reaktionslösung abgekühlt. Anschließend wurde erst dest. Wasser (20 mL) und dann konz. HCl (20 mL) tropfenweise zugegeben, wobei ein rötlicher Niederschlag ausfiel, der abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat wurde die wässrige Phase abgetrennt, mit 6 N NaOH auf pH 9 eingestellt und mit Et₂O (3 x 30 mL) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel abdestilliert. Durch Destillation (110 °C, 11 mbar) wurde das unverbrauchte Chinolin (**136**) abgetrennt. Abschließende Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch Umkristallisation (dest. Wasser), wobei (134 mg, 0.7 %) 2-Aminochinolin (**71**) in Form von weißen Kristallen gewonnen wurde.

Ausbeute:	134 mg (0.7 %)	Theorie: 18.97 g
DC:	EtOAc	R _f = 0.27
	EtOAc/ <i>n</i> -Hex 9:1	R _f = 0.1
Schmelzpunkt:	129.8 °C	Lit.: 129.5 °C ^[250]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 7.87 (d, 1H, J = 8.75, C ⁴ -H), 7.61 (d, 1H, J = 8, C ⁵ -H), 7.45 (m, 2H), 7.13 (m, 1H), 6.76 (d, 1H, J = 9, C ³ -H), 6.44 (s, 2H, -NH ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 158.14 (C ² -NH ₂), 147.86 (C ¹⁰), 136.72 (C ⁴ -H), 128.87 (C ⁷ -H), 127.35 (C ⁵ -H), 124.99 (C ⁸ -H), 122.64 (C ⁹), 120.97 (C ⁶ -H), 112.35 (C ³ -H)	
IR (KBr):	3425 (s), 3301 (w), 3125 (s), 3138 (m), 3058 (m), 3001 (w), 1655 (s), 1618 (s), 1562 (s), 1510 (s), 1484 (m), 1432 (m), 1396 (m), 1359 (m), 1295 (w), 1260 (w), 1243 (w), 1212 (w), 1143 (m), 1124 (m), 1018 (w), 978 (w), 940 (w), 866 (w), 823 (s), 783 (w), 756 (s), 704 (m), 650 (w), 620 (s), 552 (w)	

Elementaranalyse:	C ₉ H ₈ N ₂ (144.17)			
	berechnet	C: 74.98	H: 5.59	N: 19.43
	gefunden	C: 75.14	H: 5.53	N: 19.46

10.2.12 2-Chlor-6-nitro-chinolin (264)



In einem 100 mL Rundkolben mit Rückflusskühler wurden 3.45 g 6-Nitro-1*H*-chinolin-2-on (**137**) (18 mmol, 1 Äquiv.) mit 16.65 mL Phosphor(V)-oxychlorid (181 mmol, 27.81 g, 10 Äquiv.) und 7.54 g Phosphorpentachlorid (36 mmol, 2 Äquiv.) für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung auf RT musste zur Aufarbeitung auf Eis gegossen werden. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet, säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittelgradient: *n*-Hex/EtOAc 2:1 → *n*-Hex/EtOAc 1:1) und umkristallisiert (Aceton). Als Endprodukt gewann man 2-Chlor-6-nitro-chinolin (**264**) als weiße Kristalle.

Ausbeute: 2.55 g (67 %) Theorie: 3.78 g

DC: EtOAc R_f = 0.9
n-Hex/EtOAc 1:1 R_f = 0.75
n-Hex/EtOAc 3:1 R_f = 0.51
n-Hex/EtOAc 9:1 R_f = 0.24

Schmelzpunkt: 230-231 °C Lit.: 226-228 °C^[214]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 9.14 (d, 1H, $J = 2.75$, $C^5\text{-H}$), 8.79 (d, 1H, $J = 8.75$, $C^4\text{-H}$), 8.52 (dd, 1H, $J = 2.5$, $J = 9.25$, $C^7\text{-H}$), 8.17 (d, 1H, $J = 9.25$, $C^8\text{-H}$), 7.83 (d, 1H, $J = 8.5$, $C^3\text{-H}$)

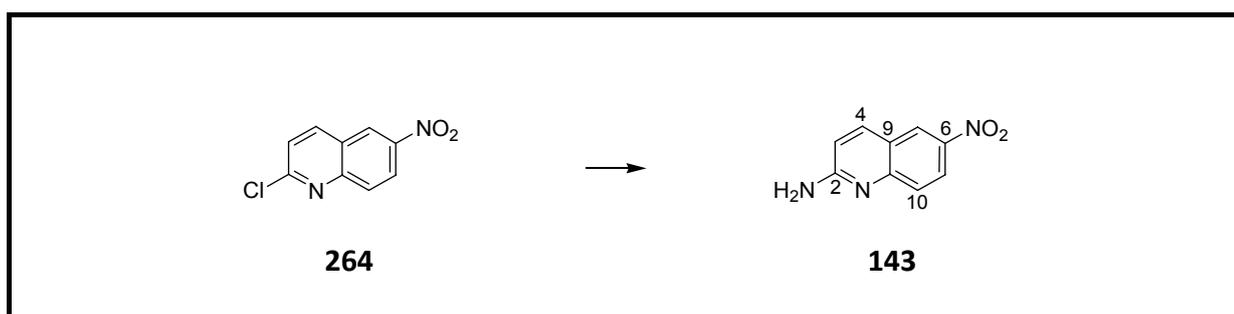
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 153.44 ($C^2\text{-Cl}$), 149.04 (C^{10}), 145.15 ($C^6\text{-NO}_2$), 141.76 ($C^4\text{-H}$), 129.58 ($C^8\text{-H}$), 125.77 (C^9), 124.93 ($C^5\text{-H}$), 124.26 ($C^3\text{-H}$), 124.01 ($C^7\text{-H}$)

IR (KBr): 3064 (m), 1654 (w), 1618 (s), 1595 (s), 1563 (m), 1523 (s), 1484 (s), 1448 (s), 1395 (w), 1381 (w), 1336 (s), 1289 (s), 1203 (m), 1143 (s), 1105 (s), 951 (m), 907 (s), 840 (w), 824 (s), 770 (m), 735 (s)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ (208.6)

berechnet	C: 51.82	H: 2.42	N: 13.43
gefunden	C: 51.57	H: 2.52	N: 13.20

10.2.13 6-Nitro-chinolin-2-ylamin (**143**)^[215]

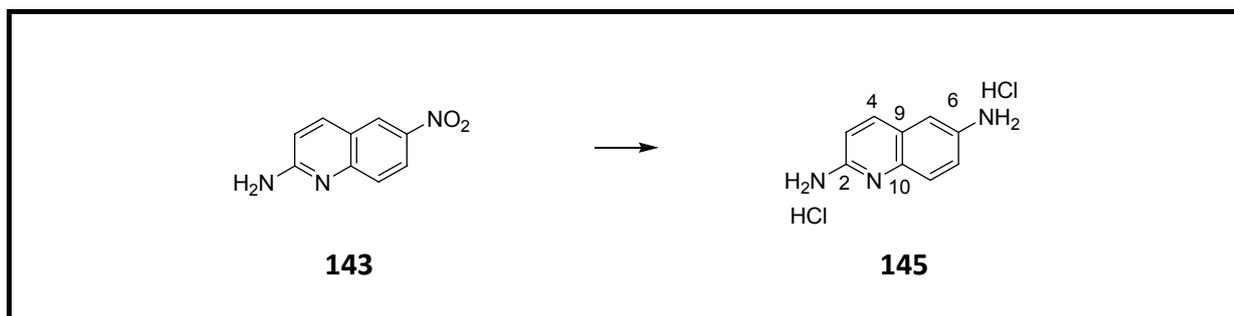


Eine Autoklavenhülse mit Rührkern wurde in einem Ethanol-Kältebad auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Eingeleitetes gasförmiges Ammoniak kondensierte solange ein, bis die Autoklavenhülse zu etwa $2/3$ mit flüssigem Ammoniak ($\sim 40\text{ mL}$, $\sim 28\text{ g}$, $\sim 1.7\text{ mol}$) befüllt war. 3.79 g 2-Chlor-6-nitro-chinolin (**264**) (18 mmol , 1 Äquiv.) wurde portionsweise in die Autoklavenhülse gegeben. Sodann erfolgte ein Rühren der Suspension im Autoklaven für die Dauer von 20 Stunden bei 75 bar und $150\text{ }^\circ\text{C}$. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsapparatur auf RT

abgekühlt und der Autoklav belüftet. Das Rohprodukt musste mit dest. Wasser (100 mL) resuspendiert, gefiltert, getrocknet und in Toluol (800 mL) umkristallisiert werden, an deren Ende als Produkt 6-Nitro-chinolin-2-ylamin (**143**) in Form von gelben Nadeln stand.

Ausbeute:	3.13 g (92 %)	Theorie: 3.40 g		
DC:	EtOAc	R _f = 0.37		
	DCM/MeOH 19:1	R _f = 0.27		
Schmelzpunkt:	264 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 8.66 (d, 1H, J = 2.5, C ⁵ -H), 8.20 (dd, 1H, J = 2.5, J = 9.25, C ⁷ -H), 8.13 (d, 1H, J = 9, C ⁴ -H), 7.50 (d, 1H, J = 9.25, C ⁸ -H), 7.22 (s, 2H, -NH ₂), 6.89 (d, 1H, J = 8.75, C ³ -H)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 160.63 (C ² -NH ₂), 151.98 (C ¹⁰), 140.39 (C ⁶ -NO ₂), 138.34 (C ⁴ -H), 125.69 (C ⁸ -H), 124.55 (C ⁵ -H), 122.99 (C ⁷ -H), 121.09 (C ⁹), 114.32 (C ³ -H)			
IR (KBr):	3433 (s), 3329 (w), 3281 (w), 3124 (m), 2759 (w), 1665 (s), 1608 (s), 1571 (s), 1522 (s), 1484 (s), 1418 (s), 1382 (w), 1316 (s), 1253 (s), 1133 (s), 1088 (s), 974 (m), 955 (m), 909 (s), 865 (m), 830 (s), 815 (s), 791 (m), 769 (m), 743 (s), 668 (m), 644 (m)			
Elementaranalyse:	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂ (189.17)			
	berechnet	C: 57.14	H: 3.73	N: 22.21
	gefunden	C: 56.98	H: 3.64	N: 21.97
Masse:	MALDI+ (berechnet für M+Na ⁺): berechnet: 212.04 gefunden: 211.80 (100)			

10.2.14 Chinolin-2,6-diamin dihydrochlorid (**145**)



400 mg 6-Nitro-chinolin-2-ylamin (**143**) (2.11 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. EtOH (6 mL) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 120 mg Pd/C (30 Massen-%) versetzt. Nach Austausch von Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde die Reaktionsmischung auf 40 °C erhitzt und für einen Zeitraum von zwei Stunden gerührt (DC: EtOAc/MeOH 9:1 + NH_4^+ (aq)). Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsmischung MeOH (20 mL) zugegeben, zum Sieden erhitzt und heiß über Celite® abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeeengt und mit 2.20 mL einer 2 N methanolischen HCl (314 μL Acetylchlorid in 1.89 mL MeOH) und Ether versetzt. Im Eisbad kristallisierte das Produkt aus, welches durch Filtration und Waschen mit Ether gewonnen werden konnte. Das Chinolin-2,6-diamin dihydrochlorid (**145**) erhält man als weißes Pulver.

Ausbeute: 380 mg (77 %) Theorie: 490 mg

DC: EtOAc + NH_4^+ (aq) $R_f = 0.18$
EtOAc/MeOH 9:1 + NH_4^+ (aq) $R_f = 0.45$
EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1 $R_f = 0.38$
DCM/MeOH 19:1 $R_f = 0.04$

Schmelzpunkt: 217 °C

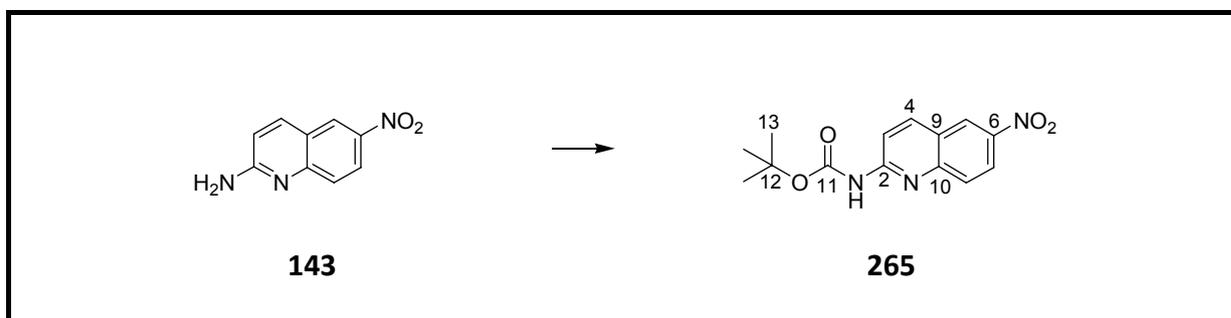
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
~9 (sehr breites s, 6H, $2 \times \text{NH}_3^+$), 8.37 (d, 1H, $J = 9.25$, $\text{C}^4\text{-H}$), 7.74 (d, 1H, $J = 8.75$, $\text{C}^8\text{-H}$), 7.66 (s, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 7.60 (d, 1H, $J = 8.75$, $\text{C}^7\text{-H}$), 7.14 (d, 1H, $J = 9.5$, $\text{C}^3\text{-H}$)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 153.52 ($\text{C}^2\text{-NH}_3^+$), 142.82 ($\text{C}^4\text{-H}$), 134.02 (C^{10}), 132.73 ($\text{C}^6\text{-NH}_3^+$),
 125.96 ($\text{C}^7\text{-H}$), 121.81 (C^9), 118.86 ($\text{C}^5\text{-H}$), 118.54 ($\text{C}^8\text{-H}$), 114.80 ($\text{C}^3\text{-H}$)

IR (KBr): 3304 (w), 3142 (m), 3037 (m), 2802 (s), 2576 (s), 1671 (s), 1617 (m),
 1577 (m), 1542 (m), 1515 (m), 1474 (w), 1449 (m), 1394 (w), 1365
 (w), 1290 (w), 1267 (w), 1241 (w), 1171 (w), 1135 (w), 967 (w), 939
 (w), 900 (w), 853 (w), 836 (m), 687 (m), 659 (w), 600 (w), 584 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3$ (232.11)
 berechnet C: 46.57 H: 4.78 N: 18.10
 gefunden C: 46.77 H: 4.84 N: 18.17

10.2.15 (6-Nitro-chinolin-2-yl)carbaminsäure-*tert*-butylester (265)



Es wurden 525 mg 6-Nitro-chinolin-2-ylamin (**143**) (2.77 mmol, 1 Äquiv.) in DCM (10 mL) gelöst und anschließend wurden 1.82 g $(\text{Boc})_2\text{O}$ (8.32 mmol, 3 Äquiv.) und 1.17 mL Triethylamin (8.32 mmol, 3 Äquiv.) zur Reaktionslösung gegeben. Durch eine Analyse per Dünnschichtchromatographie (EtOAc/*n*-Hex 3:1) mit Ninhydrin-Anfärbung konnte eine vollständige Umsetzung des Edukts nach fünf Stunden beobachtet werden. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand mit EtOAc (10 mL) aufgenommen, mit 1 N HCl (1 x 10 mL) und dest. Wasser (2 x 10 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO_4), auf Kieselgel adsorbiert, säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hex/EtOAc 9:1 \rightarrow *n*-Hex/EtOAc 1:1) und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet, wobei (6-Nitro-chinolin-2-yl)carbaminsäure-*tert*-butylester (**265**) als gelbes Pulver gewonnen wurde.

Ausbeute:	731.4 mg (91 %)	Theorie: 803 mg		
DC:	EtOAc	R _f = 0.95		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.42		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 9:1	R _f = 0.19		
Schmelzpunkt:	178-180 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d ₆):			
	10.53 (s, 1H, N-H), 8.93 (d, 1H, J = 2.4, C ⁵ -H), 8.59 (d, 1H, J = 9.2, C ⁴ -H), 8.37 (dd, 1H, J = 2.4, J = 9.2, C ⁷ -H), 8.20 (d, 1H, J = 9.2, C ⁸ -H), 7.87 (d, 1H, J = 9.2, C ³ -H), 1.50 (s, 9H, -C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 100.6 MHz, DMSO-d ₆):			
	154.88 (C ² -NH), 152.50 (C ¹¹ =O), 149.28 (C ¹⁰), 143.19 (C ⁶ -NO ₂), 140.03 (C ⁴ -H), 128.20 (C ⁸ -H), 124.67 (C ⁵ -H), 123.65 (C ⁷ -H), 123.18 (C ⁹), 114.89 (C ³ -H), 80.37 (-C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃), 27.83 (-C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃)			
IR (KBr):	3434 (w), 3158 (w), 3056 (w), 2996 (w), 2967 (w), 1730 (s), 1618 (s), 1582 (m), 1515 (s), 1492 (s), 1396 (s), 1368 (m), 1338 (s), 1325 (s), 1232 (s), 1145 (s), 1084 (m), 1059 (m), 960 (w), 905 (w), 881 (w), 852 (m), 828 (s), 758 (m), 741 (s), 638 (w), 597 (w)			
Elementaranalyse:	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₄ (289.29)			
	berechnet	C: 58.13	H: 5.23	N: 14.53
	gefunden	C: 58.22	H: 5.42	N: 14.27
Masse:	ESI+ (berechnet für M+H ⁺):			
	berechnet: 290.11, 190.11 (ohne Boc-Schutzgruppe)			
	gefunden: 290.9 (36.11) 190.9 (100)			

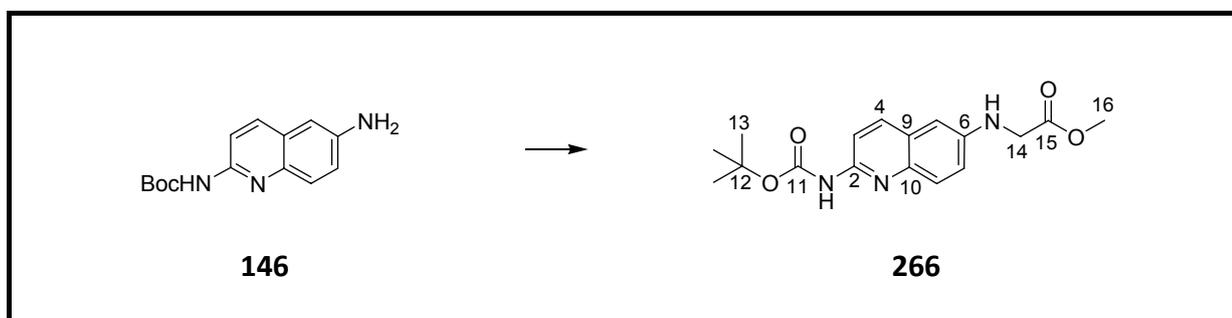
^{13}C -NMR: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 152.90 ($\text{C}^2\text{-NH}$), 147.65 ($\text{C}^{11}=\text{O}$), 145.49 (C^{10}), 139.74 ($\text{C}^6\text{-NO}_2$), 134.95 ($\text{C}^4\text{-H}$), 127.37 ($\text{C}^8\text{-H}$), 126.63 (C^9), 121.47 ($\text{C}^7\text{-H}$), 113.55 ($\text{C}^3\text{-H}$), 105.46 ($\text{C}^5\text{-H}$), 79.11 ($-\text{C}^{12}(\text{C}^{13}\text{H}_3)_3$), 27.93 ($-\text{C}^{12}(\text{C}^{13}\text{H}_3)_3$)

IR (KBr): 3371 (w), 3208 (w), 2977 (w), 1722 (s), 1632 (m), 1605 (s), 1578 (m), 1501 (s), 1473 (m), 1418 (m), 1384 (w), 1367 (m), 1326 (s), 1240 (s), 1157 (s), 1125 (w), 1074 (m), 962 (w), 934 (w), 888 (w), 861 (w), 825 (m), 773 (w), 756 (w), 686 (w), 668 (w), 621 (w), 578 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ (259.30)

berechnet	C: 64.85	H: 6.61	N: 16.20
gefunden	C: 64.67	H: 6.84	N: 16.03

10.2.17 (2-*tert*-Butoxycarbonylamino-chinolin-6-ylamino)essigsäure-methylester (266)



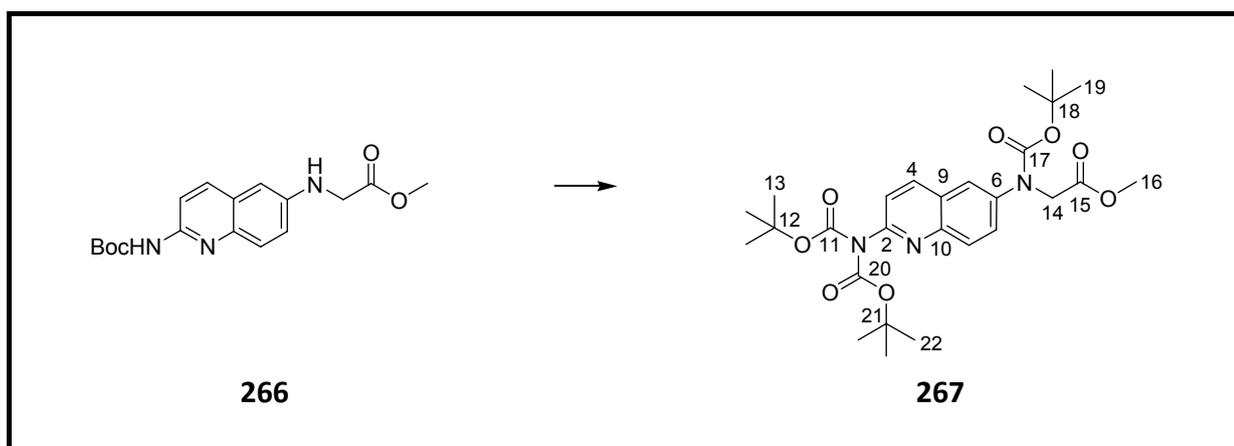
580 mg (6-Amino-chinolin-2-yl)carbaminsäure-*tert*-butylester (**146**) (2.23 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. DMF (10 mL) gelöst und mit 498 μL DIPEA (2.91 mmol, 3 Äquiv.) versetzt. Nach der tropfenweise Zugabe von 267 μL Bromessigsäuremethylester (2.91 mmol, 3 Äquiv.) unter Argonatmosphäre ließ man den Ansatz bei RT für die Dauer von 15 Stunden rühren, wobei die Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie (*n*-Hex/EtOAc 1:1) erfolgte. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit dest. Wasser (20 mL) versetzt, mit Et_2O (2 x 50 mL) extrahiert, getrocknet (MgSO_4) und säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-

Hex/EtOAc 1:1). Für analytische Zwecke erfolgte eine Umkristallisation (EtOAc/*n*-Hex), wobei der Methylester **266** als gelbes Pulver gewonnen wurde.

Ausbeute:	630 mg (85 %)	Theorie: 741 mg		
DC:	EtOAc	R _f = 0.9		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	R _f = 0.4		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:2	R _f = 0.13		
	DCM	R _f = 0.11		
Schmelzpunkt:	64-65 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 9.71 (s, 1H, C ² -N-H), 7.96 (d, 1H, J = 9.0, C ⁴ -H), 7.83 (d, 1H, J = 9.0, C ³ -H), 7.52 (d, 1H, J = 9.0, C ⁸ -H), 7.20 (dd, 1H, J = 2.7, J = 9.0, C ⁷ -H), 6.63 (d, 1H, J = 2.4, C ⁵ -H), 6.33 (t, 1H, J = 6.3, NH-C ¹⁴ H ₂ -), 4.01 (d, 2H, J = 6.3, NH-C ¹⁴ H ₂ -), 3.67 (s, 3H, C(=O)OC ¹⁶ H ₃), 1.47 (s, 9H, -C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 171.46 (C ¹⁵ =O), 152.91 (C ² -NH), 148.05 (C ¹¹ =O), 144.84 (C ¹⁰), 140.25 (C ⁶ -NO ₂), 135.45 (C ⁴ -H), 127.41 (C ⁸ -H), 126.51 (C ⁹), 121.17 (C ⁷ -H), 113.57 (C ³ -H), 102.51 (C ⁵ -H), 79.20 (-C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃), 51.56 (NH-C ¹⁴ H ₂), 44.56 (O-C ¹⁶ H ₃), 27.96 (-C ¹² (C ¹³ H ₃) ₃)			
IR (KBr):	3396 (w), 2925 (m), 2853 (w), 1724 (s), 1654 (w), 1628 (m), 1605 (s), 1578 (w), 1510 (s), 1473 (m), 1384 (m), 1366 (s), 1321 (m), 1235 (s), 1156 (s), 1070 (m), 889 (w), 849 (w), 824 (w), 772 (w), 714 (w), 620 (w)			
Elementaranalyse:	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₄ (331.37)			
	berechnet	C: 61.62	H: 6.39	N: 12.68
	gefunden	C: 61.55	H: 6.51	N: 12.51

Masse: ESI+ (berechnet für M+H⁺):
 berechnet: 332.15
 gefunden: 332.0 (100)

10.2.18 (*tert*-Butoxycarbonyl-(2-(bis-*tert*-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl)-amino)-essigsäuremethylester (**267**)



1.11 g Methylester **266** (3.3 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. DMF (10 mL) gelöst, mit 2.04 g DMAP (16.7 mmol, 5 Äquiv.) und 3.65 g (Boc)₂O (16.7 mmol, 5 Äquiv.) versetzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts (DC: *n*-Hex/EtOAc 2:1) wurden dest. Wasser (20 mL) zugegeben und mit Et₂O (3 x 40 mL) extrahiert. Die organische Phase musste mit 1 N HCl (20 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Laufmittelgradient: *n*-Hex/EtOAc 5:1 → *n*-Hex/EtOAc 1:1) aufgereinigt werden, wobei man **267** als farbloses Pulver erhielt.

Ausbeute: 1.45 g (82 %) Theorie: 1.75 g

DC:	EtOAc	R _f = 0.81
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	R _f = 0.65
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 2:1	R _f = 0.26
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.17
	DCM	R _f = 0.23

Schmelzpunkt: 134-135 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO- d_6):
8.40 (d, 1H, $J = 8.7$, $\text{C}^4\text{-H}$), 7.87 (d, 1H, $J = 2.4$, $\text{C}^5\text{-H}$), 7.86 (d, 1H, $J = 8.7$, $\text{C}^8\text{-H}$), 7.73 (dd, 1H, $J = 2.4$, $J = 9.0$, $\text{C}^7\text{-H}$), 7.53 (d, 1H, $J = 8.7$, $\text{C}^3\text{-H}$), 4.48 (s, 2H, $\text{NH-C}^{14}\text{H}_2$), 3.71 (s, 3H, $\text{C(=O)OC}^{16}\text{H}_3$), 1.41 (s, 18H, $\text{-C}^{12}(\text{C}^{13}\text{H}_3)_3$), $-\text{C}^{21}(\text{C}^{22}\text{H}_3)_3$), 1.40 (s, 9H, $-\text{C}^{18}(\text{C}^{19}\text{H}_3)_3$),

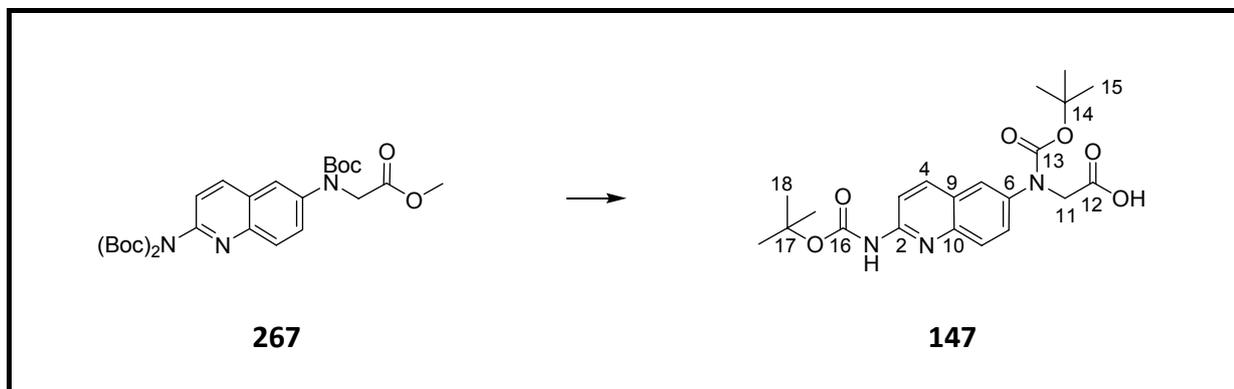
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
170.12 ($\text{C}^{15}=\text{O}$), 153.31 ($\text{C}^2\text{-NH}$), 150.88 ($\text{C}^{17}=\text{O}$), 150.67 ($\text{C}^{11}=\text{O}$, $\text{C}^{20}=\text{O}$), 143.96 (C^{10}), 140.52 ($\text{C}^6\text{-NO}_2$), 138.06 ($\text{C}^4\text{-H}$), 129.44 ($\text{C}^8\text{-H}$), 127.97 (C^9), 126.29 ($\text{C}^7\text{-H}$), 122.66 ($\text{C}^3\text{-H}$), 119.93 ($\text{C}^5\text{-H}$), 82.73 ($-\text{C}^{18}(\text{C}^{19}\text{H}_3)_3$), 80.65 ($-\text{C}^{12}(\text{C}^{13}\text{H}_3)_3$, $-\text{C}^{21}(\text{C}^{22}\text{H}_3)_3$), 51.87 ($\text{N-C}^{14}\text{H}_2$), 51.62 ($\text{O-C}^{16}\text{H}_3$), 27.63 ($-\text{C}^{18}(\text{C}^{19}\text{H}_3)_3$), 27.34 ($-\text{C}^{12}(\text{C}^{13}\text{H}_3)_3$, $-\text{C}^{21}(\text{C}^{22}\text{H}_3)_3$)

IR (KBr): 2979 (m), 2953 (m), 2938 (m), 2909 (m), 1763 (s), 1736 (s), 1700 (s), 1624 (w), 1599 (m), 1573 (w), 1502 (s), 1477 (s), 1456 (s), 1440 (s), 1356 (s), 1296 (s), 1276 (s), 1246 (s), 1206 (s), 1159 (s), 1124 (s), 1056 (s), 1047 (s), 1036 (s), 995 (s), 976 (w), 951 (s), 925 (w), 909 (m), 896 (w), 856 (s), 837 (m), 806 (s), 785 (m), 777 (m), 761 (s), 746 (w), 718 (w), 702 (w), 691 (w), 629 (w), 612 (w), 556 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$ (531.60)
berechnet C: 61.00 H: 7.02 N: 7.90
gefunden C: 60.82 H: 7.11 N: 7.74

Masse: ESI+ (berechnet für $\text{M}+\text{H}^+$):
berechnet: 532.2 (432.2 eine Boc-Schutzgruppe weniger)
gefunden: 532.2 (75.7), 432.1 (100)

10.2.19 [tert-Butoxycarbonyl-(2-tert-butoxycarbonyl)-amino-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäure (147)



1.45 g Methyl ester **267** (2.72 mmol) wurde in einem Lösungsmittelgemisch MeOH/H₂O 1:1 (20 mL) aufgelöst und 705 mg LiOH·H₂O (16.8 mmol, 6 Äquiv.) portionsweise hinzugegeben. Nach einer Stunde bei RT konnte eine vollständige Umsetzung des Edukts per Dünnschichtchromatographie (EtOAc/MeOH 9:1) festgestellt werden. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittelgemisch verdampft, der Reaktionsrückstand mit 1 N HCl auf pH 5 eingestellt und mit EtOAc (2 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden mit 1 N HCl (1 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert, säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/MeOH 9:1) und umkristallisiert (EtOAc). Dabei konnte **147** als farbloser Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute:	982 mg (86 %)	Theorie: 1.13 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH 15:5:4:1	R _f = 0.91
	EtOAc/MeOH 9:1	R _f = 0.15
	DCM/MeOH 1:1	R _f = 0.86
	DCM/MeOH 5:1	R _f = 0.8
	DCM/MeOH 19:1	R _f = 0.03
Schmelzpunkt:	170-172 °C	

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO- d_6):
 ~13 (bs, 1H, COOH), 10.09 (s, 1H, NH), 8.26 (d, 1H, $J = 9.3$, $C^4\text{-H}$), 8.02 (d, 1H, $J = 9.0$, $C^3\text{-H}$), 7.72 (d, 1H, $J = 2$, $C^5\text{-H}$), 7.69 (d, 1H, $J = 9.3$, $C^8\text{-H}$), 7.61 (dd, 1H, $J = 2$, $J = 9.0$, $C^7\text{-H}$), 4.31 (s, 2H, $C^{11}\text{-H}_2$), 1.49 (s, 9H, $C^{17}\text{-(C}^{18}\text{-H}_3)_3$), 1.39 (s, 9H, $C^{14}\text{-(C}^{15}\text{-H}_3)_3$)

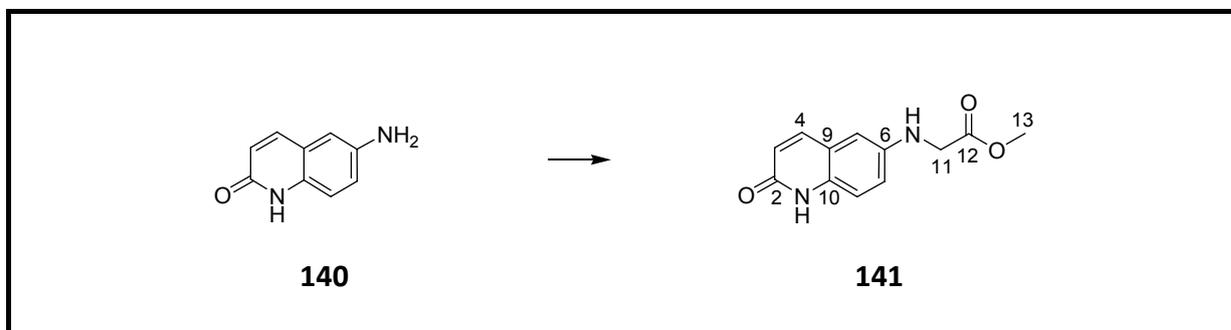
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 171.01 ($C^{12}\text{OOH}$), 153.56 ($C^2\text{-NHBoc}$), 152.74 ($C^{16}=\text{O}$), 151.65 ($C^{13}=\text{O}$), 144.28 (C^{10}), 138.86 (C^6), 137.64 ($C^4\text{-H}$), 129.27 (C^9), 126.62 ($C^7\text{-H}$), 124.67 ($C^8\text{-H}$), 122.82 ($C^5\text{-H}$), 113.54 ($C^3\text{-H}$), 80.09 (C^{14}), 79.67 (C^{17}), 51.85 ($C^{11}\text{-H}_2$), 27.89 ($\text{-(C}^{18}\text{-H}_3)_3$), 27.69 ($\text{-(C}^{15}\text{-H}_3)_3$)

IR (KBr): 3256 (w), 2979 (w), 1737 (s), 1707 (s), 1607 (s), 1498 (s), 1380 (s), 1324 (m), 1237 (s), 1151 (s), 1073 (w), 955 (w), 886 (w), 833 (w), 769 (w), 686 (w), 597 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$ (417.46)

berechnet	C: 60.42	H: 6.52	N: 10.07
gefunden	C: 60.23	H: 6.64	N: 9.84

10.2.20 (2-Oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-ylamino)-essigsäuremethylester (141)

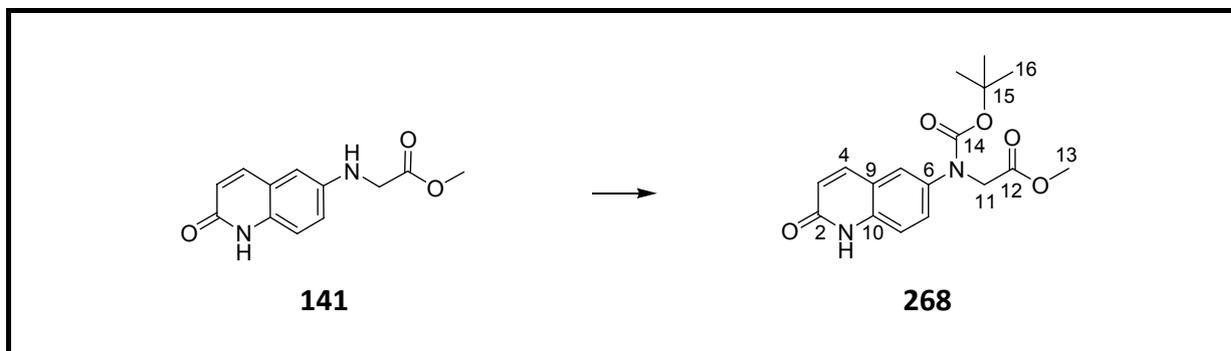


1.89 g 6-Aminochinolin-2(1H)-on (**140**) (11.79 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. DMF (20 mL) gelöst und unter Argon wurden 2.36 mL DIPEA (13.79 mmol, 1.17 Äquiv.) und 1.2 mL Bromessigsäuremethylester (13.05 mmol, 1.1 Äquiv.) zugeführt. Nach erfolgter Zugabe

wurde die Reaktionsmischung für 15 Stunden bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC: EtOAc/MeOH 9:1) wurde das Lösungsmittel verdampft, das Reaktionsgemisch auf Kieselgel adsorbiert, säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittelgradient EtOAc → EtOAc/MeOH 9:1) und umkristallisiert (MeOH), wobei man 2.25 g (82 %) Methylester **141** als hellgelbe Kristalle erhielt.

Ausbeute:	2.25 g (82 %)	Theorie: 2.73 g	
DC:	EtOAc/MeOH 9:1	R _f = 0.53	
	DCM/MeOH 9:1	R _f = 0.53	
Schmelzpunkt:	197-200 °C		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):		
	11.44 (s, 1H, NH), 7.70 (d, 1H, J = 9.3, C ⁴ -H), 7.11 (d, 1H, J = 8.7, C ⁸ -H), 6.93 (dd, 1H, J = 2.7, J = 8.7, C ⁷ -H), 6.65 (d, 1H, J = 2.7, C ⁵ -H), 6.39 (d, 1H, J = 9.6, C ³ -H), 5.96 (bs, 1H, NH-C ¹¹ H ₂), 3.94 (s, 2H, C ¹¹ -H ₂), 3.65 (s, 3H, C ¹³ -H ₃)		
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆):		
	171.61 (C ¹² =O), 161.08 (C ² =O), 143.07 (C ⁶ -NH), 139.58 (C ⁴ -H), 130.90 (C ⁹), 121.67 (C ³ -H), 119.80 (C ¹⁰), 118.33 (C ⁷ -H), 115.76 (C ⁸ -H), 106.83 (C ⁵ -H), 51.46 (C ¹³ -H ₃), 44.77 (C ¹¹ -H ₂)		
IR (KBr):	3382 (m), 3138 (w), 2953 (w), 2822 (m), 1729 (s), 1670 (s), 1627 (s), 1569 (m), 1498 (s), 1444 (s), 1425 (s), 1369 (m), 1321 (s), 1259 (w), 1224 (s), 1187 (m), 1146 (m), 1110 (m), 985 (w), 957 (w), 912 (m), 866 (m), 821 (m), 807 (m), 772 (w), 685 (w), 607 (m)		
Elementaranalyse:	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ (232.23)		
	berechnet	C: 62.06	H: 5.21
	gefunden	C: 61.84	H: 5.33
			N: 12.06
			N: 12.10

10.2.21 [tert-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäuremethylester (268)



2.25 g Methylester **141** (9.69 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. DMF (15 mL) gelöst. Unter Argon erfolgte eine portionsweise Zugabe von 3.55 g DMAP (29.08 mmol, 3 Äquiv.) und 6.35 g (Boc)₂O (29.08 mmol, 3 Äquiv.). Die Mischung wurde für sechs Stunden bei RT gerührt. Da das Edukt noch nicht vollständig umgesetzt war (DC: DCM/MeOH 9:1), wurden dem Reaktionsansatz weitere 1.18 g DMAP (9,65 mmol, 1 Äquiv.) und 2.11 g (9.66 mmol, 1 Äquiv.) (Boc)₂O hinzugefügt. Nach weiteren 15 Stunden Rühren bei 60-70 °C war die Reaktion abgeschlossen. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand mit EtOAc (20 mL) gelöst, mit 1 N HCl (1 x 10 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittelgradient: *n*-Hex/EtOAc 3:1 → *n*-Hex/EtOAc 1:1 → EtOAc), wobei 2.58 g **268** als farblose Kristalle gewonnen wurden.

Ausbeute: 2.58 g (80 %) Theorie: 3.22 g

DC: EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1 R_f = 0.5
EtOAc/*n*-Hex 9:1 R_f = 0.4

Schmelzpunkt: 178-180 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):
11.74 (s, 1H, NH), 7.88 (d, 1H, J = 9.5, C⁴-H), 7.56 (d, 1H, J = 2.0, C⁵-H), 7.42 (dd, 1H, J = 2.5, J = 8.75, C⁷-H), 7.26 (d, 1H, J = 8.75, C⁸-H),

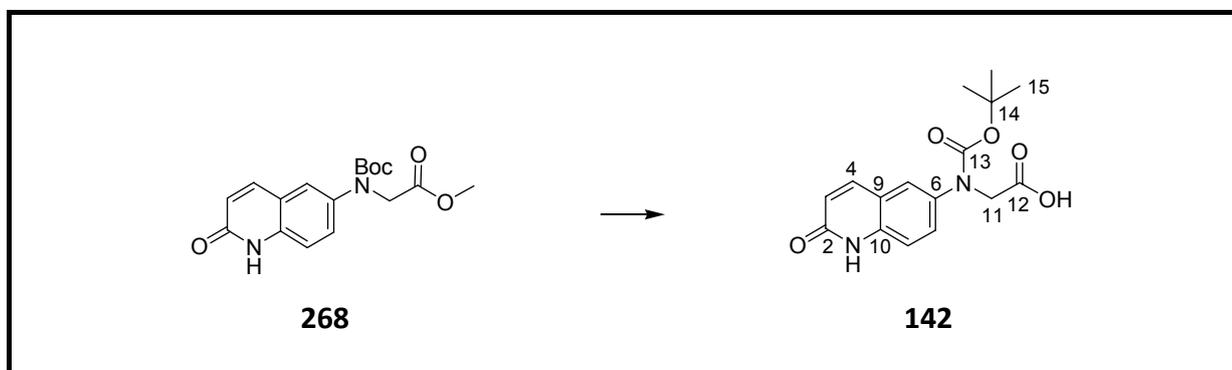
6.49 (d, 1H, $J = 9.75$, C^3-H), 4.33 (s, 2H, $C^{11}-H_2$), 3.69 (s, 3H, $C^{13}-H_3$),
1.37 (s, 9H, $C^{15}(-C^{16}-H_3)_3$)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
170.07 ($C^{12}=O$), 161.68 ($C^2=O$), 153.55 ($C^{14}=O$), 139.79 (C^4-H), 136.77
(C^6-N), 136.26 (C^{10}), 129.10 (C^7-H), 124.62 (C^5-H), 122.14 (C^3-H),
118.80 (C^8-H), 115.08 (C^9), 80.19 ($C^{15}(C^{16}-H_3)_3$), 51.76 ($OC^{13}H_3$), 51.76
($C^{11}H_2$), 27.66 ($C^{15}(C^{16}-H_3)_3$)

IR (KBr): 3143 (w), 2975 (s), 2843 (m), 1903 (w), 1751 (s), 1708 (s), 1659 (s),
1626 (s), 1561 (w), 1505 (s), 1477 (m), 1432 (s), 1393 (s), 1368 (s),
1342 (s), 1298 (m), 1281 (m), 1237 (s), 1217 (s), 1155 (s), 1052 (s),
989 (w), 954 (w), 940 (m), 909 (m), 882 (m), 863 (w), 825 (s), 774
(m), 750 (w), 732 (m), 708 (w), 688 (w), 673 (w), 622 (m), 585 (w)

Elementaranalyse: $C_{17}H_{20}N_2O_5$ (332.35)
berechnet C: 61.44 H: 6.07 N: 8.43
gefunden C: 61.61 H: 6.05 N: 8.64

10.2.22 [tert-Butoxycarbonyl-(2-oxo-1,2-dihydro-chinolin-6-yl)-amino]-essigsäure (142)



709 mg des Esters **268** (2.13 mmol, 1 Äquiv.) wurde in einem Gemisch aus MeOH/ H_2O 1:1 (2 mL) gelöst und mit 894 mg LiOH $\cdot H_2O$ (21.34 mmol, 10 Äquiv.) versetzt. Anschließend wurde

die Reaktionsmischung bei RT 15 Stunden lang gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittelgemisch verdampft, der pH-Wert durch 1 N HCl auf pH 4 eingestellt, mit EtOAc (2 x 10 mL) extrahiert, die organische Phase mit 1 N HCl (1 x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 10 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hex:EtOAc 1:9 → EtOAc → EtOAc/MeOH 9:1 → MeOH/EtOAc 1:1). Durch Umkristallisation (EtOAc) konnten 533 mg Carbonsäure **142** als weißes Pulver gewonnen werden. Es erfolgte eine Reisolierung von 70 mg des Methylesters **268**.

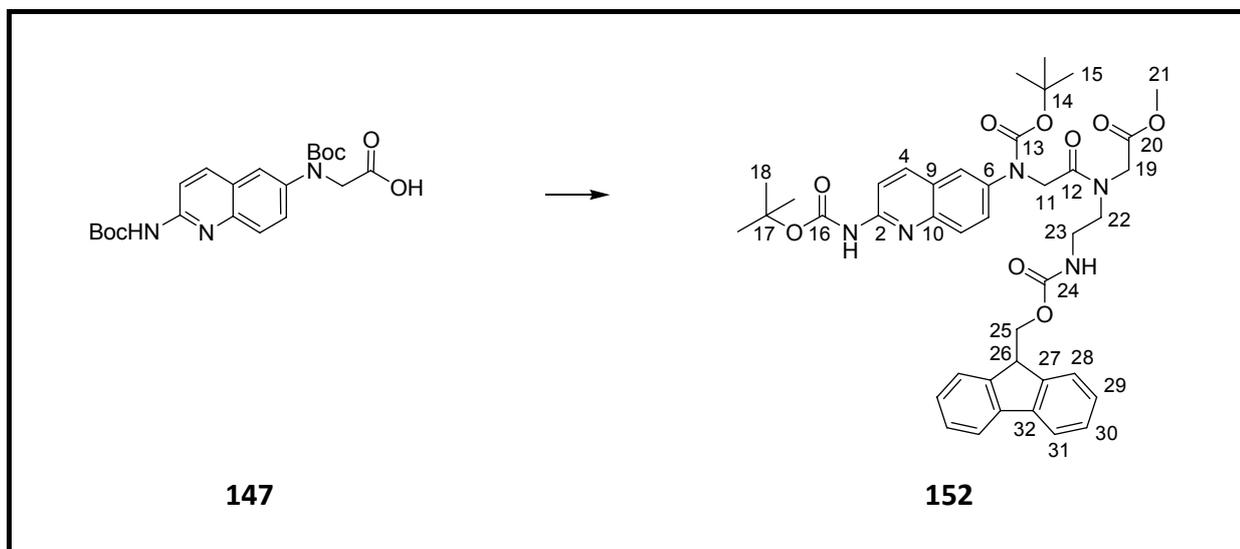
Ausbeute:	533 mg (78 %)	Theorie: 679 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH 15:5:4:1	R _f = 0.75
	EtOAc/MeOH 1:1	R _f = 0.41
	DCM/MeOH 9:1	R _f = 0.78
	DCM/MeOH 19:1	R _f = 0.14
Schmelzpunkt:	205-206 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆):	
	12.7 (bs, 1H, COOH), 11.74 (bs, 1H, NH), 7.88 (d, 1H, J = 9.5, C ⁴ -H),	
	7.55 (d, 1H, J = 2.25, C ⁵ -H), 7.42 (dd, 1H, J = 2.5, J = 8.75, C ⁷ -H), 7.25	
	(d, 1H, J = 8.75, C ⁸ -H), 6.49 (d, 1H, J = 9.75, C ³ -H), 4.22 (s, 2H, C ¹¹ -H ₂),	
	1.37 (s, 9H, C ¹⁴ (-C ¹⁵ -H ₃) ₃)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆):	
	170.95 (C ¹² OOH), 161.68 (C ² =O), 153.65 (C ¹³ =O), 139.84 (C ⁴ -H),	
	136.67 (C ⁹), 136.49 (C ⁶ -H), 129.15 (C ⁷ -H), 124.58 (C ⁵ -H), 122.09 (C ³ -	
	H), 118.77 (C ¹⁰), 115.02 (C ⁸ -H), 79.96 (C ¹⁴ (-C ¹⁵ -H ₃) ₃), 51.70 (C ¹¹ -H ₂),	
	27.70 (C ¹⁴ (-C ¹⁵ -H ₃) ₃)	
IR (KBr):	3143 (w), 2972 (m), 2926 (w), 2719 (w), 2588 (w), 2519 (w), 1924	
	(w), 1725 (s), 1705 (s), 1646 (s), 1621 (s), 1570 (w), 1556 (w), 1534	

(w), 1522 (w), 1507 (w), 1475 (w), 1458 (w), 1429 (s), 1389 (m), 1368 (m), 1344 (w), 1293 (w), 1276 (w), 1256 (m), 1212 (s), 1157 (s), 1046 (w), 961 (w), 943 (w), 900 (w), 882 (w), 858 (w), 830 (w), 773 (w), 737 (w), 708 (w), 692 (w), 670 (w), 651 (w), 630 (w), 585 (w), 561 (w), 542 (w), 525 (w), 516 (w), 470 (w)

Elementaranalyse: C₁₆H₁₈N₂O₅ (318.32)

berechnet	C: 60.37	H: 5.70	N: 8.80
gefunden	C: 60.57	H: 5.51	N: 8.73

10.2.23 {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäuremethylester (**152**)



In einem ausgeheizten 50 mL Schlenk Kolben wurden 350 mg Carbonsäure **147** (0.838 mmol, 1 Äquiv.) unter Argonatmosphäre mit abs. Acetonitril (20 mL) in Lösung gebracht. Nach Entgasung der Lösung wurden 271 µL Triethylamin (1.93 mmol, 2.3 Äquiv.), 409.5 mg HBTU (1.08 mmol, 1.3 Äquiv.) und 358.9 mg N-(Fmoc-aminethyl)glycin-Hydrochlorid (**149**) (0.92 mmol, 1.1 Äquiv.) hinzugegeben. Die Dünnschichtchromatographie (EtOAc/*n*-Hex 3:1) zeigte eine vollständige Umsetzung nach drei Stunden, woraufhin das Lösungsmittel verdampft und gegen EtOAc (20 mL) getauscht wurde. Die Reaktionslösung wurde schließlich mit gesättigter

NaHCO₃ (2 x 20 mL), gesättigter wässriger NaCl-Lsg. (2 x 20 mL) und destilliertem Wasser (20 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Laufmittelgradient: EtOAc/*n*-Hex 1:1 → EtOAc/*n*-Hex 9:1 → EtOAc) aufgereinigt. Nach Verdampfung des Lösungsmittels erfolgte die Isolierung des Methylester **152** als weißer Schaum, dessen intensive Trocknung im Ölpumpenvakuum stattfand.

Ausbeute: 450 mg (71 %) Theorie: 632 mg

DC: EtOAc R_f = 0.82

EtOAc/*n*-Hex 3:1 R_f = 0.43

EtOAc/*n*-Hex 3:2 R_f = 0.11

¹H-NMR: (δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d₆):
10.50-10.39 (bs, 1H, *NH*Boc austauschbar mit D₂O), 8.23-8.19 (d, 1H, J = 9.2, C⁴-H), 8.01-7.98 (dd, 1H, J = 9.2, C³-H), 7.88-7.86 (m, 2H, Aromat), 7.66-7.60 (m, 5H, Aromat), 7.42-7.27 (m, 5H, Aromat, *NH* austauschbar mit D₂O), 4.7-4.0 (m, 7H, C¹¹-H₂, C¹⁹-H₂, C²⁵-H₂, C²⁶-H), 3.64 (s, 3H, C²¹-H₃), 3.5-3.3 (m, 2H, C²²-H₂), 3.3-3.1 (m, 2H, C²³-H₂), 1.49 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl)

Aufgrund des Rotamers kommt es zur Aufspaltung der Signale

¹³C-NMR: (δ[ppm], 100.6 MHz, DMSO-d₆):
169.88, 169.60, 156.17, 153.73, 152.75, 151.57, 144.18, 143.73, 143.64, 140.60, 137.56, 127.46, 126.92, 126.90, 126.38, 124.98, 124.91, 124.62, 119.99, 113.48, 79.95, 79.86, 79.65, 65.26, 52.06, 51.63, 46.63, 46.57, 27.90, 27.73, 27.64

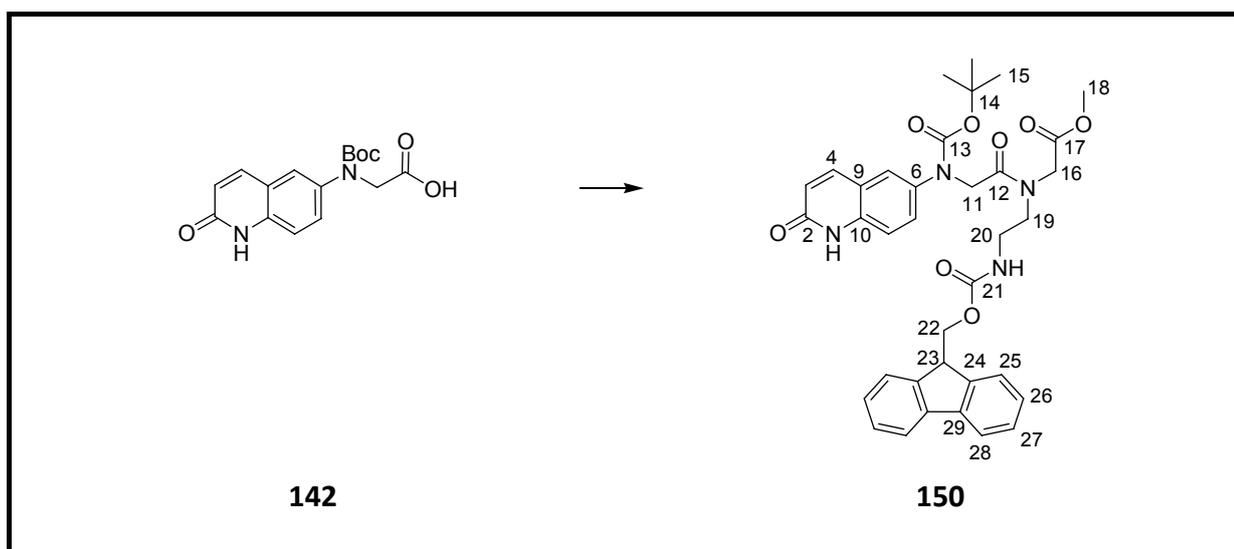
IR (KBr): 3345 (w), 2976 (m), 1723 (s), 1604 (s), 1577 (w), 1495 (s), 1452 (s), 1391 (s), 1368 (s), 1319 (s), 1235 (s), 1151 (s), 1072 (m), 1031 (m), 952 (w), 924 (w), 885 (w), 827 (w), 759 (m), 741 (m), 621 (w)

Elementaranalyse: $C_{41}H_{47}N_5O_9$ (753.84)

berechnet	C: 65.32	H: 6.28	N: 9.29
gefunden	C: 65.08	H: 6.52	N: 9.02

Masse: ESI+ (berechnet für $M+H^+$):
 berechnet: 754.33 (654.28 eine Boc-Schutzgruppe weniger)
 gefunden: 754.1 (100), 654.1 (26)

10.2.24 {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-
 [2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-
 essigsäuremethylester (**150**)



In einem ausgeheizten 25 mL Schlenkkolben wurde 250 mg Carbonsäure **142** (0.785 mmol, 1 Äquiv.) unter Argon mit 3 mL absolutem DMF in Lösung gebracht. Danach erfolgte zur entgasten Lösung die Zugabe von 173 μ L N-Methylmorpholin (1.57 mmol, 2 Äquiv.), 894 mg HBTU (2.36 mmol, 3 Äquiv.) und 378 mg -(Fmoc-aminethyl)glycin-Hydrochlorid (**149**) (0.97 mmol, 1.2 Äquiv.). Nach drei Stunden konnte eine vollständige Umsetzung per Dünnschichtchromatographie (EtOAc/MeOH 9:1) festgestellt werden. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter Vakuum verdampft und gegen EtOAc (20 mL) getauscht. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter $NaHCO_3$ (2 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lsg. (2 x 20 mL) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Laufmittelgradient: EtOAc/*n*-Hex 9:1 \rightarrow EtOAc) aufgereinigt. Nach

Verdampfen des Lösungsmittels erfolgte die intensive Trocknung des Methylester **150** in Form eines weißen Schaums im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 357 mg (69 %) Theorie: 514 mg

DC: EtOAc $R_f = 0.38$
DCM/MeOH 9:1 $R_f = 0.82$

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
11.7 (bs, 1H, Lactam-NH austauschbar mit D_2O), 7.89-7.86 (m, 3H, Aromat), 7.67-7.60 (m, 2H, Aromat), 7.55-7.48 (m, 1H, Aromat), 7.43-7.19 (m, 7H, Aromat, NH austauschbar mit D_2O), 6.45 (d, 1H, $J = 9.5$, $\text{C}^3\text{-H}$), 4.50-4.12 (m, 7H, $\text{C}^{11}\text{-H}_2$, $\text{C}^{16}\text{-H}_2$, $\text{C}^{22}\text{-H}_2$, $\text{C}^{23}\text{-H}$), 3.66 (s, 3H, $\text{C}^{18}\text{-H}_3$), 3.45-3.25 (m, 2H, $\text{C}^{19}\text{-H}_2$), 3.25-3.10 (m, 2H, $\text{C}^{20}\text{-H}_2$), 1.36 (bs, 9H, $\text{C}^{14}(\text{C}^{15}\text{-H}_3)_3$)

Aufgrund des Rotamers kommt es zur Aufspaltung der Signale

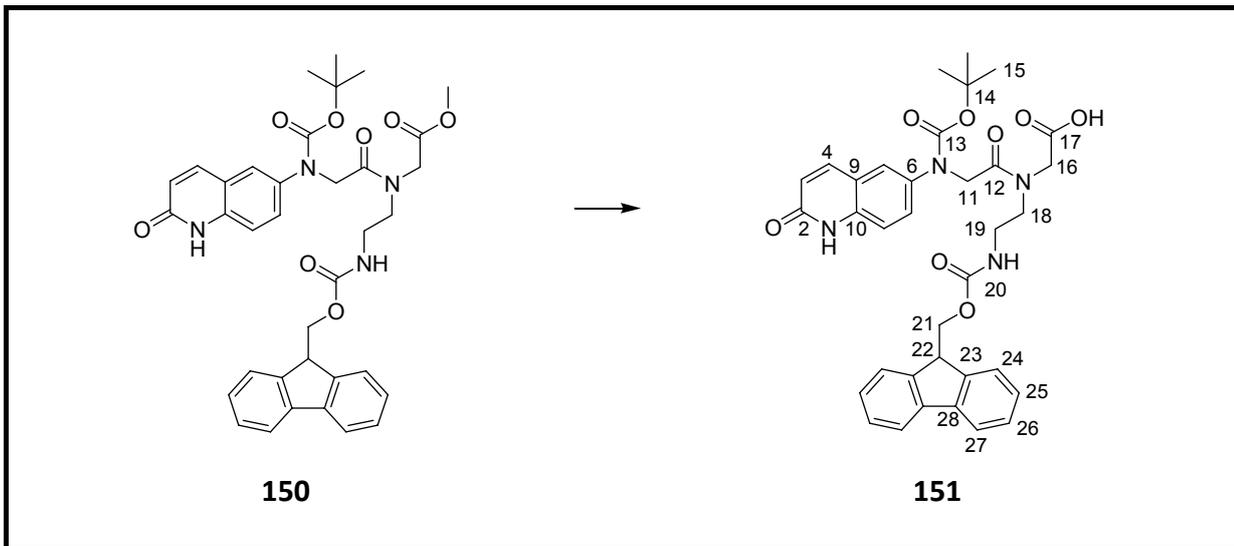
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 100.6 MHz, DMSO- d_6):
169.93, 169.66, 161.73, 161.72, 156.20, 143.77, 143.69, 140.64, 139.87, 136.53, 127.52, 126.95, 125.03, 124.96, 124.59, 122.04, 120.05, 118.70, 114.86, 79.81, 79.70, 65.31, 52.10, 51.68, 46.65, 46.59, 30.09, 27.76

IR (KBr): 3325 (w), 2976 (w), 1707 (s), 1662 (s), 1625 (m), 1560 (w), 1501 (m), 1450 (m), 1431 (m), 1431 (s), 1390 (m), 1368 (m), 1251 (s), 1153 (s), 1048 (w), 941 (w), 830 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_8$ (654.71)
berechnet C: 66.04 H: 5.85 N: 8.56
gefunden C: 65.79 H: 5.80 N: 8.38

Masse: ESI+ (berechnet für M+H⁺):
 berechnet: 655.27
 gefunden: 655.0 (100), 677.6 (27) Na⁺, 555.0 (12) ohne Boc

10.2.25 {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(1,2-dihydro-2-oxochinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-
 [2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure
(151)^[224]

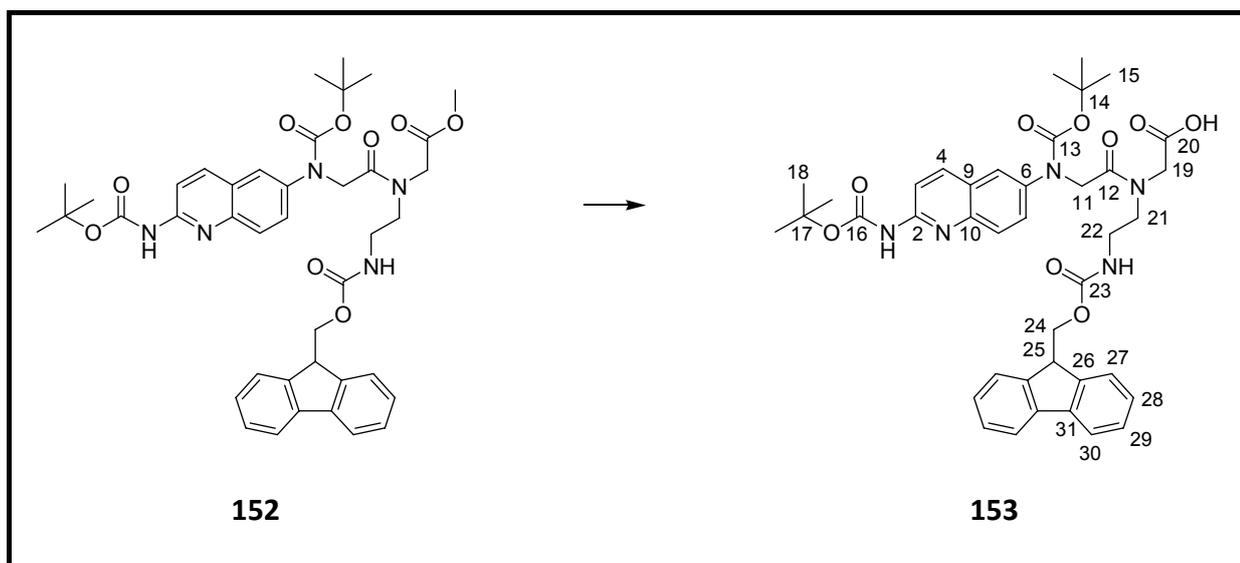


85 mg Ester **150** (0.129 mmol, 1 Äquiv.) wurde unter Argon in einem ausgeheizten 10 mL Schlenkrohr vorgelegt und mit 3 mL abs. 1,2-Dichlorethan in Lösung gebracht und auf 60-80 °C erhitzt. Danach erfolgte die Zugabe von 201 mg Trimethylzinnhydroxid (1.11 mmol, 8.6 Äquiv.). Nach zwei Stunden zeigte die Analytik (DC: EtOAc/MeOH 9:1 und EtOAc/MeOH 1:1), dass die Reaktion abgeschlossen war. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter Vakuum verdampft und gegen EtOAc (15 mL) getauscht. Die Reaktionslösung wurde mit KHSO₄ (0.01 N) (3 x 15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lsg. (1 x 15 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert, säulenchromatographisch (Laufmittelgradient: EtOAc/MeOH 9:1 → EtOAc/MeOH 1:1) und anschließend für analytische Zwecke per HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisierung des Lösungsmittels erhielt man die Carbonsäure **151** als gelblichen Schaum.

Ausbeute:	71 mg (85 %)	Theorie: 83.2 mg
DC:	EtOAc/MeOH 3:1	R _f = 0.1
	EtOAc/MeOH 1:1	R _f = 0.57
	DCM/MeOH 3:1	R _f = 0.25
HPLC-Bedingungen:	analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 42:58, 0.8 mL/min, t _R = 24.23 min präparativ: Reprosil AQ 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 42:58, 7 mL/min, t _R = 4.0 min	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 13.8-12.5 (bs, 1H, COOH austauschbar mit D ₂ O), 11.7 (s, 1H, Lactam-NH austauschbar mit D ₂ O), 7.89-7.80 (m, 3H, Aromat), 7.67-7.60 (m, 2H, Aromat), 7.50 (d, 1H, J = 2.25, Aromat), 7.43-7.20 (m, 7H, Aromat, NH austauschbar mit D ₂ O), 6.45 (d, 1H, J = 9.5, C ³ -H), 4.49-4.00 (m, 7H, C ²³ -H, C ¹¹ -H ₂ , C ¹⁶ -H ₂ , C ²¹ -H ₂), 3.3-3.2 (m, 2H, C ¹⁸ -H ₂), 3.2-3.1 (m, 2H, C ¹⁹ -H ₂), 1.36 (s, 9H, C ¹⁴ (C ¹⁵ -H ₃) ₃)	
	Aufgrund des Rotamers kommt es zur Aufspaltung der Signale	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 170.57, 161.85, 161.67, 156.15, 153.87, 143.74, 143.66, 140.60, 139.84, 136.47, 127.48, 126.93, 124.99, 124.93, 124.42, 121.96, 119.99, 118.66, 114.79, 79.76, 79.64, 65.32, 51.37, 46.93, 46.63, 46.57, 27.74	
IR (KBr):	3409 (w), 2974 (w), 1656 (s), 1507 (m), 1450 (m), 1429 (s), 1391 (m), 1368 (m), 1249 (s), 1154 (s), 1048 (w), 959 (w), 831 (w), 759 (w), 741 (s), 621 (w)	

Masse: ESI+ (berechnet für M-H⁺): C₃₅H₃₆N₄O₈ (640.68)
 berechnet: 639.25
 gefunden: 639.5 (100), 640.4 (39), 641.5 (9), 417.2 (7) ohne Fmoc

10.2.26 {{2-[*tert*-Butoxycarbonyl-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-chinolin-6-yl)-amino]-acetyl}-[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-amino}-essigsäure (**153**)^[224]



In einem ausgeheizten 10 mL Schlenkrohr wurden 39.2 mg Methylester **152** (0.052 mmol, 1 Äquiv.) unter Argonatmosphäre mit abs. 1,2-Dichlorethan (2 mL) in Lösung gebracht und die Reaktion mit 73 mg Trimethylzinnhydroxid (0.404 mmol, 7.7 Äquiv.) gestartet. Das Edukt war nach 2.5 Stunden vollständig umgesetzt (DC: EtOAc/MeOH 9:1 und EtOAc/MeOH 1:1). Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in EtOAc (15 mL) gelöst, mit 0.01 N KHSO₄ (2 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lsg. (2 x 20 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Laufmittelgradient: EtOAc → EtOAc/MeOH 3:1) aufgereinigt. Für analytische Zwecke erfolgte eine weitere Aufreinigung per HPLC, wobei nach Lyophilisierung das Produkt **153** als gelber Schaum anfiel.

Ausbeute: 32 mg (83 %) Theorie: 38.4 mg

DC: EtOAc/MeOH 3:1 R_f = 0.29

DCM/MeOH 3:1 $R_f = 0.86$
DCM/MeOH 9:1 $R_f = 0.28$

HPLC-Bedingungen: analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 42:58, 0.8 mL/min, $t_R = 24.84$ min
präparativ: Reprosil AQ 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 42:58, 7 mL/min, $t_R = 4.1$ min

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
10.3 (bs, 1H, *NH*Boc austauschbar mit D_2O), 8.3-8.2 (m, 1H, Aromat),
7.9-7.8 (m, 3H, Aromat), 7.8-7.6 (m, 5H, Aromat), 7.4-7.2 (m, 5H,
Aromat, *NH* austauschbar mit D_2O), 4.6-3.9 (m, 7H, $\text{C}^{25}\text{-H}$, $\text{C}^{11}\text{-H}_2$, $\text{C}^{19}\text{-H}_2$, $\text{C}^{24}\text{-H}_2$), 3.5-3.3 (m, 2H, $\text{C}^{21}\text{-H}_2$), 3.3-3.1 (m, 2H, $\text{C}^{22}\text{-H}_2$), 1.50 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl)

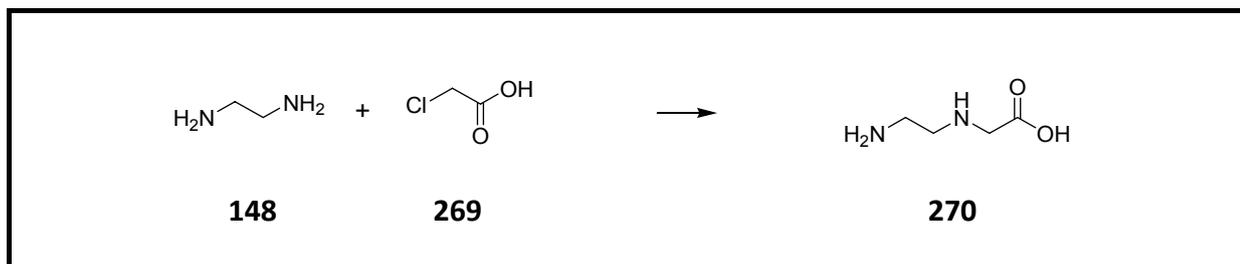
Aufgrund des Rotamers kommt es zur Aufspaltung der Signale

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
171.03, 169.15, 159.05, 158.51, 156.79, 154.35, 152.86, 151.10,
143.93, 141.01, 128.11, 127.51, 125.45, 124.77, 124.55, 123.25,
121.11, 120.46, 114.10, 111.28, 82.21, 81.05, 80.95, 65.86, 47.00,
31.38, 28.21, 28.14, 28.06, 24.26

IR (KBr): 3423 (m), 2927 (m), 1719 (s), 1675 (s), 1656 (s), 1606 (m), 1560 (w),
1498 (m), 1458 (m), 1387 (m), 1368 (m), 1321 (m), 1239 (s), 1151 (s),
1075 (w), 1048 (w), 958 (w), 844 (w), 760 (w), 742 (w), 696 (w), 671
(w), 621 (w), 588 (w)

Masse: ESI+ (berechnet für $\text{M}+\text{H}^+$): $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_9$ (739.81)
berechnet: 740.32 (639.26 eine Boc-Schutzgruppe weniger)
gefunden: 740.5 (100), 741.4 (43), 742.3 (11), 684.3 (4), 640.5 (1)

10.2.27 (Amino-ethylamino)-essigsäure (270)^[218, 251]



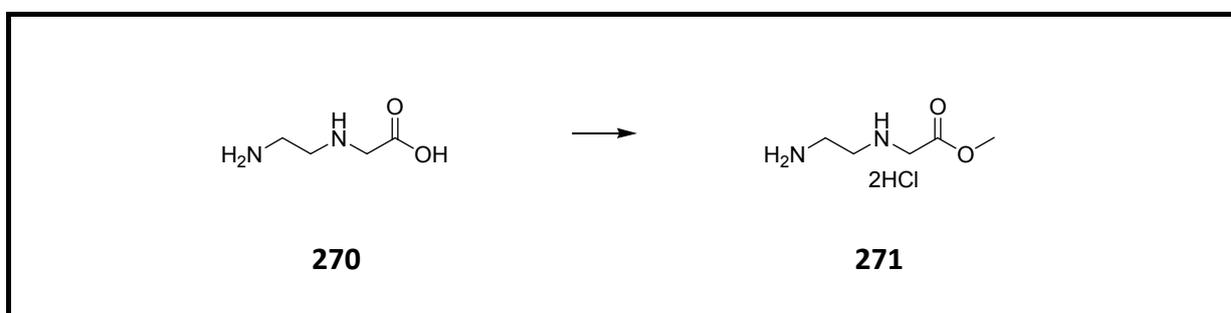
100 mL Ethylendiamin (**148**) (1.49 mol, 10 Äquiv.) wurde unter Rühren bei 4 °C portionsweise mit 14.10 g Chloressigsäure (**269**) (0.149 mol, 1 Äquiv.) versetzt. Anschließend musste die Lösung für weitere 48 Stunden bei RT gerührt werden. Danach erfolgte die Einengung des Reaktionsansatzes. Das gewonnene Öl wurde mit DMSO/Et₂O/EtOH (180 mL: 60 mL: 60 mL) versetzt, dabei fielen über einen Zeitraum von zwei Tagen bei -20 °C kleine Kristalle aus. Die gewonnenen Kristalle wurden abgesaugt, mit EtOH und Et₂O gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die Mutterlauge wurde für die weitere Kristallbildung im Kühlschrank gelagert. Dabei konnten insgesamt 13.92 g (Amino-ethylamino)-essigsäure (**270**) als weiße Kristalle gewonnen werden.

Ausbeute:	13.92 g (79 %)	Theorie: 17.6 g
DC:	<i>n</i> -Butanol/AcOH/H ₂ O/EtOAc 1:1:1:1	R _f = 0.19
Schmelzpunkt:	148-151 °C	Lit.: 152 °C ^[220] , 149-153 °C ^[219]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, D ₂ O/DMSO-d ₆): 3.11 (s, 2H, CH ₂ -COOH), 2.87 (m, 2H, H ₂ NCH ₂ CH ₂), 2.75 (m, 2H, H ₂ NCH ₂ CH ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, D ₂ O/DMSO-d ₆): 179.02 (CH ₂ -COOH), 52.68, 47.72, 39.66	
IR (KBr):	3292 (s), 2934 (bs), 2173 (m), 1931 (w), 1666 (s), 1599 (s), 1532 (s),	

1482 (s), 1468 (s), 1458 (s), 1414 (s), 1365 (s), 1348 (s), 1305 (s),
1241 (s), 1189 (s), 1128 (s), 1085 (m), 1058 (s), 1022 (s), 985 (m), 933
(m), 891 (s), 854 (m), 831 (s), 698 (s), 599 (w), 567 (w)

Elementaranalyse:	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ (118.13)		
berechnet	C: 40.67	H: 8.53	N: 23.71
gefunden	C: 40.66	H: 8.32	N: 23.47

10.2.28 Methyl 2-(2-aminoethylamino)acetat dihydrochlorid (**271**)^[218]



(Amino-ethylamino)-essigsäure (**270**) (2.30 g, 19.47 mmol, 1 Äquiv.) wurde in MeOH (70 mL) suspendiert. In die mittels Eisbad gekühlte Suspension wurde ein konstanter Strom HCl eingeleitet. Nach Sättigung mit HCl (2.5 g) wurde die Mischung für einen Zeitraum von acht Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung der Mischung auf 0 °C wurde bei dieser Temperatur für weitere drei Stunden gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet, wobei 3.53 g Methyl 2-(2-aminoethylamino)acetat dihydrochlorid (**271**) als farbloses Pulver anfielen.

Ausbeute: 3.53 g (88 %) Theorie: 3.99 g

DC: *n*-Butanol/AcOH/H₂O/EtOAc 1:1:1:1 R_f = 0.32

Schmelzpunkt: 188-190 °C Lit.: 190-191 °C^[220]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 3.94 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOCH}_3$), 3.67 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{-COOCH}_3$), 3.37-3.31 (m, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.27-3.21 (m, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, $\text{D}_2\text{O/DMSO-}d_6$):
 168.84 ($\text{CH}_2\text{-COOCH}_3$), 55.02, 49.06, 45.50, 36.79

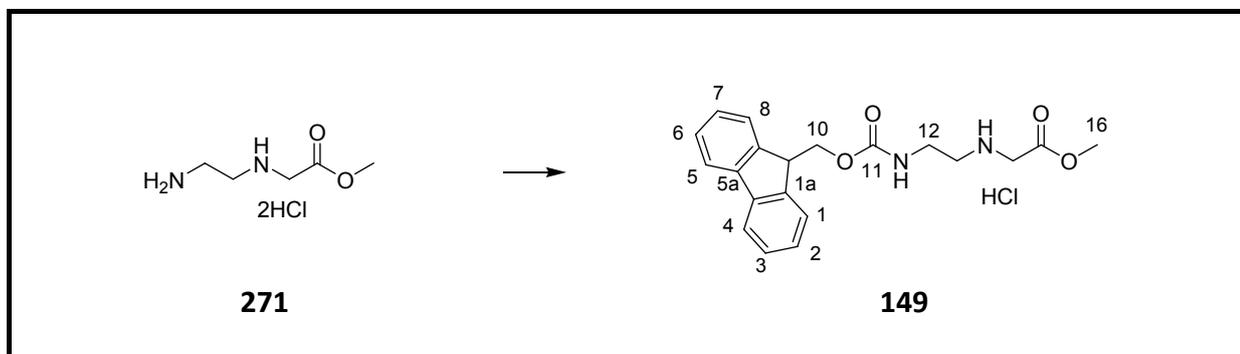
IR (KBr): 3395 (m), 3060 (s), 2646 (s), 2529 (m), 2010 (w), 1750 (s), 1609 (m), 1490 (s), 1465 (m), 1442 (s), 1412 (m), 1381 (s), 1352 (s), 1320 (s), 1248 (s), 1185 (w), 1159 (m), 1081 (m), 1062 (s), 1042 (w), 1001 (s), 969 (m), 955 (w), 895 (w), 874 (m), 823 (w), 783 (s), 697 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (205.08)

berechnet	C: 29.28	H: 6.88	N: 13.66
gefunden	C: 29.06	H: 6.61	N: 13.46

Masse: ESI+ (berechnet für M (ohne 2HCl) + H^+):
 berechnet: 133.09
 gefunden: 132.8 (100)

10.2.29 [2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethylamino]-essigsäure-methylester-Hydrochlorid (**149**)^[122, 222]



3.00 g Methyl 2-(2-aminoethylamino)acetat dihydrochlorid (**271**) (14.6 mmol, 1 Äquiv.) wurde in 30 mL dest. Wasser gelöst und unter kräftigem Rühren wurde eine Lösung aus 5.00

g Fmoc-ONSu (14.8 mmol, 1 Äquiv.) in 1,4-Dioxan (120 mL) zugegeben. Anschließend gab man innerhalb von 20 Minuten eine Lösung von 3.73 g NaHCO₃ (44.4 mmol 3 Äquiv.) in dest. Wasser (20 mL) tropfenweise zu. Die Reaktionsmischung wurde für 15 Stunden bei RT gerührt und zur Aufarbeitung im Vakuum eingengt (~15 mL). Die daraus resultierende Lösung wurde mit EtOAc (90 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit dest. Wasser (3 x 10 mL) gewaschen, getrocknet (MgSO₄), eingengt (~7 mL) und mit 15 mL DCM versetzt. Die Lösung wurde mit 3 mL einer 2N methanolischen HCl (428 µL Acetylchlorid in 2.57 mL MeOH) versetzt, dabei fiel ein weißer Feststoff aus. Eine vollständige Ausfällung wurde über Nacht bei 4 °C erreicht. Der Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig DCM nachgewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 3.55 g N-(Fmoc-aminethyl)glycin-Hydrochlorid (**149**) (62 %) als weißes Pulver gewonnen werden.

Ausbeute:	3.55 g (62 %)	Theorie: 5.7 g
DC:	EtOAc/MeOH 9:1	R _f = 0.42
	EtOAc/MeOH 1:1	R _f = 0.8
	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH 15:5:4:1	R _f = 0.48
	<i>n</i> -Butanol/AcOH/H ₂ O 3:1:1	R _f = 0.62
Schmelzpunkt:	98-100 °C	Lit.: 100 °C ^[252]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):	
	9.42 (bs, 2H, N ⁺ H ₂ , austauschbar mit D ₂ O), 7.90 (d, 2H, J = 7.2, C ⁴ -H, C ⁵ -H), 7.70 (d, 2H, J = 7.5, C ¹ -H, C ⁸ -H), 7.56 (t, 1H, J = 5.6, NH, austauschbar mit D ₂ O), 7.42 (dt, 2H, J = 0.9, J = 7.5, C ³ -H, C ⁶ -H), 7.33 (dt, 2H, J = 0.9, J = 7.2, C ² -H, C ⁷ -H), 4.34 (d, 2H, J = 6.9, C ¹⁰ -H ₂), 4.23 (t, 1H, J = 6.9, C ⁹ -H), 4.00 (s, 2H, C ¹⁴ -H ₂), 3.74 (s, 3H, C ¹⁶ -H ₃), 3.33 (t, 2H, J = 6, C ¹² -H ₂), 3.03 (t, 2H, J = 6, C ¹³ -H ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆):	
	167.17 (C ¹⁵ =O), 156.66 (C ¹¹ =O), 143.92 (C ^{1a} , C ^{8a}), 140.94 (C ^{4a} , C ^{5a}), 127.94 (C ¹ -H, C ⁸ -H), 127.36 (C ⁴ -H, C ⁵ -H), 125.27 (C ² -H, C ⁷ -H), 120.36	

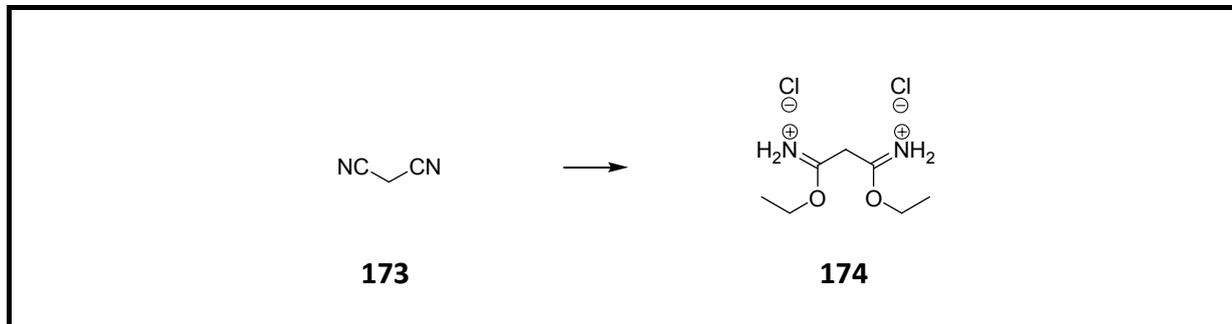
(C³-H, C⁶-H), 65.87 (C¹⁰-H₂), 52.96 (C¹³-H₂), 46.82 (C¹⁶-H₃), 46.75 (C¹²-H₂), 36.66 (C⁹-H)

IR (KBr): 3393 (w), 3246 (s), 3064 (m), 2952 (m), 2725 (m), 2420 (w), 1761 (s), 1706 (s), 1552 (s), 1473 (m), 1449 (s), 1408 (m), 1381 (m), 1312 (s), 1254 (s), 1156 (m), 1131 (m), 1100 (m), 1051 (m), 1009 (m), 976 (w), 946 (w), 895 (w), 862 (w), 785 (w), 755 (m), 735 (s), 644 (w), 620 (w), 576 (w)

Elementaranalyse: C₂₀H₂₃ClN₂O₄ (390.86)

berechnet	C: 61.46	H: 5.93	N: 7.17
gefunden	C: 61.30	H: 5.99	N: 7.36

10.2.30 Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid (**174**)^[225]

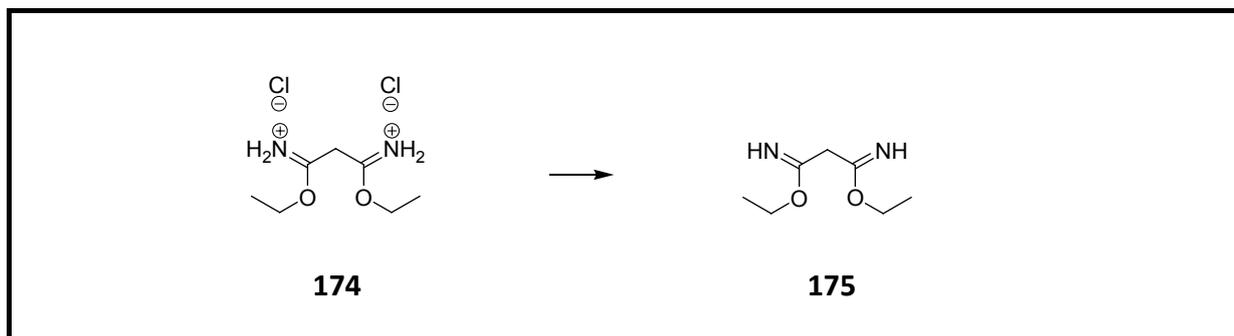


In einem 1 L-Dreihalskolben mit Einleitungsrohr und Tropftrichter wurden 320 mL 1,4-Dioxan und 15.4 mL Ethanol (265 mmol, 2.2 Äquiv.) vorgelegt. Unter Eisbad-Kühlung wurde trockenes HCl-Gas konstant zugeleitet und über einen Zeitraum von zwölf Stunden wurde eine Lösung von 7.93 g Malonsäuredinitril (**173**) (120 mmol, 1 Äquiv.) in 1,4-Dioxan (320 mL) konstant zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde für eine weitere Stunde HCl-Gas unter Eisbad-Kühlung eingeleitet. Zur Aufarbeitung wurde der farblose kristalline Niederschlag über einen Büchner-Trichter abgesaugt und mit wenig 1,4-Dioxan und schließlich mit Diethylether gewaschen. 25.5 g (92 %) Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid (**174**) wurde als farbloser pulverförmiger Feststoff gewonnen, der im

Ölpumpenvakuum getrocknet und nach abschließender Analytik sofort weiterverarbeitet wurde.

Ausbeute:	25.5 g (92 %)	Theorie: 27.7 g		
DC:	EtOAc/MeOH = 9:1	R _f = 0.2 Anfärbbar mit KMnO ₄		
Schmelzpunkt:	128-129 °C	Lit.: 122 °C ^[253] , 123-129 °C ^[254]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 12.0-11.3 (bs, 1H, NH), 8.7-7.9 (bs, 4H, 2x=NH ₂ ⁺), 4.42 (s, 1H, CH), 4.21 (q, 4H, J = 7.0, 2xCH ₂ CH ₃), 1.30 (t, 6H, J = 7.0, 2xCH ₂ CH ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 134.05, 77.21, 65.52, 13.97			
IR (KBr):	2909 (s), 2759 (s), 2656 (s), 1741 (w), 1668 (s), 1580 (s), 1464 (m), 1442 (m), 1390 (s), 1356 (s), 1299 (w), 1206 (w), 1137 (s), 1097 (m), 1005 (m), 951 (m), 905 (s), 850 (w), 824 (m), 810 (w), 727 (w), 637 (m)			
Elementaranalyse:	C ₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₂ (231.12)			
	berechnet	C: 36.38	H: 6.98	N: 12.12
	gefunden	C: 36.20	H: 6.96	N: 12.03

10.2.31 Malondiimidsäure-diethylester (**175**)^[255]



In einem Scheidetrichter wurden 24.83 g Malonsäurediimidsäure-dihydrochlorid (**174**) (107 mmol, 1 Äquiv.) in kalter gesättigter K_2CO_3 -Lsg (50 mL) aufgelöst und mit -20 °C kaltem Diethylether (5 x 50 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösungsmittel verdampft. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Vakuumdestillation des Rückstands über eine Mikrodestille (3.7 mbar, 72 °C). Es konnten 14.92 g (88 %) des Iminoesters **175** als farblose Flüssigkeit gewonnen werden.

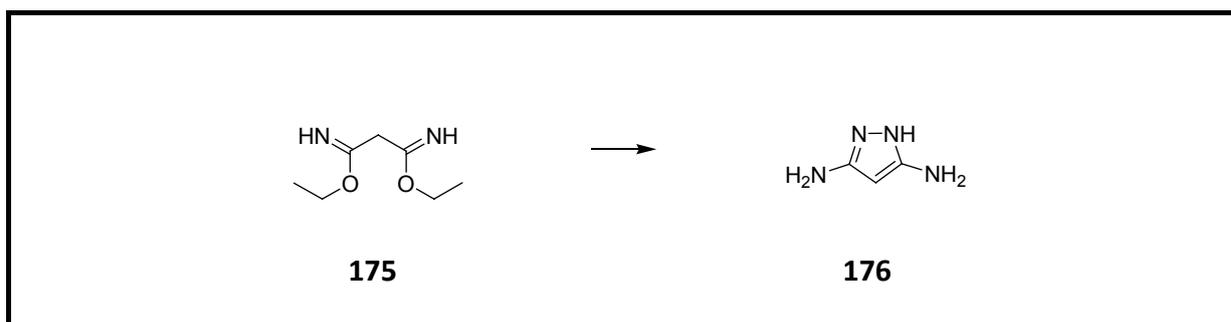
Ausbeute:	14.92 g (88 %)	Theorie: 16.93 g
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 9:1	$R_f = 0.27$
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 4:1	$R_f = 0.58$
	DCM/MeOH 19:1	$R_f = 0.48$
Siedepunkt:	72 °C bei 3.7 mbar	Lit.: 41 °C bei 0.13 mbar ^[256]
	85 °C bei 9.9 mbar	Lit.: $62\text{--}63\text{ °C}$ bei 0.53 mbar ^[255]
Brechungsindex (n^{20}):	1.4530	Lit.: 1.4530 ^[255]
1H -NMR:	(δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):	
	7.95 (bs, 2H, 2x=NH), 4.03 (q, 4H, $J = 7.0$, 2x CH_2CH_3), 3.19 (s, 2H, CH_2), 1.17 (t, 6H, $J = 7.0$, 2x CH_2CH_3)	

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
165.14 (2x $\text{C}=\text{NH}$), 60.45 (2x CH_2CH_3), 42.00 (CH_2), 13.89 (2x CH_2CH_3)

IR (Film): 3272 (m), 2981 (s), 2903 (m), 2345 (w), 2189 (w), 1944 (w), 1651 (s), 1593 (m), 1559 (w), 1479 (m), 1445 (s), 1404 (s), 1375 (s), 1340 (s), 1264 (s), 1173 (s), 1093 (s), 1040 (s), 957 (w), 842 (s), 647 (w), 582 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (158.20)
berechnet C: 53.15 H: 8.92 N: 17.71
gefunden C: 52.91 H: 8.70 N: 17.92

10.2.32 3,5-Diaminopyrazol (**176**)^[227]



Eine Lösung von Hydrazin-Monohydrat (4.67 mL, 4.81 g, 96.2 mmol, 1.02 Äquiv.) in abs. EtOH (47 mL) wurde zum Rückfluss erhitzt. Bei der tropfenweisen Zugabe von 14.78 mL Diethylmalonimidat **175** (14.95 g, 94.5 mmol, 1 Äquiv.) wurde darauf geachtet, dass die Reaktionslösung ohne externe Erwärmung im Siedezustand bleibt. Fünf Minuten nach Zugabe des Esters **175** wurde die Reaktionslösung im Eisbad abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit wenig EtOH gewaschen. Nach Umkristallisation in EtOH konnten 6.20 g (66 %) 3,5-Diaminopyrazol (**176**) als gelbliche Kristalle gewonnen werden.

Ausbeute:	6.20 g (66 %)	Theorie: 9.27 g
DC:	MeOH/EtOAc = 1:1	R _f = 0.5
	MeOH/EtOAc = 2:3	R _f = 0.19
Schmelzpunkt:	108-109 °C	Lit.: 110 °C ^[227]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 12.9 (bs, 1H, N ¹ -H), 6.5-3.75 (bs, 4H, C ³ -NH ₂ , C ⁵ -NH ₂), 4.55 (s, 1H, C ⁴ -H)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 151.51 (C ³ -NH ₂ , C ⁵ -NH ₂), 76.04 (C ⁴ -H)	
IR (KBr):	3400 (s), 3371(m), 3327 (s), 3153 (s), 2937 (s), 2791 (m), 1794 (w), 1600 (s), 1530 (s), 1497 (s), 1438 (s), 1188 (m), 1062 (s), 1020 (m), 994 (s), 907 (s), 749 (s), 689 (s), 638 (m), 611 (s)	
Elementaranalyse:	C ₃ H ₆ N ₄ (98.11)	
	berechnet	C: 36.73 H: 6.16 N: 57.11
	gefunden	C: 36.81 H: 6.07 N: 57.23

Diskussion der Struktur:

Die Struktur zeigt zwei unabhängige Moleküle, deren Dimensionen sehr ähnlich sind. Der Fünfring ist annähernd planar, wobei der größte Torsionswinkel im Ring 1.6 Grad beträgt. Die Stickstoffatome des Rings N1 und N6 stehen etwa planar, da die Summe der drei Valenzwinkel von N1 und N6 359.3 bzw. 360.0 Grad beträgt. Die Stickstoffatome der Amino-Gruppe N3, N4, N7 und N8 sind zwischen planar und pyramidal, da die Summe der drei Valenzwinkel 343.0, 340.3, 34.4 bzw. 342.0 Grad beträgt. Sieben der zehn N-H-Bindungen sind an N-H...N-Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, dabei reichen die H...N-Abstände von 2.13 (2) bis 2.56 (2) Å, was ein Zeichen für die relative Schwäche der Wasserstoffbrückenbindungen darstellt. Eine N-H-Bindung ist beteiligt an einer intramolekularen N-H...π

(Pyrazol) Wechselwirkung. Eine weitere N-H-Bindung ist in einer intramolekularen N-H...C-Wechselwirkung involviert und eine N-H-Bindung geht keine Wechselwirkungen ein.

Tabelle 17: Wasserstoffbrücken von Verbindung **176**

N-H...A	d (N-H) [Å]	d (H...A) [Å]	d (N...A) [Å]	(N-H-A) [Winkel]
N(1)-H(1A)...N(2)	0.88 (2)	2.23 (2)	2.939 (2)	138 (1)
N(3)-H(3A)...N(5)	0.93 (2)	2.29 (2)	3.154 (2)	153 (2)
N(3)-H(3A)...N(6)	0.93 (2)	2.52 (2)	3.411 (2)	159 (2)
N(3)-H(3B)...N(8)	0.88 (2)	2.23 (2)	3.071 (2)	160 (2)
N(6)-H(6A)...N(5)	0.88 (2)	2.13 (2)	2.880 (2)	143 (2)
N(7)-H(7A)...N(2)	0.89 (2)	2.50 (2)	3.325 (2)	155 (2)
N(8)-H(8A)...N(2)	0.89 (2)	2.56 (2)	3.279 (2)	139 (2)
N(8)-H(8B)...N(4)	0.92 (2)	2.21 (2)	3.097 (2)	161 (2)
N(7)-H(7B)...Cg(1)	0.85 (2)	2.57 (2)	3.387 (2)	164 (2)
N(4)-H(4A)...C(5)	0.86 (2)	2.67 (2)	3.514 (2)	167 (2)

Tabelle 18: Torsionswinkel [°] der Verbindung **176**

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(4)-N(5)-N(6)-C(6)	-0.75 (15)	C(1)-N(1)-N(2)-C(3)	1.08 (14)
N(5)-N(6)-C(6)-N(8)	178.31 (11)	N(1)-N(2)-C(3)-N(4)	175.90 (11)
N(5)-N(6)-C(6)-C(5)	1.55 (15)	N(1)-N(2)-C(3)-C(2)	-0.17 (14)
C(4)-C(5)-C(6)-N(6)	-1.64 (14)	N(2)-N(1)-C(1)-N(3)	-177.19 (11)
C(4)-C(5)-C(6)-N(8)	-178.01 (13)	N(2)-N(1)-C(1)-C(2)	-1.57 (14)
N(6)-N(5)-C(4)-N(7)	-177.43 (12)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	1.35 (13)
N(6)-N(5)-C(4)-C(5)	-0.36 (15)	N(3)-C(1)-C(2)-C(3)	176.38 (13)
C(6)-C(5)-C(4)-N(5)	1.26 (15)	N(2)-C(3)-C(2)-C(1)	-0.74 (14)
C(6)-C(5)-C(4)-N(7)	178.02 (13)	N(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-176.50 (12)

Tabelle 19: Bindungswinkel [°] und Bindungslängen [Å] von Verbindung **176**

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(4)-N(5)-N(6)	103.51 (9)	N(5)-C(4)	1.3339 (16)
C(6)-N(6)-N(5)	112.36 (10)	N(5)-N(6)	1.3892 (15)
C(6)-N(6)-H(6A)	132.2 (13)	N(6)-C(6)	1.3418 (16)
N(5)-N(6)-H(6A)	115.4 (13)	N(6)-H(6A)	0.88 (2)
C(6)-N(8)-H(8A)	115.2 (13)	N(8)-C(6)	1.3842 (16)

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(6)-N(8)-H(8B)	114.2 (13)	N(8)-H(8A)	0.89 (2)
H(8A)-N(8)-H(8B)	112.6 (19)	N(8)-H(8B)	0.91 (2)
C(6)-C(5)-C(4)	104.34 (10)	C(5)-C(6)	1.3897 (17)
C(6)-C(5)-H(5A)	127.8 (11)	C(5)-C(4)	1.4109 (17)
C(4)-C(5)-H(5A)	127.6 (11)	C(5)-H(5A)	0.967 (19)
N(6)-C(6)-N(8)	122.02 (11)	C(4)-N(7)	1.3911 (16)
N(6)-C(6)-C(5)	107.24 (10)	N(7)-H(7A)	0.89 (2)
N(8)-C(6)-C(5)	130.64 (11)	N(7)-H(7B)	0.85 (2)
N(5)-C(4)-N(7)	119.38 (11)	N(4)-C(3)	1.4015 (17)
N(5)-C(4)-C(5)	112.52 (11)	N(4)-H(4A)	0.86 (2)
N(7)-C(4)-C(5)	128.02 (11)	N(4)-H(4B)	0.86 (2)
C(4)-N(7)-H(7A)	115.0 (13)	N(3)-C(1)	1.3765 (16)
C(4)-N(7)-H(7B)	114.7 (13)	N(3)-H(3A)	0.93 (2)
H(7A)-N(7)-H(7B)	117.7 (19)	N(3)-H(3B)	0.88 (2)
C(3)-N(4)-H(4A)	114.2 (12)	N(1)-C(1)	1.3545 (17)
C(3)-N(4)-H(4B)	115.4 (15)	N(1)-N(2)	1.3940 (15)
H(4A)-N(4)-H(4B)	110.7 (19)	N(1)-H(1A)	0.876 (19)
C(1)-N(3)-H(3A)	115.9 (12)	N(2)-C(3)	1.3292 (18)
C(1)-N(3)-H(3B)	111.5 (12)	C(3)-C(2)	1.4093 (18)
H(3A)-N(3)-H(3B)	115.6 (17)	C(1)-C(2)	1.3875 (19)
C(1)-N(1)-N(2)	111.93 (11)	C(2)-H(2A)	0.963 (19)
C(1)-N(1)-H(1A)	127.5 (12)		
N(2)-N(1)-H(1A)	119.9 (12)		
C(3)-N(2)-N(1)	103.51 (10)		
N(2)-C(3)-N(4)	120.17 (12)		
N(2)-C(3)-C(2)	112.97 (11)		
N(4)-C(3)-C(2)	126.73 (12)		
N(1)-C(1)-N(3)	121.50 (12)		
N(1)-C(1)-C(2)	107.09 (11)		
N(3)-C(1)-C(2)	131.22 (12)		
C(1)-C(2)-C(3)	104.47 (11)		
C(1)-C(2)-H(2A)	127.7 (11)		
C(3)-C(2)-H(2A)	127.8 (11)		

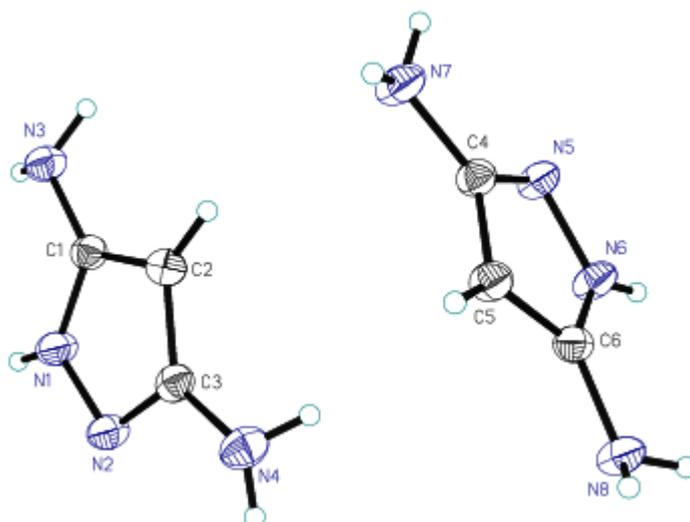


Abbildung 44: Kristallstruktur von Verbindung 176

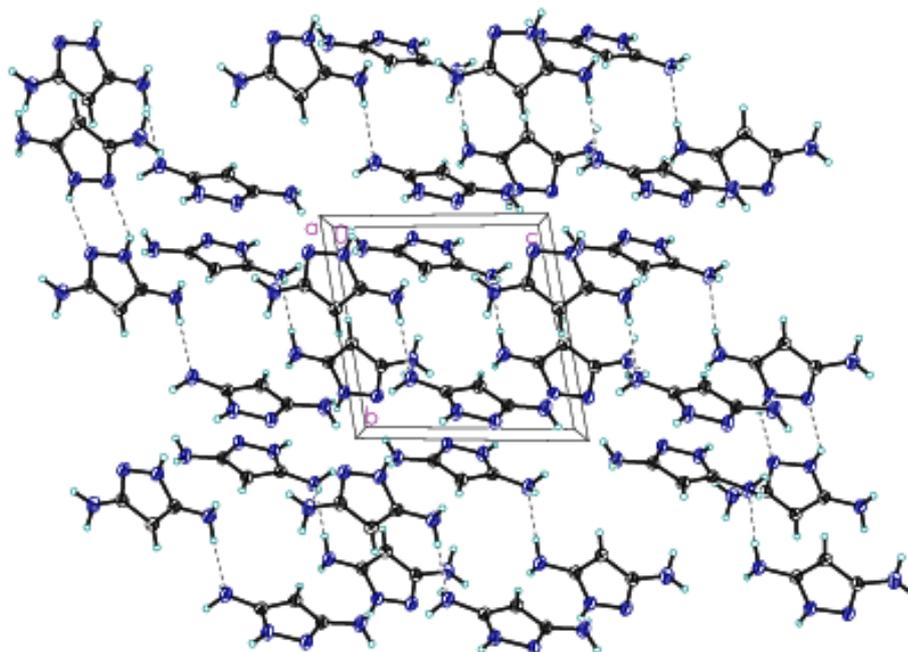
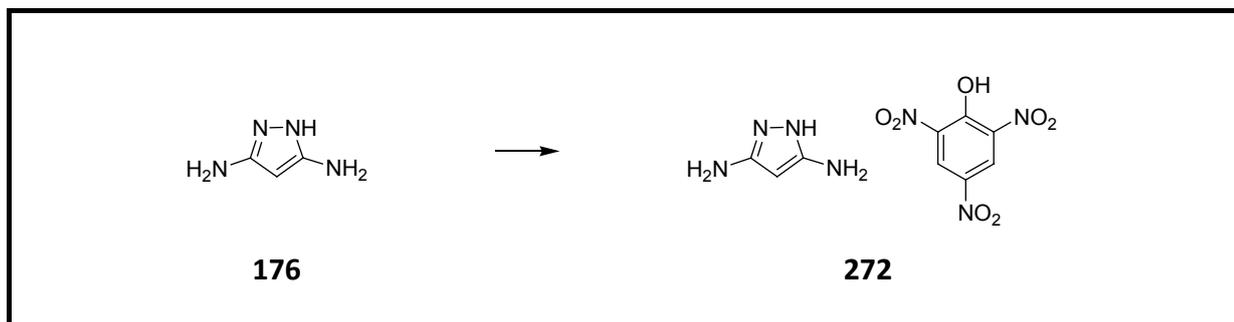


Abbildung 45: Struktur 176 im Kristallverbund

10.2.33 3,5-Diaminopyrazol-Pikrat (272)



100 mg 3,5-Diaminopyrazol (**176**) (1.02 mmol, 1 Äquiv.) wurde in 1 mL Methanol gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus 856 mg Pikrinsäure [~40 % Wasser angefeuchtete Suspension (514 mg, 2.24 mmol, 2.2 Äquiv.)] in 1 mL Methanol versetzt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 278 mg (83 %) Pikrat **272** als gelber Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 278 mg (83 %) Theorie: 333.5 mg

DC: *n*-Hex/EtOAc = 1:3 $R_f = 0.31$

Schmelzpunkt: 231 °C Zersetzungsbeginn: 221 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO- d_6):
 11.5-10.9 (bs, 1H, $\text{N}^1\text{-H}$), 8.59 (s, 2H, $2 \times \text{C}^{\text{Pikrat}}\text{-H}$), 6.9-6.4 (bs, 4H, $\text{C}^3\text{-NH}_2$, $\text{C}^5\text{-NH}_2$), 4.73 (s, 1H, $\text{C}^4\text{-H}$)

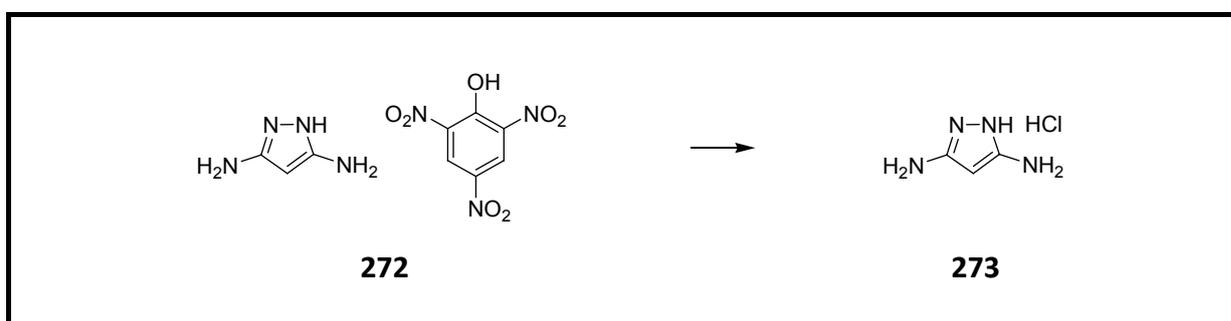
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 160.74 ($\text{C}^6\text{-OH}$), 156.65 ($\text{C}^3\text{-NH}_2$, $\text{C}^5\text{-NH}_2$), 141.74 ($\text{C}^9\text{-H}$), 125.11 ($\text{C}^7\text{-NO}_2$, $\text{C}^{11}\text{-NO}_2$), 124.17 ($\text{C}^8\text{-H}$, $\text{C}^{10}\text{-H}$), 73.81 ($\text{C}^4\text{-H}$)

IR (KBr): 3444 (s), 3346 (s), 3234 (m), 3076 (m), 1630 (s), 1589 (s), 1556 (s), 1465 (m), 1427 (m), 1363 (s), 1315 (s), 1244 (s), 1155 (s), 1077 (s),

1009 (m), 941 (m), 914 (m), 822 (m), 790 (m), 770 (s), 740 (m), 708 (s)

Elementaranalyse:	C ₉ H ₉ N ₄ O ₇ (327.21)		
berechnet	C: 33.04	H: 2.77	N: 29.96
gefunden	C: 33.22	H: 2.91	N: 30.08

10.2.34 3,5-Diaminopyrazol-Hydrochlorid (273)



200 mg des Pikrats **272** (0.61 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 5 mL MeOH gelöst und mittels Dowex[®] 1X8 200-400 MESH Cl beschichteter Säule säulenchromatographisch (MeOH) in das Hydrochlorid **273** überführt. Nach entfernen des Lösungsmittels und Umkristallisation (EtOH) erhielt man 78 mg (95 %) des 3,5-Diaminopyrazol Hydrochlorid (**273**) als weißen Feststoff.

Ausbeute: 78 mg (95 %) Theorie: 82 mg

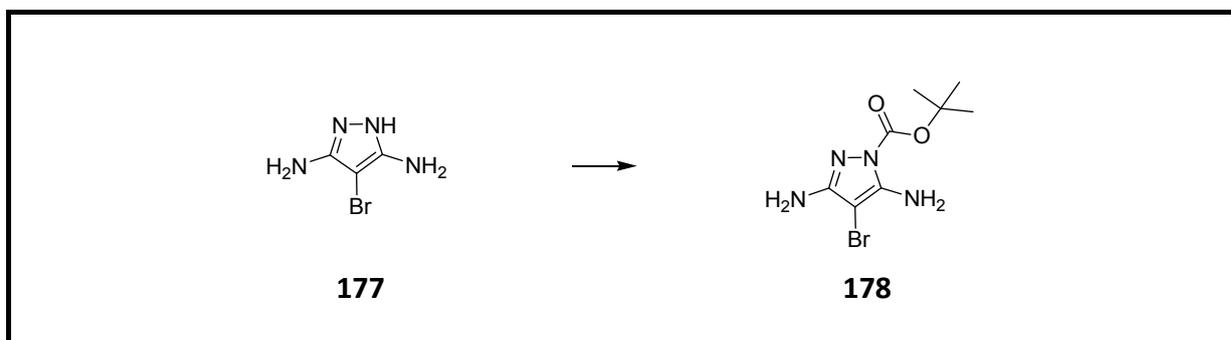
DC: *n*-Hex/EtOAc = 1:1 R_f = 0.58
n-Hex/EtOAc = 3:1 R_f = 0.15

Schmelzpunkt: 124 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d₆):
 11.50 (bs, 2H, N¹-H₂⁺), 6.9-6.2 (bs, 4H, C³-NH₂, C⁵-NH₂), 4.74 (s, 1H, C⁴-H)

Schmelzpunkt:	142-143 °C	Lit.:135-136 °C ^[227]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 10.45 (bs, 1H, N-H), 5.3-3.8 (2bs, 4H, 2xN-H ₂)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 184.69 (2xC-NH ₂), 62.78 (C-Br)			
IR (KBr):	3419 (m), 3378 (m), 3268 (m), 3154 (s), 2934 (m), 2781 (w), 1619 (s), 1591 (m), 1507 (s), 1449 (m), 1356 (m), 1141 (w), 1036 (m), 787 (m), 700 (s), 614 (s)			
Elementaranalyse:	C ₃ H ₅ BrN ₄ (177.00)			
	berechnet	C: 20.36	H: 2.85	N: 31.65
	gefunden	C: 20.63	H: 2.97	N: 31.86

10.2.36 3,5-Diamino-4-brom-pyrazol-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**178**)



300 mg 3,5-Diamino-4-brom-pyrazol (**177**) (1.69 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. THF (10 mL) gelöst und mit 595 µL Triethylamin (428 mg, 4.23 mmol, 2.5 Äquiv.) und 924 mg (Boc)₂O (4.23 mmol, 2.5 Äquiv.) versetzt und für 15 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel verdampft und die Reaktionsmischung mehrmals säulenchromatographisch aufgereinigt (1. EtOAc, 2. EtOAc/*n*-Hex 1:1). Es konnten 190 mg (40 %) 3,5-Diamino-4-brom-pyrazol-1-carbonsäure-*tert*-butylester (**178**) gewonnen werden.

Ausbeute:	190 mg (40 %)	Theorie: 466 g		
DC:	EtOAc	R _f = 0.67		
Schmelzpunkt:	212 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 6.24 (s, 2H, C ⁵ -NH ₂), 5.30 (s, 2H, C ³ -NH ₂), 1.50 (s, 9H, C(CH ₃) ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 153.73 (NC=O), 149.67 (C ⁵ -NH ₂), 147.26 (C ³ -NH ₂), 83.07 ((C(CH ₃) ₃), 64.71 (C-Br), 27.64 (C(CH ₃) ₃)			
IR (KBr):	3453 (m), 3356 (m), 3160 (m), 2983 (w), 1742 (m), 1717 (s), 1630 (s), 1560 (m), 1534 (w), 1485 (s), 1402 (s), 1371 (s), 1352 (s), 1255 (w), 1141 (s), 1080 (w), 889 (w), 845 (w), 797 (w), 756 (w)			
Elementaranalyse:	C ₈ H ₁₃ BrN ₄ O ₂ (277.11)			
	berechnet	C: 34.67	H: 4.73	N: 20.22
	gefunden	C: 34.87	H: 4.83	N: 20.36

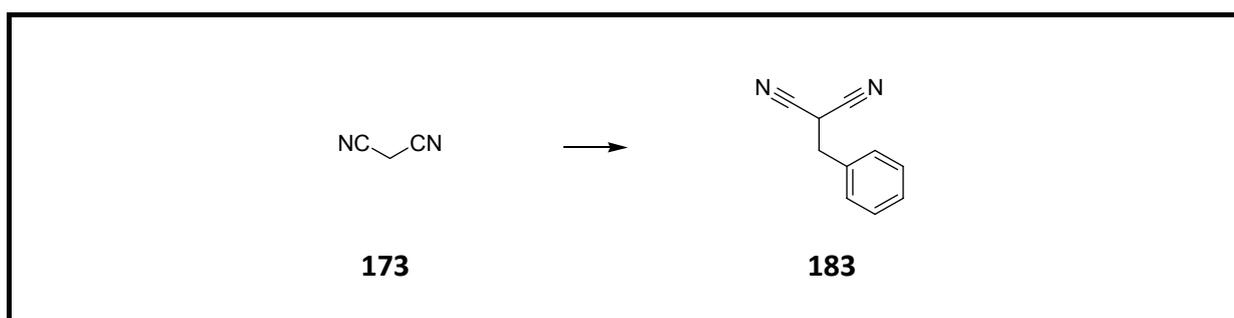
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$):
 5.89-5.73 (m, 1H, $\text{C}^4\text{H}=\text{CH}_2$), 5.40 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}^5\text{-HH}$), 5.34 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}^{5*}\text{-HH}$), 3.82 (t, 1H, $J = 6.75$, $\text{C}^2\text{-H}(\text{CN})_2$), 2.70 (tt, 2H, $J = 1.1$, $J = 6.75$, $\text{C}^3\text{-H}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$):
 129.06 ($\text{C}^4\text{-H}$), 121.98 ($\text{C}^1\equiv\text{N}$, $\text{C}^{1*}\equiv\text{N}$), 112.25 ($\text{C}^5\text{-H}_2$), 34.20 ($\text{C}^3\text{-H}_2$), 22.65 ($\text{C}^2\text{-H}$)

IR (Film): 3089 (m), 2989 (m), 2919 (s), 2259 (m), 1879 (w), 1645 (m), 1444 (s), 1420 (m), 1331 (w), 1302 (m), 1261 (w), 1204 (w), 1132 (w), 1105 (w), 1024 (m), 990 (s), 938 (s), 823 (m), 782 (w), 722 (m), 639 (m), 578 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2$ (106.12)
 berechnet C: 67.90 H: 5.70 N: 26.40
 gefunden C: 67.66 H: 5.88 N: 26.68

10.2.38 Benzylmalonsäuredinitril (**183**)^[228]

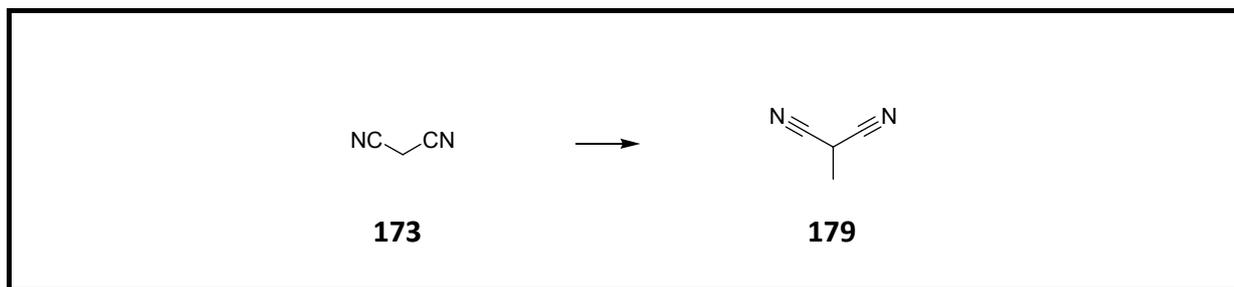


In einem 250 mL Zweihalskolben mit Rückflusskühler wurden 8.25 g Malonsäuredinitril (**173**) (125 mmol, 2 Äquiv.), 7.40 mL Benzylbromid (62.5 mmol, 1 Äquiv.) und 1.60 g TBAB (5 mmol, 4 mol%) für 30 Minuten bei RT unter Argon gerührt. Anschließend wurde die gelbliche Suspension in einem Eisbad gekühlt und portionsweise 8.65 g wasserfreies Kaliumcarbonat (62.5 mmol, 1 Äquiv.) aus einem Schlenk Kolben über ein Schlenkrohr zugegeben. Anschließend wurde die bläuliche Suspension für weitere 10 Stunden bei RT gerührt. Zur

Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung mit DCM (5 x 200 mL) extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel abdestilliert und anschließend säulenchromatographisch (Toluol) aufgereinigt, wobei 5.87 g (60 %) Benzylmalonsäuredinitril (**183**) als farblose Nadeln gewonnen werden konnten.

Ausbeute:	5.87 g (60 %)	Theorie: 9.76 g		
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc = 9:1	$R_f = 0.28$		
Schmelzpunkt:	88-89 °C	Lit.: 92 °C ^[258]		
¹ H-NMR:	(δ [ppm], 250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 7.44-7.26 (m, 5H, Aromat-H), 3.90 (t, 1H, $J = 5.75$, $\text{C}^2\text{-H}(\text{CN})_2$), 3.28 (d, 2H, $J = 5.75$, $\text{C}^3\text{-H}_2$)			
¹³ C-NMR:	(δ [ppm], 62.9 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 132.89 (C^4), 129.24 ($\text{C}^6\text{-H}$), 129.08 ($\text{C}^5\text{-H}$), 128.76 ($\text{C}^7\text{-H}$), 112.14 ($\text{C}^1\equiv\text{N}$, $\text{C}^{1*}\equiv\text{N}$), 36.65 ($\text{C}^3\text{-H}_2$), 24.94 ($\text{C}^2\text{-H}$)			
IR (KBr):	3089 (w), 3066 (w), 3029 (w), 2986 (w), 2955 (w), 2914 (m), 2257 (m), 1958 (w), 1885 (w), 1812 (w), 1763 (w), 1602 (w), 1496 (s), 1453 (s), 1446 (s), 1395 (w), 1328 (m), 1283 (m), 1251 (m), 1205 (m), 1163 (m), 1075 (s), 1030 (s), 1015 (m), 942 (w), 824 (w), 805 (w), 748 (s), 700 (s), 621 (w), 591 (m), 566 (s)			
Elementaranalyse:	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ (156.19)			
	berechnet	C: 76.90	H: 5.16	N: 17.94
	gefunden	C: 77.09	H: 5.30	N: 18.07

10.2.39 Methylmalonsäuredinitril (**179**)^[228]



In einem 250 mL Zweihalskolben mit Rückflusskühler wurden 10.00 g Malonsäuredinitril (**173**) (150 mmol, 2 Äquiv.), 4.67 mL Iodmethan (10.65 g, 75 mmol, 1 Äquiv.) und 967 mg TBAB (3 mmol, 2 mol%) für 30 Minuten bei RT unter Argon gerührt. Die Suspension wurde in einem Eisbad gekühlt und portionsweise 8.41 g Kalium-*tert*-butanolat (75 mmol, 1 Äquiv.) aus einem Schlenk Kolben über ein Schlenkrohr zugegeben. Anschließend wurde die gelbe Suspension für eine weitere Stunde bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung mit DCM (5 x 200 mL) extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel abdestilliert und anschließend säulenchromatographisch (DCM) aufgereinigt. Dabei wurden 4.25 g eines gelben Öl gewonnen. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Produkt einer Feststoffdestillation (63 °C bei 8.3 mbar) unterzogen. Dabei konnten 3.86 g (64 %) Methylmalonsäuredinitril (**179**) als farbloser Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute vor Destillation: 4.25 g (70 %)

Theorie: 6.00 g

Ausbeute nach Destillation: 3.86 g (64 %)

DC: *n*-Hex/EtOAc = 9:1

R_f = 0.11

n-Hex/EtOAc = 5:1

R_f = 0.29

DCM

R_f = 0.68

Schmelzpunkt: 35 °C

Lit.: 33-35 °C^[259]

Siedepunkt: 63 °C bei 8.3 mbar

Lit.: 90-100 °C/20mbar^[260]

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):

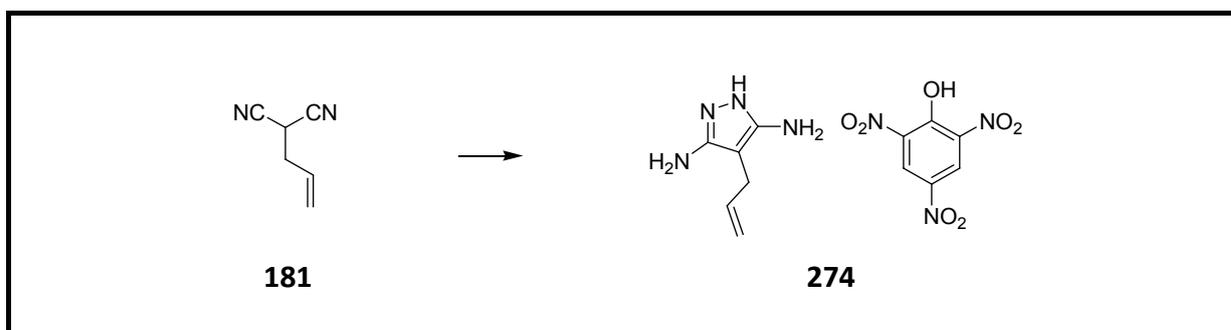
4.75 (q, 1H, J = 7, C²-H), 1.63 (d, 3H, J = 7, C³-H₃)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
115.20 ($\text{C}^1\equiv\text{N}$, $\text{C}^{1*}\equiv\text{N}$), 16.67 ($\text{C}^2\text{-H}$), 15.73 ($\text{C}^3\text{-H}_3$)

IR (KBr): 2937 (s), 2262 (s), 1457 (s), 1388 (m), 1304 (m), 1127 (s), 1068 (s),
1021 (s), 912 (m), 569 (s)

Elementaranalyse: $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2$ (80.09)
berechnet C: 59.99 H: 5.03 N: 34.98
gefunden C: 59.95 H: 5.09 N: 35.18

10.2.40 4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (**274**)



In einem 25 mL Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Septum wurden 459 μL Allylmalonsäuredinitril (**181**) (470 mg, 4.4 mmol, 1 Äquiv.) in 10 mL abs. EtOH gelöst und zum Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurden 220 μL Hydrazin-Monohydrat (213 mg, 4.4 mmol, 1 Äquiv.) über eine Spritze tropfenweise unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach einer weiteren tropfenweisen Zugabe von 110 μL Hydrazin-Monohydrat (107 mg, 2.2 mmol, 0.5 Äquiv.) wurde die Lösung für weitere 15 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufreinigung wurde das Lösungsmittel verdampft und das schwarze Öl säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 20:1:1:1). Das gewonnene dunkelbraune Öl wurde in wenig MeOH gelöst und mit einer Lösung von 1.83 g Pikrinsäure (1.10 g, 4.8 mmol einer ~40 % Wasser angefeuchteten Suspension, 1.1 Äquiv.) in wenig warmem MeOH versetzt. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Wasser kam es zur Trübung der Lösung, so dass sich über Nacht bei 4 °C gelbe Kristalle abschieden, die abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Dabei konnten 347 mg (21 %) Pikrat **274** isoliert werden.

Ausbeute:	347 mg (21 %)	Theorie: 1.61 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 15:5:4:1	R _f = 0.52
	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 20:1:1:1	R _f = 0.19
	DCM/MeOH = 19:1	R _f = 0.10
	EtOAc/MeOH = 1:1	R _f = 0.47
Schmelzpunkt:	212-213 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):	
	11.14 (bs, 2H, Pyrazol-NH ₂ ⁺), 8.59 (s, 2H, 2 x Pikrat-H), 6.53 (bs, 4H, 2x-NH ₂), 5.79-5.68 (m, 1H, CH ₂ CH=CH ₂), 5.04-4.93 (m, 2H, CH ₂ CH=CH ₂), 2.95 (d, 2H, J = 6, CH ₂ CH=CH ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆):	
	160.69, 154.84, 141.76, 135.12, 125.08, 124.03, 114.49, 82.65, 23.26	
IR (KBr):	3473 (s), 3374 (s), 3354 (s), 3272 (m), 3047 (m), 1624 (s), 1549 (s), 1478 (s), 1432 (s), 1363 (s), 1294 (s), 1153 (s), 1074 (s), 914 (s), 789 (s), 742 (s), 713 (s), 550 (w)	
Elementaranalyse:	C ₁₂ H ₁₃ N ₇ O ₇ (367.27)	
	berechnet	C: 39.24 H: 3.57 N: 26.70
	gefunden	C: 39.39 H: 3.73 N: 26.78

Diskussion der Struktur:

Der Pyrazol Fünfring zeigt kleine Abweichungen der Planarität. Es besitzt annähernd eine N3, N4 Twist-Konformation, wobei die Atome N3 und N4 um 0.06 bzw. 0.04 Å in entgegengesetzter Richtung von der Ebene von C1, C2 und C3 abweichen. Der Benzolring ist planar (durchschnittliche Abweichung von der Ebene: 0.006 Å). Die Winkel zwischen der Benzolringebene und der Ebene der drei Nitrogruppen beträgt 12.3, 2.6 bzw. 36.1 Grad. Die

Kationen und Anionen sind verbunden über ein dreidimensionales Netzwerk von intermolekularen N-H...O Wasserstoffbrückenbindungen. Verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen sind eher schwach. Drei der Wasserstoffbrückenbindungen liegen gegabelt vor. Jedes Kation ist verbunden mit fünf symmetrieverwandten Anionen. Das Kation zeigt ebenfalls schwache intramolekulare N-H... π -Wechselwirkung zwischen der N2-H2A Bindung und dem π -System der C5-C6 Doppelbindung.

Tabelle 20: Wasserstoffbrücken von Verbindung **274**

N-H...O	d (N-H) [Å]	d (H...O) [Å]	d (N...O) [Å]	(N-H-O) [Winkel]
N(1)-H(1A)...O(6)	0.91 (3)	2.56 (5)	3.191 (4)	127 (4)
N(1)-H(1A)...O(7)	0.91 (3)	2.58 (5)	3.190 (4)	124 (4)
N(1)-H(1B)...O(4)	0.89 (5)	2.26 (5)	3.132 (4)	167 (4)
N(2)-H(2A)...O(3)	0.80 (3)	2.58 (3)	3.109 (4)	125 (3)
N(2)-H(2B)...O(1)	0.83 (4)	2.23 (4)	2.938 (4)	144 (3)
N(3)-H(3A)...O(1)	0.82 (3)	1.94 (3)	2.652 (4)	143 (3)
N(3)-H(3A)...O(2)	0.82 (3)	2.22 (3)	2.875 (4)	136 (3)
N(4)-H(4A)...O(6)	1.00 (3)	2.11 (3)	3.098 (4)	167 (3)
N(4)-H(4A)...O(7)	1.00 (3)	2.35 (3)	3.149 (3)	135 (3)

Tabelle 21: Torsionswinkel [°] der Verbindung **274**

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
O(3)-N(5)-C(8)-O(9)	11.6 (4)	C(3)-N(3)-N(4)-C(1)	7.6 (3)
O(2)-N(5)-C(8)-C(9)	-167.5 (3)	C(7)-C(12)-C(11)-C(10)	2.4 (4)
O(3)-N(5)-C(8)-C(7)	-167.5 (3)	N(7)-C(12)-C(11)-C(10)	-179.2 (3)
O(2)-N(5)-C(8)-C(7)	13.4 (4)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.0 (4)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0.8 (4)	C(8)-C(9)-C(10)-N(6)	-178.7 (3)
N(5)-C(8)-C(9)-C(10)	-178.2 (3)	C(12)-C(11)-C(10)-C(9)	-1.5 (4)
C(9)-C(8)-C(7)-O(1)	-176.7 (3)	C(12)-C(11)-C(10)-N(6)	177.2 (2)
N(5)-C(8)-C(7)-O(1)	2.3 (4)	O(5)-N(6)-C(10)-C(9)	-179.1 (3)
C(9)-C(8)-C(7)-C(12)	0.0 (4)	O(4)-N(6)-C(10)-C(9)	1.1 (4)
N(5)-C(8)-C(7)-C(12)	179.0 (3)	O(5)-N(6)-C(10)-C(11)	2.2 (4)
O(1)-C(7)-C(12)-C(11)	175.1 (3)	O(4)-N(6)-C(10)-C(11)	-177.6 (3)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-1.6 (4)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-177.6 (3)
O(1)-C(7)-C(12)-N(7)	-3.2 (4)	N(4)-C(1)-C(2)-C(3)	1.9 (3)
C(8)-C(7)-C(12)-N(7)	-180.0 (2)	C(8)-C(7)-C(2)-C(1)	0.7 (2)
N(4)-N(3)-C(3)-N(2)	173.2 (3)	N(1)-C(1)-C(2)-C(4)	3.8 (5)

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
N(4)-N(3)-C(3)-C(2)	-6.4 (3)	N(4)-C(1)-C(2)-C(4)	-176.7 (3)
C(11)-C(12)-N(7)-O(7)	144.8 (3)	N(3)-C(3)-C(2)-C(1)	2.8 (4)
C(7)-C(12)-N(7)-O(7)	-36.7 (4)	N(2)-C(3)-C(2)-C(1)	-176.8 (4)
C(11)-C(12)-N(7)-O(6)	-35.0 (4)	N(3)-C(3)-C(2)-C(4)	-178.6 (3)
C(7)-C(12)-N(7)-O(6)	143.4 (3)	N(2)-C(3)-C(2)-C(4)	1.8 (6)
N(1)-C(1)-N(4)-N(3)	173.8 (3)	C(1)-C(2)-C(4)-C(5)	155.0 (4)
C(2)-C(1)-N(4)-N(3)	-5.8 (3)	C(3)-C(2)-C(4)-C(5)	-23.3 (6)
C(2)-C(4)-C(5)-C(6)	116.2 (5)		

Tabelle 22: Bindungswinkel [°] und Bindungslängen [Å] von Verbindung **274**

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
O(3)-N(5)-O(2)	122.1 (3)	N(5)-O(3)	1.223 (3)
O(3)-N(5)-C(8)	118.8 (3)	N(5)-O(2)	1.229 (3)
O(2)-N(5)-C(8)	119.1 (3)	N(5)-C(8)	1.460 (4)
C(3)-N(3)-N(4)	108.4 (3)	O(1)-C(7)	1.245 (4)
C(9)-C(8)-C(7)	123.1 (3)	N(3)-C(3)	1.340 (4)
C(9)-C(8)-N(5)	116.6 (2)	N(3)-N(4)	1.385 (3)
C(7)-C(8)-N(5)	120.2 (3)	C(8)-C(9)	1.386 (4)
C(10)-C(9)-C(8)	120.1 (3)	C(8)-C(7)	1.457 (4)
O(1)-C(7)-C(12)	123.2 (3)	O(5)-N(6)	1.232 (3)
O(1)-C(7)-C(8)	125.1 (3)	C(9)-C(10)	1.381 (4)
C(12)-C(7)-C(8)	111.6 (3)	C(7)-C(12)	1.450 (4)
C(11)-C(12)-C(7)	125.7 (3)	O(4)-N(6)	1.239 (3)
C(11)-C(12)-N(7)	116.9 (3)	C(12)-C(11)	1.368 (4)
C(7)-C(12)-N(7)	117.3 (3)	C(12)-N(7)	1.465 (4)
N(3)-C(3)-N(2)	119.6 (3)	C(3)-N(2)	1.344 (4)
N(3)-C(3)-C(2)	109.3 (2)	C(3)-C(2)	1.405 (5)
N(2)-C(3)-C(2)	131.1 (3)	O(6)-N(7)	1.231 (3)
O(7)-N(7)-O(6)	122.3 (3)	N(7)-O(7)	1.226 (4)
O(7)-N(7)-C(12)	119.5 (3)	C(1)-N(1)	1.346 (4)
O(6)-N(7)-C(12)	118.5 (3)	C(1)-N(4)	1.358 (4)
N(1)-C(1)-N(4)	121.2 (3)	C(1)-C(2)	1.397 (4)
N(1)-C(1)-C(2)	129.6 (3)	N(6)-C(10)	1.439 (4)
N(4)-C(1)-C(2)	109.2 (3)	C(11)-C(10)	1.394 (4)
C(1)-N(4)-N(3)	107.5 (2)	C(2)-C(4)	1.509 (4)
O(5)-N(6)-O(4)	122.4 (3)	C(4)-C(5)	1.453 (5)

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
O(4)-N(6)-C(10)	118.9 (2)		
C(12)-C(11)-C(10)	118.3 (3)		
C(9)-C(10)-C(11)	121.0 (3)		

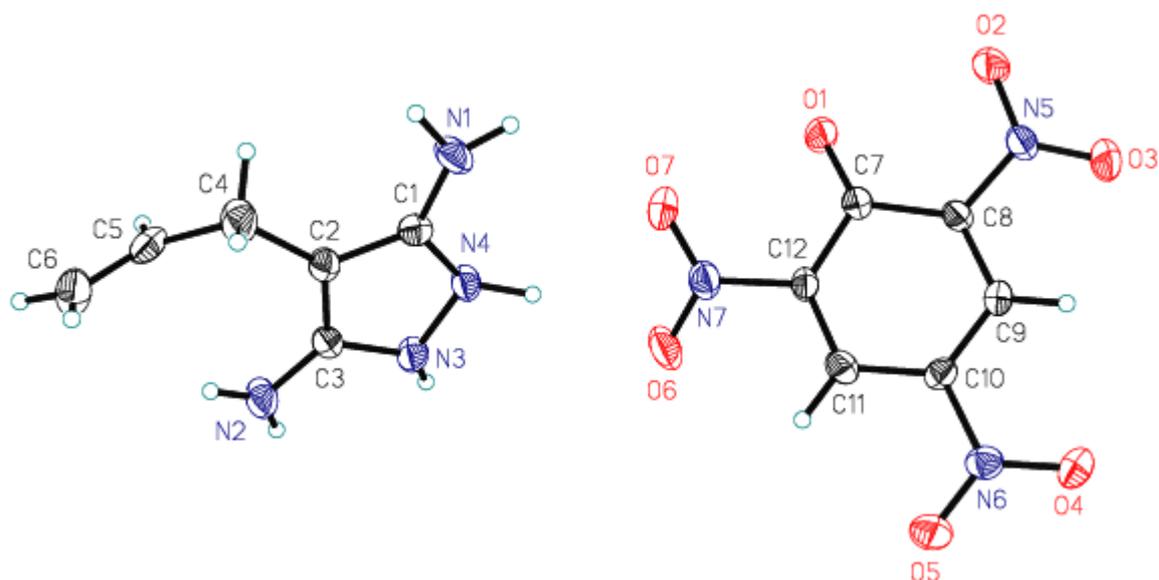


Abbildung 46: Kristallstruktur von Verbindung 274

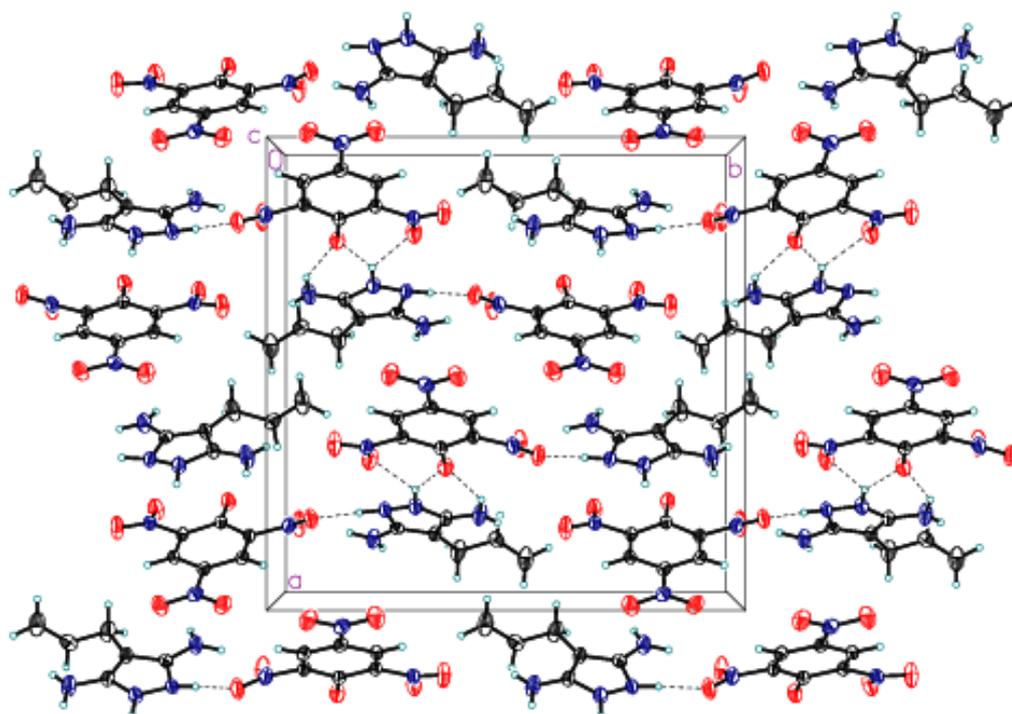
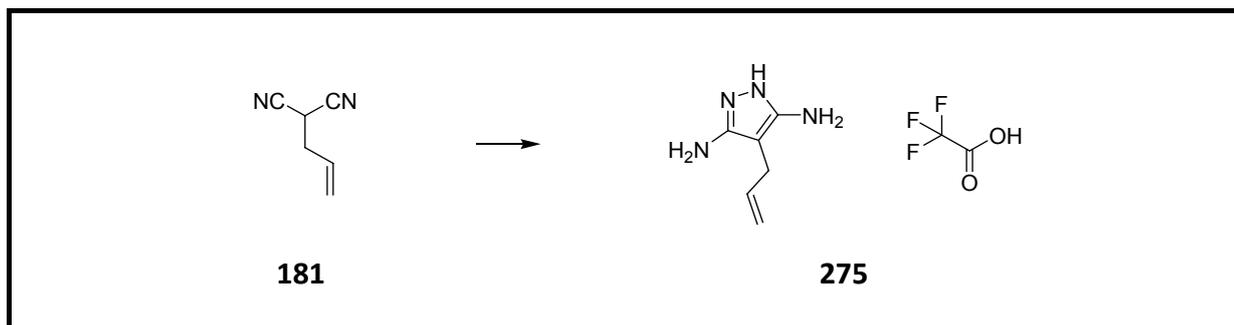


Abbildung 47: Verbindung 274 in der Ebene

10.2.41 4-Allyl-3,5-diaminopyrazol Trifluoracetat (**275**)



In einem 25 mL Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Septum wurden 470 mg Allylmalonsäuredinitril (**181**) (4.4 mmol, 1 Äquiv.) in abs. EtOH (10 mL) gelöst und zum Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurden 220 μ L Hydrazin-Monohydrat (4.4 mmol, 1 Äquiv.) über eine Spritze tropfenweise unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach einer weiteren tropfenweisen Zugabe von 110 μ L Hydrazin-Monohydrat (2.2 mmol, 0.5 Äquiv.) wurde die Lösung für weitere 15 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufreinigung wurde das Lösungsmittel verdampft und das schwarze Öl säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 20:1:1:1). Anschließend erfolgte die weitere Aufreinigung mittels HPLC. Dabei konnten 145 mg (13 %) des farblosen TFA-Salzes von 3,5-Diamino-4-allylpyrazol (**275**) gewonnen werden.

Ausbeute:	145 mg (13 %)	Theorie: 1.11 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 15:5:4:1	R _f = 0.52
	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 20:1:1:1	R _f = 0.19
	DCM/MeOH = 19:1	R _f = 0.1
	EtOAc/MeOH = 1:1	R _f = 0.47
HPLC-Bedingungen:	analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 90:10, 0.8 mL/min, t _R = 4.81 min	
	präparativ: Reprosil AQ 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 90:10, 7 mL/min, t _R = 13.4 min	
Schmelzpunkt:	107-110 °C	

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO- d_6):
 11.30 (s, 2H, N^+-H_2), 6.53 (s, 4H, 2x $\text{N}-\text{H}_2$), 5.81-5.68 (m, 1H, $J = 2.1$, C^7-H), 5.04-4.92 (m, 2H, $J = 2.1, 5.7$, C^8-H_2), 2.96 (d, 2H, $J = 6$, C^6-H_2)

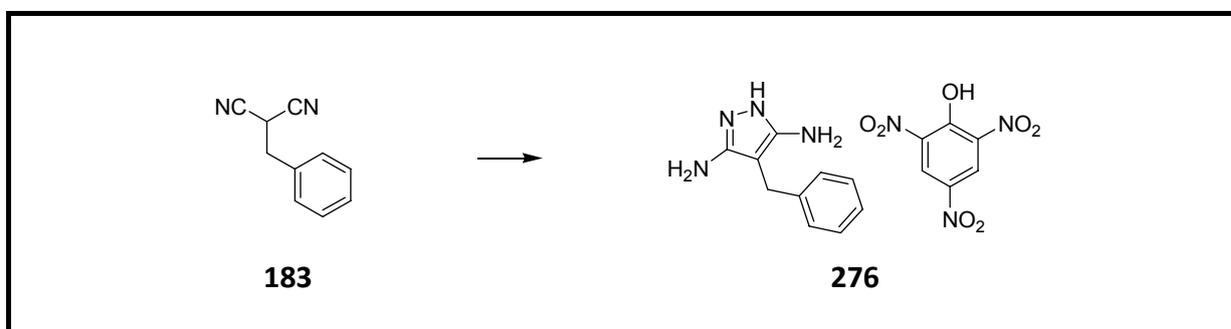
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 154.67, 135.16, 114.48, 82.62, 23.28

IR (KBr): 3433 (m), 3333 (m), 3195 (m), 3098 (m), 2934 (w), 1670 (s), 1645 (s), 1594 (s), 1559 (m), 1477 (w), 1408 (w), 1356 (w), 1202 (s), 1154 (m), 1128 (s), 1002 (w), 924 (w), 847 (w), 798 (m), 726 (m), 618 (w), 564 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ (252.19)
 berechnet C: 38.10 H: 4.40 N: 22.22
 gefunden C: 38.06 H: 4.63 N: 22.37

Masse: ESI+ (berechnet für $\text{M}+\text{H}^+$):
 berechnet 139.09
 gefunden 138.9 (100), 139.8 (9.1), 140.8 (1.4)

10.2.42 4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (276)



In einem 25 mL Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Septum wurden 400 mg Benzylmalonsäuredinitril (**183**) (2.5 mmol, 1 Äquiv.) in abs. EtOH (5 mL) gelöst und zum Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurden 124 μL Hydrazin-Monohydrat (2.5 mmol, 1

Äquiv.) über eine Spritze tropfenweise unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach einer weiteren tropfenweisen Zugabe von 62 μL Hydrazin-Monohydrat (1.25 mmol, 0.5 Äquiv.) wurde die Lösung für weitere 15 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufreinigung wurde das Lösungsmittel verdampft und das schwarze Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 20:1:1:1). Es konnten 172.5 mg (0.92 mmol) eines braunen Öls gewonnen werden, das in wenig MeOH gelöst und mit einer Lösung von 350 mg Pikrinsäure (210 mg, 0.92 mmol, ~40 % Wasser angefeuchteten Suspension) in wenig MeOH tropfenweise versetzt wurde. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Wasser kam es zur Trübung der Lösung. Dabei schieden sich über Nacht bei 4 °C gelbe Kristalle von 3,5-Diamino-4-benzylpyrazol (**276**) ab, die abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Die Gesamtausbeute von **276** belief sich auf 216 mg (20 %).

Ausbeute:	216 mg (20 %)	Theorie: 1.04 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 15:5:4:1	R _f = 0.87
	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 20:1:1:1	R _f = 0.25
	DCM/MeOH = 19:1	R _f = 0.1
Schmelzpunkt:	163-164 °C	
¹ H-NMR:	(δ [ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):	
	11.21 (s, 2H, N ⁺ -H ₂), 8.59 (s, 2H, 2x Pikrat-C ¹³ -H), 7.29-7.13 (m, 5H, Aromat-H), 6.63 (s, 4H, 2x N-H ₂), 3.59 (s, 2H, C ⁶ -H ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆):	
	160.71, 154.89, 141.75, 140.05, 128.06, 127.77, 125.75, 125.10, 124.07, 84.45, 24.72	
IR (KBr):	3467 (m), 3373 (m), 3299 (m), 3238 (m), 3080 (w), 1636 (s), 1550 (s), 1493 (m), 1427 (m), 1365 (s), 1336 (s), 1315 (s), 1263 (s), 1156 (m), 1081 (m), 1027 (w), 934 (w), 913 (w), 836 (w), 790 (w), 735 (m), 706	

(s), 625 (w)

Elementaranalyse: $C_{16}H_{15}N_7O_7$ (417.33)

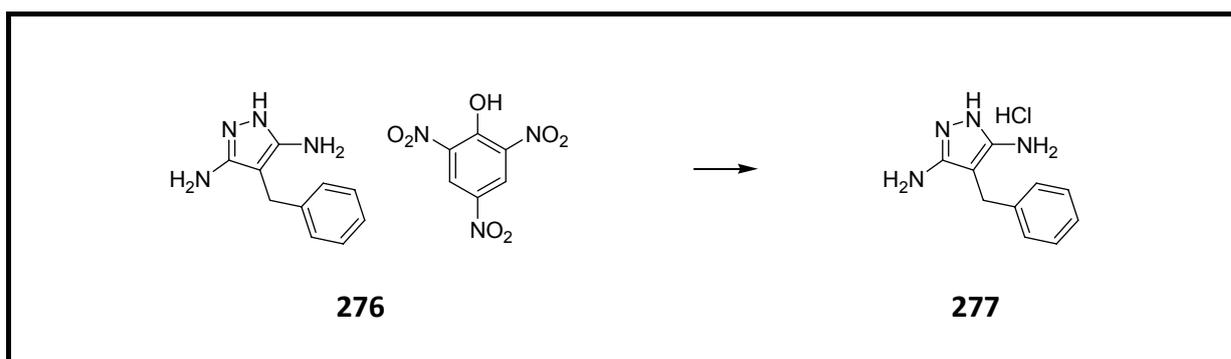
berechnet C: 46.05 H: 3.62 N: 23.49

gefunden C: 46.15 H: 3.80 N: 23.58

Masse: ESI+ (berechnet für $M+H^+$):

berechnet 189.10

gefunden 188.7 (100), 189.8 (15.6)

10.2.43 4-Benzyl-3,5-diaminopyrazol Hydrochlorid (277)

Zum Austausch des Anions wurde 150 mg Pikrat **276** (0.36 mmol, 1 Äquiv.) in wenig MeOH gelöst und auf eine Säule mit Dowex® 1X8 200-400 MESH Cl (MeOH) gegeben. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man das Hydrochlorid von 3,5-Diamino-4-benzylpyrazol (**277**). Zur weiteren Aufreinigung wurde das Hydrochlorid in EtOH umkristallisiert. Es konnten 75 mg (92 %) des Hydrochlorids **277** als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 75 mg (92 %)

Theorie: 80.9 mg

DC: EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH = 15:5:4:1 $R_f = 0.87$ EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH = 20:1:1:1 $R_f = 0.25$

DCM/MeOH = 19:1

 $R_f = 0.1$

Schmelzpunkt: 221.5 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d₆):
 11.51 (s, 2H, N⁺-H₂), 7.28-7.12 (m, 5H, 2x C⁸-H, 2x C⁹-H, C¹⁰-H), 6.62 (s, 4H, 2x N-H₂), 3.61 (s, 2H, C⁶-H₂)

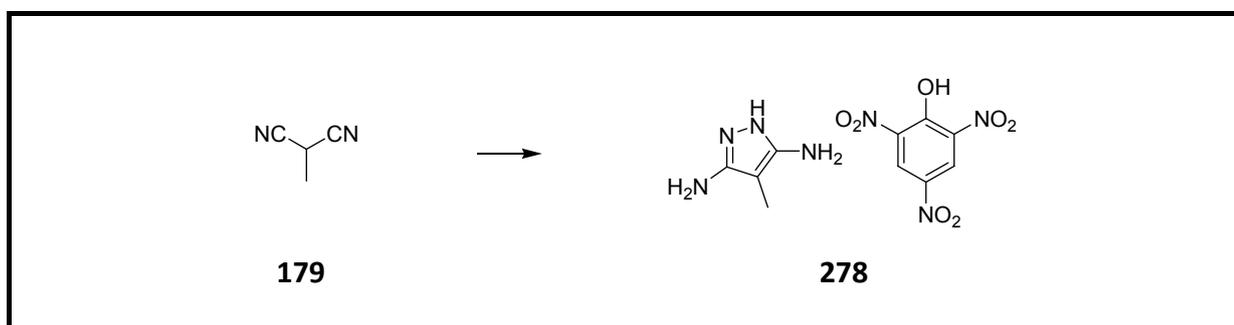
¹³C-NMR: (δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d₆):
 154.49, 140.25, 128.02, 127.85, 125.70, 84.51, 24.75

IR (KBr): 3448 (m), 3416 (s), 3332 (m), 3262 (m), 3179 (s), 3022 (s), 2793 (m), 1956 (w), 1622 (s), 1579 (s), 1543 (s), 1491 (m), 1464 (m), 1452 (m), 1362 (w), 1335 (w), 1313 (w), 1161 (w), 1071 (w), 1026 (w), 1001 (w), 923 (w), 891 (w), 819 (w), 782 (m), 733 (s), 700 (m), 645 (m), 601 (m), 572 (m)

Elementaranalyse: C₁₀H₁₃ClN₄ (224.69)

berechnet	C: 53.45	H: 5.83	N: 24.94
gefunden	C: 53.19	H: 5.85	N: 24.94

10.2.44 4-Methyl-3,5-diaminopyrazol Pikrat (278)



In einem 25 mL Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Septum wurden 380 mg Methylmalonsäuredinitril (**179**) (4.75 mmol, 1 Äquiv.) in abs. EtOH (4 mL) gelöst und zum Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurden 230 µL Hydrazin-Monohydrat (237.4 mg, 4.75 mmol, 1 Äquiv.) über eine Spritze tropfenweise unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung

wurde für weitere fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufreinigung wurde das Lösungsmittel verdampft und das schwarze Öl säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1). Es konnten 322 mg (2.87 mmol) eines braunen Öls gewonnen werden, das in wenig MeOH gelöst und mit einer Lösung von 1.10 g Pikrinsäure (660 mg, 2.87 mmol, ~40 % Wasser angefeuchteten Suspension) in wenig MeOH tropfenweise versetzt wurde. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Wasser kam es zur Trübung der Lösung, woraus sich über Nacht bei 4 °C gelbe Kristalle von 3,5-Diamino-4-methylpyrazol (**278**) abschieden, die abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. **278** konnte mit einer Gesamtausbeute von 782 mg (48 %) gewonnen werden.

Ausbeute:	782 mg (48 %)	Theorie: 1.62 g
DC:	EtOAc/EtOH/H ₂ O/AcOH = 15:5:4:1	R _f = 0.47
	DCM/MeOH = 5:1	R _f = 0.17
Schmelzpunkt:	Zersetzung bei 260 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 11.06 (s, 2H, N ⁺ -H ₂), 8.58 (s, 2H, 2x C ⁹ -H), 6.53 (s, 4H, 2x N-H ₂), 1.67 (s, 3H, C ⁶ -H ₃)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 160.71, 155.09, 141.75, 125.10, 124.07, 80.14, 4.82	
IR (KBr):	3474 (s), 3372 (s), 3347 (s), 3235 (m), 3078 (m), 1868 (w), 1638 (s), 1585 (s), 1559 (s), 1481 (m), 1431 (m), 1363 (s), 1337 (s), 1281 (s), 1155 (s), 1078 (m), 942 (w), 924 (w), 911 (m), 822 (w), 787 (m), 741 (m), 713 (s), 646 (m)	

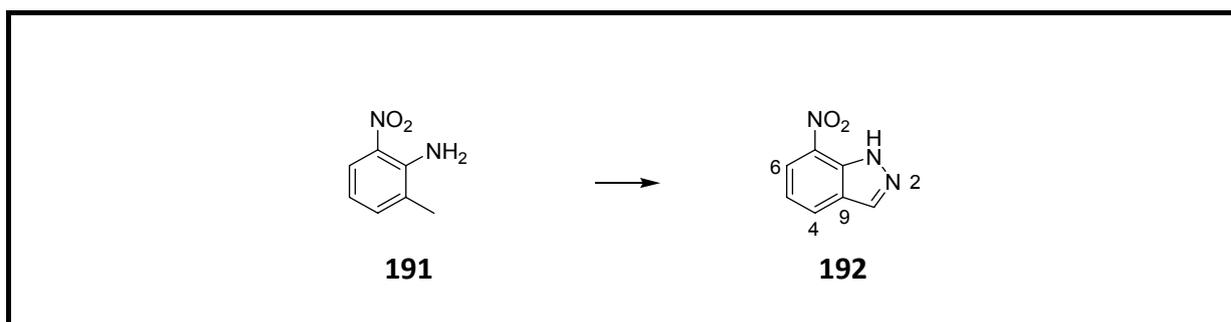
^{13}C -NMR: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
155.42 ($\text{C}^3\text{-NH}_2$, $\text{C}^5\text{-NH}_2$), 80.84 (C^4), 5.17 ($\text{C}^6\text{-H}_3$)

IR (KBr): 3430 (m), 3306 (s), 3175 (s), 3047 (m), 2799 (m), 1632 (s), 1612 (s),
1564 (s), 1533 (s), 1450 (m), 1388 (w), 1338 (w), 1249 (w), 1206 (w),
1154 (w), 953 (w), 799 (w), 766 (w), 729 (w), 713 (w), 600 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_4\text{H}_9\text{ClN}_4$ (148.59)

berechnet	C: 32.33	H: 6.10	N: 37.70
gefunden	C: 32.51	H: 6.19	N: 37.57

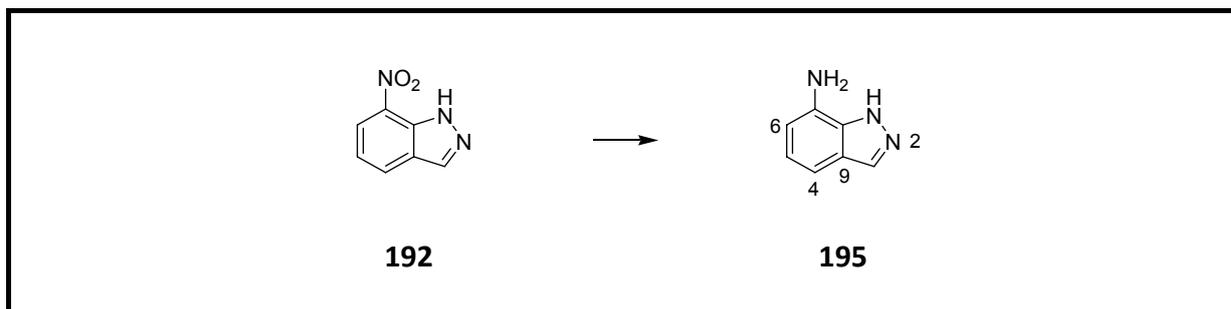
10.2.46 7-Nitro-indazol (**192**)^[231]



3.00 g 2-Methyl-6-nitro-anilin (**191**) (19,7 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 150 mL Essigsäureanhydrid gelöst und auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurde unter Rühren eine Lösung aus 1.38 g NaNO_2 (20 mmol, 1,02 Äquiv.) in so wenig Wasser wie möglich auf einmal zugegeben. Es wurde für weitere 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Rühren eingestellt und die Mischung über Nacht (12 Stunden) bei RT stehen gelassen. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz im Vakuum auf ein Drittel seines Ausgangsvolumens eingeeengt. Daraufhin wurde das vierfache Volumen heißen Wassers hinzugefügt und die Mischung wurde rasch filtriert. Das rote Filtrat wurde bei 4 °C aufbewahrt und der gelb-orange Feststoff abgesaugt und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde der Feststoff aus EtOH umkristallisiert, abgesaugt und mit wenig kaltem EtOH gewaschen und säulenchromatographisch aufgereinigt (*n*-Hex/EtOAc 9:1). 7-Nitro-indazol (**192**) konnte als ein gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 600 mg (18 %) gewonnen werden.

Ausbeute:	600 mg (18 %)	Theorie: 3.21 g		
DC:	DCM/ <i>n</i> -Hex 1:1	R _f = 0.28		
	MeOH/ <i>n</i> -Hex 1:5	R _f = 0.3		
	EtOAc/ <i>n</i> -Hex 1:5	R _f = 0.31		
Schmelzpunkt:	185 °C	Lit: 185 °C ^[231]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 13.94 (bs, 1H, NH), 8.42 (d, 1H, J = 1.0, C ³ -H), 8.36 (dd, 1H, J = 1.0, 7.75, C ⁴ -H), 8.33 (d, 1H, J = 7.75, C ⁶ -H), 7.37 (t, 1H, J = 7.75, C ⁵ -H)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 135.98 (C ⁸), 132.27 (C ³ -H), 131.99 (C ⁷ -NO ₂), 130.26 (C ⁴ -H), 127.34 (C ⁹), 123.86 (C ⁵ -H), 120.63 (C ⁶ -H)			
IR (KBr):	3275 (m), 1636 (s), 1576 (w), 1516 (s), 1497 (m), 1463 (m), 1381 (m), 1328 (s), 1297 (s), 1258 (s), 1152 (w), 1057 (m), 1005 (m), 938 (s), 867 (m), 811 (w), 791 (m), 723 (s), 639 (w), 606 (w)			
Elementaranalyse:	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂ (163.13)			
	berechnet	C: 51.54	H: 3.09	N: 25.76
	gefunden	C: 51.44	H: 3.27	N: 25.60

10.2.47 7-Amino-indazol (195)



In einem Schlenkrohr wurden 72 mg 7-Nitro-indazol (**192**) (0.44 mmol, 1 Äquiv.) in abs. MeOH (2 mL) gelöst und unter Argon mit 22 mg (30 Massen-%) Pd/C versetzt. Anschließend wurde gegen Wasserstoff (1 bar) getauscht und bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle durch Dünnschichtchromatographie (DCM/EtOAc 3:1) nach 30 Minuten ergab eine vollständige Umsetzung des Edukts, so dass das Reaktionsgemisch über Celite abgesaugt und mit MeOH nachgewaschen wurde. Nach Adsorption des Rohprodukts auf Kieselgel wurde 7-Amino-indazol (**195**) durch säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 9:1) als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 50 mg (85 %) gewonnen.

Ausbeute: 50 mg (85 %) Theorie: 58.7 mg

DC: DCM/EtOAc 3:1 $R_f = 0.31$

MeOH/DCM 1:9 $R_f = 0.73$

EtOAc/*n*-Hex 1:1 $R_f = 0.52$

Schmelzpunkt: 151 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 12.56 (s, 1H, NH), 7.89 (d, 1H, $J = 1.5$, $C^3\text{-H}$), 6.92 (d, 1H, $J = 8$, $C^6\text{-H}$),
 6.82 (t, 1H, $J = 7.25$, 8, $C^5\text{-H}$), 6.45 (dd, 1H, $J = 0.75$, 7.25, $C^4\text{-H}$), 5.28
 (s, 2H, NH_2)

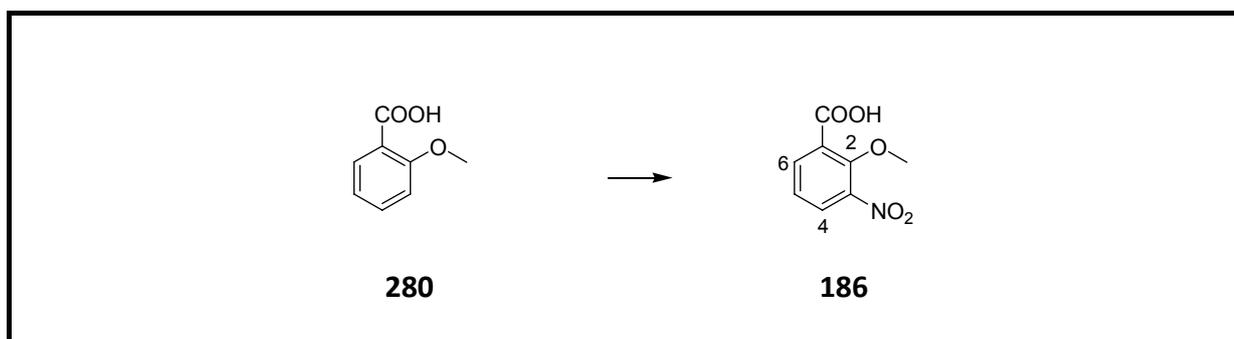
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
 133.39, 132.60, 131.38, 123.44, 121.50, 107.39, 106.64

IR (KBr): 3443 (s), 3357 (s), 3169 (s), 3103 (s), 2961 (m), 2919 (m), 1654 (w), 1617 (s), 1592 (s), 1542 (w), 1521 (s), 1496 (m), 1438 (m), 1392 (m), 1371 (s), 1327 (m), 1282 (s), 1214 (w), 1068 (w), 1018 (w), 958 (s), 854 (s), 774 (m), 730 (s), 680 (m), 668 (m), 599 (w), 550 (w)

Elementaranalyse: C₇H₇N₃ (133.15)

berechnet	C: 63.14	H: 5.30	N: 31.56
gefunden	C: 63.18	H: 5.47	N: 31.71

10.2.48 2-Methoxy-3-nitro-benzoesäure (**186**)^[229, 261]



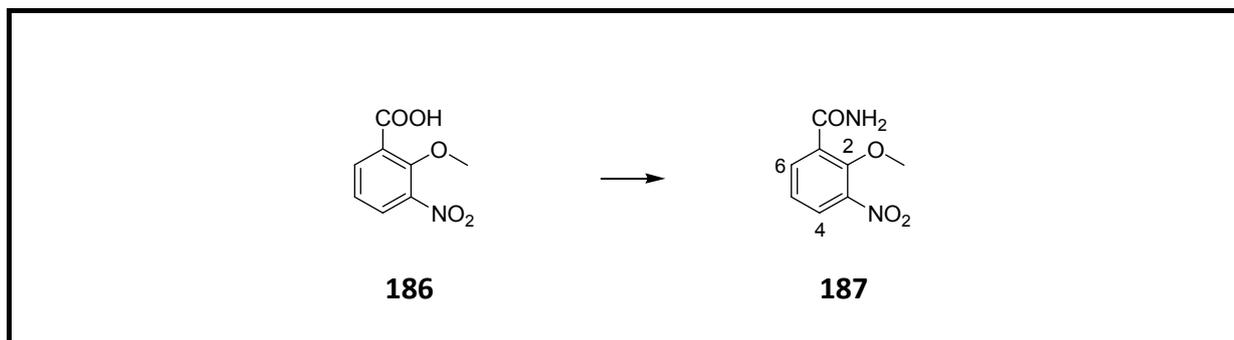
15 mL konz. Salpetersäure ($d = 1.50 \text{ g/mL}$, 22.5 g, 0.357 mol) wurden gekühlt in einem Eisbad vorgelegt, mit 50 mL (54 g, 0.529 mol) Essigsäureanhydrid versetzt und so lange gerührt, bis keine nitrosen Gase mehr entstanden. 5.00 g 2-Methoxy-benzoesäure (**280**) (32.8 mmol) wurden portionsweise zur hellgelben Reaktionslösung zugegeben. Unter Eiskühlung bildete sich ein Niederschlag, der durch Filtration und gründlichen Waschen mit Wasser aufgereinigt wurde. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden 1.32 g (20 %) 2-Methoxy-3-nitro-benzoesäure (**186**) als farbloser Feststoff gewonnen.

Ausbeute: 1.32 g (20 %) Theorie: 6.47 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 3:1 + 1 % AcOH R_f = 0.31
n-Hex/EtOAc 1:1 + 1 % AcOH R_f = 0.5

Schmelzpunkt:	194-195 °C	Lit.: 194-195 °C ^[262]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 13.52 (bs, 1H, COOH), 8.04 (dd, 1H, J = 1.25, 6.75, C ⁴ -H), 8.00 (dd, 1H, J = 1.25, 6.5, C ⁶ -H), 7.38 (t, 1H, J = 6.5, 6.75, C ⁵ -H), 3.88 (s, 3H, OC-H ₃)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 165.52 (COOH), 151.44 (C ² -OCH ₃), 145.00 (C ⁶ -H), 134.99 (C ³ -NO ₂), 128.03 (C ⁴ -H), 127.56 (C ⁵ -H), 124.22 (C ¹ -COOH), 63.64 (C ² -OCH ₃)	
IR (KBr):	3015 (m), 2964 (m), 2669 (m), 1976 (w), 1702 (s), 1679 (s), 1604 (s), 1573 (m), 1528 (s), 1465 (s), 1426 (s), 1369 (s), 1307 (s), 1286 (s), 1243 (s), 1145 (m), 1089 (m), 993 (s), 910 (m), 835 (m), 821 (m), 784 (w), 766 (m), 754 (m), 718 (w), 695 (s), 611 (w), 592 (w), 557 (w)	
Elementaranalyse:	C ₈ H ₇ NO ₅ (197.14)	
	berechnet	C: 48.74 H: 3.58 N: 7.10
	gefunden	C: 48.49 H: 3.57 N: 6.92

10.2.49 2-Methoxy-3-nitro-benzamid (187)



11,44 g 2-Methoxy-3-nitro-benzoesäure (**186**) (58 mmol, 1 Äquiv.) wurden mit 18 g (87 mmol, 1,5 Äquiv.) PCl_5 bei 80 °C zusammengeschmolzen. Nach dem Abkühlen wurden 300 mL einer mit NH_3 gesättigten DCM-Lösung zugegeben. Dabei fiel ein gelblicher Feststoff aus. Die Suspension wurde mit Wasser (2 x 100 mL) gewaschen und die wässrige Phase verworfen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO_4) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der entstandene hellgelbe Feststoff wurde umkristallisiert ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$). Die gewonnenen farblosen Kristalle wurden zur weiteren Aufarbeitung säulenchromatographisch (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt und nach dem Entfernen des Lösungsmittels erneut in Methanol umkristallisiert. Dabei konnten 6,97 g (61 %) 2-Methoxy-3-nitro-benzamid (**187**) als farblose Kristalle gewonnen werden.

Ausbeute: 6,97 g (61 %) Theorie: 11,38 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 1:1 $R_f = 0,45$

Schmelzpunkt: 123 °C Lit.: 123 °C^[263]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO-d_6):
7,95 (dd, 2H, $J = 1,2, 8,1$, $\text{C}^4\text{-H}$, NH), 7,77 (dd, 2H, $J = 1,2, 7,8$, $\text{C}^6\text{-H}$, NH), 7,36 (t, 1H, $J = 7,8, 8,1$, $\text{C}^5\text{-H}$), 3,88 (s, 3H, OC- H_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62,9 MHz, DMSO-d_6):
166,32 (CONH_2), 149,47 ($\text{C}^2\text{-OCH}_3$), 144,01 ($\text{C}^6\text{-H}$), 133,47 ($\text{C}^3\text{-NO}_2$),

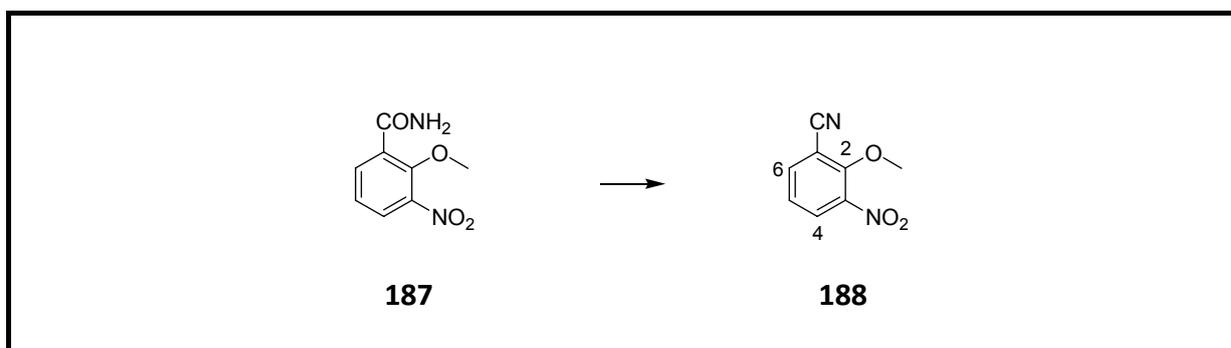
132.62 (C^4 -H), 125.78 (C^5 -H), 124.10 (C^1 -CONH₂), 63.09 (C^2 -OCH₃)

IR (KBr): 3382 (s), 3189 (s), 1643 (s), 1532 (s), 1463 (s), 1352 (s), 1242 (s),
1110 (m), 991 (s), 899 (w), 813 (s), 748 (m), 667 (s), 591 (m)

Elementaranalyse: C₈H₈N₂O₄ (196.16)

berechnet	C: 48.98	H: 4.11	N: 14.28
gefunden	C: 49.15	H: 4.27	N: 14.09

10.2.50 2-Methoxy-3-nitro-benzonitril (188)



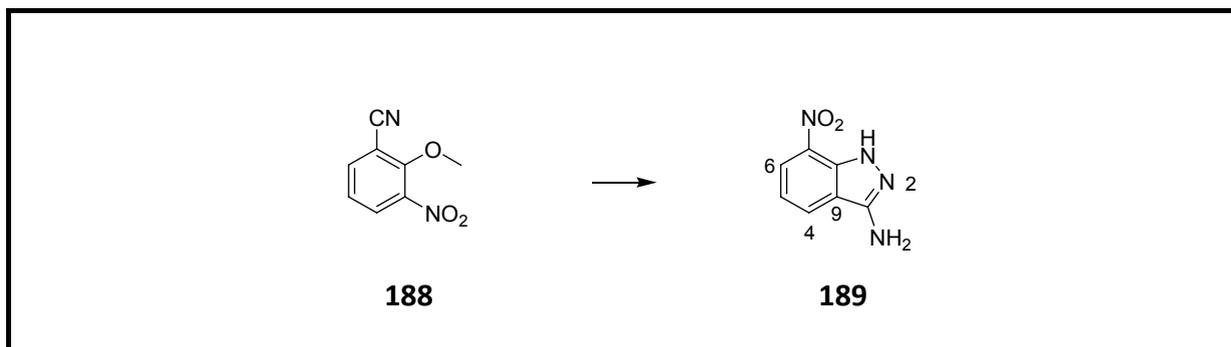
In einem 500 mL Rundkolben wurden 6.86 g 2-Methoxy-3-nitro-benzamid (**187**) (34.97 mmol, 1 Äquiv.) in 41 mL abs. Pyridin (0.5 mol, 14 Äquiv.) gelöst und mit 4,1 mL POCl₃ (44.66 mmol, 1.3 Äquiv.) versetzt. Das Gemisch wurde für eine Stunde im Eisbad unter Argon gerührt. Zur erhaltenen lila Lösung wurden ca. 300 mL dest. Wasser zugegeben, bis ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde abgesaugt und in Methanol umkristallisiert. Die resultierenden farblosen Kristalle wurden zur weiteren Aufarbeitung einer säulenchromatographischen Aufreinigung (*n*-Hex/EtOAc 5:1) unterzogen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 4.23 g (67 %) 2-Methoxy-3-nitro-benzonitril (**188**) als farblose Kristalle gewonnen werden.

Ausbeute: 4,23 g (67 %) Theorie: 6.23 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 1:1 R_f = 0.72

Schmelzpunkt:	104-105 °C	Lit.: 104-105 °C ^[264]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 8.27 (dd, 1H, J = 1.8, 8.1, C ⁴ -H), 8.17 (dd, 1H, J = 1.8, 7.8, C ⁶ -H), 7.50 (t, 1H, J = 7.8, 8.1, C ⁵ -H), 4.08 (s, 3H, OC-H ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 154.55 (C ² -OCH ₃), 143.18 (C ⁶ -H), 138.68 (C ³ -NO ₂), 130.06 (C ⁴ -H), 124.97 (C ⁵ -H), 114.76 (CN), 107.89 (C ¹ -CN), 63.30 (C ² -OCH ₃)			
IR (KBr):	3087 (w), 2957 (w), 2237 (m), 1602 (s), 1573 (s), 1530 (s), 1473 (s), 1421 (s), 1349 (s), 1282 (m), 1254 (m), 1182 (w), 1084 (m), 979 (s), 913 (w), 807 (s), 756 (s), 725 (m), 614 (w)			
Elementaranalyse:	C ₈ H ₆ N ₂ O ₃ (178.14)			
	berechnet	C: 53.94	H: 3.39	N: 15.73
	gefunden	C: 53.90	H: 3.46	N: 15.73

10.2.51 7-Nitro-3-amino-indazol (189)



In einem 25 mL Schlenkkolben wurden 1.00 g 2-Methoxy-3-nitro-benzonitril (**188**) (5.61 mmol, 1 Äquiv.) in abs. Methanol (20 mL) gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Über ein Septum wurden tropfenweise 1.35 mL Hydrazin-Monohydrat (28 mmol, 5 Äquiv.) hinzugefügt. und die rote Lösung für eine halbe Stunde zum Rückfluss erhitzt. Eine Kontrolle über DC zeigte eine vollständige Umsetzung von **188**, so dass die Reaktionsmischung abgekühlt und der rote Feststoff abgesaugt wurde. Der Feststoff wurde mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dabei konnten 830 mg (83 %) 7-Nitro-3-amino-indazol (**189**) gewonnen werden.

Ausbeute: 830 mg (83 %) Theorie: 1.00 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 1:1 $R_f = 0.16$
n-Hex/EtOAc 1:2 $R_f = 0.27$

Schmelzpunkt: 280-282 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 12.37 (s, 1H, NH), 8.25 (dd, 1H, $J = 1.25, 7.75$, $C^6\text{-H}$), 8.22 (dd, 1H, $J = 1.25, 7.75$, $C^4\text{-H}$), 7.12 (t, 1H, $J = 7.75$, $C^5\text{-H}$), 5.90 (s, 2H, NH_2)

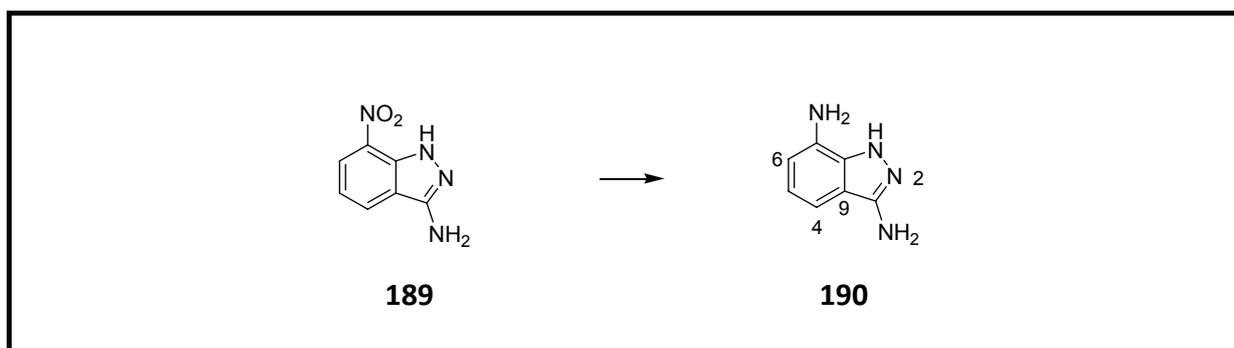
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 150.92 ($C^3\text{-NH}_2$), 133.10 ($C^7\text{-NO}_2$), 131.13 (C^8), 130.03 ($C^4\text{-H}$), 124.39 ($C^6\text{-H}$), 119.55 (C^9), 117.68 ($C^5\text{-H}$)

IR (KBr): 3406 (s), 3197 (s), 1631 (s), 1581 (m), 1550 (s), 1508 (s), 1485 (m), 1462 (w), 1429 (w), 1361 (m), 1331 (s), 1270 (s), 1220 (m), 1134 (m), 1052 (m), 955 (m), 888 (w), 805 (m), 788 (m), 732 (m), 668 (m), 604 (m)

Elementaranalyse: C₇H₆N₄O₂ (178.15)

berechnet	C: 47.19	H: 3.39	N: 31.45
gefunden	C: 47.24	H: 3.60	N: 31.70

10.2.52 3,7-Diamino-indazol (190)



In einem Schlenkrohr wurden 810 mg 7-Nitro-3-amino-indazol (**189**) (4.55 mmol, 1 Äquiv.) in 5 mL abs. MeOH gelöst und unter Argon 270 mg (33 Massen-%) Pd/C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 40 °C unter Wasserstoff (1 bar) gerührt. Nach 12 Stunden wurde durch Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (DCM/EtOAc 3:1) eine vollständige Umsetzung von **189** festgestellt. Zur Aufreinigung wurde das Reaktionsgemisch über Celite abgesaugt, mit MeOH gewaschen, auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc). Es konnten 606 mg (90 %) 3,7-Diamino-indazol (**190**) als ein bläulicher Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 606 mg (90 %) Theorie: 673 mg

DC: *n*-Hex/EtOAc 1:1 R_f = 0.13
n-Hex/MeOH 2:1 R_f = 0.57

DCM/EtOAc 3:1 $R_f = 0.13$

DCM/MeOH 9:1 $R_f = 0.44$

Schmelzpunkt: 235 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
10.83 (s, 1H, NH), 6.88 (d, 1H, $J = 7.75$, $C^4\text{-H}$), 6.64 (dd, 1H, $J = 7.25$,
7.75, $C^5\text{-H}$), 6.37 (dd, 1H, $J = 0.75$, 7.25, $C^6\text{-H}$), 5.11 (s, 2H, NH_2), 5.03
(s, 2H, NH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
149.40 ($C^3\text{-NH}_2$), 132.85 ($C^7\text{-NH}_2$), 132.01 (C^8), 118.79 ($C^5\text{-H}$), 114.40
($C^6\text{-H}$), 107.54 ($C^4\text{-H}$), 107.25 (C^9)

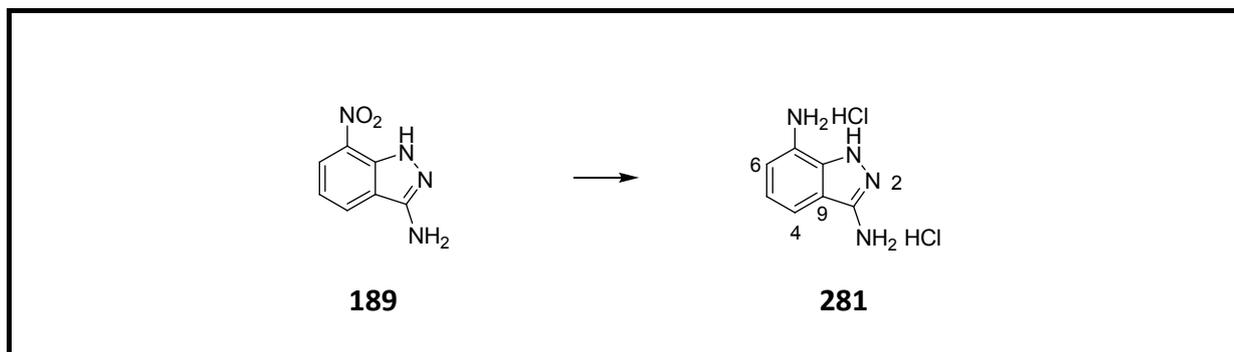
IR (KBr): 3434 (m), 3409 (s), 3329 (s), 3148 (s), 2938 (s), 1637 (s), 1591 (s),
1534 (s), 1508 (s), 1429 (s), 1409 (s), 1375 (s), 1310 (m), 1287 (s),
1143 (m), 1058 (m), 990 (m), 879 (m), 866 (s), 786 (s), 763 (s), 731
(s), 641 (s), 565 (s)

Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4$ (148.17)

berechnet	C: 56.74	H: 5.44	N: 37.81
-----------	----------	---------	----------

gefunden	C: 56.90	H: 5.54	N: 37.96
----------	----------	---------	----------

10.2.53 3,7-Diamino-indazol Dihydrochlorid (**281**)



30 mg 7-Nitro-3-amino-indazol (**189**) (0.168 mmol, 1 Äquiv.) wurde in 5 mL 6 N HCl aufgelöst und mit 200 mg Zinnpulver (1.68 mmol, 10 Äquiv.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden auf 100 °C erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde das überschüssige Zinn über eine Nutsche mit Fritte abgesaugt. Durch Abkühlen auf RT kam es zur Kristallisation. Der farblose Niederschlag wurde mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. 28 mg 3,7-Diamino-indazol Dihydrochlorid (**281**) (75 %) konnten gewonnen werden.

Ausbeute: 28 mg (75 %) Theorie: 37 mg

DC: *n*-Hex/EtOAc 1:1 $R_f = 0.13$
n-Hex/MeOH 2:1 $R_f = 0.57$
 DCM/EtOAc 3:1 $R_f = 0.13$
 DCM/MeOH 9:1 $R_f = 0.44$

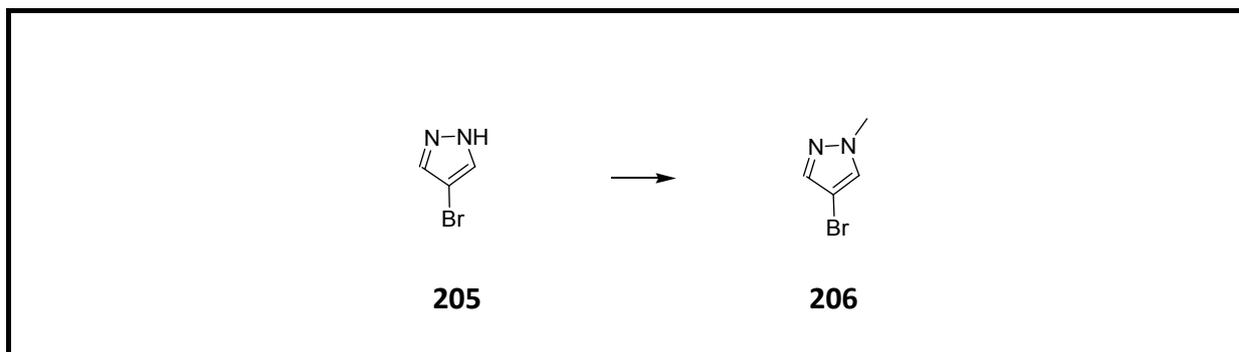
Schmelzpunkt: 167-170 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 10.5-7.5 (bs, 7H, 2 x NH_3^+ , NH), 7.31 (dd, 1H, $J = 0.75$, 8, $\text{C}^4\text{-H}$), 7.00 (t, 1H, $J = 7.5$, 8, $\text{C}^5\text{-H}$), 6.88 (dd, 1H, $J = 0.75$, 7.5, $\text{C}^6\text{-H}$)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 100.6 MHz, DMSO- d_6):
 142.10, 135.12, 122.63, 121.82, 119.27, 116.26, 114.80

DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	$R_f = 0.20$		
Schmelzpunkt:	97 °C	Lit.: 76-77 °C ^[265]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 13.17 (bs, 1H, NH), 7.76 (s, 2H, 2xCH)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 133.79, 91.61			
IR (KBr):	3448 (w), 3129 (m), 3026 (w), 2942 (m), 1521 (m), 1437 (m), 1416 (m), 1379 (s), 1323 (s), 1298 (s), 1284 (s), 1252 (w), 1184 (s), 1252 (w), 1184 (m), 1116 (m), 1053 (w), 980 (s), 954 (s), 841 (s), 796 (s), 774 (w)			
Elementaranalyse:	C ₃ H ₃ BrN ₂ (146.97)			
	berechnet	C: 24.52	H: 2.06	N: 19.06
	gefunden	C: 24.65	H: 2.14	N: 19.22

10.2.55 4-Bromo-1-methyl-1*H*-pyrazol (**206**)^[234]

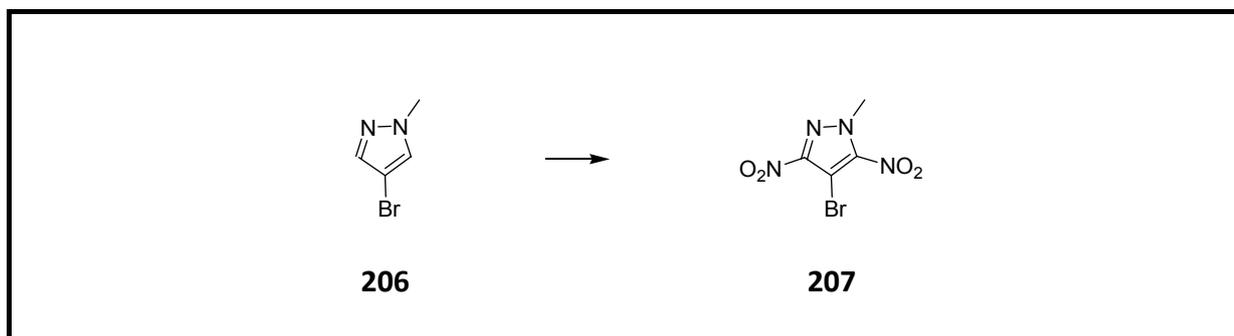


20.40 g 4-Bromo-1*H*-pyrazol (**205**) (0.138 mol, 1 Äquiv.) wurde mit 11.60 g gemörserterem Kaliumhydroxid (207 mmol, 1.5 Äquiv.) und 4.36 g Tetraethylammoniumbromid (TEAB) (20.75 mmol, 0.15 Äquiv.) zusammengegeben und auf 0-5 °C gekühlt. Nach der tropfenweisen Zugabe von 8.63 mL Methyljodid (19.69 g, 0.138 mol, 1 Äquiv.) wurde die Reaktionsmischung für 15 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde destillativ über eine Vigreux-Kolonnen im Vakuum aufgereinigt. 18.30 g (81 %) 4-Bromo-1-methyl-1*H*-pyrazol (**206**) als farblose Flüssigkeit konnten bei einer Siedetemperatur von 59 °C bei 7 mbar gewonnen werden.

Ausbeute:	18.30 g (81 %)	Theorie: 22.34 g
DC:	n-Hex/EtOAc 5:1	R _f = 0.38
Dichte:	1.7158 g/mL	
Brechungsindex (n ²¹):	1.5311	
Siedepunkt:	59 °C bei 7 mbar	Lit.: 76-78 °C bei 18 Torr ^[266]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):	
	7.93 (s, 1H, CH), 7.52 (s, 1H, CH), 3.83 (s, 3H, CH ₃)	

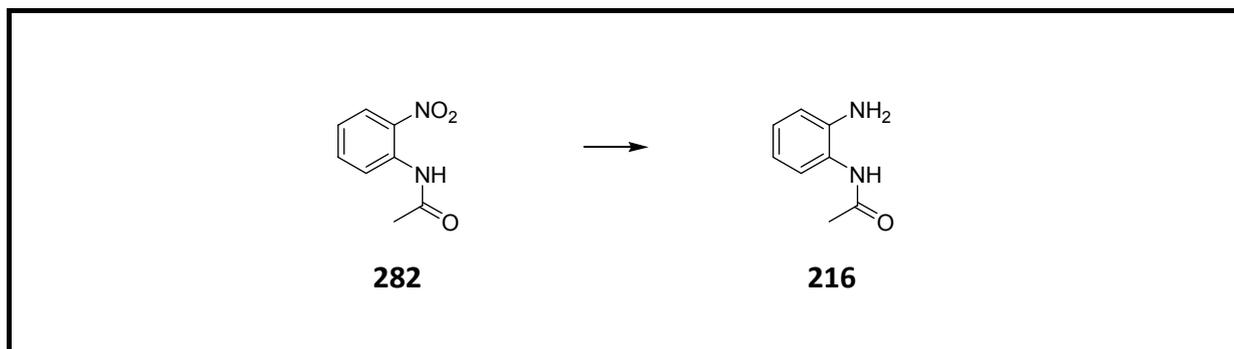
^{13}C -NMR:	(δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
	138.66, 130.62, 91.21, 38.92
IR (Film):	3155 (s), 3071 (s), 2985 (s), 2938 (s), 2872 (s), 2811 (s), 2756 (s), 2697 (s), 1646 (m), 1590 (m), 1564 (m), 1508 (m), 1493 (m), 1375 (s), 1335 (s), 1278 (w), 1248 (w), 1186 (s), 1141 (s), 1033 (s), 951 (s), 939 (s), 851 (s), 798 (s)
Elementaranalyse:	$\text{C}_4\text{H}_5\text{BrN}_2$ (161.00)
	berechnet C: 29.84 H: 3.13 N: 17.40
	gefunden C: 29.94 H: 3.17 N: 17.12

10.2.56 4-Bromo-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol (**207**)^[234]



30.5 mL rauchende Salpetersäure (46.05 g, 0.73 mol, $d = 1.51$, 25.5 Äquiv.) wurde unter Kühlung im Eisbad mit 39.0 mL konzentrierter Schwefelsäure (71.76 g, 0.73 mol, 1 Äquiv., $d = 1.84$, 25.5 Äquiv.) versetzt. Die Nitriersäure wurde für weitere zehn Minuten gerührt und anschließend 4.60 g 4-Brom-1-methyl-1H-pyrazol (**206**) (28.6 mmol, 1 Äquiv.) zugegeben. Nach entfernen des Eisbades erhitze man das Reaktionsgemisch für zwei Stunden zum Rückfluss. Zur Aufarbeitung wurde die rote Reaktionsmischung auf RT abgekühlt und auf 400 mL Eiswasser gegossen. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 4.71 g (65 %) Dinitropyrazol **207** als weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute:	4.71 g (65 %)	Theorie: 7.17 g		
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc	R _f = 0.20		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	R _f = 0.55		
Schmelzpunkt:	111-112 °C	Lit 111-112 °C ^[267]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 4.28 (s, 3H, C-H ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 149.57, 144.48, 90.43, 43.33			
IR (KBr):	3049 (m), 2967 (m), 2856 (m), 2819 (m), 2793 (m), 2765 (m), 2727 (m), 2666 (m), 2631 (m), 2570 (m), 2510 (m), 2463 (m), 1558 (s), 1535 (s), 1497 (s), 1426 (s), 1392 (s), 1369 (s), 1333 (s), 1298 (s), 1144 (s), 1126 (s), 1079 (s), 1036 (s), 875 (s), 819 (s), 760 (s), 741 (s), 671 (s), 620 (s)			
Elementaranalyse:	C ₄ H ₃ BrN ₄ O ₄ (251.00)			
	berechnet	C: 19.14	H: 1.20	N: 22.32
	gefunden	C: 18.91	H: 1.46	N: 22.04

10.2.57 N-(2-Amino-phenyl)-acetamid (216)

1.50 g 2-Nitroacetanilid (**282**) (8.32 mmol, 1 Äquiv.) wurden in MeOH (15 mL) aufgelöst und unter Argon mit 250 mg Pd/C (16.6 Massen-%) versetzt. Nach Austausch von Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde bei RT für vier Stunden weitergerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Filtration über Celite® und Verdampfen des Lösungsmittels. Das Rohprodukt konnte durch Säulenchromatographie (EtOAc) aufgereinigt werden. Dabei wurde N-(2-Aminophenyl)-acetamid (**216**) als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 1.19 g gewonnen.

Ausbeute: 1.19 g (95 %)

Theorie: 1.25 g

DC: EtOAc

R_f = 0.26

Schmelzpunkt: 133-134 °C

Lit.: 133 °C^[268]

¹H-NMR: (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d₆):

9.10 (bs, 1H, NH), 7.15 (d, 1H, J = 7.8, Aromat-H), 6.88 (t, 1H, J = 7.8, Aromat-H), 6.70 (d, 1H, J = 7.8, Aromat-H), 6.53 (d, 1H, J = 7.8, Aromat-H), 4.83 (bs, 2H, NH₂), 2.03 (s, 3H, COCH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d₆):

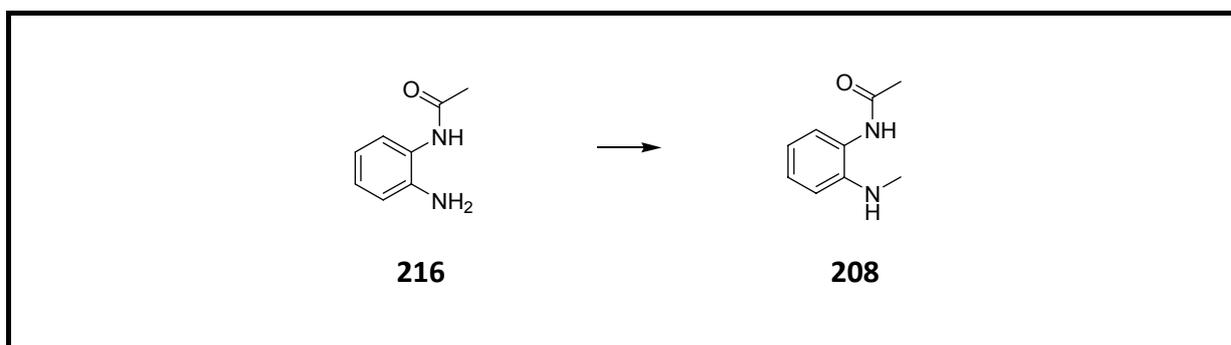
168.00, 141.74, 125.53, 125.13, 123.41, 115.94, 115.64, 23.14

IR (KBr): 3457 (w), 3365 (s), 3274 (m), 3040 (w), 1924 (w), 1643 (s), 1588 (s), 1535 (s), 1497 (s), 1458 (s), 1370 (s), 1300 (s), 1255 (s), 1220 (m), 1156 (m), 1138 (w), 1057 (w), 1040 (w), 1012 (m), 964 (m), 925 (w), 859 (w), 847 (w), 809 (w), 746 (s), 700 (m), 653 (m), 607 (m), 572 (m)

Elementaranalyse: C₈H₁₀N₂O (150.18)

berechnet	C: 63.98	H: 6.71	N: 18.65
gefunden	C: 64.14	H: 6.76	N: 18.86

10.2.58 N-(2-Methylamino-phenyl)-acetamid (208)

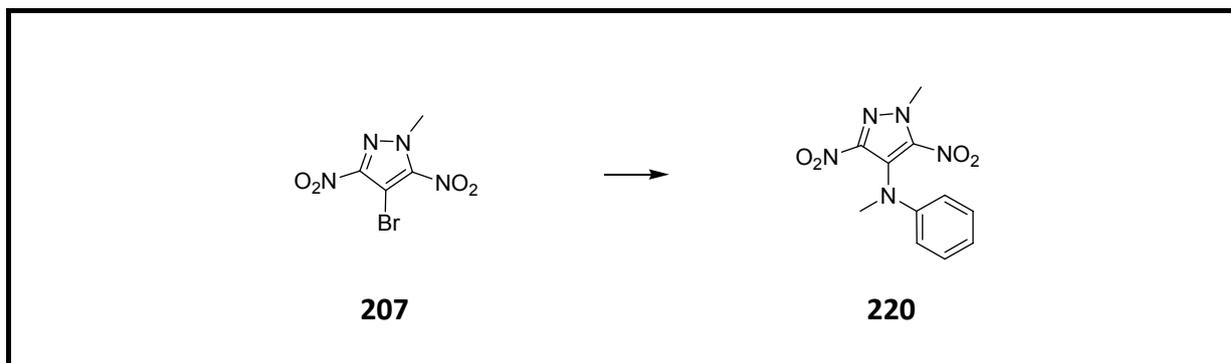


15.00 g 2-Nitroacetanilid (**216**) (83.2 mmol, 1 Äquiv.) wurden in MeOH (300 mL) aufgelöst und unter Argon mit 2.25 mg Pd/C (15 Massen-%) versetzt. Nach Austausch von Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde bei RT für vier Stunden weitergerührt. Anschließend DC-Kontrolle (EtOAc) zeigte eine vollständige Umsetzung des Acetanilid **216**, woraufhin 6.19 mL Formaldehyd-Lsg 37 % (2.5 g, 83.2 mmol, 1 Äquiv.) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 15 Stunden gerührt wurde. Zur Aufarbeitung wurde über Celite[®] abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das Rohprodukt konnte durch säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc) aufgereinigt werden. N-(2-Aminophenyl)-acetamid (**208**) konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 11.78 g gewonnen werden.

Ausbeute: 11.78 g (86 %) Theorie: 13.67 g

DC:	EtOAc	R _f = 0.36		
Schmelzpunkt:	85-87 °C	Lit.: 89-90 °C ^[269]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆): 9.03 (bs, 1H, NH), 7.10 (d, 1H, J = 7.8, Aromat-H), 7.03 (t, 1H, J = 7.5, Aromat-H), 6.58-6.53 (m, 2H, J = 7.8, J = 7.5, Aromat-H), 5.04 (q, 1H, J = 5.1, NHCH ₃), 2.70 (d, 3H, J = 5.1, NHCH ₃), 2.02 (s, 3H, COCH ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d ₆): 169.29, 144.01, 126.90, 126.15, 123.43, 115.70, 110.46, 29.93, 23.33			
IR (KBr):	3384 (s), 3228 (s), 3026 (s), 2912 (s), 2872 (s), 2815 (s), 2617 (w), 1917 (w), 1882 (w), 1846 (w), 1646 (s), 1606 (s), 1518 (s), 1467 (s), 1439 (s), 1426 (s), 1372 (s), 1326 (s), 1308 (s), 1285 (s), 1264 (s), 1170 (s), 1128 (m), 1098 (w), 1069 (w), 1039 (s), 1017 (m), 968 (s), 924 (m), 858 (m), 835 (m), 742 (s), 662 (m), 614 (m), 556 (m)			
Elementaranalyse:	C ₉ H ₁₂ N ₂ O (164.20)			
	berechnet	C: 65.83	H: 7.37	N: 17.06
	gefunden	C: 66.00	H: 7.36	N: 17.19

10.2.59 *N*,1-Dimethyl-3,5-dinitro-*N*-phenyl-1*H*-pyrazol-4-amin (**220**)^[234]



4.00 g 4-Bromo-1-methyl-3,5-dinitro-1*H*-pyrazol (**207**) (15.9 mmol, 1 Äquiv.) wurden in DMSO (5 mL) gelöst und die Reaktionslösung auf 50-60 °C erhitzt. Anschließend wurden 5.1 mL *N*-Methylanilin (5.0 g, 48.8 mmol, 3 Äquiv.) tropfenweise zugegeben und auf 100 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Pyrazols **207** wurde das Lösungsmittel im Kugelrohr verdampft und der Rückstand umkristallisiert (EtOH). 639 mg des Pyrazols **220** als rote Kristalle konnten erhalten werden.

Ausbeute: 639 mg (14 %)

Theorie: 4.41 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 5:1

R_f = 0.30

Schmelzpunkt: 157 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d₆):

7.19 (dd, 2H, J = 7.2, 2xAromat-H), 6.83-6.77 (m, 3H, J = 7.2, 3xAromat-H), 4.29 (s, 3H, Pyrazol-N-CH₃), 3.24 (s, 3H, N-CH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 75.4 MHz, DMSO-d₆):

146.38, 141.56, 128.83, 122.01, 119.10, 117.48, 113.37, 43.06, 38.47

IR (KBr):

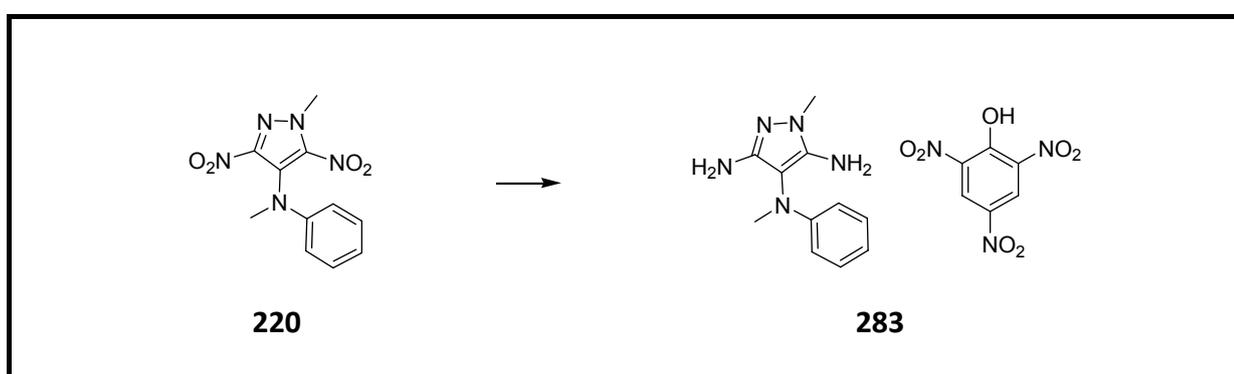
3423 (w), 3026 (w), 2965 (w), 1586 (s), 1577 (s), 1512 (m), 1495 (s), 1473 (w), 1446 (w), 1426 (s), 1378 (m), 1319 (s), 1296 (m), 1235 (w), 1188 (w), 1144 (w), 1106 (w), 1092 (w), 1067 (w), 1048 (w), 902 (w),

854 (w), 826 (w), 815 (w), 773 (w), 760 (m), 698 (w), 676 (w)

Elementaranalyse: $C_{11}H_{11}N_5O_4$ (277.24)

berechnet C: 47.66 H: 4.00 N: 25.26

gefunden C: 47.50 H: 3.97 N: 25.27

10.2.60 *N*,1-Dimethyl-*N*⁴-phenyl-1*H*-pyrazol-3,4,5-triamin Pikrat (283**)**

100 mg Pyrazol **220** (0.36 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 5 mL 2 N NaOH-Lsg. suspendiert, mit 55 mg pulverigem NaBH₄ (1.44 mmol, 4 Äquiv.) versetzt und für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung aus RT abgekühlt und mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel verdampft. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgte säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH 9:1). Nach anschließendem Trocknen im Ölpumpenvakuum konnte ein Schaum gewonnen werden. Zur Analysenreinheit wurde eine Pikratfällung (303 mg, 0.792 mmol, 2.2 Äquiv. Pikrinsäure ~40 % Wasser angefeuchtete Suspension) vorgenommen. 67 mg des Pikrats **283** wurden erhalten.

Ausbeute: 67 mg (41 %)

Theorie: 160.7 mg

DC: EtOAc/MeOH 9:1

R_f = 0.16

Schmelzpunkt: 198-199 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 300 MHz, DMSO- d_6):
11.64 (bs, 1H, NH), 8.59 (s, 2H, 2 x Pikrat-CH), 7.18 (t, 2H, J = 9.6, 2xAromat-CH), 6.91 (bs, 2H, NH₂), 6.81 (bs, 2H, NH₂), 6.69 (t, 1H, J = 8.75, Aromat-CH), 6.60 (d, 2H, J = 9.6, 2xAromat-CH), 3.35 (s, 3H, CH₃), 3.08 (s, 3H, CH₃)

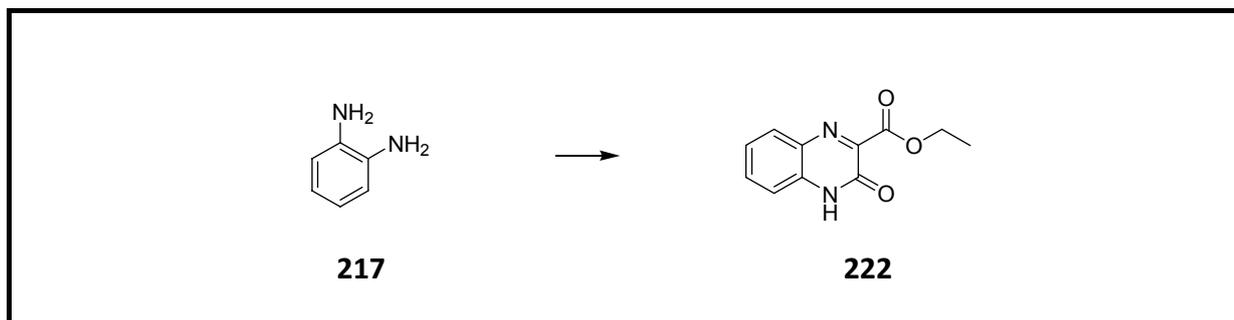
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 75.4 MHz, DMSO- d_6):
161.43, 153.46, 152.26, 148.29, 142.15, 129.39, 125.78, 125.13, 117.50, 112.54, 95.12, 38.41, 34.49

IR (KBr): 3428 (m), 3353 (m), 3319 (m), 3258 (w), 3196 (w), 3068 (w), 2946 (w), 2894 (w), 2818 (w), 1631 (s), 1603 (s), 1569 (s), 1550 (s), 1499 (m), 1483 (m), 1429 (m), 1365 (s), 1336 (s), 1310 (s), 1295 (s), 1266 (s), 1159 (m), 1081 (m), 942 (w), 912 (w), 876 (w), 841 (w), 790 (w), 753 (m), 713 (m), 695 (w), 620 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_7$ (446.37)

berechnet	C: 45.74	H: 4.06	N: 25.10
gefunden	C: 45.73	H: 4.25	N: 25.31

10.2.61 3-Oxo-3,4-dihydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (**222**)^[235]



9.74 g *o*-Phenylendiamin (**217**) (90 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. EtOH (156 mL) gelöst, mit 13.73 mL Ethylketomalonat (15.68 g, 90 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde heiß abfiltriert, das Filtrat mit Wasser (300 mL) verdünnt und mit Aktivkohle (4 g) für 15 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Über Celite[®] wurde heiß abfiltriert. Die durch Kühlung ausgefallenen Kristalle konnten durch Filtration und Trocknen im Ölpumpenvakuum erhalten werden. Zur Analyse wurden die gewonnenen Kristalle umkristallisiert (EtOH). Insgesamt konnten 15.04 g Lactam **222** (77 %) als gelbliche Kristalle gewonnen werden.

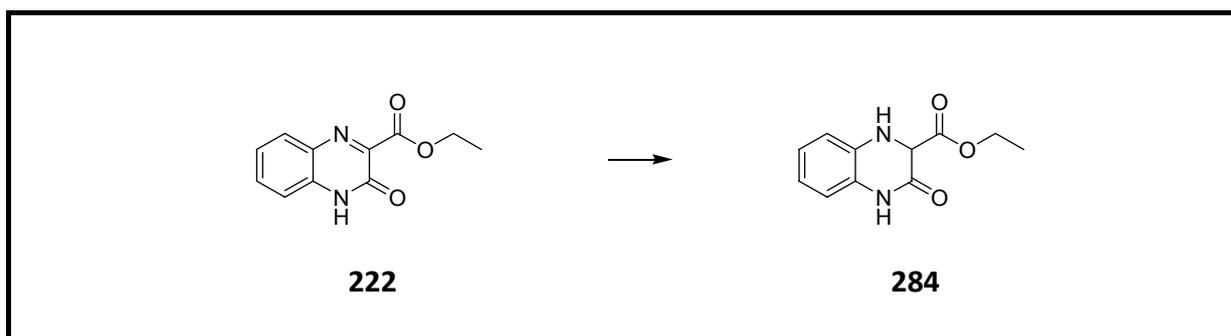
Ausbeute:	15.04 g (77 %)	Theorie: 19.64 g
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	R _f = 0.17
Schmelzpunkt:	176-177 °C	Lit.: 175.5-176.5 °C ^[235, 270]
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 12.87 (bs, 1H, NH), 7.83 (dd, 1H, J = 1.25, J = 8.75, Aromat-H), 7.64 (dt, 1H, J = 1.25, J = 8.75, Aromat-H), 7.35 (m, 2H, Aromat-H), 4.37 (q, 2H, J = 7.0, C-H ₂), 1.32 (t, 3H, J = 7.0, C-H ₃)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 163.88, 152.49, 150.53, 132.68, 132.60, 130.85, 129.42, 124.35, 115.99, 62.16, 14.17	

IR (KBr): 3456 (w), 3308 (w), 3155 (w), 3091 (w), 2965 (m), 2901 (m), 2835 (m), 2716 (m), 1995 (w), 1964 (w), 1931 (w), 1899 (w), 1742 (s), 1656 (s), 1610 (s), 1555 (s), 1502 (s), 1482 (m), 1436 (s), 1371 (s), 1346 (m), 1300 (s), 1253 (s), 1223 (s), 1155 (s), 1133 (s), 1091 (s), 1022 (w), 1009 (m), 950 (m), 930 (m), 901 (s), 863 (m), 801 (s), 766 (s), 755 (s), 708 (w)

Elementaranalyse: C₁₁H₁₀N₂O₃ (218.21)

berechnet	C: 60.55	H: 4.62	N: 12.84
gefunden	C: 60.68	H: 4.71	N: 12.83

10.2.62 3-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (284)

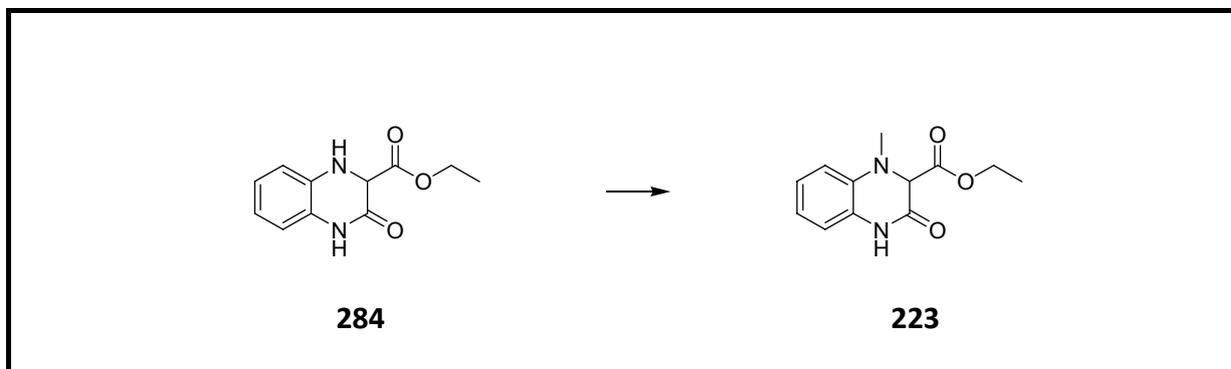


2.00 g Lactam **222** (91.65 mmol, 1 Äquiv.) wurde in abs. DMF (15 mL) unter Argon gelöst und mit 115 mg Pd/C (10 Massen-%) versetzt. Nach Austausch von Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde das Reaktionsgemisch für drei Stunden bei RT gerührt. Der Katalysator wurde über Celite[®] abgesaugt und das Filtrat wurde in Eiswasser (100 mL) gegossen. Dabei fiel ein weißer Niederschlag aus, der abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurde der gewonnene Feststoff aus Chloroform umkristallisiert. Nach Umkristallisation wurden 1.91 g Lactam **284** (95 %) als weiße Kristalle erhalten.

Ausbeute: 1.91 g (95 %)

Theorie: 2.02 g

DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	$R_f = 0.14$		
Schmelzpunkt:	145-146 °C	Lit.: 144-145 °C ^[235]		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 10.50 (bs, 1H, NH), 6.78-6.70 (m, 3H, Aromat-H), 6.64-6.59 (m, 2H, NH, Aromat-H), 4.53 (d, 1H, J = 2.0, CH-COOEt), 4.07 (q, 2H, J = 7.0, C-H ₂), 1.21 (t, 3H, J = 7.0, C-H ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 169.39, 162.12, 133.24, 125.18, 123.66, 118.76, 115.43, 114.13, 61.67, 59.59, 14.28			
IR (KBr):	3274 (s), 3154 (m), 2981 (m), 2936 (w), 2899 (w), 1728 (s), 1686 (s), 1611 (s), 1509 (s), 1469 (m), 1423 (s), 1375 (s), 1308 (m), 1269 (m), 1251 (s), 1234 (s), 1119 (m), 1109 (w), 1092 (w), 1034 (w), 1019 (m), 958 (w), 929 (w), 912 (w), 870 (w), 859 (w), 779 (m), 749 (s), 726 (m), 686 (w), 604 (m), 557 (w)			
Elementaranalyse:	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃ (220.23)			
	berechnet	C: 59.99	H: 5.49	N: 12.72
	gefunden	C: 60.17	H: 5.52	N: 12.80

10.2.63 1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonsäureethylester (223)

230.4 mg Chinoxalin **284** (1.05 mmol, 1 Äquiv.) wurde in MeOH/H₂O (5 mL : 2 mL) gelöst und mit 34 mg Pd/C (15 Massen-%) und 62.8 mg Paraformaldehyd (2.10 mmol, 2 Äquiv.) versetzt und für 15 Stunden bei 100 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das Rohprodukt wurde mit EtOAc (25 mL) versetzt, mit Wasser (1 x 10 mL) gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 192 mg Methylchinoxalin **223** (78 %) als weißer Feststoff nach Umkristallisation (DCM/*n*-Hex) gewonnen werden.

Alternative Methode:

1.63 g Chinoxalin **222** (7.47 mmol, 1 Äquiv.) wurden in MeOH (15 mL) unter Argon mit 245 mg Pd/C (15 Massen-%) versetzt. Nach Tausch des Argons gegen Wasserstoff (1 bar) wurde der Ansatz für drei Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde 1.21 mL Formaldehyd-Lsg. 37 % (448 mg, 14.94 mmol, 2 Äquiv.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 12 Stunden bei RT unter Wasserstoff (1 bar) gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das Rohprodukt wurde mit EtOAc (50 mL) versetzt, mit Wasser (1 x 20 mL) gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 1.57 g Methylchinoxalin **223** (90 %) als weißer Feststoff nach Umkristallisation (DCM/*n*-Hex) gewonnen werden.

Ausbeute: 192 mg (78 %)

Theorie: 245 mg

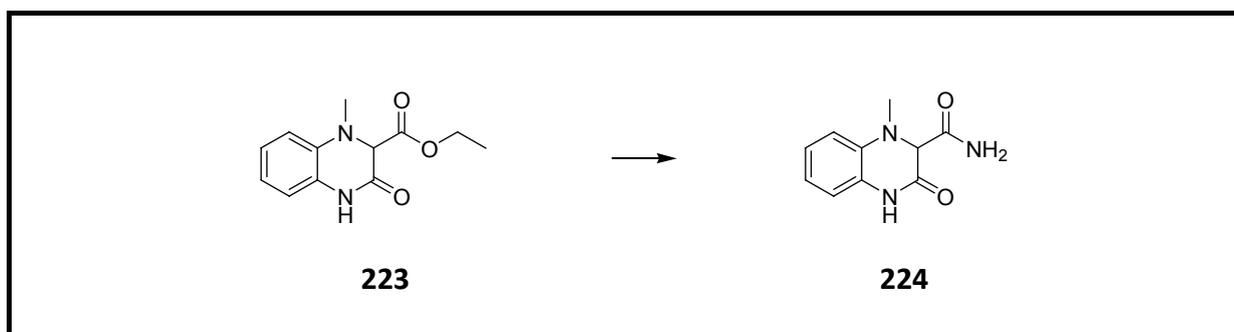
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 2:1	$R_f = 0.30$		
Schmelzpunkt:	145-147 °C			
$^1\text{H-NMR}$:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO- d_6): 10.67 (bs, 1H, NH), 6.96-6.89 (m, 1H, Aromat-H), 6.82-6.69 (m, 3H, Aromat-H), 4.69 (s, 1H, CH-COOEt), 4.05 (q, 2H, $J = 7.0$, C- H_2), 2.90 (s, 3H, N- CH_3), 1.09 (t, 3H, $J = 7.0$, C- H_3)			
$^{13}\text{C-NMR}$:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6): 167.76, 161.80, 134.71, 126.15, 123.94, 119.03, 115.12, 112.17, 66.24, 61.57, 14.29			
IR (KBr):	3431 (w), 3194 (w), 3135 (w), 3074 (w), 2977 (m), 2939 (w), 2908 (w), 2872 (w), 1730 (s), 1718 (s), 1686 (s), 1638 (w), 1613 (w), 1592 (w), 1560 (w), 1518 (m), 1508 (m), 1474 (w), 1440 (w), 1423 (w), 1406 (w), 1377 (w), 1305 (w), 1281 (m), 1229 (s), 1105 (w), 1044 (w), 1036 (w), 1018 (w), 974 (w), 934 (w), 920 (w), 896 (w), 862 (w), 840 (w), 818 (w), 771 (w), 737 (m), 688 (w), 676 (w), 668 (w), 619 (w), 592 (w), 564 (w)			
Elementaranalyse:	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (234.25)			
	berechnet	C: 61.53	H: 6.02	N: 11.96
	gefunden	C: 61.73	H: 6.16	N: 11.88

IR (KBr): 3066 (m), 3039 (m), 2981 (s), 2938 (s), 2900 (s), 2825 (w), 1738 (s), 1650 (s), 1599 (m), 1577 (m), 1493 (s), 1446 (s), 1376 (s), 1340 (s), 1312 (s), 1235 (s), 1124 (s), 1102 (s), 1044 (s), 1023 (s), 923 (m), 889 (m), 875 (m), 814 (w), 746 (s), 668 (w), 614 (w), 569 (w)

Elementaranalyse: C₁₄H₁₈N₂O₃ (262.30)

berechnet	C: 64.10	H: 6.92	N: 10.68
gefunden	C: 64.05	H: 6.86	N: 10.62

10.2.65 1,2,3,4-Tetrahydro-1-methyl-3-oxochinoxalin-2-carboxamid (**224**)



In eine Autoklavenhülle mit Rührkern wurde Ammoniak (~ 30 mL) einkondensiert und 1.50 g Methylchinoxalin **223** (6.4 mmol, 1 Äquiv.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden auf 120 °C und 50 bar eingestellt. Anschließend wurde bei RT das Ammoniak verdampft, das Rohprodukt mit MeOH (200 mL) aufgenommen, auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (EtOAc/n-Hex 9:1 → EtOAc → EtOAc/MeOH 9:1) aufgereinigt. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden 1.03 g Carboxamid **224** (78 %) als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.03 g (78 %) Theorie: 1.31 g

DC: EtOAc/MeOH 9:1 R_f = 0.51

Schmelzpunkt: 237-239 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
10.53 (bs, 1H, NH), 7.47 (bs, 1H, NH₂), 7.25 (bs, 1H, NH₂), 6.89-6.82 (m, 1H, Aromat-H), 6.75-6.71 (m, 1H, Aromat-H), 6.65-6.60 (m, 2H, Aromat-H), 4.39 (s, 1H, CH-COOEt), 2.80 (s, 3H, N-CH₃)

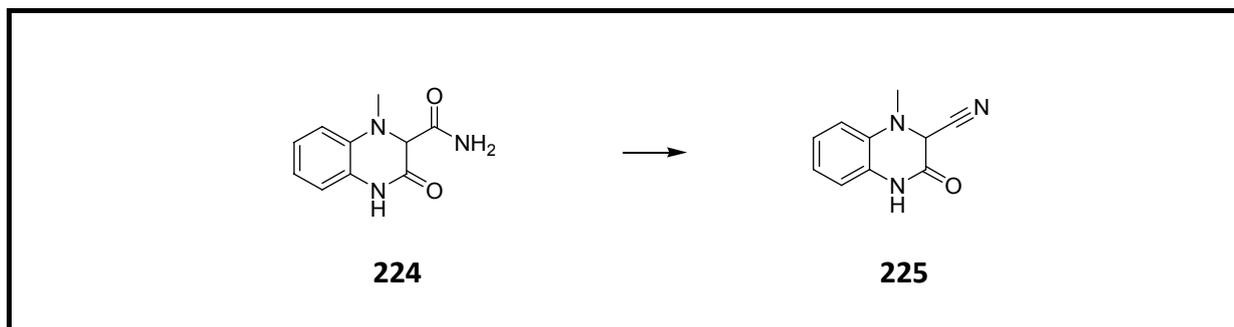
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
168.42, 163.75, 135.04, 126.06, 123.66, 117.93, 114.55, 111.19, 66.74, 35.62

IR (KBr): 3340 (m), 3194 (m), 3049 (m), 2992 (w), 2975 (w), 2916 (w), 2870 (w), 2806 (w), 2345 (w), 2916 (w), 2870 (w), 2806 (w), 1921 (w), 1910 (w), 1694 (s), 1688 (s), 1615 (s), 1594 (s), 1506 (s), 1474 (m), 1450 (m), 1435 (s), 1426 (s), 1374 (s), 1301 (s), 1264 (s), 1251 (s), 1212 (s), 1134 (m), 1119 (m), 1102 (m), 1044 (m), 1025 (m), 972 (w), 955 (m), 918 (m), 892 (m), 840 (m), 801 (m), 784 (s), 742 (s), 667 (s), 626 (s), 583 (m), 563 (s)

Elementaranalyse: C₁₀H₁₁N₃O₂ (205.21)

berechnet	C: 58.53	H: 5.40	N: 20.48
gefunden	C: 58.73	H: 5.55	N: 20.28

10.2.66 1-Methyl-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-chinoxalin-2-carbonitril (**225**)



2.05 g Carboxamid **224** (10 mmol, 1 Äquiv.) wurden unter Argon mit abs. Pyridin (10 mL) versetzt und mittels Eisbad auf 0-5 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 2.74 mL POCl₃ (4.59 g, 30 mmol, 3 Äquiv.) zugetropft. Nach zehn Minuten wurde die Reaktionsmischung auf Eiswasser (100 mL) gegeben und mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 4:1) aufgereinigt. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 1.58 g Nitril **225** (84 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1.58 g (84 %)

Theorie: 1.87 g

DC: EtOAc/MeOH 9:1

R_f = 0.35

Schmelzpunkt: 183 °C

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):

11.18 (bs, 1H, NH), 7.09-7.03 (m, 1H, Aromat-H), 6.98-6.89 (m, 3H, Aromat-H), 5.43 (s, 1H, CH-CN), 2.90 (s, 3H, N-CH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d₆):

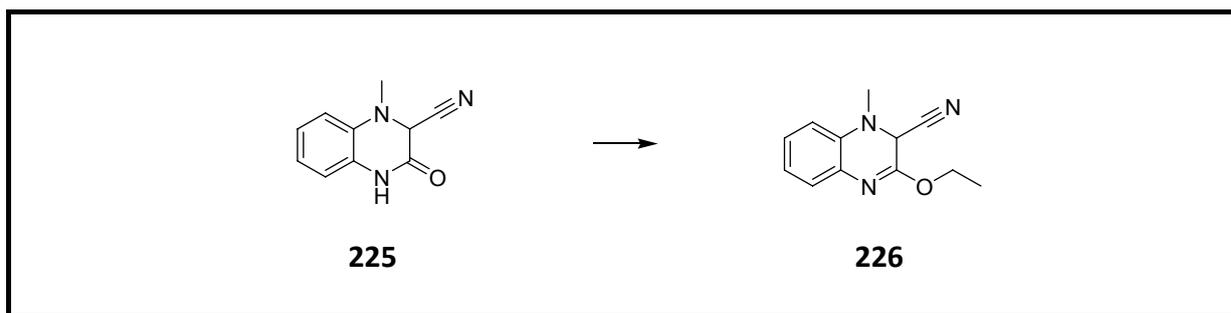
158.67, 132.72, 126.35, 123.95, 120.85, 115.58, 114.19, 113.48, 54.59, 35.31

IR (KBr): 3367 (w), 3269 (m), 3126 (w), 3099 (w), 2976 (w), 2900 (w), 2816

(w), 1942 (w), 1900 (w), 1700 (s), 1681 (s), 1610 (m), 1596 (s), 1506 (s), 1467 (m), 1450 (m), 1420 (s), 1379 (s), 1352 (s), 1298 (s), 1250 (s), 1236 (m), 1200 (s), 1162 (m), 1132 (m), 1094 (m), 1043 (m), 1010 (s), 947 (m), 929 (m), 897 (m), 776 (s), 759 (s), 742 (s), 664 (s), 563 (m)

Elementaranalyse:	C ₁₀ H ₉ N ₃ O (187.20)		
berechnet	C: 64.16	H: 4.85	N: 22.45
gefunden	C: 64.31	H: 4.93	N: 22.19

10.2.67 3-Ethoxy-1-methyl-1,2-dihydro-chinoxalin-2-carbonitril (**226**)



39.8 mg Nitril **225** (0.213 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. DCM (400 μ L) bei RT unter Argon tropfenweise mit 213 μ L Triethyloxoniumtetrafluoroborat (1.0 mol/L in DCM, 0.213 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und für 20 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionslösung 10 mL DCM zugegeben und mit gesättigter NaHCO₃-Lsg. (1 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 5:1) aufgereinigt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 42.3 mg Ethylether **226** (92 %) als farbloses Öl gewonnen werden.

Ausbeute:	42.3 mg (92 %)	Theorie: 45.8 mg
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.32

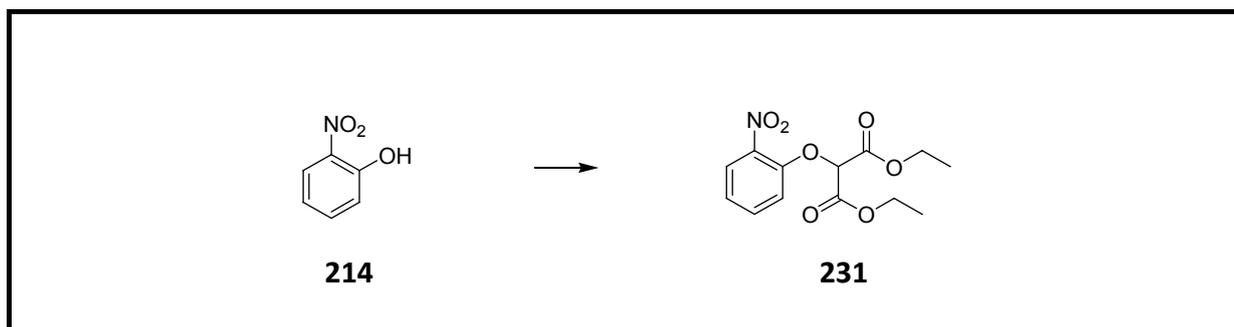
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 7.18-7.12 (m, 2H, Aromat-H), 6.95-6.89 (m, 2H, Aromat-H), 5.59 (s, 1H, CH-CN), 4.41 (q, 2H, $J = 7.0$, CH_2), 2.92 (s, 3H, N- CH_3), 1.34 (t, 3H, $J = 7.0$, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 153.34, 135.30, 132.14, 126.94, 125.36, 120.89, 114.18, 112.90, 63.56, 49.38, 35.17, 14.08

IR (KBr): 3044 (w), 2980 (m), 2900 (m), 1740 (m), 1670 (s), 1608 (s), 1492 (s), 1474 (s), 1420 (m), 1372 (m), 1305 (s), 1275 (m), 1245 (s), 1162 (w), 1129 (s), 1043 (m), 1016 (m), 947 (w), 931 (w), 904 (w), 869 (w), 813 (w), 753 (s), 718 (w), 668 (w), 638 (w), 550 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} + 0.1 \text{ EtOAc}$ (215.25)
 berechnet C: 66.47 H: 6.21 N: 18.75
 gefunden C: 66.32 H: 6.47 N: 18.72

10.2.68 2-(2-Nitro-phenoxy)-malonsäurediethylester (**231**)^[271]



In einem 250 mL Zweihalskolben wurden zu einer Suspension von 30.25 g Kaliumfluorid (520 mmol, 2.5 Äquiv.) in abs. DMF (150 mL) unter Argon und bei RT 70 mL Brommalonsäurediethylester (50 g, 209 mmol, 1 Äquiv.) zugetropft und anschließend für weitere 15 Minuten bei RT gerührt. Nach der Zugabe von 29.08 g 2-Nitrophenol **214** (209 mmol, 1 Äquiv.) wurde die Reaktionsmischung für sechs Stunden bei 60 °C gerührt. Zur

Aufarbeitung wurde die Mischung auf RT abgekühlt, auf Eiswasser (500 mL) gegeben und mit Diethylether (4 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen mit 0.1 M NaOH (6 x 50 mL) und 0.1 M HCl (3 x 50 mL) und anschließend getrocknet (MgSO₄) und auf Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*n*-Hex/EtOAc 5:1) wurden 54.34 g (87 %) Diethylmalonsäure **231** als gelbes Öl gewonnen.

Ausbeute: 54.34 g (87 %) Theorie: 62.12 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 4:1 R_f = 0.26

Brechungsindex (n²⁰): 1,5150

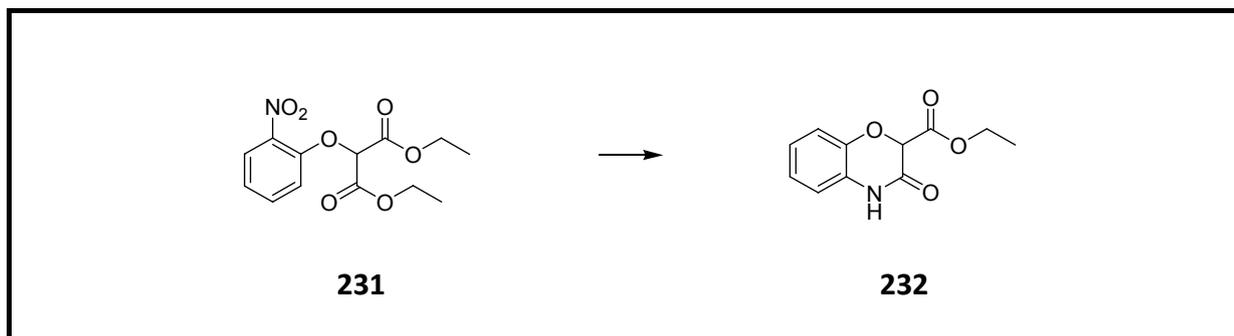
¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):
7.91 (dd, 1H, J = 1.5, J = 8.0, Aromat-H), 7.65 (dt, 1H, J = 1.5, J = 8.5, Aromat-H), 7.31 (d, 1H, J = 8.5, Aromat-H), 7.23 (dt, 1H, J = 1.0, J = 8.0, Aromat-H), 5.97 (s, 1H, CH-(COOEt)₂), 4.30-4.16 (m, 4H, CH₂), 1.20 (t, 6H, J = 7.0, CH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d₆):
164.36, 148.75, 140.26, 134.05, 124.97, 122.53, 116.24, 76.55, 62.08, 13.66

IR (Film): 3082 (w), 2987 (s), 2941 (m), 2909 (m), 1748 (s), 1605 (s), 1531 (s), 1487 (s), 1451 (s), 1359 (s), 1235 (s), 1101 (s), 1074 (s), 1026 (s), 947 (w), 855 (s), 774 (s), 745 (s), 700 (w), 661 (m), 613 (w), 573 (w)

Elementaranalyse: C₁₃H₁₅NO₇ (297.26)
berechnet C: 52.53 H: 5.09 N: 4.71
gefunden C: 52.53 H: 5.10 N: 4.79

10.2.69 3-Oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**232**)^[271]



6.89 g der Diethylmalonsäure **231** (23 mmol) wurden in abs. EtOH (140 mL) gelöst und unter Argon mit 689 mg Pd/C (10 Massen-%) versetzt. Nach Austausch des Argon gegen Wasserstoff (1 bar) wurde die Reaktionsmischung für drei Stunden bei 60 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Katalysator durch Filtration über Celite[®] abgetrennt und das Volumen der Lösung um die Hälfte aufkonzentriert. Durch Kühlung über Nacht fiel ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert wurde. Nach Waschen mit wenig kaltem EtOH wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Dabei konnten 3.87 g Ethylester **232** (56 %) als weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 3.87 g (56 %)

Theorie: 5.08 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 4:1

R_f = 0.17

Schmelzpunkt: 149-150 °C

Lit.: 146-148 °C^[271]

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):

10.97 (bs, 1H, NH), 7.05-6.87 (m, 4H, Aromat-H), 5.43 (s, 1H, CH-COOEt), 4.11 (q, 2H, J = 7.25, CH₂CH₃), 1.15 (t, 3H, J = 7.25, CH₂CH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d₆):

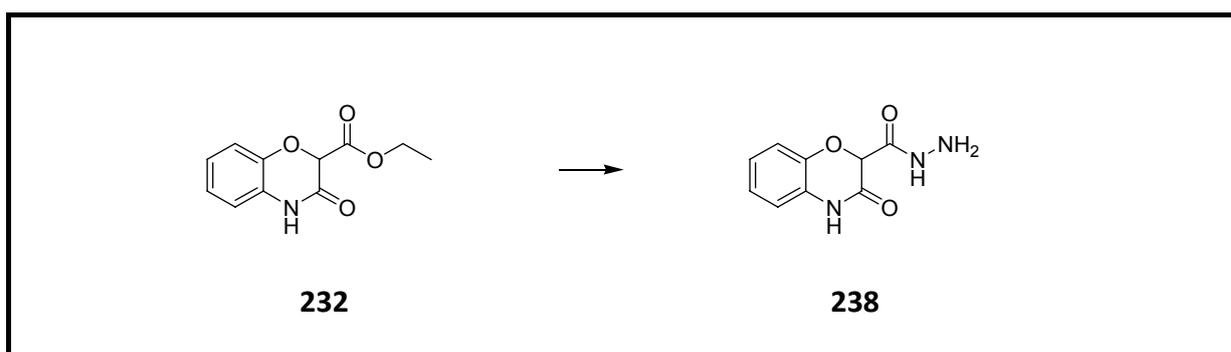
165.86, 160.41, 141.94, 126.14, 123.34, 122.73, 116.42, 115.86, 75.47, 61.59, 13.78

IR (KBr): 3192 (w), 3129 (m), 3079 (m), 3056 (m), 2975 (m), 2920 (m), 1749

(s), 1696 (s), 1610 (m), 1560 (w), 1502 (s), 1436 (w), 1395 (m), 1364 (w), 1342 (w), 1274 (m), 1240 (m), 1205 (m), 1114 (w), 1087 (m), 1020 (w), 974 (w), 938 (w), 909 (w), 852 (w), 818 (w), 804 (w), 774 (w), 751 (m), 730 (w), 712 (w), 694 (w), 660 (w), 621 (w), 594 (w), 556 (w)

Elementaranalyse:	$C_{11}H_{11}NO_4$ (221.21)		
berechnet	C: 59.73	H: 5.01	N: 6.33
gefunden	C: 59.45	H: 5.00	N: 6.25

10.2.70 3,4-Dihydro-3-oxo-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-carbohydrazid (**238**)



5.60 g Ethylester **232** (25.3 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. EtOH (40 mL) unter Rückfluss tropfenweise mit 1.35 mL Hydrazin-Monohydrat (1.39 g, 27.83 mmol, 1.1 Äquiv.) versetzt. Nach einer Stunde wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt, der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit abs. EtOH gewaschen. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum erhielt man 4.95 g (94 %) Carbohydrazid **238** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 4.95 g (94 %) Theorie: 5.24 g

DC: EtOAc/MeOH 5:1 $R_f = 0.50$
 DCM/MeOH 9:1 $R_f = 0.35$

Schmelzpunkt: 217 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
10.86 (bs, 1H, NH), 9.62 (bs, 1H, NH), 6.96-6.84 (m, 4H, Aromat-H),
5.00 (s, 1H, CH-CO), 4.40 (bs, 2H, NH_2)

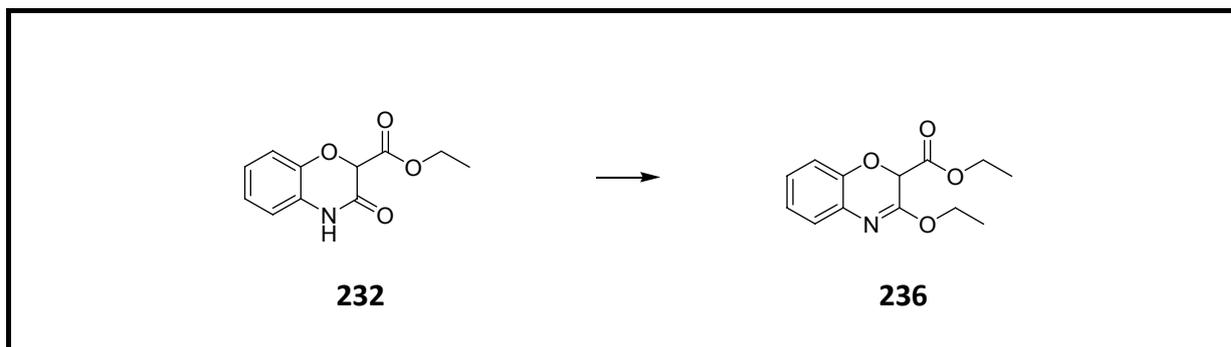
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
164.36, 161.99, 142.08, 126.20, 123.04, 122.07, 115.96, 115.55,
75.13

IR (KBr): 3300 (s), 3202 (s), 3150 (s), 3084 (s), 3057 (s), 2983 (m), 2900 (m),
2837 (w), 2745 (w), 2680 (w), 2657 (w), 2611 (w), 2551 (w), 1921
(w), 1895 (w), 1869 (w), 1708 (s), 1593 (s), 1550 (s), 1500 (s), 1430
(s), 1406 (s), 1361 (m), 1324 (w), 1304 (m), 1271 (s), 1248 (m), 1226
(s), 1143 (w), 1116 (w), 1076 (m), 1029 (w), 999 (s), 936 (s), 906 (m),
854 (w), 813 (m), 792 (m), 744 (s), 675 (m), 587 (w), 565 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ (207.19)

berechnet	C: 52.17	H: 4.38	N: 20.28
gefunden	C: 52.31	H: 4.44	N: 20.15

10.2.71 3-Ethoxy-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (236)



690 mg Lactam **232** (3.12 mmol, 1 Äquiv.) wurden in abs. DCM (10 mL) bei RT unter Argon tropfenweise mit 3.12 mL Triethyloxoniumtetrafluoroborat (1.0 mol/L in DCM, 3.12 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und für 24 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionslösung 20 mL DCM zugegeben und mit gesättigter NaHCO₃-Lsg. (1 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 540 mg Ethylether **236** (69 %) als farbloses Öl gewonnen werden.

Ausbeute: 540 mg (69 %) Theorie: 777 mg

DC: *n*-Hex/EtOAc 9:1 R_f = 0.37

Brechungsindex (n²²): 1.5316

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):
 7.13-6.93 (m, 4H, Aromat-H), 5.56 (s, 1H, CH-COOEt), 4.48-4.28 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.12 (q, 2H, J = 7.0, CH₂CH₃), 1.31 (t, 3H, J = 7.0, CH₂CH₃), 1.13 (t, 3H, J = 7.0, CH₂CH₃)

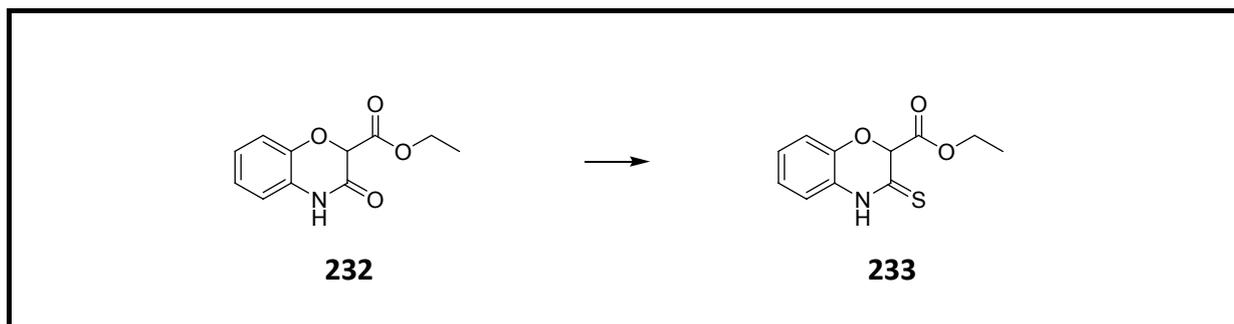
¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d₆):
 165.93, 156.63, 143.94, 131.01, 126.03, 125.05, 122.57, 115.59, 70.20, 62.66, 61.58, 13.83, 13.70

IR (Film): 3061 (w), 3042 (w), 2983 (m), 2939 (w), 2905 (w), 2873 (w), 1752 (s), 1650 (s), 1598 (m), 1483 (s), 1463 (m), 1446 (w), 1399 (w), 1376 (m), 1346 (m), 1318 (m), 1272 (m), 1244 (m), 1191 (s), 1112 (m), 1092 (m), 1021 (m), 936 (w), 905 (w), 875 (w), 861 (w), 822 (w), 755 (m), 708 (w), 686 (w)

Elementaranalyse: C₁₃H₁₅NO₄ (249.26)

berechnet	C: 62.64	H: 6.07	N: 5.62
gefunden	C: 62.38	H: 6.12	N: 5.50

10.2.72 3-Thioxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (233)^[239]



1.61 g des Lactam **232** (7.2 mmol, 2 Äquiv.) wurden in abs. THF (35 mL) unter Argon mit 1.47 g Lawesson-Reagenz (3.6 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und 24 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Es konnten 1.54 g Thiolactam **233** (89 %) als gelber Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 1.54 g (89 %) Theorie: 1.73 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 9:1 R_f = 0.21

Schmelzpunkt: 106-107 °C Lit: 107 °C^[272]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 13.00 (bs, 1H, NH), 7.10-6.97 (m, 4H, Aromat-H), 5.61 (s, 1H, CH-COOEt), 4.14 (q, 2H, J = 7.0, CH_2CH_3), 1.14 (t, 3H, J = 7.25, CH_2CH_3)

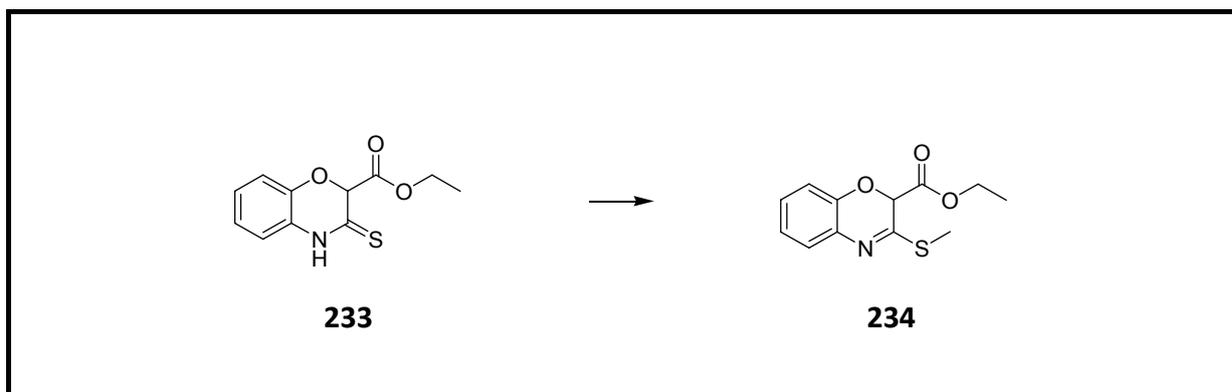
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 185.86, 166.30, 143.56, 125.93, 125.56, 123.16, 116.81, 116.50, 80.29, 62.16, 13.99

IR (KBr): 3445 (w), 3172 (m), 3117 (m), 3025 (m), 2980 (m), 2902 (m), 2764 (w), 1738 (s), 1617 (w), 1552 (s), 1496 (w), 1456 (s), 1385 (s), 1333 (m), 1310 (m), 1272 (s), 1255 (s), 1209 (s), 1190 (s), 1158 (m), 1135 (m), 1111 (m), 1096 (m), 1046 (s), 1028 (s), 952 (m), 931 (m), 858 (m), 783 (s), 766 (s), 752 (s), 705 (m), 671 (m), 614 (m), 587 (m)

Elementaranalyse: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ (237.28)

berechnet	C: 55.68	H: 4.67	N: 5.90
gefunden	C: 55.76	H: 4.76	N: 5.96

10.2.73 3-Methylsulfanyl-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureethylester (**234**)^[239]



4.16 g Thiolactam **233** (17.5 mmol, 1 Äquiv.) wurden mit 462 mg NaH (770 mg einer 60 %igen Suspension in Mineralöl, 19.3 mmol, 1.1 Äquiv.) in abs. THF (30 mL) bei RT gerührt und nach beendeter Gasentwicklung tropfenweise mit 1.09 mL (2.48 g, 17.5 mmol, 1 Äquiv.) Methyljodid versetzt. Nach drei Stunden wurde das Lösungsmittel gegen DCM (30 mL)

getauscht und mit Wasser (2 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 9:1) aufgereinigt. 3.81 g Methylthioether **234** (87 %) konnten als gelbes Öl erhalten werden.

Ausbeute: 3.81 g (87 %) Theorie: 4.40 g

DC: *n*-Hex/EtOAc 9:1 $R_f = 0.46$
n-Hex $R_f = 0.3$

Brechungsindex (n^{20}): 1.5969

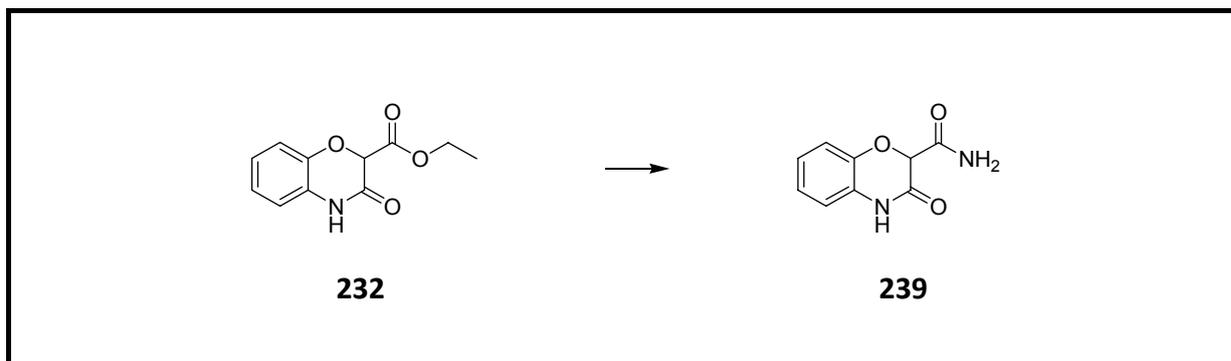
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$):
 7.29-7.25 (m, 1H, Aromat-*H*), 7.14-7.07 (m, 1H, Aromat-*H*), 7.01-6.95 (m, 2H, Aromat-*H*), 5.09 (s, 1H, *CH*-COOEt), 4.20 (q, 2H, $J = 7.0$, CH_2CH_3), 2.58 (s, 3H, *SCH*₃), 1.24 (t, 3H, $J = 7.25$, CH_2CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO-d_6):
 165.95, 159.41, 144.36, 132.43, 127.40, 125.41, 122.50, 115.85, 72.44, 61.66, 13.68, 12.14

IR (Film): 3483 (w), 3074 (w), 3047 (w), 2982 (s), 2929 (m), 2906 (w), 2872 (w), 1754 (s), 1608 (s), 1568 (s), 1478 (s), 1461 (s), 1445 (m), 1427 (m), 1392 (m), 1369 (s), 1346 (m), 1310 (s), 1269 (s), 1232 (s), 1185 (s), 1119 (s), 1090 (s), 1036 (s), 969 (m), 941 (s), 888 (w), 855 (s), 814 (w), 757 (s), 608 (m), 563 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ (251.30)
 berechnet C: 57.35 H: 5.21 N: 5.57
 gefunden C: 57.47 H: 5.32 N: 5.66

10.2.74 3-Oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonsäureamid (239)



4.36 g Ethylester **232** (19.7 mmol, 1 Äquiv.) wurden in eine Autoklavenhülle mit Rührkern und einkondensiertem Ammoniak (~ 30 mL) gegeben und für fünf Stunden bei 120 °C und 45 bar gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Ammoniak bei RT verdampft und das Rohprodukt mit MeOH (200 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde verdampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/*n*-Hex 5:1). Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden 3.22 g (85 %) Carboxamid **239** als weißer Feststoff gewonnen.

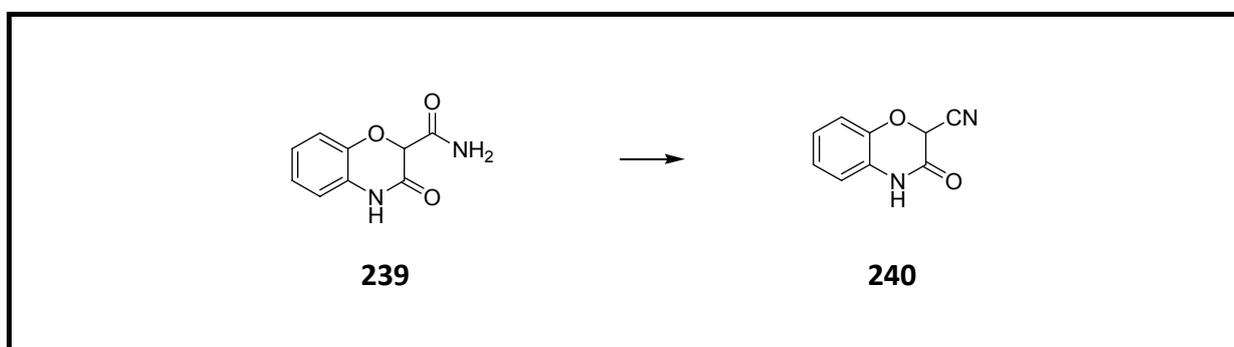
Ausbeute:	3.22 g (85 %)	Theorie: 3.78 g
DC:	EtOAc/ <i>n</i> -Hex 19:1	R _f = 0.44
Schmelzpunkt:	225-226 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 10.78 (bs, 1H, NH), 7.72 (bs, 1H, NH), 7.49 (bs, 1H, NH), 7.02-6.84 (m, 4H, Aromat-H), 5.08 (s, 1H, CH-CONH ₂)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 167.04, 162.09, 142.18, 126.38, 123.02, 122.23, 116.27, 115.58, 76.15	
IR (KBr):	3387 (s), 3219 (m), 3170 (m), 2956 (m), 2911 (w) 1891 (w), 1705 (s), 1612 (m), 1600 (m), 1504 (s), 1427 (m), 1401 (m), 1370 (m), 1343	

(m), 1307 (m), 1274 (m), 1252 (w), 1217 (m), 1120 (m), 1105 (m),
1086 (w), 1031 (w), 952 (w), 920 (w), 895 (w), 858 (w), 786 (m), 773
(m), 747 (s), 713 (m), 650 (w), 601 (w), 580 (m), 553 (m)

Elementaranalyse: C₉H₈N₂O₃ (192.17)

berechnet	C: 56.25	H: 4.20	N: 14.58
gefunden	C: 56.31	H: 4.30	N: 14.65

10.2.75 3-Oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (**240**)



310 mg Carboxamid **239** (1.6 mmol, 1 Äquiv.) wurden unter Argon mit abs. Pyridin (1.5 mL) versetzt und mittels Eisbad auf 0-5 °C gekühlt. Nach der tropfenweisen Zugabe von 443 µL POCl₃ (742 mg, 4.8 mmol, 3 Äquiv.) wurde für fünf Minuten bei 0-5 °C weitergerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz auf Eiswasser (100 mL) gegeben und mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄), auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 5:1) aufgereinigt. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden 245 mg Nitril **240** (87 %) als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 245 g (87 %) Theorie: 281 mg

DC: *n*-Hex/EtOAc 4:1 R_f = 0.28

Schmelzpunkt: 173-174 °C

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
11.43 (bs, 1H, NH), 7.15-6.97 (m, 4H, Aromat-H), 6.24 (s, 1H, CH-CN)

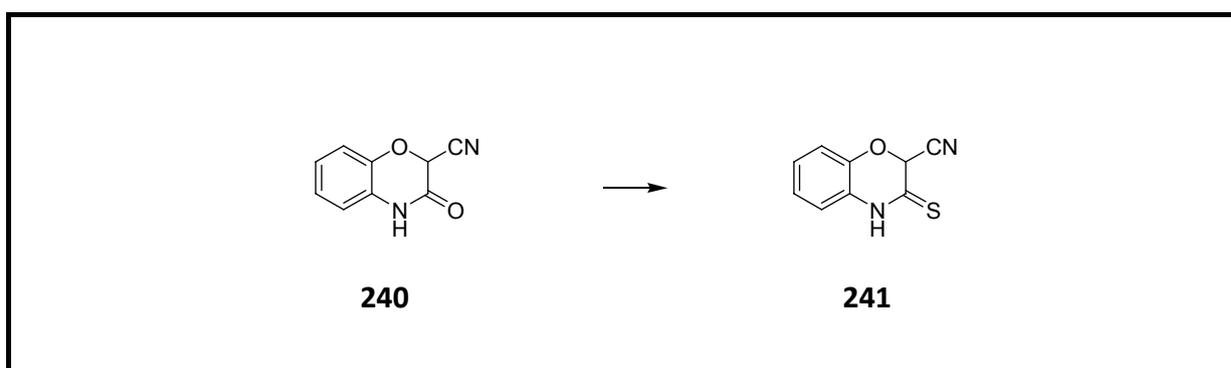
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
157.91, 140.56, 126.03, 124.14, 123.98, 116.87, 116.52, 114.40,
65.43

IR (KBr): 3196 (m), 3147 (m), 3088 (s), 2985 (m), 2920 (m), 2881 (m), 2753 (w), 1950 (w), 1910 (w), 1794 (w), 1697 (s), 1607 (m), 1503 (m), 1436 (w), 1399 (s), 1320 (m), 1304 (w), 1285 (m), 1270 (m), 1252 (w), 1219 (m), 1153 (w), 1118 (m), 1068 (s), 1017 (w), 936 (w), 918 (w), 878 (w), 857 (w), 800 (m), 756 (s), 719 (w), 687 (m), 654 (w), 612 (w), 586 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ (174.16)

berechnet	C: 62.07	H: 3.47	N: 16.09
gefunden	C: 61.81	H: 3.63	N: 16.24

10.2.76 3-Thioxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazin-2-carbonitril (**241**)



300 mg des Lactam **240** (1.72 mmol, 2 Äquiv.) wurden in abs. THF (5 mL) unter Argonatmosphäre mit 348 mg Lawesson-Reagenz (0.86 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und zwei Stunden bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel entfernt, der

Rückstand auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 9:1) aufgereinigt. 116 mg Thiolactam **241** (35 %) konnten als gelber Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute:	116 mg (35 %)	Theorie: 328 mg		
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 9:1	R _f = 0.30		
Schmelzpunkt:	145-148 °C			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 13.43 (bs, 1H, NH), 7.23-7.14 (m, 4H, Aromat-H), 6.50 (s, 1H, CH-CN)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 181.66, 141.99, 126.01, 125.62, 124.28, 117.12, 116.85, 114.62, 69.89			
IR (KBr):	3140 (w), 3060 (m), 2946 (m), 2245 (w), 1959 (w), 1915 (w), 1784 (w), 1760 (w), 1707 (w), 1651 (w), 1614 (m), 1605 (m), 1539 (s), 1494 (s), 1455 (s), 1379 (s), 1328 (m), 1306 (m), 1284 (m), 1266 (m), 1252 (m), 1208 (s), 1137 (s), 1098 (s), 1036 (s), 1021 (s), 944 (s), 902 (s), 865 (w), 853 (w), 757 (s), 669 (m), 620 (w), 604 (m), 553 (w)			
Elementaranalyse:	C ₉ H ₆ N ₂ OS (190.22)			
	berechnet	C: 56.83	H: 3.18	N: 14.73
	gefunden	C: 56.98	H: 3.35	N: 14.65

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 900 MHz, DMSO- d_6):
7.8-5.8 (bs, 4H, NH_3^+ , NH), 9.52 (bs, 1H, NH), 8.58 (s, 2H, 2xPikrat-H),
6.86 (dt, 1H, J = 0.9, J = 8.1, Aromat-H), 6.79 (dt, 1H, J = 1.8, J = 8.1,
Aromat-H), 6.72 (m 2H, Aromat-H)

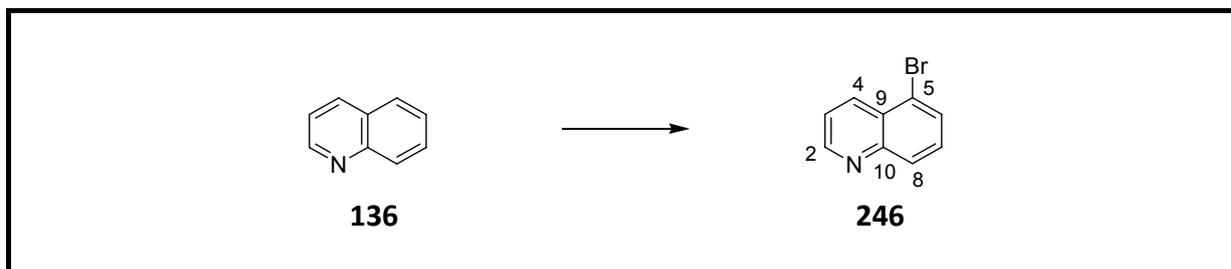
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
160.74, 142.68, 141.74, 140.72, 139.99, 128.09, 125.12, 124.20,
124.10, 123.28, 116.44, 116.17, 109.38

IR (KBr): 3435 (s), 3345 (s), 3268 (s), 3129 (s), 1682 (m), 1630 (s), 1601 (s),
1578 (s), 1561 (s), 1487 (s), 1463 (m), 1430 (m), 1412 (m), 1363 (s),
1333 (s), 1298 (s), 1268 (s), 1158 (m), 1129 (w), 1077 (m), 1036 (w),
922 (w), 910 (w), 835 (w), 812 (w), 786 (w), 755 (m), 738 (w), 710
(m), 643 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{OxC}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ (417.29)

berechnet	C: 43.17	H: 2.66	N: 23.50
gefunden	C: 43.12	H: 2.93	N: 23.65

Masse: ESI+ (berechnet für M+H):
berechnet 189.07
gefunden 188.8 (100)

10.2.78 5-Bromchinolin (246)^[243, 244]

Eine Mischung von 5.89 mL Chinolin (**136**) (50 mmol, 1 Äquiv.) mit 8.9 g N-Bromsuccinimid (NBS) (50 mmol, 1 Äquiv.) in 100 mL 95 %iger H₂SO₄ wurde für drei Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung auf 500 mL Eiswasser gegeben. Die wässrige Lösung wurde auf einen pH-Wert von 10, mit Hilfe einer 45 %iger KOH-Lösung, eingestellt, um anschließend mit Chloroform (4 x 250 mL) extrahiert zu werden. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel verdampft und das Rohprodukt auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgearbeitet (*n*-Hex/EtOAc 10:1). Es konnte 5,8-Dibromchinolin (**248**) (weißes Pulver) als Reinfraction gewonnen werden. Die Mischfraktionen wurden einer weiteren Aufreinigung durch HPLC unterzogen. 5-Bromchinolin (**246**) konnte als leicht rosa Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 2.20 g (21 %) Theorie: 10.4 g

DC:	EtOAc	R _f = 0.7
	Hex/EtOAc = 1:1	R _f = 0.5
	Hex/EtOAc = 8:2	R _f = 0.37
	Hex/EtOAc = 9:1	R _f = 0.22

HPLC-Bedingungen: analytisch: Nucleosil 50-10, 300x4.6, *n*-Hex/EtOAc 10:6.67, 2 mL/min, t_R = 3.8 min
 präparativ: Nucleosil 50-10, 250x20, *n*-Hex/EtOAc 10:6.67, 7 mL/min

Schmelzpunkt: 45.5 °C Lit.: 47-48 °C^[244]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6):
 8.98 (dd, 1H, $J = 1.5, 4.25$, $C^2\text{-H}$), 8.51 (d, 1H, $J = 8.5$, $C^4\text{-H}$), 8.07 (d, 1H, $J = 8.5$, $C^8\text{-H}$), 7.98 (dd, 1H, $J = 8.5$, $C^6\text{-H}$), 7.71-7.67 (m, 2H, $C^3\text{-H}$, $C^7\text{-H}$)

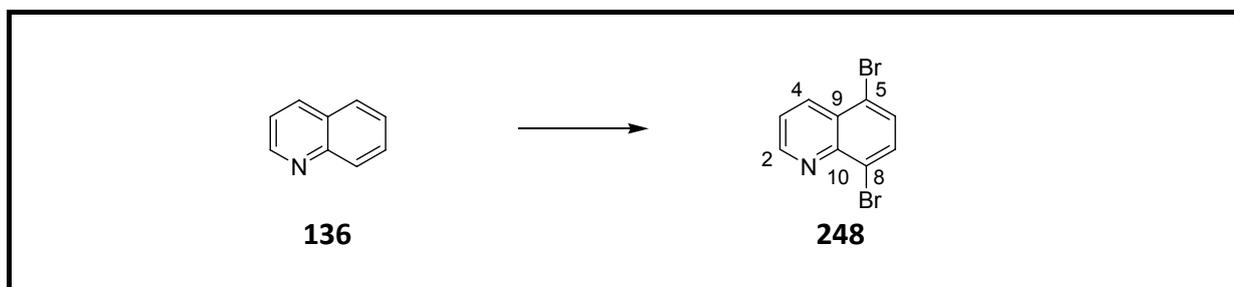
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 151.37 ($C^2\text{-H}$), 148.32 (C^9), 134.57 ($C^4\text{-H}$), 130.35 ($C^6\text{-H}$), 130.09 ($C^7\text{-H}$), 129.17 ($C^8\text{-H}$), 126.73 (C^{10}), 122.94 ($C^3\text{-H}$), 120.96 ($C^5\text{-Br}$)

IR (KBr): 1654 (w), 1586 (m), 1554 (s), 1490 (s), 1380 (m), 1309 (m), 1193 (m), 1125 (w), 1032 (s), 950 (s), 818 (s), 792 (s), 641 (w), 624 (s)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_6\text{BrN}$ (208.05)

berechnet	C: 51.96	H: 2.91	N: 6.73
gefunden	C: 51.98	H: 2.92	N: 6.61

10.2.79 5,8-Dibromchinolin (248)^[243, 244]



Ausbeute: 920 mg (12 %) Theorie: 7.17 g

DC: EtOAc $R_f = 0.93$
 Hex/EtOAc = 1:1 $R_f = 0.67$
 Hex/EtOAc = 5:1 $R_f = 0.57$
 Hex/EtOAc = 10:1 $R_f = 0.34$

Schmelzpunkt: 128 °C Lit.: 126-128 °C^[243]

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 400 MHz, DMSO- d_6):
9.09 (dd, 1H, $J = 1.6, 4.0$, $\text{C}^2\text{-H}$), 8.55 (dd, 1H, $J = 1.6, 8.4$, $\text{C}^4\text{-H}$), 8.09
(d, 1H, $J = 4.0$, $\text{C}^7\text{-H}$), 7.90 (d, 1H, $J = 4$, $\text{C}^6\text{-H}$), 7.80 (dd, 1H, $J = 4.0$,
8.4, $\text{C}^3\text{-H}$)

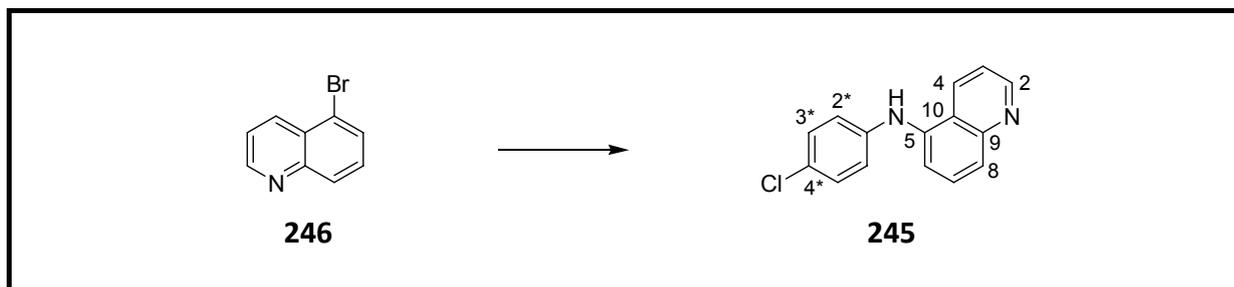
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 100.6 MHz, DMSO- d_6):
152.39, 144.86, 135.67, 133.46, 130.97, 128.01, 124.32, 124.03,
120.92

IR (KBr): 3020 (w), 1865 (w), 1654 (w), 1585 (m), 1546 (w), 1479 (m), 1452
(m), 1378 (m), 1338 (m), 1277 (m), 1202 (w), 1181 (m), 1142 (m),
1042 (m), 966 (s), 867 (w), 831 (s), 815 (s), 776 (s), 656 (w), 621 (w),
559 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_5\text{Br}_2\text{N}$ (286.95)

berechnet	C: 37.67	H: 1.76	N: 4.88
gefunden	C: 37.90	H: 1.85	N: 4.72

10.2.80 (4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (**245**)



In einem ausgeheizten 20 mL Schlenkcolben mit Rückflusskühler wurden 550 mg 4-Chloranilin (4.3 mmol, 1.1 Äquiv.), 815 mg 5-Bromchinolin (**246**) (3.9 mmol, 1 Äquiv.), 564 mg Natrium-*tert*-butylat (5.8 mmol, 1.5 Äquiv.) und Pd(dppf)Cl₂ (82 mg, 2.5 mol%) in 5 mL absolutem 1,4-Dioxan unter Argon gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Analyse durch Dünnschichtchromatographie nach 15 Stunden ergab eine Umsetzung des gesamten 5-Bromchinolins (**246**). Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und das Rohprodukt mit EtOAc (10 mL) gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und mit Kieselgel versetzt. Nach Destillation des Lösungsmittels unter Vakuum wurde säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 10:1) aufgereinigt. (4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (**245**) konnte als gelbliches Pulver gewonnen werden.

Ausbeute: 179 mg (18 %)

Theorie: 998 mg

Alternative Methode:

In einem ausgeheizten 10 mL Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 101 mg 4-Chloranilin (0.79 mmol, 1.1 Äquiv.), 150 mg 5-Bromchinolin (**246**) (0.72 mmol, 1 Äquiv.), 104 mg Natrium-*tert*-butylat (1.1 mmol, 1.5 Äquiv.) und Pd(dppf)Cl₂ (15 mg, 2.5 mol%) in 3 mL abs. Toluol unter Argon gelöst. Die Mikrowellenreaktion wurde in einem Discover CEM Mikrowellenreaktor durchgeführt. Dabei wurde die Reaktion bei einer durchschnittlichen Leistung von 100 W und einem Zeitraum von 600 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurde eine Analyse durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt, dabei konnte keine vollständige Umsetzung des gesamten 5-Bromchinolin (**246**) beobachtet werden. Nach

weiteren 600 Sekunden bei einer durchschnittlichen Leistung von 100 W ergab eine Dünnschichtchromatographie die vollständige Umsetzung von 5-Bromchinolin (**246**). Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und das Rohprodukt mit EtOAc (10 mL) gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und mit Kieselgel versetzt. Nach Destillation des Lösungsmittels unter Vakuum wurde säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 10:1) aufgereinigt. (4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (**245**) konnte als gelbliches Pulver gewonnen werden.

Ausbeute:	111 mg (60 %)	Theorie: 183 mg
DC:	EtOAc	R _f = 0.7
	Hex/EtOAc = 1:1	R _f = 0.28
	Hex/EtOAc = 8:2	R _f = 0.11
	Hex/EtOAc = 9:1	R _f = 0.04
HPLC-Bedingungen:	analytisch: Nucleosil 50-10, 300x4.6, <i>n</i> -Hex/1,4-Dioxan 10:5, 2 mL/min, t _R = 5.2 min	
Schmelzpunkt:	198 °C	
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 8,89 (dd, 1H, J = 1.5, 4.25, C ² -H), 8.54 (dd, 1H, J = 1.5, 8.5, C ⁴ -H), 8.51 (s, 1H, N-H austauschbar mit D ₂ O), 7.64 (d, 2H, J = 4.5, C ⁶ -H, C ⁸ -H), 7.51 (dd, 1H, J = 4.25, 8.5, C ³ -H), 7.36 (m, 1H, C ⁷ -H), 7.27 (d, 2H, J = 9, 2 x C ^{3*} -H), 7.06 (d, 2H, J = 9, 2 x C ^{2*} -H)	
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 150.42 (C ² -H), 148.88 (C ¹⁰), 143.46 (C ⁵ -NH), 139.24 (C ^{1*} -NH), 131.11 (C ⁴ -H), 129.59 (C ⁸ -H), 128.90 (2 x C ^{3*} -H), 123.07 (C ^{4*} -Cl), 122.47 (C ⁶ -H), 121.79 (C ⁹), 120.23 (C ³ -H), 118.48 (2 x C ^{2*} -H), 113.99 (C ⁷ -H)	

IR (KBr): 3248 (m), 3033 (w), 1611 (w), 1586 (s), 1571 (s), 1523 (m), 1492 (s), 1464 (s), 1407 (s), 1386 (m), 1356 (m), 1318 (s), 1298 (s), 1286 (s), 1244 (m), 1169 (w), 1148 (w), 1104 (w), 1084 (m), 1062 (m), 1020 (w), 1008 (w), 822 (m), 800 (s), 764 (m), 749 (m), 648 (w), 566 (w)

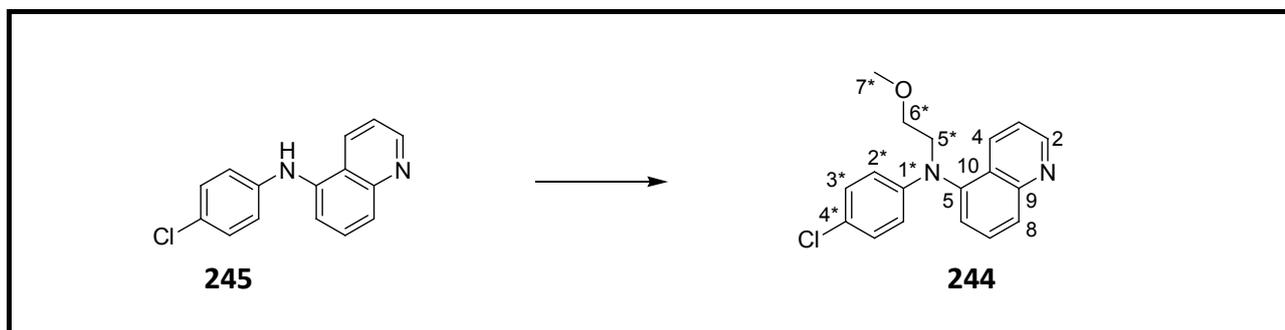
Elementaranalyse: C₁₅H₁₁ClN₂ (254.71)

berechnet	C: 70.73	H: 4.35	N: 11.00
gefunden	C: 70.83	H: 4.48	N: 10.96

Masse: ESI+ (berechnet für M+H):

berechnet	255.0
gefunden	254.9 (100.0), 255.9 (16.2), 256.9 (33.1)

10.2.81 (4-Chloro-phenyl)-(2-methoxy-ethyl)-chinolin-5-yl-amin (**244**)

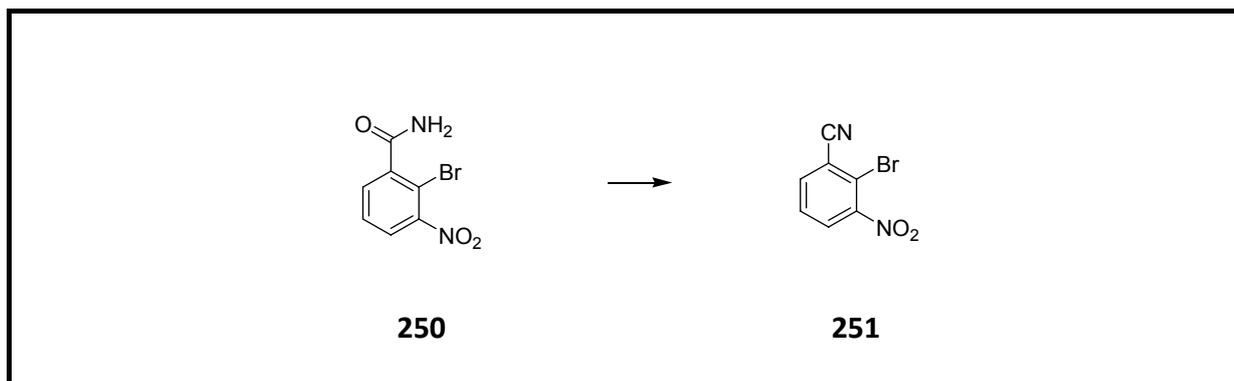


In einem ausgeheizten 25 mL Schlenkcolben wurde unter Argon 251 mg (4-Chloro-phenyl)-chinolin-5-yl-amin (**245**) (0.98 mmol, 1 Äquiv.) in 5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 822 mg wasserfreiem Kaliumcarbonat (5.9 mmol, 6 Äquiv.) versetzt. Es erfolgte eine tropfenweise Zugabe von 158 µL 2-Bromethylmethylether (1.56 mmol, 1.6 Äquiv.) zum zweiphasigen Gemisch. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 36 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch in Wasser (10 mL) gegeben und mit EtOAc (10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Vorreinigung erfolgte per Säulenchromatographie (*n*-Hex/EtOAc 5:1). Abschließende Reinigung der Mischphasen erfolgte über HPLC. (4-Chloro-phenyl)-(2-methoxy-ethyl)-chinolin-5-yl-amin (**244**) konnte als gelbes Öl gewonnen werden.

Ausbeute:	130 mg (41.9 %)	Theorie: 330 mg		
DC:	EtOAc	R _f = 0.7		
	Hex/EtOAc = 1:1	R _f = 0.3		
	Hex/EtOAc = 8:2	R _f = 0.15		
	Hex/EtOAc = 9:1	R _f = 0.1		
HPLC-Bedingungen:	analytisch: Nucleosil 50-10, 300x4.6, <i>n</i> -Hex/1,4-Dioxan 10:5, 2 mL/min, t _R = 3.6 min			
	präparativ: Nucleosil 50-10, 250x20, <i>n</i> -Hex/1,4-Dioxan 10:5, 7 mL/min			
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆):			
	8.91 (dd, 1H, J = 1.5 J = 4.0, C ² -H), 8.03 (t, 2H, J = 7.5, C ⁴ -H, C ⁸ -H), 7.86 (t, 1H, J = 7.5, C ⁷ -H), 7.61 (dd, 1H, J = 1.0, J = 7.5, C ⁶ -H), 7.47 (dd, 1H, J = 4.0, J = 8.5, C ³ -H), 7.10 (m, 2H, 2 x C ^{3*} -H), 6.47 (m, 2H, 2 x C ^{2*} -H), 3.96 (t, 2H, J = 5.75, C ^{6*} -H ₂), 3.52 (t, 2H, J = 5.75, C ^{5*} -H ₂), 3.17 (s, 3H, C ^{7*} -H ₃)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆):			
	150.59 (C ² -H), 149.07 (C ⁹), 147.89 (C ⁵ -NH), 142.45 (C ^{1*} -NH), 131.79 (C ⁴ -H), 130.14 (C ⁷ -H), 128.58 (C ⁸ -H), 127.96 (C ⁶ -H), 126.85 (C ^{4*} -Cl), 125.84 (C ³ -H), 121.59 (2 x C ^{3*} -H), 120.74 (2 x C ^{2*} -H), 114.90 (C ¹⁰), 69.58 (C ^{5*} -H ₂), 58.06 (C ^{7*} -H ₃), 51.91 (C ^{6*} -H ₂)			
IR (KBr):	2925 (w), 2877 (w), 1592 (s), 1569 (m), 1493 (s), 1471 (m), 1393 (m), 1360 (m), 1309 (m), 1257 (m), 1196 (m), 1122 (s), 1004 (m), 805 (s), 709 (s), 632 (w)			
Elementaranalyse:	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₂ O (312.79)			
	berechnet	C: 69.12	H: 5.48	N: 8.96
	gefunden	C: 68.87	H: 5.49	N: 8.77

Masse:	MALDI+ (berechnet für M+H):
	berechnet 313.10
	gefunden 313.59 (100), 315.64 (38)

10.2.82 2-Bromo-3-nitro-benzonitril (**251**)^[273]



120 mg des Amids **250** (0.489 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 1.5 mL abs. Pyridin gelöst und auf 0-5 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 55 µL POCl₃ (90 mg, 0.587 mmol, 1.2 Äquiv.) und die Reaktionslösung wurde unter Eisbadkühlung für eine Stunde weitergerührt. Nach vollständigem Umsatz des Amids **250** wurde der Ansatz hydrolysiert. Der ausgefallene Niederschlag konnte durch Filtration gewonnen werden. Nach abschließender Umkristallisation (MeOH/H₂O) und Trocknen im Ölpumpevakuum erfolgte die Isolierung von 81 mg des Nitrils **251** als farbloser Feststoff.

Ausbeute:	81 mg (73 %)	Theorie: 111 mg
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 1:1	R _f = 0.50
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.34
Schmelzpunkt:	134 °C	Lit.: ^[273] 136-137 °C
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d ₆):	
	8.34 (dd, 1H, J = 1.5, J = 8.4, Aromat-CH), 8.25 (dd, 1H, J = 1.5, J = 8.4, Aromat-CH), 7.83 (t, 1H, J = 8.1, Aromat-CH)	

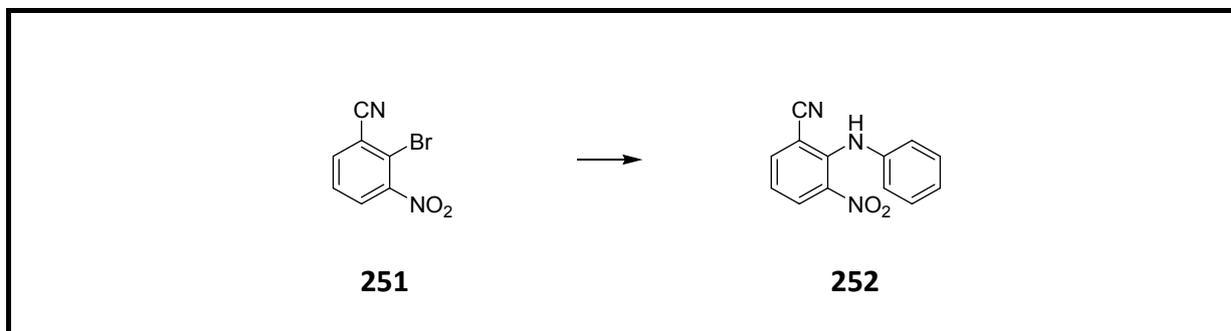
$^{13}\text{C-NMR}$: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
150.49, 138.03, 129.96, 129.43, 117.40, 117.03, 116.15

IR (KBr): 3129 (w), 3078 (w), 3069 (w), 3021 (w), 2236 (m), 1969 (w), 1918 (w), 1861 (w), 1741 (w), 1589 (s), 1535 (s), 1448 (m), 1425 (s), 1360 (s), 1306 (w), 1280 (w), 1236 (w), 1190 (w), 1156 (w), 1109 (w), 1040 (m), 988 (w), 932 (w), 911 (m), 810 (s), 790 (s), 736 (s), 710 (s), 699 (m), 614 (w), 571 (w)

Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_3\text{BrN}_2\text{O}_2$ (227.015)

berechnet	C: 37.03	H: 1.33	N: 12.34
gefunden	C: 36.81	H: 1.47	N: 12.27

10.2.83 3-Nitro-2-phenylamino-benzonitril (**252**)

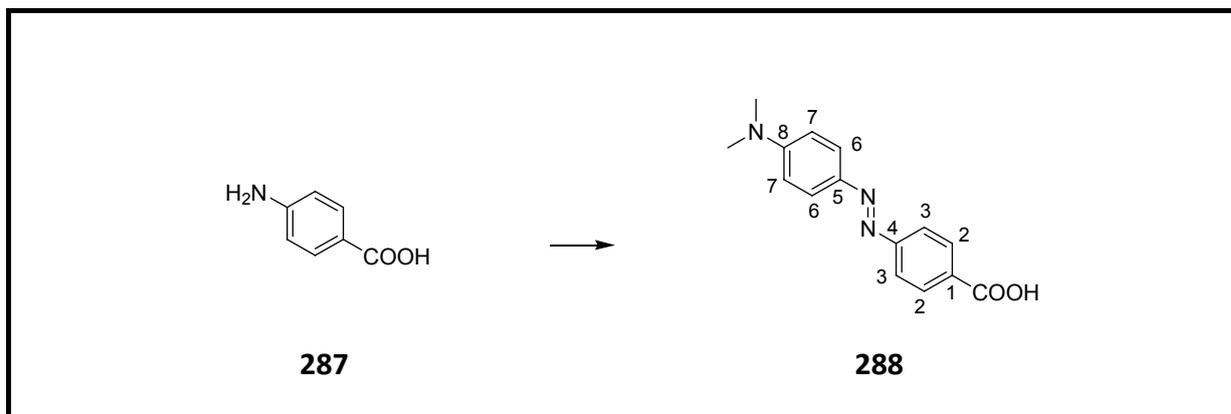


In einem 10 mL Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 47.9 mg Nitril **251** (0.211 mmol, 1 Äquiv.), 22 μL Anilin (23 mg, 0.232 mmol, 1.1 Äquiv.), 30.4 mg Natrium-*tert*-butylat (0.3165 mmol, 1.5 Äquiv.) und $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (4.3 mg, 2.5 mol%) in 1 mL abs. Toluol unter Argon gelöst. Die Mikrowellenreaktion wurde in einem Discover CEM Mikrowellenreaktor durchgeführt. Dabei wurde die Reaktion eine Stunde bei einer durchschnittlichen Leistung von 100 W durchgeführt. Anschließend wurde eine Analyse durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt, die eine vollständige Umsetzung des Nitrils **251** aufzeigte. Nach Verdampfen des Lösungsmittels gelang die Aufreinigung des Reaktionsgemisches säulenchromatographisch (*n*-Hex/EtOAc 5:1). Nach Trocknen im

Ölpumpenvakuum konnte das Benzonitril **252** als orange-farbener Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute:	9.2 mg (18 %)	Theorie: 50.5 mg		
DC:	<i>n</i> -Hex/EtOAc 3:1	R _f = 0.65		
	<i>n</i> -Hex/EtOAc 5:1	R _f = 0.29		
Schmelzpunkt:	90 °C	Lit.: ^[274] 89-91 °C		
¹ H-NMR:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d ₆): 9.16 (bs, 1H, NH), 8.30 (m, 1H, Aromat-CH), 8.06 (m, Aromat-CH), 7.4-6.8 (m, 6H, 3xAromat-CH)			
¹³ C-NMR:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO-d ₆): 141.67, 140.75, 140.61, 140.31, 130.88, 128.97, 122.98, 121.40, 119.21, 115.69, 106.54			
IR (KBr):	3432 (w), 3320 (m), 3089 (w), 2928 (w), 2851 (w), 2218 (w), 1952 (w), 1910 (w), 1870 (w), 1654 (w), 1607 (m), 1592 (s), 1570 (m), 1526 (m), 1497 (s), 1482 (s), 1453 (s), 1391 (m), 1350 (m), 1269 (s), 1173 (w), 1156 (w), 1093 (w), 1074 (w), 1024 (w), 1006 (w), 977 (w), 932 (w), 903 (w), 831 (w), 804 (w), 757 (m), 743 (m), 717 (w), 694 (m), 591 (w), 567 (w)			
Elementaranalyse:	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₂ (239.229)			
	berechnet	C: 65.27	H: 3.79	N: 17.56
	gefunden	C: 65.29	H: 3.96	N: 17.33

10.2.84 4-(4-Dimethylamino-phenylazo)-benzoesäure (Dabcytl) (**288**)



6.86 g 4-Aminobenzoesäure (**287**) (50 mmol, 1 Äquiv.) wurden in einer Lösung aus 6.25 mL HCl (12 M, 75 mmol, 1.5 Äquiv.) in 15 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe einer Lösung von 6.9 g Natriumnitrit (0.10 mol, 2 Äquiv.) in 15 mL Wasser wurde die Reaktionslösung mit 6.34 mL N,N`-Dimethylanilin (6.05 g, 50 mmol, 1 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C für eine Stunde weitergerührt und anschließend langsam auf RT gebracht. Durch die Zugabe von K₂CO₃ wurde auf pH 7 eingestellt und der rote Niederschlag abfiltriert. Nach gründlichem Waschen mit Wasser und Trocknen im Ölpumpenvakuum konnten 10.62 g 4-(4-Dimethylamino-phenylazo)-benzoesäure (**288**) als rotes Pulver nach mehrmaliger Umkristallisation aus EtOH gewonnen werden.

Ausbeute: 10.62 g (78 %) Theorie: 13.46 g

DC: EtOAc R_f = 0.73
n-Hex/EtOAc 1:1 R_f = 0.37
n-Hex/EtOAc 1:2 R_f = 0.21
 DCM/MeOH 19:1 R_f = 0.15

Schmelzpunkt: 275-278 °C Lit.:263 °C^[275]

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆):
 13.06 (bs, 1H, COOH), 8.07 (d, 2H, J = 8.75, 2xC²-H), 7.83 (m, 4H,

$2\times C^3-H$, $2\times C^6-H$), 6.84 (d, 2H, $J = 9.25$, $2\times C^7-H$), 3.07 (s, 6H, $2\times C-H_3$)

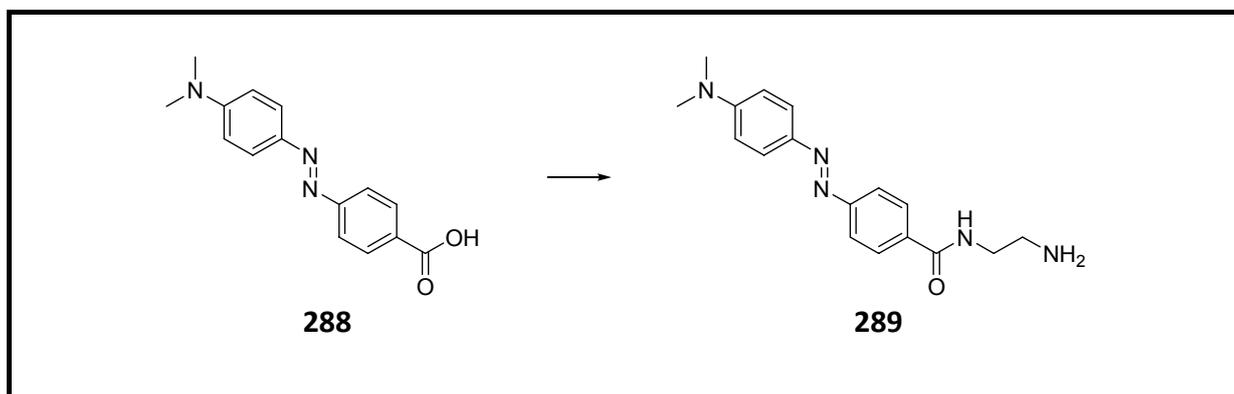
^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
 166.73 (COOH), 154.93 (C^4), 152.85 (C^5), 142.55 (C^1), 130.76 (C^8),
 130.33 ($2\times C^2-H$), 125.10 ($2\times C^7-H$), 121.55 ($2\times C^3-H$), 111.45 ($2\times C^6-H$),
 39.69 ($(N(C-H_3)_2)$)

IR (KBr): 3448 (w), 1681 (s), 1594 (s), 1521 (m), 1420 (m), 1362 (s), 1298 (s),
 1249 (m), 1134 (s), 943 (m), 862 (m), 820 (m), 774 (w), 726 (w), 692
 (w)

Elementaranalyse: $C_{15}H_{15}N_3O_2$ (269.30)

berechnet	C: 66.90	H: 5.61	N: 15.60
gefunden	C: 67.03	H: 5.79	N: 15.57

10.2.85 Dabcyl-NH(CH₂)₂NH₂ (**289**)



50.8 mg Dabcyl (**288**) (0.188 mmol, 1 Äquiv.) und 70.9 μ L Ethylendiamin (**148**) (63.6 mg, 0.943 mmol, 5 Äquiv.) wurden in 2 mL DMF gelöst und mit 58.4 μ L DIC (47.6 mg, 0.377 mmol, 2 Äquiv.) und 50.9 mg HOBt (0.377 mmol, 2 Äquiv.) bei RT versetzt. Nach drei Stunden wurde der Ansatz mit 2 mL Wasser versetzt und mit Et₂O (5 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und im Ölpumpenvakuum eingengt. Der säulenchromatographische Aufreinigung (MeOH/EtOAc 9:1) folgte eine Aufreinigung über HPLC, so dass 21.5 mg (26 %) von **289** gewonnen werden konnten.

Ausbeute:	21.5 mg (26 %)	Theorie: 80 mg
HPLC-Bedingungen:	analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 69:31, 0.8 mL/min, $t_R = 4.44$ min präparativ: Reprosil AQ 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 69:31, 7 mL/min, $t_R = 17.0$ min	
$^1\text{H-NMR}$:	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O): 7.96 (d, 2H, J = 8.5, Aromat-H), 7.80 (m, 4H, Aromat-H), 6.83 (d, 2H, J = 9.25, Aromat-H), 3.52 (t, 2H, J = 6.0, CH $_2$), 3.04 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$), 3.00 (t, 2H, J = 6.0, CH $_2$)	
$^{13}\text{C-NMR}$:	(δ[ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O): 166.27, 154.04, 152.79, 142.52, 134.10, 128.39, 125.02, 121.39, 111.49, 39.47, 38.25, 37.10	
Masse:	ESI+ (C $_{17}$ H $_{21}$ N $_5$ O): berechnet 312.18 [M+H] $^+$, 623.5 [2M+H] $^+$ gefunden 312.0 (100), 623.5 (13)	

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.9 MHz, DMSO- d_6):
165.91, 153.94, 152.78, 142.51, 134.54, 128.19, 125.00, 121.44,
111.48, 52.24, 52.22, 50.75, 36.73, 36.68

Masse: ESI+ ($\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}$):
berechnet 398.27 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 199.63 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$
gefunden 398.1 (100), 199.4 (24)

10.3 Peptide

10.3.1 Allgemeines Verfahren der Festphasenpeptidsynthese (FPPS)

Die FPPS erfolgte in einer mit Filter (PE-Platte, Stärke 4 mm, mittlere Porenweite 50 μm , Werkstoff PE, Porex Technologies GmbH) bestückten Spritze, in der das Fmoc-geschützte Rinkamid-MBHA-Harz (Novabiochem) (100 mg 72 μmol , cap = 0.72 mmol/g) eingewogen wurde. Anschließend wurde das Harz zweimal mit 2 mL CH_2Cl_2 für jeweils 10 min zum Quellen der Harzkügelchen behandelt. Das Umstellen des Lösungsmittels auf NMP erfolgte durch fünfmaliges Spülen mit NMP für jeweils fünf Minuten. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz wurde dieses dreimal (15 min, 10 min, 2 min) mit Piperidin (25% in DMF, 2 mL) versetzt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen. Für die Kupplung der ersten Aminosäure wurde z.B. eine Lösung von Fmoc-(D)Arg(Pbf)-OH (94 mg, 144 μmol , 2 Äquiv.), DIC (33 μL , 27 mg, 216 μmol , 3 Äquiv.) und HOBT (33 mg, 216 μmol , 3 Äquiv.) in 2 mL NMP auf das Harz gegeben und für drei Std. auf dem Schwenktisch zur Reaktion gebracht. Zur Reaktionskontrolle wurde die Reaktionslösung über Filter vom Harz getrennt und das Harz gründlich mit NMP gewaschen. Die quantitative Kupplung wurde mittels Kaiser-Test überprüft. Bei nicht vollständiger Kupplung (positiver Kaisertest) wurde die Reaktionslösung mit DIC (11 μL , 9 mg, 72 μmol , 1 Äquiv.) und HOBT (11 mg, 72 μmol , 1 Äquiv.) versetzt und mit dem Harz für weitere drei Std. zur Reaktion gebracht. Bei quantitativer Kupplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe, wie oben erwähnt abgespalten, das Harz fünfmal mit NMP gewaschen und die nächste Fmoc-Aminosäure an die feste Phase gekuppelt. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz fünfmal mit NMP und

anschließend fünfmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Das intensive Trocknen des Harzes erfolgte im Ölpumpenvakuum. Zur Abspaltung des synthetisierten Peptides wurde das Harz mit einer Abspalllösung (TFA (1650 μL), H_2O (100 μL), Thioanisol (100 μL), PhOH (50 mg) und EDT (50 μL) für fünf Std. auf dem Schüttler behandelt. Die Abspalllösung, die das Peptid enthält, wird auf vorgekühlten Ether gegeben. Das Harz wurde mit 2 mL TFA gewaschen, und die Waschlösung wird ebenfalls auf den vorgekühlten Ether gegeben. Zur vollständigen Peptidfällung wurde der Ansatz bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ stengelassen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (1800 G) und der überstehende Ether abdekantiert. Das Tripeptid wurde weitere fünfmal mit Ether behandelt (Ultraschallbad) und abzentrifugiert. Nach vorsichtigem entfernen von restlichem Ether im leichtem Vakuum wurde der Niederschlag mit DEPC behandeltem Wasser (1.5 mL) aufgenommen. 10 μL der Lösung wurden zur massenspektrometrischen Untersuchung zurückgehalten und der Rest mittels SpeedVac eingengt, um flüchtige Verunreinigungen zu entfernen. Nach anschließender unerlässlicher Aufreinigung über HPLC und Trocknen durch Lyophilisieren wird das TFA-Salz des Peptides wieder in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und einer abschließenden massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Die Konzentrationsbestimmung des Tripeptides vor den RNA-Bindungsassays erfolgte bei bekanntem Extinktionskoeffizienten im UV und ansonsten gravimetrisch.

 $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Lactam}-(\text{D})\text{Arg-CONH}_2$ **154**

Ausbeute 4.7 mg (40 %, 20 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 0.8 mL/min, $t_R = 14.64$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 7 mL/min, $t_R = 22.6$ min;

MS (MALDI) m/z (%) = 629.80 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$;

MS (ESI) m/z (%) = 630.4 (5.59) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 315.7 (100.00) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_{13}\text{O}_5$ berechnet 629.36

 $\text{H}_2\text{N}-(\text{D})\text{Arg-Lactam}-(\text{D})\text{Lys-CONH}_2$ **155**

Ausbeute: 4.2 mg (38 %, 19 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 90:10, 0.8 mL/min, $t_R = 3.11$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 92:8, 7 mL/min, $t_R = 26.8$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 602.39 (13.25) $[M+H]^+$, 301.71 (100.00) $[M+2H]^{2+}$

$C_{27}H_{43}N_{13}O_5$ berechnet 601.35

H₂N-(D)Lys-Lactam-(D)Arg-CONH₂ 156

Ausbeute: 4.7 mg (39 %, 21 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 92:8, 0.8 mL/min, $t_R = 4.52$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 92:8, 7 mL/min, $t_R = 24.2$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 602.21 (9.52) $[M+H]^+$, 301.71 (100.00) $[M+2H]^{2+}$

$C_{27}H_{43}N_{13}O_5$ berechnet 601.35

H₂N-(D)Lys-Lactam-(D)Lys-CONH₂ 157

Ausbeute: 5.2 mg (49 %, 19 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

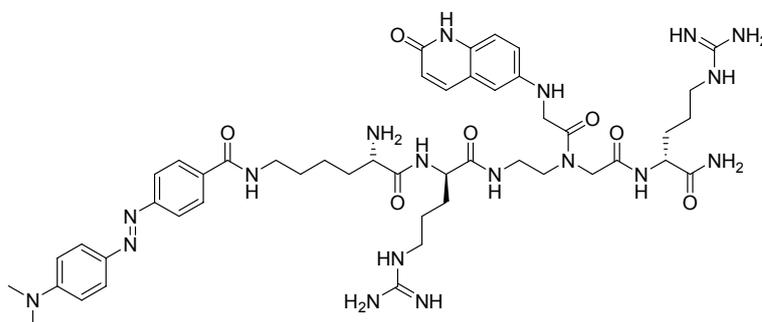
HPLC-Bedingungen:

analytisch: Bischoff Prontosil-H, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 93:7, 0.8 mL/min, $t_R = 4.22$ min;

präparativ: Bischoff Prontosil-H, 250x16, 0.1 % TFA/MeCN 100:6, 7 mL/min, $t_R = 19.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 574.35 (100.00) $[M+H]^+$, 287.72 (40.21) $[M+2H]^{2+}$

$C_{27}H_{43}N_9O_5$ berechnet 573.34



H₂N-(L)Lys^{Dabicyl}-(D)Arg-Lactam-(D)Arg-CONH₂ 291

Ausbeute: 4.32 mg (26 %, 21 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 0` 99:1 → 20` 30:70, 0.8 mL/min, $t_R = 18.82$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:40, 7 mL/min, $t_R = 16.2$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 1009.91 (29.86) $[M+H]^+$, 505.31 (100) $[M+2H]^{2+}$

$C_{48}H_{68}N_{18}O_7$ berechnet 1008.56

H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ 158

Ausbeute: 11.4 mg (31 %, 45 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 0.8 mL/min, $t_R = 5.07$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 7 mL/min, $t_R = 26.0$ min;

MS (MALDI) m/z (%) = 629.64 (100) $[M+H]^+$;

MS (ESI) m/z (%) = 629.3 (2.73) $[M+H]^+$, 315.1 (100) $[M+2H]^{2+}$, 210.3 (92.88) $[M+3H]^{3+}$

$C_{27}H_{44}N_{14}O_4$ berechnet 628.37

H₂N-(D)Arg-Amidin-(D)Lys-CONH₂ 159

Ausbeute: 9.34 mg (59 %, 25 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 91:9, 0.8 mL/min, $t_R = 4.02$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 7 mL/min, $t_R = 19.8$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 601.34 (7.31) $[M+H]^+$, 301.13 (100.00) $[M+2H]^{2+}$, 200.88 (37.00) $[M+3H]^{3+}$

$C_{27}H_{44}N_{12}O_4$ berechnet 600.36

H₂N-(D)Lys-Amidin-(D)Arg-CONH₂ 160

Ausbeute: 10.2 mg (64 %, 25 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 91:9, 0.8 mL/min, $t_R = 4.10$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 7 mL/min, $t_R = 20.4$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 601.23 (3.13) $[M+H]^+$, 301.07 (100.00) $[M+2H]^{2+}$, 200.94 (12.16) $[M+3H]^{3+}$,

150.59 (0.07) $[M+4H]^{4+}$, 120.65 (0.01) $[M+5H]^{5+}$

$C_{27}H_{44}N_{12}O_4$ berechnet 600.36

H₂N-(D)Lys-Amidin-(D)Lys-CONH₂ 161

Ausbeute: 6.27 mg (59 %, 17 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

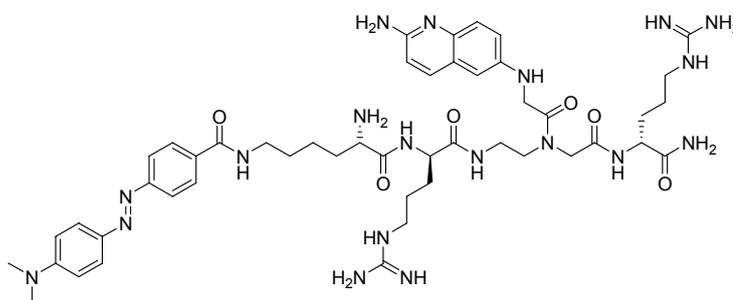
analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 0.8 mL/min, $t_R = 4.85$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:10, 7 mL/min, $t_R = 20.0$ min;

MS (MALDI) m/z (%) = 572.51 (100) $[M+H]^+$;

MS (ESI) m/z (%) = 573.19 (13.70) $[M+H]^+$, 287.08 (100.00) $[M+2H]^{2+}$

$C_{27}H_{44}N_{10}O_4$ berechnet 572.36

**H₂N-(L)Lys^{Dabcyl}-(D)Arg-Amidin-(D)Arg-CONH₂ 292**

Ausbeute: 5.14 mg (24 %, 19 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.7 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Macherey-Nagel NucleoDur, 150x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 0.8 mL/min, $t_R = 4.51$ min;

präparativ: Macherey-Nagel NucleoDur, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 7 mL/min, $t_R = 17.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 504.89 (51.53) $[M+2H]^{2+}$, 336.88 (100.00) $[M+3H]^{3+}$, 252.83 (14.64) $[M+4H]^{4+}$

$C_{48}H_{69}N_{19}O_6$ berechnet 1007.57

H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ 169

Ausbeute: 4.2 mg (30 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 0.8 mL/min, $t_R = 2.37$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 7 mL/min, $t_R = 10.0$ min;

präparative Nachtrennung: Bischoff-Prontosil, 250x16, 0.1% TFA/MeCN 100:6.5, 7 mL/min,
 $t_R = 11.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 507.31 (1.11) $[M+H]^+$, 254.11 (100) $[M+2H]^{2+}$, 170.40 (2.29) $[M+3H]^{3+}$

$C_{21}H_{38}N_{12}O_3$ berechnet 506.32

H₂N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ 170

Ausbeute: 5.4 mg (40 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 0.8 mL/min, $t_R = 2.35$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 7 mL/min, $t_R = 9.8$ min;

präparative Nachtrennung: Bischoff-Prontosil, 250x16, 0.1% TFA/MeCN 100:6.5, 7 mL/min,
 $t_R = 10.6$ min;

oder

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 0.8 mL/min, $t_R = 2.40$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:8, 7.5 mL/min, $t_R = 9.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 479.10 (11.55) $[M+H]^+$, 240.00 (100) $[M+2H]^{2+}$

$C_{21}H_{38}N_{10}O_3$ berechnet 478.31

H₂N-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH₂ 171

Ausbeute: 2.3 mg (17 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 0.8 mL/min, $t_R = 2.39$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 7 mL/min, $t_R = 10.2$ min;

präparative Nachtrennung: Bischoff-Prontosil, 250x16, 0.1 % TFA/MeCN 100:6.5, 7 mL/min,
 $t_R = 10.0$ min;

oder

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1%TFA/MeCN 94:6, 0.8 mL/min, $t_R = 4.11$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1%TFA/MeCN 100:6, 7 mL/min, $t_R = 16.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 479.2 (14.09) $[M+H]^+$, 240.1 (100) $[M+2H]^{2+}$

$C_{21}H_{38}N_{10}O_3$ berechnet 478.31

H₂N-(D)Lys-(D)2Pyrim-(D)Lys-CONH₂ 172

Ausbeute: 2.4 mg (18 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

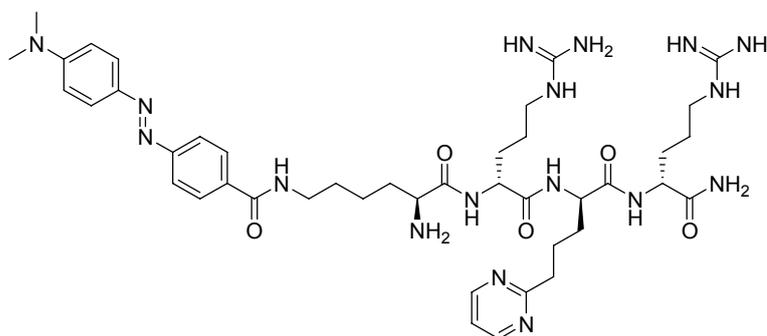
HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 0.8 mL/min, $t_R = 2.35$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:23, 7 mL/min, $t_R = 9.2$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 451.18 (12.43) $[M+H]^+$, 226.01 (100) $[M+2H]^{2+}$

C₂₁H₃₈N₈O₃ berechnet 450.31

**H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ 293**

Ausbeute: 10.4 mg (31 %, 50 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 70:30, 0.8 mL/min, $t_R = 3.96$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 70:30, 7 mL/min, $t_R = 15.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 886.76 (5.00) $[M+H]^+$, 443.84 (100) $[M+2H]^{2+}$, 296.20 (33.01) $[M+3H]^{3+}$

C₄₂H₆₃N₁₇O₅ berechnet 885.52

H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(L)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ 294

Ausbeute: 9.34 mg (28 %, 50 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.54 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 68:32, 0.8 mL/min, $t_R = 5.44$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 67:33, 7 mL/min, $t_R = 15.4$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 443.84 (61.08) $[M+2H]^{2+}$, 296.14 (100) $[M+3H]^{3+}$

C₄₂H₆₃N₁₇O₅ berechnet 885.52

H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-CONH₂ 295

Ausbeute: 19 mg (64 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 73:27, 0.8 mL/min, $t_R = 4.22$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 73:27, 7 mL/min, $t_R = 15.6$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 433.33 (100) $[M+2H]^{2+}$, 289.19 (98.01) $[M+3H]^{3+}$, 490.37 (13.75) $[M+TFA+2H]^{2+}$, 327.24 (8.34) $[M+TFA+3H]^{3+}$

C₃₉H₆₄N₁₈O₅ berechnet 864.53

H₂N-(L)Lys^{DabcyI}-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ 296

Ausbeute: 17 mg (58 %, 30 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 0.8 mL/min, $t_R = 4.45$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 7 mL/min, $t_R = 15.6$ min;

MS (MALDI) m/z (%) = 864.33 (100) $[M+H]^+$;

MS (ESI) m/z (%) = 433.33 (100) $[M+2H]^{2+}$, 289.25 (86.30) $[M+3H]^{3+}$, 979.42 (1.87) $[M+TFA+H]^+$, 490.37 (21.82) $[M+TFA+2H]^{2+}$, 327.18 (10.77) $[M+TFA+3H]^{3+}$

C₃₉H₆₄N₁₈O₅ berechnet 864.53

DabcyI-Gly-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ 297

Ausbeute: 32.4 mg (89 %, 50 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.64 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 73:27, 0.8 mL/min, $t_R = 4.06$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 73:27, 7 mL/min, $t_R = 18.2$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 794.6 (12.02) $[M+H]^+$, 397.8 (100) $[M+2H]^{2+}$, 265.5 (50.00) $[M+3H]^{3+}$

C₃₅H₅₅N₁₇O₅ berechnet 793.46

DabcyI-Gly-(D)Arg-(D)2Pyrim-(D)Arg-CONH₂ 298

Ausbeute: 4.2 mg (31 %, 20 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.64 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 70:30, 0.8 mL/min, $t_R = 4.50$ min;
präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 70:30, 7 mL/min, $t_R = 16.6$ min;
MS (ESI) m/z (%) = 815.7 (38.00) $[M+H]^+$, 408.3 (100) $[M+2H]^{2+}$, 272.4 (10.30) $[M+3H]^{3+}$
MS (MALDI) m/z (%) = 838.08 (100) $[M+Na]^+$
 $C_{38}H_{54}N_{16}O_5$ berechnet 814.45

Dabcyl-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ 299

Ausbeute: 9.3 mg (67 %, 20 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.64 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 0.8 mL/min, $t_R = 4.16$ min;
präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 74:26, 7 mL/min, $t_R = 16.0$ min;
MS (ESI) m/z (%) = 737.3 (7.45) $[M+H]^+$, 369.1 (100) $[M+2H]^{2+}$, 246.3 (36.43) $[M+3H]^{3+}$
 $C_{35}H_{40}N_{14}O_5$ berechnet 736.33

Dabcyl-Gly-(L)Arg-(D)2Pyrim-(L)Arg-Gly-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ 300

Ausbeute: 3.2 mg (54 %, 10 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.64 mmol/g). HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 75:25, 0.8 mL/min, $t_R = 3.92$ min;
präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 75:25, 7 mL/min, $t_R = 25.2$ min;
MS (ESI) m/z (%) = 642.5 (100) $[M+2H]^{2+}$, 428.6 (95.81) $[M+3H]^{3+}$, 321.6 (63.51) $[M+4H]^{4+}$
 $C_{58}H_{78}N_{26}O_9$ berechnet 1282.64

Dabcyl-KSFTTKALGISYGRKKRRRPPQGSQTHQVLSKQ-CONH₂ 301

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 0` 99:1 → 5` 30:70, 0.8 mL/min, $t_R = 19.03$ min;
analytisch: Gemini 5 μ m C18, 150x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 75:25, 0.8 mL/min, $t_R = 2.80$ min;
präparativ: Gemini 10 μ m C18, 250x10, 0.1 % TFA/MeCN 0` 75:25 → 10` 68:32, 3.7 mL/min, $t_R = 14.0$ min;
MS (MALDI) m/z (%) = 4548.07 (100) $[M+H]^+$, 2276.71 (5) $[M+2H]^{2+}$, 9104.75 $[2M+H]^+$
 $C_{199}H_{328}N_{70}O_{53}$ berechnet 4546.51

H₂N-(L)Lys-(L)Lys-(L)Lys-CONH₂ 166

Ausbeute: 42.32 mg (66 %, 100 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA 100%, 0.8 mL/min, $t_R = 2.88$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA 100%, 7 mL/min, $t_R = 14.0$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 402.2 (100) [M+H]⁺, 201.5 (50.31) [M+2H]²⁺, 516.1 (20.58) [M+TFA+H]⁺

C₁₈H₃₉N₇O₃ berechnet 401.31

H₂N-(L)Arg-(L)Arg-(L)Arg-CONH₂ 163

Ausbeute: 35.4 mg (49 %, 100 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 85:15, 0.8 mL/min, $t_R = 1.98$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:4, 7 mL/min, $t_R = 17.4$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 486.4 (7.14) [M+H]⁺, 243.7 (100) [M+2H]²⁺, 162.6 (25.53) [M+3H]³⁺, 600.2

(6.78) [M+TFA+H]⁺, 300.8 (11.66) [M+TFA+2H]²⁺, 714.3 (5.53) [M+2TFA+H]⁺, 357.4 (5.53)

[M+2TFA+2H]⁺

C₁₈H₃₉N₁₃O₃ berechnet 485.33

H₂N-(L)His-(L)His-(L)His-CONH₂ 167

Ausbeute: 40.3 mg (61 %, 100 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 95:5, 0.8 mL/min, $t_R = 2.96$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA/MeCN 100:4, 7 mL/min, $t_R = 15.0$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 429.1 (100) [M+H]⁺, 215.0 (39.13) [M+2H]²⁺

C₁₈H₂₄N₁₀O₃ berechnet 428.20

H₂N-(L)Lys-(L)Arg-(L)Lys-CONH₂ 165

Ausbeute: 50.1 mg (76 %, 100 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 0` 99:1 → 5` 30:70, 0.8 mL/min, $t_R = 3.19$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA 100%, 7 mL/min, $t_R = 17.2$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 430.3 (100) [M+H]⁺, 544.5 (5.60) [M+TFA+H]⁺

C₁₈H₃₉N₉O₃ berechnet 429.32

H₂N-(L)Arg-(L)Lys-(L)Arg-CONH₂ 162

Ausbeute: 49.6 mg (73 %, 100 mg Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74 mmol/g).

HPLC-Bedingungen:

analytisch: Reprosil AQ, 125x4.6, 0.1 % TFA/MeCN 0` 99:1 → 5` 30:70, 0.8 mL/min, $t_R = 4.64$ min;

präparativ: Reprosil AQ, 250x20, 0.1 % TFA 100%, 7 mL/min, $t_R = 14.4$ min;

MS (ESI) m/z (%) = 458.3 (100) [M+H]⁺, 229.7 (3.26) [M+2H]²⁺, 572.4 (22.95) [M+TFA+H]⁺

C₁₈H₃₉N₁₁O₃ berechnet 457.32

11. METHODEN ZUR BIOPHYSIKALISCHEN UND BIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG

11.1 FRET-Assay^[167]

Der FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-Assay wurde in schwarzen 96 Well Mikrotiterplatten (Corning 6860 und nicht-bindende Oberfläche) durchgeführt. Die Messung erfolgt in einem TK-Puffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.01 % Triton-X100) bei pH 7.4 oder 6.0 und einem Gesamtvolumen pro Well von 100 μ L. Das an beiden Enden Farbstoffmarkierte Tat-Protein (FtatRhd) (Fluorescein-AAARKKRRQRRRAAC-Tetramethylrhodamin) (Thermo Electron Corporation, Ulm) und die jeweilige Mutante der TAR-RNA (HIV-1 und HIV-2) (Biospring, Frankfurt am Main) (Abbildung 41 und Abbildung 42) wurden mit einer Konzentration von 10 nM vorgelegt. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte bei 37 °C (Tecan safire²; λ_{ex} = 489 nm, λ_{em} = 590 nm). Zuerst wurden die Fluoreszenzen von reinem Tat₄₉₋₅₇-Peptid und des Tat/TAR-Komplexes bestimmt. Aus den Werten war es möglich den Verstärkungsfaktor, der zwischen 2.5 (Minimum) und 2.7 (Maximum) lag und die jeweiligen Endpunkte der Titration zu bestimmen. Weitere Fluoreszenzbestimmungen wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen einer zu untersuchenden Substanz vorgenommen. Aus den resultierenden Daten wurde in einer Titrationskurve die Fluoreszenz gegen die Konkurrentkonzentration aufgetragen. Das arithmetische Mittel aus der Fluoreszenz des Tat/TAR-Komplexes und des unkomplexierten Tat-Peptides wurde als IC₅₀-Wert des RNA-Liganden definiert.

11.2 Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)^[178, 246]

Bedingungen: Im FCS-Assay wurde über denaturierte PAGE gereinigte Cy5 markierte TARwt-RNA und HPLC gereinigte Alexa Fluor 488 markierte 11mer Tat-Protein eingesetzt. Die Bindungsexperimente wurden in einem Volumen von 30 μ L auf einem mit Deckglas abgedeckten Objektträger durchgeführt. Dabei wurde ein Reaktionspuffer, der 75 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ und 0.5 mg/mL BSA (pH 7.0) verwendet. Für die Titrationsexperimente wurde die Konzentration von Tat bei 25 nM festgelegt und die Konzentration der TAR-RNA

wurde variiert von 0 zu 70 nM. Für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurden die Konzentrationen von Tat und TAR-RNA auf 25 nM festgesetzt und der Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen bei Raumtemperatur zugegeben. Anwendung findet ein Kombisystem aus einem kommerziellen Fluoreszenz-Korrelationsspektrometer (Confocor 2) und einem LSM 510, das als Konfokales Mikroskop eingesetzt wird. Dabei können die von den zwei Lasern (Ar und NeHe) erzeugten zwei Fluoreszenzemissionen über zwei Photodetektoren separat detektiert werden. Die beiden Laserstrahlen werden zu einem Strahl zusammengebracht und so auf die zu untersuchende Probe geleitet. Im dualen Emissionsmodus, der für zweifarbige Messungen charakteristisch ist, ist die zeitaufgelöste Fluoreszenz von zwei Fluorophoren enthalten, die anschließend gefiltert und separat von Photodioden detektiert und analysiert werden. Wenn die Konzentration der Probe im nanomolaren Bereich liegt, dann ist annähernd ein Partikel im Focus der Laser, was eine Untersuchung eines einzelnen Moleküls möglich macht. Wenn zwei unterschiedlich markierte Moleküle einen Komplex bilden, dann enthält die Funktion der Fluoreszenz-Kreuzkorrelation der zwei Emissionen Informationen über die Bewegung des doppelmarkierten Komplexes. Durch die Kreuzkorrelationsanalyse ist es möglich die Anzahl der Moleküle im Komplex und durch die Autokorrelationsanalyse (FCCS) die Anzahl der ungebundenen Moleküle zu erlangen.

11.3 Selektivitätsstudien^[167]

Die Selektivitätsstudien wurden in 96 Well Mikrotiterplatten (Corning 6860, schwarz, nicht-bindende Oberfläche) bei 37 °C bei einem Endvolumen von 100 μ L in TK-Puffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.01 % Triton-X100, pH 7.4) durchgeführt. Optional wurde Magnesium mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. 500 ng BSA und 10 nM der unterschiedlichen TAR-RNA-Mutanten (Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40) wurden in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Deren Fluoreszenz wurde zuerst bei 37 °C einzeln bestimmt (Tecan safire²; λ_{ex} = 483 nm, λ_{em} = 525 nm). Anschließend erfolgte die Titration von Dabcyl-markiertem Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Titrationskurve wurde bis zur Konstanz der Daten bestimmt. Durch Vergleich der gewonnenen Daten mit einer theoretischen Kurve ist die Verifikation eines 1:1 Komplexes möglich.

11.4 Zellkulturexperimente

11.4.1 Zellkulturexperimente HeLa P4^[167]

Die HeLa P4-Zellkulturexperimente wurden von M. Stoll in der Arbeitsgruppe von U. Dietrich (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) durchgeführt. Das Experiment basiert auf HeLa-P4-Zellen, die mit den für eine HIV-Infektion benötigten Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 ausgestattet sind. Das Gen für die β -Galactosidase befindet sich unter der Kontrolle des Promoters der LTR von HIV-1 (Abbildung 20). In einer 96 Well Mikrotiterplatte (100 μ L Medium) wurden die Zellen (1.2×10^4 /Well) über Nacht bei 37 °C exprimiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit HIV-1 Lai (30 μ L) infiziert und mit verschiedenen Konzentrationen von Testsubstanzen bei einem Gesamtvolumen von 100 μ L für 48 h inkubiert. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen gewaschen und für 10 min auf Eis mit Hilfe eines Erntepuffers [50 μ L, hergestellt aus Glycerol (2.5 mL), MES-Tris (1.25 mL), DTT (1 M, 25 μ L), Triton X-100 (250 μ L), H₂O (auf 25 mL aufgefüllt)] lysiert. 3 μ L des Lysats, das durch zentrifugieren gewonnen wurde, wurden mit einem Reaktionspuffer [33 mL, bestehend aus MgCl₂ (1 M, 15 μ L), NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (0.5 M, 3 mL), Galacton (100 \times , 150 μ L), H₂O (auf 15 mL aufgefüllt)] gefüllten Well der Mikrotiterplatte übergeführt. Unter Ausschluss von Licht wurde die Platte für 45 min geschüttelt und anschließend mit Verstärker [25 μ L/Well, bestehend aus NaOH (80 μ L), Emerald (10 \times , 400 μ L), H₂O (auf 4 mL aufgefüllt)] versetzt. Die Auswertung erfolgte luminometrisch (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies).

11.4.2 Cytotoxizitätsassay (HeLa P4)^[167]

Für den Cytotoxizitätsassay wurde ein Vialight Plus Kit (Cambrex) verwendet. Damit ist es möglich die Menge an ATP von lebenden Zellen luminometrisch zu bestimmen. Über Nacht wurden die HeLa P4-Zellen (1.5×10^4 /Well) im Medium [100 μ L, bestehend aus DMEM (10 % FCS), (L)-Glutamin (2 %), Penicillin/Streptomycin (1 %), Genitacin(500 μ g/mL), Pyromycin (1 μ g/mL)] inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen ein Medium ausgetauscht, das die Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen enthält, und für 48 h inkubiert. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen gewaschen und mit Hilfe des Vialight Plus Kits lysiert. Die Menge des dadurch extrahierten ATP kann durch Zugabe eines „ATP-Beobachtungsreagenz“

mittels Lumineszenz durch einen Luminometer (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies) bestimmt werden.

11.4.3 Zellkultorexperiment MT-4^[5, 182]

Die MT-4-Zellkultorexperimente wurden in der Arbeitsgruppe von C. Pannecouque (Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgien) durchgeführt. Die Durchführung des Experiments erfolgte in flachen 96 Well Mikrotiterplatten, die mit 50 µL einer Lösung von exponentiell wachsenden MT-4-Zellen^[276] mit einer Startkonzentration von 6×10^5 Zellen/mL und Zellkulturmedium versetzt wurden. Zu einem Teil der Zellen wurde eine Stammlösung (50 µL) von HIV-1 (IIIB)^[277] mit 100-300 CCID₅₀ (50 % cell culture infection dose) zugegeben. Nicht infizierte Zellen dienten zur Überprüfung von cytotoxischen Eigenschaften der zu untersuchenden Verbindungen. Insgesamt erfolgte die Untersuchung der MT-4-Zellkultorexperimente in zwei Serien in jeweils dreifacher Ausführung. Eine Serie bestand aus der automatischen Zugabe (Biomek 3000 robot, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) von 25 µL der Testsubstanz in fünf verschiedenen Verdünnungen. Die MT-4-Zellen besitzen die Eigenschaft, dass sie bei einer erfolgreichen HIV-Infektion sterben. Die Aktivität eines Inhibitors kann an der Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen durch den MTT-Assay spektroskopisch untersucht. Der Assay basiert auf der Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) mittels mitochondrialer Dehydrogenase zu blau-violettem Formazan. Da dieser metabolische Prozess nur in lebenden Zellen möglich ist, kann durch spektroskopische Messung des Formazans die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Die Absorption wurde durch einen acht-Kanal Computer-gesteuerten Photometer (Multiscan Ascent Reader, Labsystems, Helsinki, Finnland) bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (540 und 690 nm) gemessen. Die Daten wurden über die mittlere OD (optische Dichte) aus den Einzelmessungen von drei Wells berechnet. Die Testsubstanz-Konzentration, bei der 50 % der HIV-infizierten MT-4-Zellen überlebten, wurde als EC₅₀-Wert definiert.

11.4.4 Cytotoxizitätsassay (MT-4)^[5, 182]

Der Cytotoxizitätsassay wurde mit MT-4-Zellen durchgeführt, die nicht mit dem HIV-1 (IIIB) Stamm infiziert, sondern nur mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz versetzt wurden. Der CC_{50} -Wert (50 % cytotoxische Konzentration) ist definiert als die Konzentration, bei der die Anzahl der nicht infizierten MT-4-Zellen um 50 % zurückgeht. Die Messung erfolgte, wie beim oben angegebenen Zellkulturexperiment MT-4, jedoch wurde nur bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

11.5 Antimikrobielle Untersuchungen

11.5.1 Zellfreier Transkriptions-/Translationsassay (CFTT-Assay)^[278]

Der zellfreie Transkriptions-/Translationsassay (CFTT-Assay) wurde in der Arbeitsgruppe von Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt am Main) von M. Weidlich durchgeführt. Die 25 μ L des Reaktionsvolumens enthielten 3.5 mM Tris-Acetat (pH 8.2), 220 mM KOAc, 13 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 0.7 mM EDTA, 0.2 mM Folinsäure, 2 mM DTT, 2 % Polyethylenglycol 8000, 1.2 mM ATP und 0.8 mM der NTPs, 20 mM Acetylphosphat (Lithium-Kalium-Salz), 20 mM Phosphorenoypyruvat (Trinatriumsalz), 0.05 % NaN_3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf), 500 mg/L *E. coli* tRNA Mischung, 40 mg/L Pyruvat-Kinase, 1 Tablette/10 mL vollständiger Protease-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim), 0.3 U/ μ L RNasin RNase-Inhibitor (Promega GmbH, Mannheim), 3 U/ μ L T7- RNA-Polymerase (GE Healthcare Europe GmbH, München) und eine vollständige Aminosäure-Mischung (Endkonzentration 0.75-1.0 mM). 40-60 ng/ μ L des Plasmides pIVEX2.3-GFP und 30 % *E. coli* A19 S30 wurden in MilliQTM-Wasser (Millipore Corp.) gelöst zugegeben. Die so zusammengesetzte Reaktionsmischung wurde anschließend mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz versetzt und für fünf Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Menge des entstandenen GFP wurde mittels Fluozenspektrometer (Hitachi F-4500, λ_{ex} = 395 nm, λ_{em} = 509 nm) bestimmt. Störend für den Assay sind Testsubstanzen mit Eigenfluoreszenz im Bereich von 480-520 nm und Absorption bei 395 nm.

11.5.2 Aktivitätsbestimmung gegen Modellkeime *Bacillus subtilis*^[278]

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) für *B. subtilis* durch die Bouillon-Mikrodilutionsmethode wurde im Arbeitskreis Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt am Main) von D. Urbanek und M. Weidlich durchgeführt. Dafür wurde das Medium der Übernachtskultur von *B. subtilis* auf 10^5 Zellen/mL verdünnt und 5 μ L der Verdünnung mit Testsubstanz versetzt, bis zu einem Gesamtvolumen von 100 μ L. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht in 96 Well Mikrotiterplatten bis zu einer optischen Dichte (OD) von 1.0, die bei 600 nm photometrisch bestimmt wurde. Anschließend wurde das Zellwachstum mittels eines Microplate Readers (Anthos LabTech Instruments GmbH, Wals) bei Absorption um 620 nm bestimmt. Als Negativkontrolle wurden einige Wells ohne Testsubstanz mit 5 μ L Bakterienkultur inkubiert. Die Positivkontrolle erfolgte, für den Ausschluss von methodischen Fehlern, mit Streptomycin (**18**). Bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel wurde zusätzlich reines DMSO als Testsubstanz charakterisiert. Als MIC wurde die Konzentration definiert, bei der kein Zellwachstum erkennbar war.

11.5.3 Aktivitätsbestimmung gegen pathogene Mikroorganismen^[279]

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) gegen pathogene Mikroorganismen wurde in der Arbeitsgruppe von T. Wichelhaus (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) durchgeführt. Die Bestimmung der Testsubstanzen wurde mit folgenden Kontrollstämmen durchgeführt: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) und *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), multiresistente *Enterococcus faecalis* (VRE) und multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Die Aktivitätsbestimmung der pathogenen Mikroorganismen ist im Prinzip vergleichbar mit dem Verfahren für den Modellkeim *B. subtilis*. Das Kulturmedium (Mueller-Hinton-Medium) wurde durch Verdünnung mit NaCl [0.9 % (w/v)] auf 10^7 KBE/mL standardisiert. Die Wells wurden mit Nährmedium (100 μ L) und unterschiedlichen Konzentrationen an Testsubstanz (100 μ L) ausgestattet. Anschließend wurde jedes Well mit 5 μ L Bakteriensuspension versetzt, so dass etwa 5×10^4 KBE/Well als Startzellzahl erhalten wurde. Als Negativkontrolle wurde ein Well ohne Testsubstanz inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Konzentration, bei der visuell

kein Zellwachstum mehr feststellbar war, wurde als minimale Hemmkonzentration (MIC) definiert.

12. ANHANG

12.1 Abkürzungen

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
Äquiv.	Äquivalente
br	breit (NMR)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc-ON	2-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril
BSA	Rinder-Serumalbumin
CC	Cytotoxische Konzentration
CCID	Zellkultur Infektionsdosis
CFTT	Zellfreier Transkription/Translation
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dd	Dublett von Dubletts (NMR)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dp	3-Dimethylamino-1-propylamin
EA	Elementaranalyse
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDT	Ethandithiol
ESI	Elektronensprayionisation
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPPS	Festphasenpeptidsynthese
FRET	Floureszenz Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-Coupled Receptors
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
Hex	<i>n</i> -Hexan
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Halbe Inhibitionskonzentration
IR	Infrarot
KBE	Kolonienbildende Einheit
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lit	Literatur
LTR	Long terminal repeats
m	Multipllett (NMR); medium (IR)
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MIC	Minimale Inhibierungskonzentation
MS	Massenspektrometrie
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-triethyl-benzolsulfonyl
NBS	N-Bromsuccinimid
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuklear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
PhOH	Phenol
PhSMe	Thioanisol
q	Quartett (NMR)

qn	Quintett (NMR)
RFU	Relative Fluorescence Units
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Singulett (NMR), strong (IR)
Sdp	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt
sx	Sextett (NMR)
t	Triplett (NMR)
TAR	Trans-Activation Responsive Region
TARwt	Wildtyp-TAR-RNA (Abbildung 38)
TARbl	Bulge-freie-TAR-RNA (Abbildung 39)
TARll	Loop-freie-TAR-RNA (Abbildung 40)
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TritonX	Alkylphenylpolyethylenglykol
UV	Ultraviolett
w	weak (IR)

12.2 Literaturverzeichnis

- [1] M. G. Sarngadharan, M. Popovic, L. Bruch, J. Schüpbach, R. C. Gallo, *Science* **1984**, 224, 506.
- [2] F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daguuet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, *Science* **1983**, 220, 868.
- [3] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/adv.pdf.
- [4] <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/default.asp>.
- [5] R. Pauwels, J. Balarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. D. Clercq, *J. Virol. Methods* **1988**, 20, 309.
- [6] 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.
- [7] J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, 257, 76.
- [8] J. D. Puglisi, L. Chen, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3680.
- [9] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 313.
- [10] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3974.
- [11] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4598.
- [12] C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1489.
- [13] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, Vol. 2., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1995**.
- [14] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, B. L. Stryer, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1996, *Stryer Biochemie*, Vol. 6., Spektrum Verlag Heidelberg, **2007**.
- [15] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Vol. 8., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2001**.
- [16] T. Biesinger, M. T. Y. Kimata, J. T. Kimata, *Virology* **2008**, 370, 184.
- [17] T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. A. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, D. A. Koup, J. P. Moore, W. A. Paxton, *Nature* **1996**, 381, 667.
- [18] S. N. Richter, G. Palù, *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1305.
- [19] B. Berkhout, R. I.-I. Silverman, K.-T. Jeang, *Cell* **1989**, 59, 273.
- [20] I. Huq, Y.-H. Ping, N. Tamilarasu, T. M. Rana, *Biochemistry* **1999**, 38, 5172.
- [21] D. H. Price, *Cell. Biol.* **2000** 20, 2629.
- [22] S. J. Madore, B. R. Cullen, *J. Virol.* **1993**, 67, 3703.
- [23] M. Kuppaswamy, T. Subramanian, A. Srinivasan, G. Chinnadurai, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 3551.
- [24] Y. Tor, *ChemBioChem* **2003**, 4, 998.
- [25] http://www.hivandhepatitis.com/hiv_and_aids/hiv_treat.html.
- [26] F. J. Palella, K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, S. D. Holmberg, *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 853.
- [27] N. J. Schönbrunner, E. H. Fiss, O. Budker, S. Stoffel, C. L. Sigua, D. H. Gelfand, T. W. Myers, *Biochemistry* **2006**, 45, 12786.
- [28] M. Emerman, M. H. Malim, *Science* **1998**, 280, 1880.
- [29] B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science* **1991**, 252, 1167.
- [30] F. Kashanchi, M. R. Sadaie, J. N. Brady, *Virology* **1997**, 227, 431.
- [31] R. V. Duyne, 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.

- [32] I. Choudhury, J. Wang, S. Stein, A. Rabson, M. J. Leibowitz, *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 777.
- [33] C. Fraiser, D. Abraham, M. v. Oijen, V. Cunliffe, A. Irvine, R. Craig, E. Dzierzak, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 946.
- [34] Y. F. Melekhovets, S. Joshi, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1908.
- [35] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3548.
- [36] H. M. Al-Hashimi, N. G. Walter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 321.
- [37] 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.
- [38] M. A. Gelman, S. Richter, H. Cao, N. Umezawa, S. H. Gellman, T. M. Rana, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3563.
- [39] N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 505.
- [40] P. R. Bohjanen, Y. Liu, M. A. Garcia-Blanco, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4481.
- [41] E. Puerta-Fernández, A. B.-d. Jesus, C. Romero-López, N. Tapia, M. A. Martínez, A. Berzal-Herranz, *AIDS* **2005**, *19*, 863.
- [42] A. Arzumanov, A. P. Walsh, V. K. Rajwansh, R. Kumar, J. Wengel, M. J. Gait, *Biochemistry* **2001**, *40*, 14645.
- [43] T. Hamma, A. Saleh, I. Huq, T. M. Ranab, P. S. Millera, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1845.
- [44] F. Darfeuille, A. Arzumanov, S. Gryaznov, M. J. Gait, C. D. Primo, J.-J. Toulme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9709.
- [45] M. J. Gait, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 844.
- [46] M.-J. Li, G. Bauer, A. Michienzi, J.-K. Yee, N.-S. Lee, J. Kim, S. Li, D. Castanotto, J. Zaia, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 196.
- [47] J.-M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson, *Nature* **2002**, *418*, 435.
- [48] 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.
- [49] A. Litovchick, A. Lapidot, M. Eisenstein, A. Kalinkovich, G. Borkow, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15612.
- [50] J. A. Loo, D. E. DeJohn, P. Du, T. I. Stevenson, R. R. O. Loo, *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 307.
- [51] A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 972.
- [52] 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.
- [53] K. S. Long, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8885.
- [54] A. S. Brodsky, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624.
- [55] R. Nifosi, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4944.
- [56] 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.
- [57] C. Parolin, B. Gatto, C. D. Vecchio, T. Pecere, E. Tramontano, V. Cecchetti, A. Fravolini, S. Masiero, M. Palumbo, G. Palu, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 889.
- [58] C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1460.
- [59] L. Dassonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4487.
- [60] 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.

- [61] F. Hamy, V. Brondani, A. Flörsheimer, W. Stark, M. J. J. Blommers, T. Klimkait, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5086.
- [62] A. V. Filikov, V. Mohan, T. A. Vickers, R. H. Griffey, P. D. Cook, R. A. Abagyan, T. L. James, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 593.
- [63] K. E. Lind, Z. Du, K. Fujinaga, B. M. Peterlin, T. L. James, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 185.
- [64] S. W. Pitt, Q. Zhang, D. J. Patel, H. M. Al-Hashimi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3412.
- [65] S. Renner, V. Ludwig, O. Boden, U. Scheffer, M. Göbel, G. Schneider, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1119.
- [66] Z. Xiao, N. Zhang, Y. Lin, G. B. Jones, I. H. Goldberg, *Chem. Commun.* **2006**, 4431.
- [67] M. Rusnati, C. Urbinati, A. Caputo, L. Possati, H. Lortat-Jacobi, M. Giacca, D. Ribatti, M. Presta, *J. Biol. Chem. Vol.* **2001**, *276*, 22420.
- [68] M. Rusnati, G. Tulipano, C. Urbinati, E. Tanghetti, R. Giuliani, M. Giacca, M. Ciomei, A. Corallini, M. Prestai, *J. Biol. Chem. Vol.* **1998**, *273*, 16027.
- [69] F. Hamy, N. Gelus, M. Zeller, J. L. Lazdins, C. Bailly, T. Klimkait, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 669.
- [70] T. C. Rodman, J. D. Lutton, S. Jiang, H. B. Al-Kouatly, R. Winston, *Exp. Hematol.* **2001**, *29*, 1004.
- [71] W. F. Michne, J. D. Schroeder, T. R. Bailey, D. C. Young, J. V. Hughes, F. J. Dutko, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2701.
- [72] M.-C. Hsu, A. D. Schutt, M. Holly, L. W. Slice, Michael I. Sherman, D. D. Richman, M. J. Potash, D. J. Volsky, *Science* **1991**, *254*, 1799.
- [73] S.-H. Chao, K. Fujinaga, J. E. Marion, R. Taube, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, B. M. Peterlin, D. H. Price, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28345.
- [74] K. Fujinaga, R. Taube, J. Wimmer, T. P. Cujec, B. M. Peterlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1285.
- [75] G. L. Olsen, T. E. Edwards, P. Deka, G. Varani, S. T. Sigurdsson, G. P. Drobny, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3447.
- [76] S. Richter, Y.-H. Ping, T. M. Rana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7928.
- [77] A. L. Hopkins, C. R. Groom, *Nature Reviews Drug Disc.* **2002**, *1*, 727.
- [78] S. Fox, S. Farr-Jones, L. Sopchak, A. Boggs, J. Comley, *J. Biomol. Screen* **2004**, *9*, 354.
- [79] <http://www.isispharm.com/vitravene.html>.
- [80] G. J. R. Zaman, P. J. A. Michiels, C. A. A. v. Boeckel, *Drug. Discov. Today* **2003**, *8*, 297.
- [81] V. M. Shelton, T. R. Sosnick, T. Pan, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16831.
- [82] K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Science* **1993**, *261*, 1574.
- [83] T. Hermann, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 829.
- [84] K. Chin, K. A. Sharp, B. Honig, A. M. Pyle, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1055.
- [85] C. B. Carlson, O. M. Stephens, P. A. Beal, *Biopolymers* **2003**, *70*, 86.
- [86] D. P. Arya, L. Xue, B. Willis, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10148.
- [87] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *Science* **1999**, *285*, 1722.
- [88] B. Bozdogan, P. C. Appelbaum, *J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 113.
- [89] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 340.
- [90] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. C. Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, *292*, 897.
- [91] A. H. Lin, R. W. Murray, T. J. Vidamar, K. R. Marotti, *Antimicrob. Agents Chermther.* **1997**, *41* 2127.
- [92] E. V. Bobkova, Y. P. Yan, D. B. Jordan, M. G. Kurilla, D. L. Pompliano, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9802.

- [93] M. Ibba, D. Söll, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617.
- [94] N. E. Mikkelsen, K. Johansson, A. Virtanen, L. A. Kirsebom, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 510.
- [95] T. M. Henkin, B. L. Glass, F. J. Grundy, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 1299.
- [96] F. J. Grundy, T. R. Moir, M. T. Haldeman, T. M. Henkin, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1646.
- [97] J. A. Means, J. V. Hines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2169.
- [98] N. W. Luedtke, Y. Tor, *Biopolymers* **2003**, *70*, 103.
- [99] K. A. Lacourciere, J. T. Stivers, J. P. Marino, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5630.
- [100] S. Nanduri, B. W. Carpick, Y. Yang, B. R. G. Williams, J. Qin, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5458.
- [101] M. Zhao, L. Janda, J. Ncuyen, L. Streckowski, W. D. Wilson, *Biopolymers* **1994**, *34*, 61.
- [102] M. Zhao, L. Ratmeyer, R. G. Peloquin, S. Yao, A. Kumar, J. Spsychala, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 785.
- [103] C. B. Carlson, M. Vuyisich, B. D. Gooch, P. A. Beal, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 663.
- [104] R. J. M. Russell, J. B. Murray, G. Lentzen, J. Haddad, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3410.
- [105] B. Francois, J. Szychowski, S. S. Adhikari, K. Pachamuthu, E. E. Swayze, R. H. Griffey, M. T. Migawa, E. Westhof, S. Hanessian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6735.
- [106] K. B. Simonsen, B. K. Ayida, D. Vourloumis, G. C. Winters, M. Takahashi, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 886.
- [107] L. Yu, T. K. Oost, J. M. Schkeryantz, J. Yang, D. Janowick, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4444.
- [108] Y. He, J. Yang, B. Wu, D. Robinson, K. Sprankle, P.-P. Kung, K. Lowery, V. Mohan, S. Hofstadler, E. E. Swayze, R. Griffey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 695.
- [109] J. A. Means, S. Katz, A. Nayek, R. Anupam, J. V. Hines, S. C. Bergmeier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3600.
- [110] J. D. Tibodeau, P. M. Fox, P. A. Ropp, E. C. Theil, H. H. Thorp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 253.
- [111] A. Y. Gayle, A. M. Baranger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2839.
- [112] Z. Yan, S. Sikri, D. L. Beveridge, A. M. Baranger, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4096.
- [113] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12434.
- [114] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [115] M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677.
- [116] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796.
- [117] C. D. Giorgio, S. Palrot, C. Schwergold, N. Patino, R. Condom, A. F.-D. Giorgio, R. Guedj, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1937.
- [118] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179.
- [119] G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14671.
- [120] D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azliikina, E. D. Sverdlov, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3571.
- [121] P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3357.
- [122] G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O'Malley, E. Uhlmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 665.

- [123] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12069.
- [124] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767.
- [125] L. Kospinkina, W. Wang, T. C. Liaag, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5173.
- [126] B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083.
- [127] L. Kospinkina, W. Wang, T. C. Liang, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5173.
- [128] G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1939.
- [129] K. H. Petersen, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 793.
- [130] S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, E. Schwenner, U. Stropp, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 681.
- [131] P. Lagriffoule, P. Wittung, M. Eriksson, K. K. Jensen, B. Nordén, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912.
- [132] M. Cantin, R. Schütz, C. J. Leumann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4211.
- [133] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.* **1995**, *3*, 175.
- [134] M. A. Bonham, S. Brown, A. L. Boyd, P. H. Brown, D. A. Bruckenstein, J. C. Hanvey, S. A. Thomson, A. Pipe, F. Hassman, J. E. Bisi, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1197.
- [135] H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996** *24*, 494.
- [136] J. C. Hanvey, N. J. Pepper, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, C. F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Bruckenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, *258*, 1481.
- [137] V. V. Demidov, V. N. Potaman, Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310.
- [138] T. Shiraishi, N. Bendifallah, P. E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 189.
- [139] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, U. Koppelhus, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 750.
- [140] K. Albertshofer, A. M. Siwkowski, E. V. Wancewicz, C. C. Esau, T. Watanabe, K. C. Nishihara, G. A. Kinberger, L. Malik, A. B. Eldrup, M. Manoharan, R. S. Geary, B. P. Monia, E. E. Swayze, R. H. Griffey, C. F. Bennett, M. A. Maier, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6741.
- [141] Y. Wolf, S. Pritz, S. Abes, M. Bienert, B. Lebleu, J. Oehlke, *Biochemistry* **2006**, *45*, 14944.
- [142] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Gene* **1994**, *149*, 139.
- [143] R. Lee, N. Kaushik, M. J. Modak, R. Vinayak, V. N. Pandey, *Biochemistry* **1998**, *37*, 900.
- [144] N. E. Mollegaard, O. Buchardt, M. Egholm, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3892.
- [145] N. Kaushik, A. Basu, V. N. Pandey, *Antiviral Res.* **2002**, *56*, 13.
- [146] E. Riguet, S. Tripathi, B. Chaubey, J. Désiré, V. N. Pandey, J.-L. Décout, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4806.
- [147] S. Tripathi, B. Chaubey, S. Ganguly, D. Harris, R. A. Casale, V. N. Pandey, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4345.
- [148] J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6837.
- [149] B. Chaubey, S. Tripathi, S. Ganguly, D. Harris, R. A. Casale, V. N. Pandey, *Virology* **2005**, *331*, 418.

- [150] G. Depecker, N. Patino, C. D. Giorgio, R. Terreux, D. Cabrol-Bass, C. Bailly, A.-M. Aubertin, R. Condom, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 74.
- [151] G. Upert, M. Mehiri, A. D. Giorgio, R. Condom, N. Patino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6026.
- [152] T. Hermann, *Biochimie* **2002**, *84*, 869.
- [153] Z. Yan, A. M. Baranger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5889.
- [154] T. D. Bradrick, J. P. Marino, *RNA* **2004**, *10*, 1459.
- [155] C.-H. Wong, M. Hendrix, E. S. Priestley, W. A. Greenberg, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 397.
- [156] B. Llano-Sotelo, C. S. Chow, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.
- [157] J. Haddad, L. P. Kotra, B. Llano-Sotelo, C. Kim, J. Eduardo F. Azucena, M. Liu, S. B. Vakulenko, C. S. Chow, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3229.
- [158] K. F. Blount, Y. Tor, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5490.
- [159] K. Hamasaki, R. R. Rando, *Anal. Biochem.* **1998**, *261*, 183.
- [160] J. B.-H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Biochemistry* **1999**, *38*, 199.
- [161] S. R. Kirk, N. W. Luedtke, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 980.
- [162] Y. Wang, K. Hamasaki, R. R. Rando, *Biochemistry* **1997**, *36*, 768.
- [163] C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1857.
- [164] D. Klostermeier, D. P. Millar, *Methods* **2001**, *23*, 240.
- [165] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie, Vol. 4.*, Springer Verlag, Heidelberg, **2002**.
- [166] M. P. Latham, D. J. Brown, S. A. McCallum, A. Pardi, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1492.
- [167] V. Ludwig, A. Krebs, M. Stoll, U. Dietrich, J. Ferner, H. Schwalbe, U. Scheffer, G. Dürner, M. W. Göbel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1850.
- [168] J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15699.
- [169] E. C. Johnson, V. A. Feher, J. W. Peng, J. M. Moore, J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15724.
- [170] C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. Stockman, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 349.
- [171] P. Z. Qin, T. Dieckmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 350.
- [172] L. Zídek, R. Štefl, V. Sklenár, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 275.
- [173] C. Kreutz, H. Kählig, R. Konrat, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3450
- [174] S. A. Hofstadler, R. H. Griffey, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 377.
- [175] K. A. Sannes-Lowery, R. H. Griffey, S. A. Hofstadler, *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 264.
- [176] D. S. Pilch, M. Kaul, C. M. Barbieri, J. E. Kerrigan, *Biopolymers* **2003**, *70*, 58.
- [177] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151.
- [178] N. Morgner, H. D. Barth, T. L. Schmidt, A. Heckel, U. Scheffer, M. W. Göbel, P. Fucini, B. Brutschy, *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221*, 689.
- [179] N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11391.
- [180] J. Cho, R. R. Rando, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8548.
- [181] C. K. Nandi, P. P. Parui, B. Brutschy, U. Scheffer, M. Göbel, *Biopolymers* **2007**, *89*, 17.
- [182] C. Pannecouque, D. Daelemans, E. D. Clercq, *Nature Protocols* **2008**, *3*, 427.
- [183] S. Udenfried, L. Gerber, N. Nelson, *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 494.
- [184] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967.
- [185] J. L. Duffner, P. A. Clemons, A. N. Koehler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 74.
- [186] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849.
- [187] F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature* **2002**, *416*, 653.

- [188] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3308.
- [189] M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3641.
- [190] Y. Zhou, V. E. Gregor, Z. Sun, B. K. Ayida, G. C. Winters, D. Murphy, K. B. Simonsen, D. Vourloumis, S. Fish, J. M. Froelich, D. Wall, T. Hermann, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4942.
- [191] Z. Yan, S. R. Ramisetty, P. H. Bolton, A. M. Baranger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1658.
- [192] W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, *419*, 952.
- [193] A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043.
- [194] G. A. Soukup, E. C. DeRose, M. Koizumi, R. R. Breaker, *RNA* **2001**, *7*, 524.
- [195] T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14843.
- [196] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptides Synthesis A Practical Approach, Vol. 1*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [197] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801.
- [198] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [199] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 539.
- [200] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 537.
- [201] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- [202] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318.
- [203] J. Klose, M. Bienert, C. Mollenkopf, D. Wehle, C.-w. Zhang, L. A. Carpino, P. Henklein, *Chem. Commun.* **1999**, 1847.
- [204] G.-s. Lu, S. Mojssov, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3433.
- [205] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen, Vol. 1*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [206] M. Suhartono, *Diplomarbeit 2004, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [207] T. Rothenbücher, *Diplomarbeit 2003, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [208] M. Suhartono, *Dissertation 2008, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [209] V. Ludwig, *Dissertation 2005, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*.
- [210] A. Krebs, *Dissertation 2004, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*.
- [211] F. Effenberger, W. Hartmann, *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 3260.
- [212] F. Effenberger, W. Hartmann, *Angew. Chem.* **1964**, *176*, 188.
- [213] P. Friedlaender, J. K. Lazarus, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1885**, 233.
- [214] G. M. Bennett, P. C. Crofts, D. H. Hey, *J. Chem. Soc.* **1949**, 227.
- [215] O. Fischer, Guthmann, *J. Prakt. Chem.* **1916**, 386.
- [216] A. E. Tschitschibabin, *Chem. Ber.* **1923**, 1880.
- [217] A. Farèse, N. Patino, R. Condom, S. Dalleu, R. Guedj, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1413.
- [218] L. Bialy, J. J. Días-Mochón, E. Specker, L. Keinicke, M. Bradley, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8295.
- [219] G. Byk, C. Gilon, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5687.
- [220] E. P. Heimer, H. E. Gallo-Torres, A. M. Felix, M. Ahmad, T. J. Lambros, F. Scheidl, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1984**, *23*, 203.
- [221] R. H. E. Hudson, Y. Liu, F. Wojciechowski, *Can. J. Chem.* **2007**, *85*, 302.

- [222] G. Breipohl, E. Uhlmann, J. Knolle, *Vol. EP 0672701 A1* (Ed.: E. Patentanmeldung), Höchst AG, Germany **1995**.
- [223] S. Breitung, *Diplomarbeit 2004, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [224] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1402.
- [225] D. Akalay, G. Dürner, J. W. Bats, M. Bolte, M. W. Göbel, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5618.
- [226] S. M. McElvain, J. P. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 40.
- [227] J. A. Settepani, J. B. Stokes, *J. Org. Chem.* **1968**, 2606.
- [228] E. Diez-Barra, A. d. l. Hoz, Andrés Moreno Prado Sánchez-Verdú *J. Chem. Soc. Perkin Trans. , J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2589.
- [229] D. E. Ames, O. Ribeiro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1976**, 1073.
- [230] J. H. Short, in *United States Patent, Vol. US 4470977*, Adria Laboratories, Inc., Columbus, Ohio, USA, **1984**.
- [231] J. Barbet, M. Minjat, A.-F. Petavy, J. Paris, *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther.* **1986**, *21*, 359.
- [232] P. Cohen-Fernandes, C. L. Habraken, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3084.
- [233] Kakefuda, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2594.
- [234] G. Seifert, *Dissertation 2007, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*.
- [235] Abdulla, Fuhr, *J. Heterocycl. Chem.* **1976**, *13*, 427.
- [236] Y. M. Elkholy, *Molecules* **2007**, *12*, 361.
- [237] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210.
- [238] A. Rutar, D. Kikelj, *Synthetic Communications* **1998**, *28*, 2737.
- [239] H. Bartsch, T. Erker, G. Neubauer, *Monatshefte für Chemie* **1988**, *119*, 1439.
- [240] A. Schüller, M. Suhartono, U. Fechner, Y. Tanrikulu, S. Breitung, U. Scheffer, M. W. Göbel, G. Schneider, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2008**, *22*, 59.
- [241] J. P. Saighi, R. A. Singer, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4960.
- [242] T. Wang, D. R. Magnin, L. G. Hamann, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 897.
- [243] W. D. Brown, A. H. Gouliaev, *Synthesis* **2002**, *1*, 83.
- [244] A. I. Tochilkin, I. R. Kovel'man, E. P. Prokofev, I. N. Gracheva, M. V. Levinskii, *Chemistry of Heterocyclic Compounds (Khimiya Geterotskiklicheskikh Soedinenii)* **1988**, *8*, 1084.
- [245] G. Seifert, *Diplomarbeit 2002, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [246] N. Morgner, H.-D. Barth, B. Brutschy, U. Scheffer, S. Breitung, M. Göbel, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2008**, *19*, 1600.
- [247] M. Zeiger, *Diplomarbeit 2007, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main*
- [248] F. Fernández, X. Garcia-Mera, M. Morales, J. E. Rodriguez-Borges, *Synthesis* **2001**, *2*, 239.
- [249] P. Friedlaender, A. Weinberg, *Chem. Ber.* **1882**, 2103.
- [250] A. E. Tschitschibabin, D. P. Witkovsky, M. I. Lapschin, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* **1925**, *58*, 803.
- [251] L. Heinisch, S. Wittmann, T. Stoiber, A. Berg, D. Ankel-Fuchs, U. Möllmann, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3032.
- [252] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *4*, 681.
- [253] K. Hartke, H.-G. Mueller, *Arch. Pharm.* **1988**, 321.
- [254] S. Scheithauer, R. Mayer, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 1413.
- [255] S. M. McElvain, J. P. Schroeder, *J. Amer. Chem. Soc.* , *71*, 40.

- [256] B. Krug, K. Hartke, *Arch. Pharm.* **1984**, 317, 883.
- [257] J. R. Rodriguez, A. Rumbo, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 966.
- [258] R. Sommer, W. P. Neumann, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 546.
- [259] A. Hassner, J. K. Rasmussen, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1451.
- [260] F. T. Oakes, N. J. Leonard, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 4986.
- [261] U. S. Patent, 4470977, US, **1984**.
- [262] Froelicher, Cohen, *J. Chem. Soc.* **1922**, 121, 1656.
- [263] Richtzenhain, Nippus, *Chem. Ber.* **1949**, 82, 408.
- [264] Letsinger, M. Cain, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 6425.
- [265] M. K. Ehlert, S. J. Rettig, A. Storr, R. C. Thompson, J. Trotter, *Can. J. Chem.* **1991**, 69, 432.
- [266] Huettel, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1955**, 593, 199.
- [267] V. P. Perevalov, Y. A. Manaev, M. A. Andreeva, B. I. Stepanov, *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1985**, 55, 787.
- [268] Phillips, *J. Chem. Soc.* **1928**, 174.
- [269] *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1973**, 9, 1506.
- [270] Gowenlock, *J. Chem. Soc.* **1945**, 622.
- [271] A. Rutar, D. Kikelj, *Synthetic Communications* **1998**, 28, 2737.
- [272] H. Bartsch, T. Erker, G. Neubauer, *Monatsh. Chem.* **1988**, 119, 1439.
- [273] L. K. A. Rahman, R. M. Scrowston, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 3, 385.
- [274] D. L. Vivian, J. L. Hartwell, H. C. Waterman, *J. Org. Chem.* **1955**, 20, 797.
- [275] F. Gertson, E. Heilbronner, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 6, 42.
- [276] I. Miyoshi, H. Taguchi, I. Kobonishi, S. Yoshimoto, Y. Ohtsuki, Y. Shiraishi, T. Akagi, *Gann. Monogr.* **1982**, 28, 219.
- [277] M. Popovic, M. G. Sarngadharan, E. Read, R. C. Gallo, *Science* **1984**, 224, 497.
- [278] M. Suhartono, M. Weidlich, T. Stein, M. Karas, G. Dürner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1608.
- [279] Y. Tanrikulu, M. Nietert, U. Scheffer, E. Proschak, K. Grabowski, P. Schneider, M. Weidlich, M. Karas, M. Göbel, G. Schneider, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1932.

12.3 Publikationsliste

1. Sven Breitung, Hans-Wolfram Lerner, Michael Bolte, *Acta. Cryst. E*, **2003**, 59, 445-446.
"2,2,6,6-Tetramethyl-4-oxopiperidiniumtrifluoroacetat"
2. Andreas Schüller, Marcel Suhartono, Uli Fechner, Yusuf Tanrikulu, Sven Breitung, Ute Scheffer, Michael W. Göbel, Gisbert Schneider, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2008**, 22, 59-68.
"The concept of template-based de novo design from drug-derived molecular fragments and its application to TAR RNA"
3. Nina Morgner, Hans-Dieter Barth, Bernhard Brutschy, Ute Scheffer, Sven Breitung, Michael W. Göbel, *JASMS*, **2008**, 19, 1600-1611.
"Binding sites of the viral RNA element TAR and of TAR mutants for various peptide ligands, probed with LILBID: a new laser mass spectrometry"
4. Sven T. Breitung, Jakob J. Lopez, Gerd Dürner, Clemens Glaubitz, Michael W. Göbel, Marcel Suhartono, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2008**, 4(35). doi:10.3762/bjoc.4.35.
"A practical synthesis of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled tripeptide N-Formyl-Met-Leu-Phe, useful as a reference in solid-state NMR spectroscopy"
5. Jan Ferner, Marcel Suhartono, Sven Breitung, Hendrik R. A. Jonker, Mirko Hennig, Jens Wöhnert, Michael Göbel, Harald Schwalbe, *ChemBioChem*, **2009**, 10(9), 1490-1494.
"Structures of HIV TAR RNA-Ligand Complexes Reveal Higher Binding Stoichiometries"

12.4 Ausgewählte wissenschaftliche Vorträge

1. 2. Nukleinsäurechemie-Treffen, 22. September **2006**, Göttingen.
"Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands"

12.5 Posterbeiträge

1. O. Boden, G. Seifert, S. Breitung, U. Scheffer, M.W. Göbel
1. Nukleinsäurechemie-Treffen, 8. September **2004**, Karlsruhe.
“Design heterocyclischer Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1”
2. O. Boden, G. Seifert, S. Breitung, U. Scheffer, M.W. Göbel
ORCHEM 2004, 9.-11. September **2004**, Bad Nauheim.
“Design heterocyclischer Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1”
3. M. Suhartono, S. T. Breitung, M. W. Göbel,
3rd Postgraduate Industry Study Tour, 21.-25. Mai **2006**, Darmstadt/Manchester, GB.
“Synthesis of Non-Natural α -Amino Acids as Building Blocks of RNA Ligands”
4. M. Suhartono, S. T. Breitung, M. W. Göbel,
ORCHEM 2006, 7.-9. September **2006**, Bad Nauheim.
“Synthesis of Artificial α -Amino Acids as Building Blocks of RNA Ligands”
5. S. T. Breitung, U. Scheffer, M. Suhartono, M. W. Göbel,
ORCHEM 2006, 7.-9. September **2006**, Bad Nauheim.
“Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands”
6. M. Suhartono, S. T. Breitung, M. W. Göbel,
2. Nukleinsäurechemie-Treffen, 22. September **2006**, Göttingen.
“Synthesis of Artificial α -Amino Acids as Building Blocks of RNA Ligands”
7. S. T. Breitung, U. Scheffer, M. Suhartono, M. W. Göbel,
2. Nukleinsäurechemie-Treffen, 22. September **2006**, Göttingen.
“Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands”
8. M. Suhartono, S. T. Breitung, M. W. Göbel,
GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2007, 16.-19. September **2007**, Ulm.
“Synthesis of Non-Natural α -Amino Acids as Building Blocks of RNA Ligands”
9. S. T. Breitung, U. Scheffer, M. Suhartono, M. W. Göbel,
GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2007, 16.-19. September **2007**, Ulm.
“Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands”
10. M. Suhartono, S. T. Breitung, M. W. Göbel,
Int. Symposium “RNA-Ligand-Interactions”, 27.-29. September **2007**, Frankfurt.
“Synthesis of Non-Natural α -Amino Acids as Building Blocks of RNA Ligands”
11. S. T. Breitung, U. Scheffer, M. Suhartono, M. W. Göbel,
Int. Symposium “RNA-Ligand-Interactions”, 27.-29. September **2007**, Frankfurt.
“Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands”
12. S. T. Breitung, M. Zeiger, G. Seifert, U. Scheffer, M. W. Göbel,
Gutachtersitzung “RNA-Ligand-Interactions”, 4.-5. März **2008**, Frankfurt.

“Synthesis and Evaluation of Heterocyclic TAR Ligands”

13. M. Suhartono, S. T. Breitung, U. Scheffer, M. W. Göbel,
Gutachtersitzung “RNA-Ligand-Interactions”, 4.-5. März **2008**, Frankfurt.
“Non-Natural Amino Acids and PNA as Building Blocks for Artificial RNA Ligands”
14. S. T. Breitung, U. Scheffer, M. Suhartono, M. W. Göbel,
10th Tetrahedron Symposium, 23.-26. Juni **2009**, Paris, FR.
“Peptidomimetic Building Blocks for Artificial RNA Ligands”

12.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

„Peptidomimetische Bausteine für synthetische RNA-Liganden“

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, 11. März 2009

Sven Thomas Breitung