

**Synthese neuer Inhibitoren der
Desoxyhypusinsynthase
als potentielle Wirkstoffe gegen HIV-1**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Marcus Schröder

aus Hamburg

vorgelegt dem Department Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Januar 2009 bis Dezember 2012 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 25.01.2013

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich sehr für die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Anregungen begleitet von steter Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Frau Dr. Maria Trusch und Herrn Prof. Dr. Jürgen Heck für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Meinen Kooperationspartnern im Rahmen des BMBF-Konsortiums „Combating Drug Resistance“ danke ich für die biochemischen Tests der Verbindungen, die sehr gute Zusammenarbeit und interessanten Diskussionen. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Adrian Kolodzik, Marcel Krepstakies und Joachim Hauber. Es war mir eine Freude an diesem Projekt mitarbeiten zu können. A. Martínez danke ich für die Tests gegen das Maispathogen.

Den Teams der NMR-Abteilungen und MS-Abteilung des Fachbereichs Chemie danke ich für die sehr gute Unterstützung und Versorgung mit den analytischen Daten zu meinen Verbindungen.

Für die tatkräftige Mithilfe möchte ich mich weiterhin bei allen Studenten bedanken, die experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben. Besonders hervorzuheben sind Katharina Pfaff, Sara Otto, Patrick Thiele, Dirk Landschulze und Dennis Hieke.

Für die intensive und kritische Durchsicht dieser Arbeit geht ein großer Dank an Johanna Huchting und Viktoria Tonn.

Dem Arbeitskreis und vielen Ehemaligen (UG, BR, NB, JT, VT) danke ich für das exzellente Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft, lustigen Kaffeepausen und die schöne Zeit im 5. Stock. Ein spezieller Dank gilt meinem Laborkollegen Florian Pertenbreiter für die gemeinsamen Jahre in OC522. Das war eine echt gute Zeit und hat so manche „Spot-to-Schrott“-Reaktion^{®VT} erträglich gemacht.

Meinem Vater und meiner Schwester danke ich aus tiefstem Herzen für die selbstlose, liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums, der Promotion und deutlich über das Universitäre hinaus.

Meiner „Herzbewohnerin“ Viktoria Tonn danke ich für ihre liebevolle Art und ihren uneingeschränkten Rückhalt - Du machst mich so unglaublich glücklich...!

Meiner Mutter

*„Der Walfisch könnte das kleinste
lebende Säugetier sein, wenn er nur
nicht so groß wäre.“*

Loriot

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Äquiv.	Moläquivalente
ATR	Attenuated Total Reflexion
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin, Zidovudin®
ber.	berechnet
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl-
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BOP	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-Hexafluorophosphat
CEM-ss	humane T-Lymphozyten-Zelllinie
CD	circularer Dichroismus
Chromatotron®	zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie
CPE	4-Cyanophenylethyl-
CPG	Controlled Pore Glass
<i>cyclo</i> Sal	<i>cyclo</i> Saligenyl-
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett
2'-dA	2'-Desoxyguanosin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dba	Dibenzylidenaceton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
2'-dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dest.	destilliert
2'-dG	2'-Desoxyguanosin
DHS	Desoxyhypusinsynthase
DIAD	<i>N,N'</i> -Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	<i>N,N</i> -Disopropylethylamin (<i>Hünigs Base</i>)

DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
1,2-DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO(- <i>d</i> ₆)	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriertes)
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl-
DNA	Desoxyribonucleicacid
D ₂ O	Deuteriumoxid
DOHH	Desoxyhypusinhydroxylase
2'-dU	2'-Desoxyuridin
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EE	Ethylacetat
eIF-5A	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et ₃ N	Triethylamin
FAB	Fast Atom Bombardement
FGU	Funktionelle-Gruppen-Umwandlung
gef.	gefunden
gp41	Glycoprotein 41
gp120	Glycoprotein 120
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HeLa	Cervix-Karzinom Zell-Linie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die zu 50% Inhibition führt
IF	Ionische Flüssigkeit
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante (NMR)
konz.	konzentriert
m	Multiplett

MeOH	Methanol
mod.	modifiziert
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pd EnCat TPP30 [®]	Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (heterogen)
PE	Petrolether
PM1	humane T-Zelllinie
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
q	Quartett
Rev	Regulator of expression of virion protein
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
s.	siehe
S.	Seite
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
t _{1/2}	Hydrolysehalbwertszeit
T	Temperatur
TEAA	Triethylammoniumacetat
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> BuOK	Kalium- <i>tert</i> -butanolat
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran

Tos	4-Toluolsulfonyl
t _R	Retentionszeit
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	2
2.1	Epidemiologie der Immunerkrankung AIDS	2
2.1.1	Der Replikationszyklus und Therapiemöglichkeiten von HIV-1.....	3
2.1.2	Transport viraler RNAs aus dem Zellkern - virale Helfer	5
2.2	Transport viraler RNAs aus dem Zellkern - zelluläre Helfer	7
2.2.1	Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A)	8
2.2.2	Die Desoxyhypusinsynthese (DHS)	9
2.2.3	eIF-5A als potentiellcs Therapieziel für verschiedene Erkrankungen	12
2.3	Wirkstoffentwicklung in der Medizinischen Chemie	12
2.3.1	Hochdurchsatz-Screening.....	14
2.3.2	Virtuelles Wirkstoffdesign.....	15
2.4	Toxizität chemischer Verbindungen	17
2.5	Krebs	17
2.5.1	Carcinogenese durch aromatische Amine	18
2.5.2	Darstellung von N^2 -Arylamin-Addukten.....	20
2.5.3	Polymerase-Tests mit den Arylamin-modifizierten Oligonucleotiden	21
3	Aufgabenstellung.....	23
4	Entwicklung neuer <i>active-site</i> Inhibitoren der DHS	25
4.1	Erste Generation potentieller DHS-Inhibitoren.....	25
4.1.1	Synthese der GC7-analogen, potentiellen DHS-Inhibitoren.....	27
4.1.2	Synthese der virtuellen <i>Hits</i> aus der ZINC-Datenbank.....	29
4.1.3	Biochemische Tests der ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren	45
4.1.4	Fazit: Erste Generation potentieller DHS-Inhibitoren	49
4.2	Zweite Generation neuer, verbesserter DHS-Inhibitoren	50
4.2.1	Synthesestrategie für den neuen DHS-Inhibitor der zweiten Generation...	53
4.2.2	Erste Gehversuche zur Darstellung von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1 <i>H</i> -indol 46	55
4.2.3	Fazit: Erste Syntheseveruche zur Darstellung von 46	69
4.3	Verbesserte Syntheseroute zur Darstellung von 46	71

4.3.1	Reduktion von 4-Amino-3-iodbenzonitril 50 und Einführung der Schutzgruppen.....	73
4.3.2	Aufbau der Indoleinheit - direkter Ringschluss (Teil 1)	74
4.3.3	Aufbau der Indoleinheit - direkter Ringschluss (Teil 2)	77
4.3.4	Einführung der Guanidinogruppe auf Indolstufe	79
4.3.5	Abspaltung der Tosyl-Schutzgruppe	81
4.3.6	C-C-Kreuzkupplung und anschließender Ringschluss.....	83
4.3.7	Abspaltung der Boc-Gruppen: Darstellung von 46	86
4.3.8	Biochemische Tests der Verbindung 46 aus der zweiten Generation neuer DHS-Inhibitoren	90
4.3.9	Fazit: Synthesen zur erstmaligen Darstellung von 46	93
5	Untersuchung von CNI-1493 und seiner Derivate.....	97
5.1	Synthese von CNI-1493 2	97
5.2	Darstellung der CNI-1493 Analoga 75-87	101
5.3	Biochemische Tests der CNI-1493 Analoga 75-87	103
5.3.1	Inhibition der DHS durch die CNI-1493 Analoga.....	103
5.3.2	Inhibition von HIV-1 in infizierten PM1-Zellen	106
5.3.3	Wirkung von CNI-1493 2 und dessen Analoga auf Pflanzenpathogene ...	108
5.4	Untersuchung der Hydrolyse von CNI-1493 2	111
5.4.1	Entwicklung einer HPLC-Methode	111
5.4.2	Hydrolyse von CNI-1493 2	112
5.5	Fazit: Synthese und Untersuchung der CNI-1493 Derivate	116
6	Carcinogenese durch aromatische Amine	118
6.1	Versuche zur Darstellung von C5-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxycytidin-Addukten	118
6.1.1	Darstellung von C5-Halogen-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dC.....	119
6.1.2	Darstellung von C5-Halogen-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dU.....	122
6.1.3	Kupplung der halogenierten Nucleoside mittels Buchwald-Hartwig Reaktion.....	123
6.2	Darstellung von <i>N</i> ² -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten und deren Einbau in Oligonucleotide	125
6.2.1	Darstellung der Edukte für die C-N-Kreuzkupplungsreaktion.....	126
6.2.2	Alternative zur Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion.....	129

Inhaltsverzeichnis

6.2.3	Darstellung der N^2 -Arylamin-modifizierten Phosphoramidite	132
6.2.4	Untersuchung N^2 -Arylamin-modifizierter Oligonucleotide	134
6.3	Darstellung N^2 -Arylamin-modifizierter 2'-dG-5'-Triphosphate	140
6.3.1	Synthese der N^2 -Arylamin-modifizierten <i>cyclo</i> Sal-Phosphattriester 153a und 153b	141
6.3.2	Darstellung der N^2 -(4-Anisidin)-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphate 152a und 152b	145
6.4	Fazit: Synthesen zur Darstellung der Arylamin-Addukte	150
7	Zusammenfassung	152
7.1	Neue <i>active-site</i> Inhibitoren der DHS	152
7.2	Untersuchung von CNI-1493 Derivaten als DHS-Inhibitoren	154
7.3	Aromatische Amine als DNA-Addukte	156
8	Summary	158
8.1	New <i>active-site</i> DHS inhibitors	158
8.2	CNI-1493 derivatives as DHS inhibitors	159
8.3	Synthesis of arylamine modified nucleosides	161
9	Experimenteller Teil	163
9.1	Allgemeines	163
9.1.1	Reagenzien	163
9.1.2	Lösungsmittel	163
9.1.3	Puffer für die HPLC	165
9.1.4	Chromatographie	165
9.1.5	Geräte	167
9.2	Biochemische Assays	169
9.2.1	Inhibition der Desoxyhypusinsynthese	169
9.2.2	Inhibition der HIV-1 Replikation in Zellkultur	170
9.2.3	Inhibition des Pathogenwachstums bei Mais	170
9.3	Hydrolyseuntersuchungen	171
9.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften	172
9.5	Synthesen zu den <i>active-site</i> DHS-Inhibitoren	181
9.5.1	Synthesen der ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren	181
9.5.2	Synthese des neuartigen DHS-Inhibitors (46) der zweiten Generation	193
9.6	Synthesen zu den CNI-Analoga 75-87	217

Inhaltsverzeichnis

9.6.1	Synthese von 3,5-Diacetylanilin 68	217
9.6.2	Synthese der <i>N,N'</i> -Bis[3,5-diacetylphenyl]-Diamide 89-100	219
9.6.3	Synthese der Guanylhydrazone zur Darstellung der CNI-1493 Analoga ..	226
9.7	Synthesen der Arylamin-Addukte	235
9.7.1	Synthesen zur Darstellung der C5-Arylamin 2'-dC-Addukte	235
9.7.2	Synthese der geschützten und C2-funktionalisierten 2'-dG-Derivate.....	245
9.7.3	Synthese der <i>N</i> ² -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte über die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion	256
9.7.4	Synthese der <i>N</i> ² -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte über die nucleophile aromatische Substitution.....	260
9.7.5	Überführung der <i>N</i> ² -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte in die Phosphoramidite	267
9.7.6	Synthesen zu den <i>N</i> ² -Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphaten	279
9.7.7	Synthese und Analytik der Oligonucleotide.....	283
10	Literaturverzeichnis	287
Anhang	I	
Gefahrstoffverzeichnis	I	
Verbindungsübersicht Teil 1	VII	
Verbindungsübersicht Teil 2	IX	
Verbindungsübersicht Teil 3	X	
Lebenslauf	XII	
Publikationen	XIII	
Eidesstattliche Erklärung	XV	

1 Einleitung

Im Verlauf der Geschichte traten immer wieder durch verschiedenste Auslöser schwere Epidemien auf, denen sehr viele Lebewesen zum Opfer fielen. Jedoch konnten viele Krankheiten erfolgreich therapiert, eingedämmt oder sogar ausgerottet werden. In der heutigen Zeit zählen die erworbene Immunschwächekrankheit AIDS und die Bildung von Tumoren durch entartetes Zellwachstum, bezeichnet als Krebs, zu den bedrohlichsten Krankheiten.

AIDS wird durch das Humane Immundefizienzvirus (HIV) ausgelöst und hat sich seit der ersten Diagnose im Jahre 1981 zu einer der bedrohlichsten Infektionskrankheiten der Welt entwickelt. Weltweit waren Ende 2011 laut UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) ungefähr 34.0 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert (vgl. Abb. 1, S. 2). Jährlich sterben etwa 1.6-1.9 Mio. Menschen an den Folgen von AIDS.^[1] Diese Zahlen machen die Notwendigkeit einer weitergehenden Entwicklung effizienter Strategien im Kampf gegen das HI-Virus deutlich. In den letzten Jahrzehnten haben antiretrovirale Therapien immens zur Verlängerung der Lebenserwartung HIV-positiver Patienten beigetragen. Bei diesen Therapieansätzen tritt jedoch immer häufiger das Problem der Resistenzbildung auf.

Krebserkrankungen unterscheiden sich grundlegend von AIDS und werden in den meisten Fällen durch chemische Substanzen und UV-Strahlung verursacht. Das Auslösen einer Tumorbildung durch Viren bildet eine Ausnahme, so z. B. der durch humane Papillomaviren hervorgerufene Gebärmutterhalskrebs (lat. Zervixkarzinom). Die unter dem Oberbegriff Krebs zusammengefassten Erkrankungen waren 2008 für 7.6 Millionen Tote weltweit verantwortlich.^[2] Nicht nur anhand der Zahl der Todesfälle ist deutlich erkennbar, dass Krebs ebenfalls eine große Gefahr für die Menschheit darstellt. Es sind in den letzten Jahrzehnten diverse Therapieansätze und diagnostische Möglichkeiten identifiziert und entwickelt worden. Jedoch ist oft keine vollständige Heilung möglich, so dass hier ebenfalls weitere Forschung notwendig ist.

Diese Arbeit umfasst vor allem Studien zu einem neuartigen Therapieansatz gegen das HI-Virus, der die Vermeidung von Resistenzen und Therapie gegen resistente Viren zum Ziel hat. Im Folgenden wird deshalb der Replikationszyklus des HI-Virus mit besonderem Augenmerk auf die involvierten zellulären Faktoren diskutiert und dabei auf mögliche Ansatzpunkte eingegangen. Als weiteres Projekt beschäftigt sich diese Arbeit mit Untersuchungen zur Carcinogenese durch aromatische Amine.

2 Kenntnisstand

2.1 Epidemiologie der Immunerkrankung AIDS

Zwei Jahre nach der ersten AIDS Diagnose wurde 1983 von *Montagnier et al.* und *Gallo et al.* erstmalig das für diese Immunkrankheit verantwortliche Virus isoliert, das als HIV bezeichnet wird.^[3,4] Der im Jahre 1986 identifizierte, zweite Typ des HI-Virus^[5] wurde als HIV-2 und der zuvor isolierte als HIV-1 bezeichnet.

Die dokumentierte Ausbreitung von HIV begann zunächst in den USA und Zentralafrika. Mittlerweile ist dieses Virus weltweit und vor allem in Ländern der Dritten Welt vertreten. International betrachtet stabilisiert sich die Anzahl der Erkrankten, so ist seit 2001 die Zahl der Neuinfektionen bis 2011 um etwa 20% auf ca. 2.5 Mio. Menschen gesunken (s. Abb. 1).

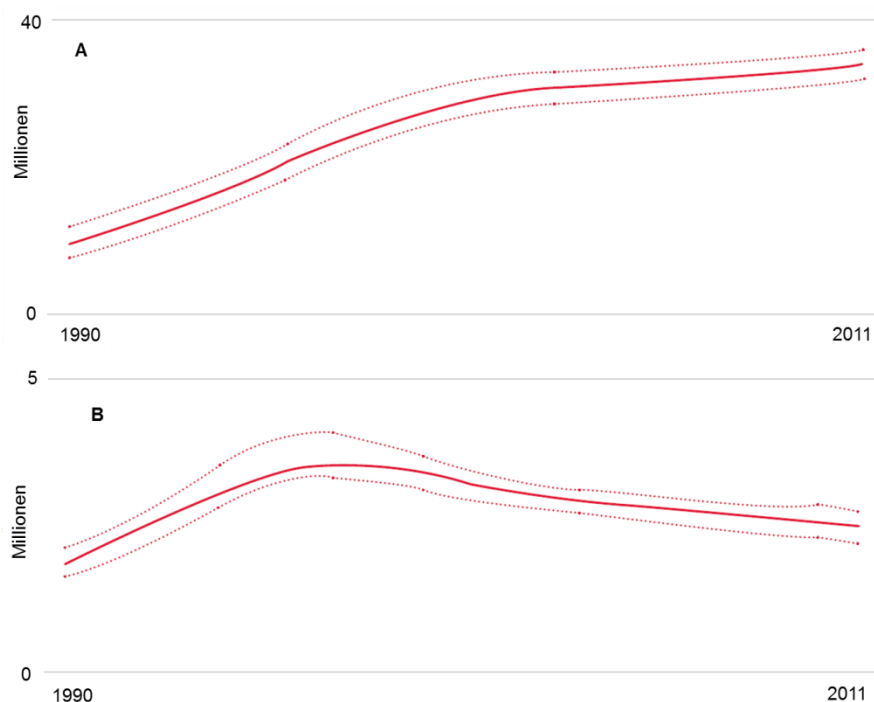


Abb. 1: A) Zahl der weltweit HIV-Infizierten, B) Zahl der weltweiten HIV-Neuinfektionen pro Jahr^[1]

Auch in afrikanischen Staaten zeigt sich eine Stabilisierung und teilweise ein Abfall des hohen prozentualen Anteils an HIV-Infizierten durch die sinkende Zahl an Neuinfektionen. In einigen Ländern in Ost-Europa und Zentralasien hingegen ist ein gegensätzlicher Trend zu beobachten, der auf die politischen Zustände sowie unzureichenden Zugang zu antiviralen Wirkstoffen zurückzuführen ist.^[1]

2.1.1 Der Replikationszyklus und Therapiemöglichkeiten von HIV-1

Das HI-Virus zählt zur Familie der Retroviren, welche das eigene Enzym *Reverse Transkriptase* (RT) benutzen, um die virale RNA in provirale cDNA umzuschreiben. Über die aus dem Vorläuferglykoprotein gp160 gebildeten Hüllproteine gp41 und gp120 erfolgt der Angriff des HI-Virus hauptsächlich auf Zellen, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Bei den CD4-positiven Zellen handelt es sich fast ausschließlich um Zellen des Immunsystems, z. B. T-Helferzellen. Da das Immunsystem durch massives Absterben dieser Zellen immens geschwächt wird, werden schließlich normalerweise ungefährliche Infektionen zur Lebensgefahr. Der Replikationszyklus des HI-Virus ist inzwischen sehr weit aufgeklärt und bietet mehrere Ansätze zur Therapie (vgl. Abb. 2).

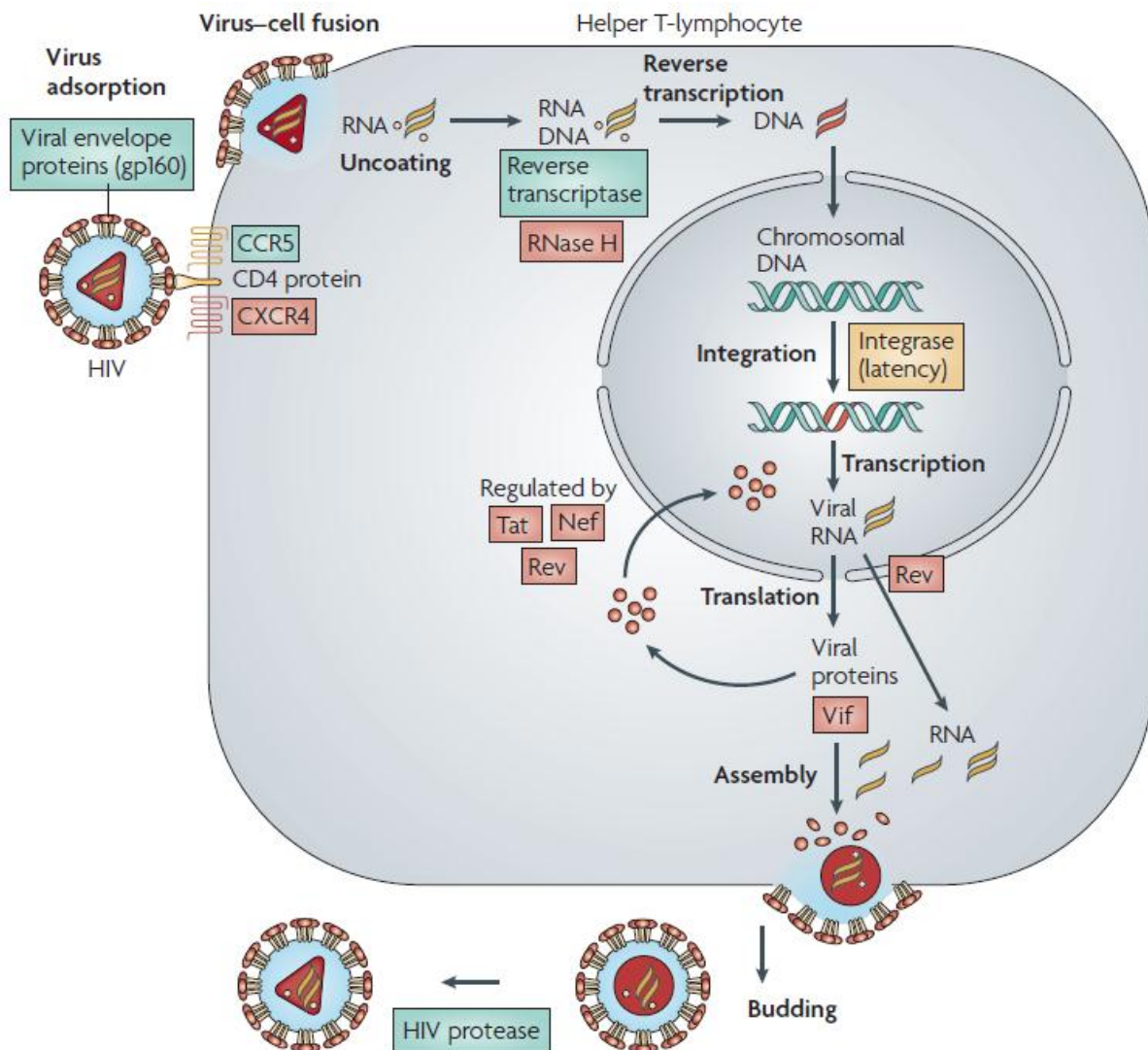


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ziele für Therapeutika im HIV-1 Replikationszyklus. In grün sind die zur Zeit adressierten Targets, in Gelb jene in fortgeschrittener klinischer Entwicklung und in Rot die zukünftig denkbaren Ziele für neue Medikamente dargestellt (mod.).^[6]

Die Inhibierung der viralen Enzyme RT und der Protease sowie der Fusion des Virus mit der Wirtszelle stellen die klassischen Behandlungswege dar.^[7] Der erste Durchbruch im Kampf gegen HIV gelang 1987 nach der Zulassung von Zidovudin[®] (3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin, AZT) zur Behandlung von AIDS.^[8] Hierbei handelt es sich um ein Nucleosidanalogen, dessen entsprechendes Triphosphat als Inhibitor der Reversen Transkriptase fungiert, da es keine 3'-Hydroxygruppe trägt und somit nach Einbau in den proviralen cDNA-Strang zu einem Kettenabbruch führt. Die RT besitzt keine *proof reading* Funktion und kann deswegen, anders als die humane DNA Polymerase, den Einbau dieser sogenannten NRTIs (Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren) nicht korrigieren.

Jedoch liegt im Fehlen der Korrekturfunktion auch ein großer „Vorteil“ für das HI-Virus, da die Fehlerhäufigkeit der RT und damit die Mutationsrate mit ca. 3 Mutationen pro Virus in einem Replikationszyklus extrem hoch ist.^[9] Aus dieser Mutationsrate resultiert die Bildung von Resistenzen des HI-Virus gegen die eingesetzten Medikamente. Bereits zwei Jahre nach Markteinführung konnten aus Patienten, die über einen längeren Zeitraum mit Zidovudin[®] behandelt worden waren, resistente Viren gegen diesen Wirkstoff isoliert werden.^[10]

Als Verbesserung der Monotherapie und zur Vermeidung von Resistenzen wurde 1996 die Kombinationstherapie HAART (*highly active anti-retroviral therapy*) eingeführt. Hierbei werden mindestens drei Wirkstoffe gemeinsam verabreicht, davon zwei NRTIs und ein dritter Wirkstoff, z. B. ein nicht-nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI) oder ein Protease Inhibitor (PI).^[8] Mit dieser Therapieform und der steten Weiterentwicklung neuer Wirkstoffe gegen die genannten viralen Targets konnten die Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten deutlich gesteigert werden.^[11] Die Viruslast kann mittels HAART so stark gesenkt werden, dass sie mit HIV-Tests oft nicht mehr nachgewiesen werden kann (< 50 Kopien/mL).^[12] Jedoch ist es falsch in diesen Fällen von einer Heilung zu sprechen, da sich im Körper latente Reservoirs befinden, z. B. in ruhenden T-Zellen oder im Gehirn.^[13-15] Aus diesen Reservoirs kann die Infektion jederzeit wieder ausbrechen. Erschwerend kommt hinzu, dass unter HAART multiresistente HI-Viren entstehen können und schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten können.^[16-18]

Ein aktueller Ansatz wurde im Jahre 2007 von *Sarkar et al.* veröffentlicht. Hier wurde über die Entwicklung einer Rekombinase berichtet, die in der Lage ist, die integrierte provirale HIV-1 DNA wieder aus dem Genom der Wirtszelle zu schneiden.^[19] Aktuell wird diskutiert, ob antiretrovirale Therapie als Prävention zur Verminderung der Ansteckungsgefahr angewendet werden soll.^[20-22] Normalerweise wird die antiretrovirale Therapie begonnen, wenn die Menge an Immunzellen unter eine kritische Grenze gefallen ist. Sehr problematisch bei diesem präventiven Ansatz sind die Kontrolle der Einnahme und die aus unregelmäßiger Einnahme entstehenden Resistenzen, die Nebenwirkungen durch längere Anwendung und der weltweit sehr ungleiche Zugang zu HIV-Medikamenten.

Neben den bereits beschriebenen viralen Enzymen benötigt das HI-Virus genau wie andere Viren diverse zelluläre Cofaktoren für die erfolgreiche Replikation und Bildung neuer Virionen (vgl. Abb. 2, S. 3).^[23] Generell bieten diese als Angriffsziel in der Therapie den Vorteil, dass Resistenzen durch z. B. die hohe Mutationsrate des Virus umgangen werden können. Hier besteht die Herausforderung darin, die Selektivität zwischen der Cytotoxizität und der beabsichtigten Wirkung sicherzustellen. Im Folgenden wird auf den Mechanismus des Transports viraler mRNA und der ungespleißten RNA zur Bildung neuer Viruspartikel näher eingegangen, da in diesem Zusammenhang ein neues, potenzielles Therapieziel gegen HIV-1 identifiziert wurde.

2.1.2 Transport viraler RNAs aus dem Zellkern - virale Helfer

Nach der Transkription der viralen RNA durch die RT gelangt die provirale DNA in den Nucleus. Anschließend kommt es zur Integration der retroviralen DNA in das Genom der Wirtszelle. Wird der Replikationsmechanismus der Wirtszelle aktiv, kommt es durch die wirtseigene RNA-Polymerase zur Transkription der proviralen DNA in die entsprechende mRNA. Die gespleißten mRNAs werden zur Proteinsynthese auf den zelleigenen Wegen ins Cytoplasma „transportiert“ und anschließend in die viralen Proteine translatiert. Diese Phase wird als „frühe Phase“ bezeichnet.

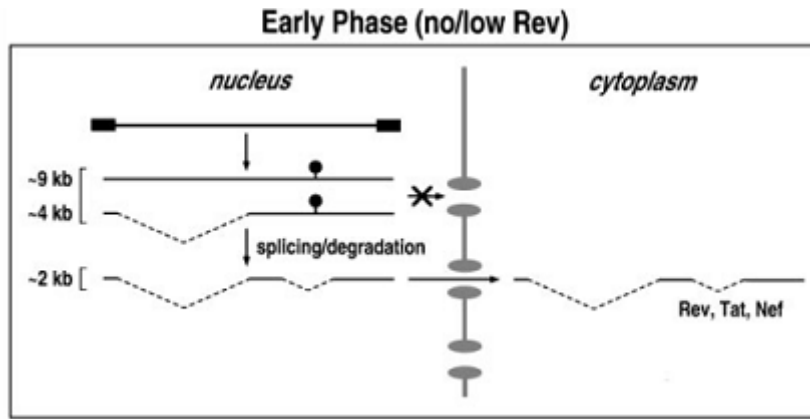


Abb. 3: Gespleißte virale mRNAs gelangen aus dem Zellkern ins Cytoplasma zur Translation der viralen Proteine^[24]

Unter diesen Proteinen befindet sich auch das virale Regulationsprotein Rev (vgl. Abb. 4). In der frühen Phase ist kein Rev vorhanden, es akkumuliert erst über die Zeit im Cytoplasma. Über ein *nuclear localization signal* am N-Terminus wird Rev in den Zellkern transportiert und löst dort den Übergang zur „späten Phase“ aus.^[25] Das HI-Virus benötigt Rev, um ungespleißte, intron-haltige virale RNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma zu transportieren und so neue Virionen bilden zu können. Darüber hinaus wird diskutiert, ob Rev auch in den Spleißvorgang eingreift.^[26]

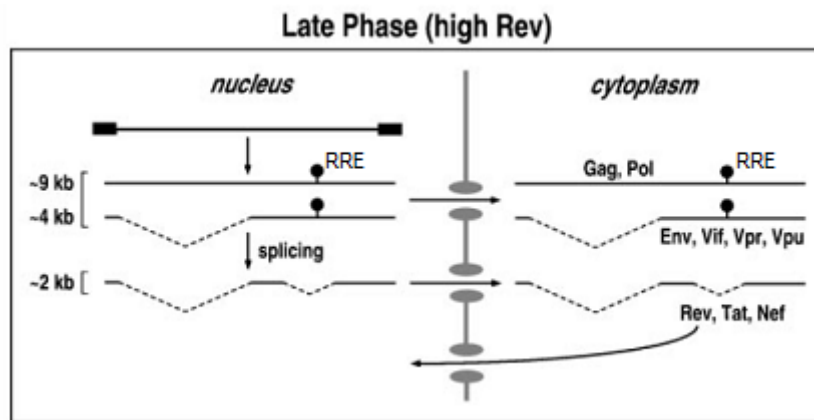


Abb. 4: Ungespleißte oder nicht vollständig gespleißte virale mRNAs gelangen durch Erkennung des RRE von Rev ins Cytoplasma (mod.)^[24]

Nach dem Übergang zur späten Phase initiiert Rev im Zellkern das Zusammenspiel weiterer Faktoren und führt dann durch Wechselwirkungen mit dem *Rev Response Element* (RRE) auf unvollständig gespleißten viralen mRNAs zu deren Transport ins Cytoplasma und zur dortigen Akkumulation dieser RNAs (s. Abb. 4). Das RRE ist eine ca. 250 Nucleotide lange, hoch geordnete Region innerhalb eines *env* Introns auf den viralen mRNAs und bildet eine *stem-loop* Struktur.^[27,28] Rev oligomerisiert mit dem RRE unter Bildung eines Ribonucleoprotein-Komplexes (RNP-Komplex) bestehend aus 8-10 Rev Molekülen und der mRNA.^[29]

2.2 Transport viraler RNAs aus dem Zellkern - zelluläre Helfer

Der Transport intron-haltiger, viraler mRNAs aus dem Nucleus ins Cytoplasma benötigt den bereits erwähnten Komplex aus Rev und dem RRE. Mit einer leucinreichen Erkennungssequenz am C-Terminus von Rev wird der Export über den zellulären „CRM1-Weg“ initiiert (siehe Abb. 5, S. 7).^[30] Nach erfolgreichem Transport dissoziiert der Translokationskomplex im Cytoplasma und sowohl CRM1 als auch Rev gelangen wieder in den Zellkern. Der Kreislauf beginnt erneut und führt zur Akkumulation der RRE-enhaltenden, viralen RNAs im Cytoplasma.^[31] Bis heute wurde eine Vielzahl von weiteren Wirtszellproteinen identifiziert, die am Transport beteiligt sind.^[32]

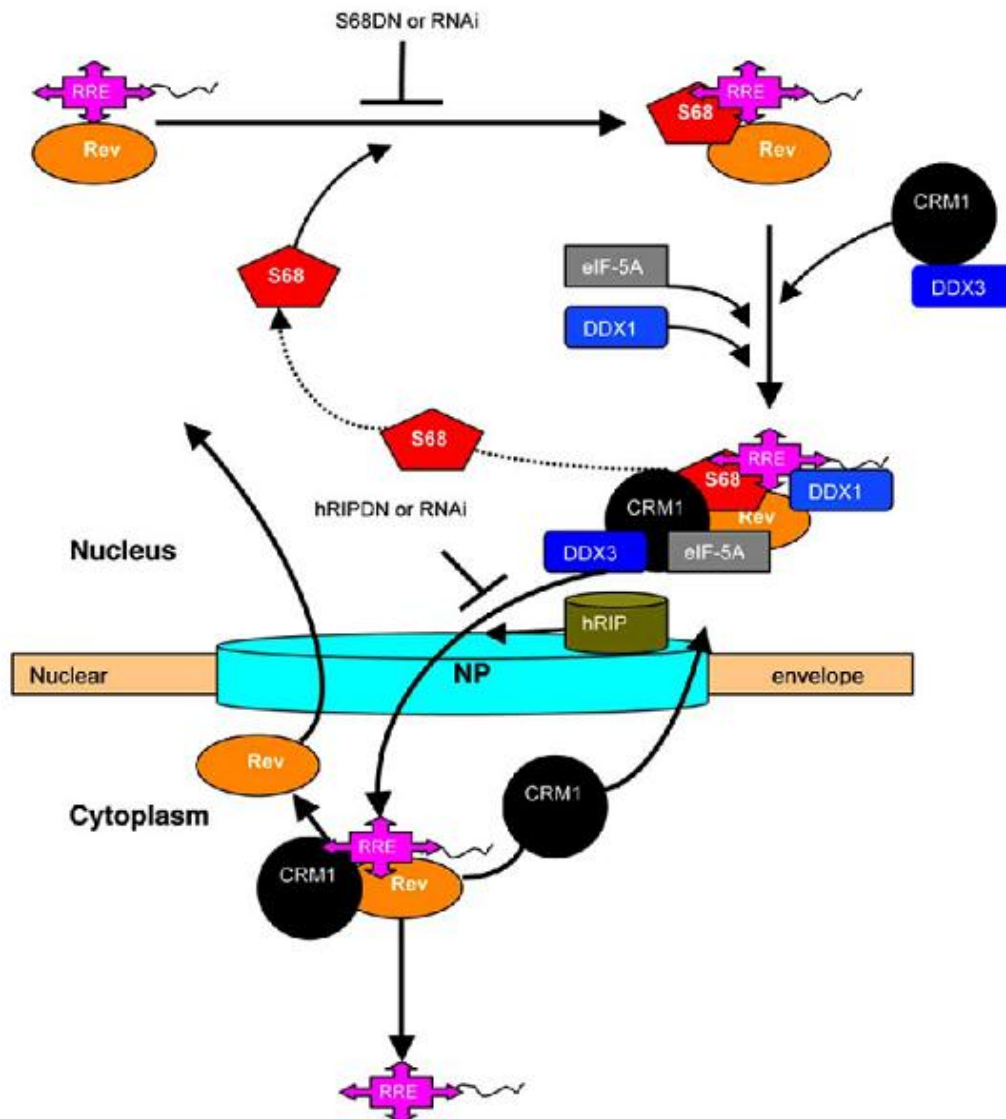


Abb. 5: Schematische Übersicht über die zellulären Cofaktoren des viralen mRNA Transports in der späten Phase des Replikationszyklus mit dem in grau dargestellten eIF-5A.^[31]

Zu den identifizierten, zellulären Cofaktoren gehört der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A), auf den im Folgenden näher eingegangen wird, da dieser für die HIV-1 Therapie und darüber hinaus ein neuartiges, interessantes Target darstellt (siehe Kapitel 2.2.3, S. 12).

2.2.1 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A)

Anfangs wurde eIF-5A als Initiationsfaktor für die Proteinsynthese im Allgemeinen gesehen.^[33,34] Dagegen sprach, dass der zelluläre „Knock-Out“ von eIF-5A keinen großen Einfluss auf die Proteinbiosyntheserate hat.^[35] Bis heute ist die exakte zelluläre Funktion von eIF-5A noch nicht vollständig aufgeklärt und wird weiter kontrovers diskutiert. Neuere Forschungsergebnisse deuten auf einen Einfluss dieses Proteins auf die Kettenverlängerung bei der Translation hin.^[36]

Sehr interessant ist, dass die generelle Aktivität von eIF-5A in Säugetierzellen besonders unter zellulärem Stress stark zunimmt.^[37,38] Hierdurch ergibt sich ein möglicherweise nutzbares therapeutisches Fenster, da so die Differenzierung zwischen gesunden und kranken bzw. infizierten Zellen möglich sein könnte. In höheren Eukaryoten wurde außerdem gezeigt, dass eIF-5A den Transport spezifischer mRNAs aus dem Nucleus ins Cytoplasma über den CRM1/Exportin1-Weg reguliert.^[39,40] Da das HI-Virus mittels Rev den Transport ungespleißter bzw. nicht vollständig gespleißter retroviraler mRNAs über den CRM1-Weg für seine Zwecke benutzt, ist ein funktionsfähiger eIF-5A für eine effektive HIV Replikation notwendig (s. Abb. 5, S. 7).^[41-43]

eIF-5A ist ein evolutionär hochkonserviertes, 17 kDa großes, acidisches Protein und bis heute das einzige bekannte zelluläre Enzym, welches an einer Position die seltene Aminosäure Hypusin enthält.^[44] Hypusin (*N*⁶-(4-Amino-2*R*-hydroxybutyl)-lysin) wurde 1971 erstmals von *Shiba et al.* aus homogenisiertem Rinderhirn isoliert und charakterisiert.^[45] Zur Aktivierung von eIF-5A wird spezifisch das Lysin an Position 50 durch zwei zelluläre Enzyme über posttranslationale Modifikation in Hypusin überführt (siehe Abb. 6, S.9).

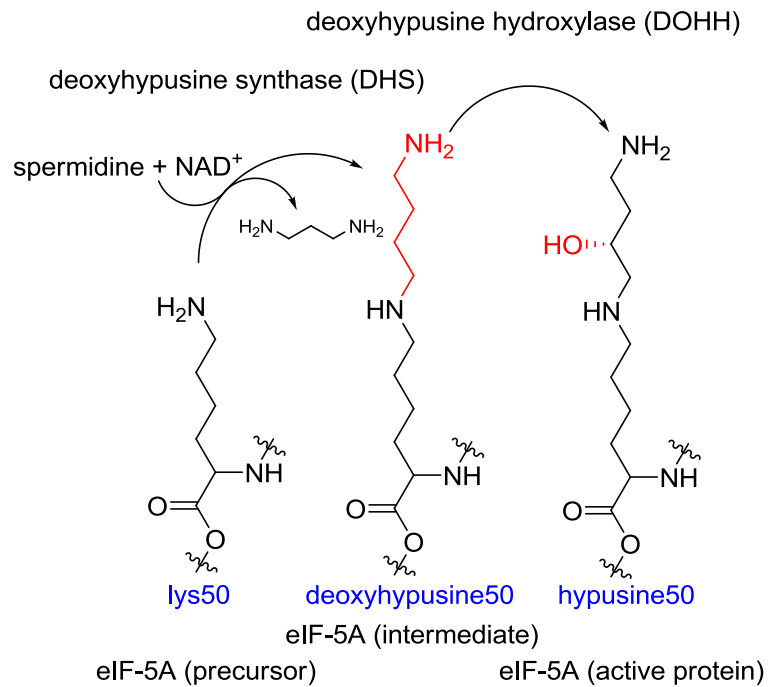


Abb. 6: Aktivierung von eIF-5A

Zuerst überträgt die Desoxyhypusinsynthase (DHS) mit NAD⁺ als Cofaktor die Aminobutyleinheit eines Spermidins auf die terminale Aminogruppe vom Lysin. Anschließend wird die Hydroxygruppe durch die Desoxyhypusinhydroxylase (DOHH) eingeführt.

2.2.2 Die Desoxyhypusinsynthase (DHS)

Von den beiden zur eIF-5A Aktivierung benötigten Enzymen konzentrierte sich die Forschung zunächst auf die DHS (s. Abb. 7, S. 10), da für die DOHH bis jetzt noch keine Röntgenkristallstruktur publiziert worden ist. Jedoch wurden über Homologie-Simulationen erste Strukturhinweise bezüglich der DOHH gewonnen.^[46]

Die DHS hat als Homotetramer ein Gewicht von 164 kDa, besteht aus zwei eng assoziierten Dimeren und hat bei einem pH-Wert von 9.0 - 9.5 ihre maximale Aktivität, welche sich mit sinkendem kontinuierlich verringert und unter pH 7.0 nahezu null ist.^[47]

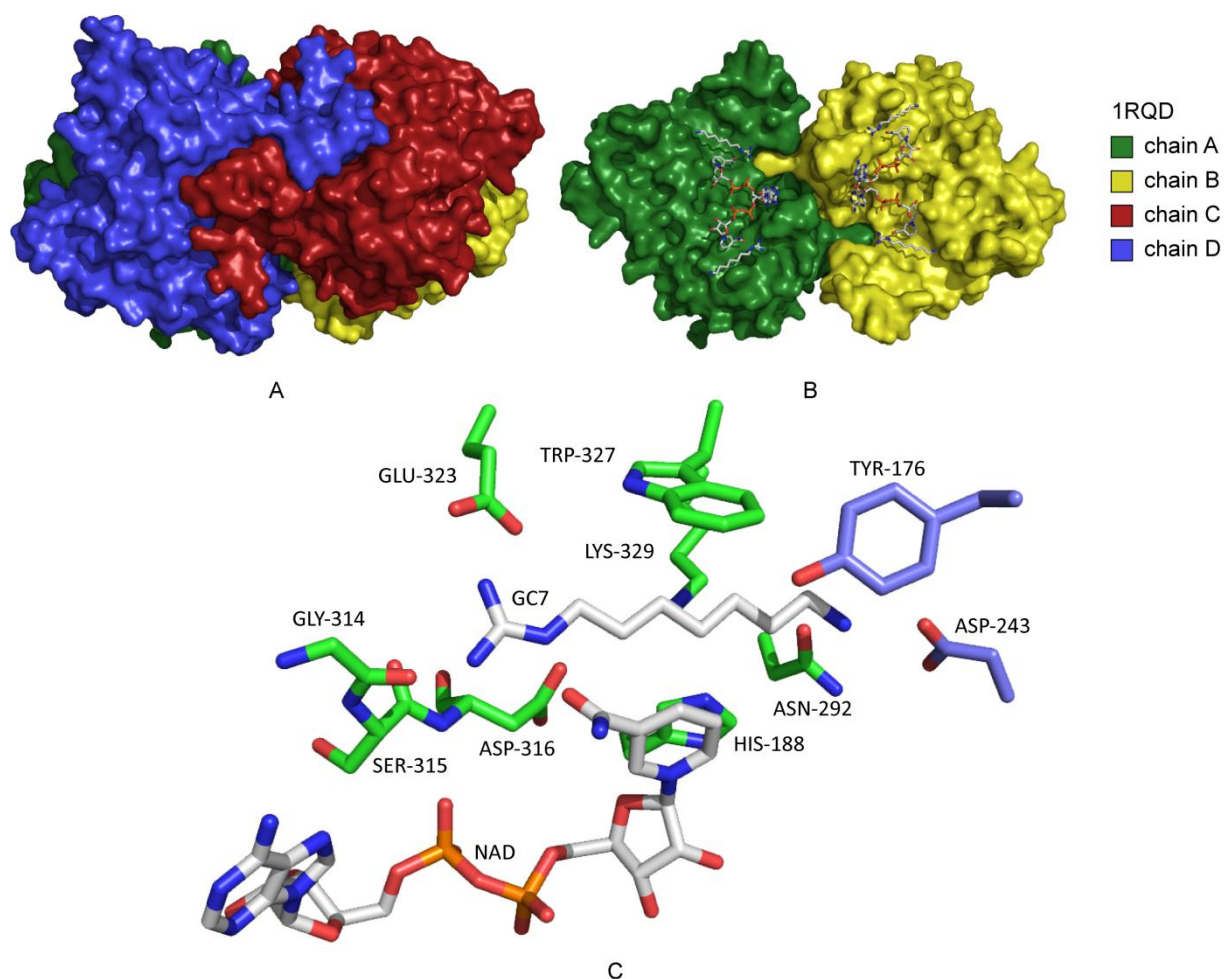


Abb. 7: A) Tetramere Kristallstruktur 1RQD der humanen DHS, B) Ketten A und B mit NAD und dem Inhibitor GC7 **1** in allen vier Bindungsstellen, C) Detaillierte Ansicht des aktiven Zentrums^[48]

Im Jahre 1998 wurde erstmalig eine Röntgenkristallstruktur der DHS erhalten.^[49] Sechs Jahre später wurden neue Kristallstrukturen, die nun auch die aktive Form der DHS abbildeten, veröffentlicht (1ROZ und 1RQD).^[47] Durch Co-Kristallisation von DHS mit *N*-1-Guanyl-1,7-diaminoheptan (GC7 **1**) und NAD konnte gezeigt werden, dass die aktive Form der DHS ein Tetramer mit 4 aktiven Zentren ist, wobei GC7 **1** als kompetitiver Inhibitor in den vier aktiven Zentren der DHS anstelle des natürlichen Substrates Spermidin bindet (s. Abb. 7 B).

GC7 **1** wurde 1993 von *Jakus et al.* noch vor der ersten Kristallstruktur durch Testen verschiedener Analoga des natürlichen Substrats Spermidin als Inhibitor der DHS identifiziert.^[50] Mit einem IC_{50} von 0.04 μM ist GC7 ein sehr aktiver Inhibitor, der jedoch aufgrund seiner Flexibilität zu sehr unspezifischen Bindungen *in vivo* tendiert.^[51] Ein weiterer Inhibitor der DHS ist das Guanylhydrazon CNI-1493 bzw. Semapimod **2** (s. Abb. 8, S.11). Ursprünglich wurde CNI-1493 **2** von *Bianchi et al.* als Wirkstoff zur Unterdrückung Lipopolysaccharid-induzierter pro-inflammatorischer Zytokine beschrieben.^[52]

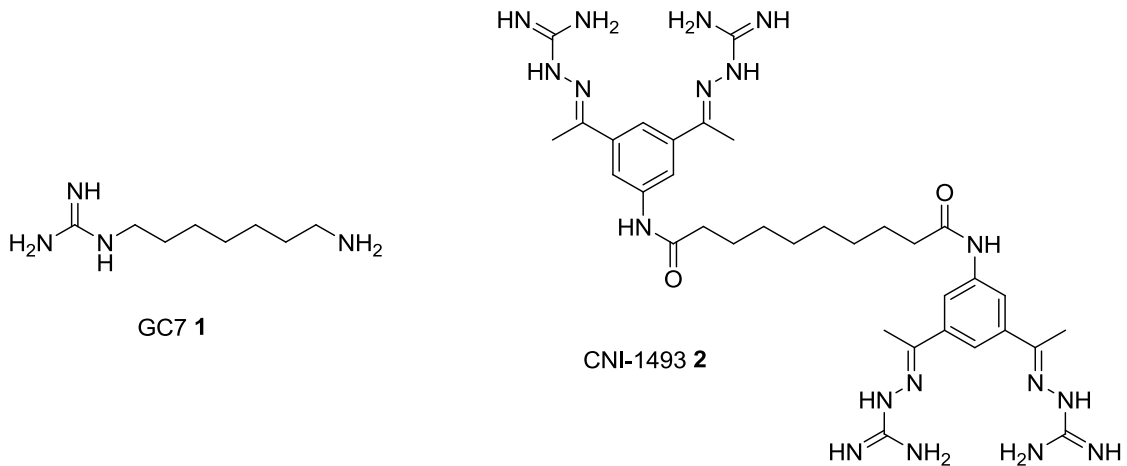


Abb. 8: Beispiele für Inhibitoren der Desoxyhypusinsynthese

Es zeigte sich später, dass CNI-1493 **2** auch ein effizienter Inhibitor der DHS ist ($IC_{50} = 2 \mu M$).^[53] Der genaue Wirkmechanismus von CNI-1493 **2** ist jedoch noch nicht bekannt. Von unserem Kooperationspartner *R. Hilgenfeld* konnte die DHS mit CNI-1493 **2** co-kristallisiert werden und eine Struktur mit einer sehr guten Auflösung von $1.85 \text{ \AA}$ erhalten werden.^[54] Die Struktur ergab, dass CNI-1493 **2** auf der Außenseite sehr nah am Eingang zum aktiven Zentrum gebunden ist und möglicherweise den Zugang von eIF-5A blockiert. Alternativ könnte CNI-1493 **2** zwei DHS-Tetramere koordinieren und so die Interaktion zwischen DHS und eIF-5A stören.

Sehr interessante Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden 2005 von *Hauber et al.* veröffentlicht, die den Bogen von den zellulären Proteinen eIF-5A und DHS zurück zum HI-Virus spannten.^[55] Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der DHS durch $0.5 - 1.0 \mu M$ CNI-1493 **2** über die Hemmung der Aktivierung von eIF-5A zu einer effektiven Hemmung der HIV-1 Replikation führte (s. Abb. 9, S. 11). In Vergleichsexperimenten wurde die DHS mittels RNA Interferenz ausgeschaltet, und dabei wurde festgestellt, dass es in diesen Zellen ebenfalls zu einer Inhibition der Virusreplikation kam. Daraus folgt ein weiterer Hinweis darauf, dass eine DHS Inhibition ein erfolgsversprechender Ansatz zur HIV Therapie sein könnte.

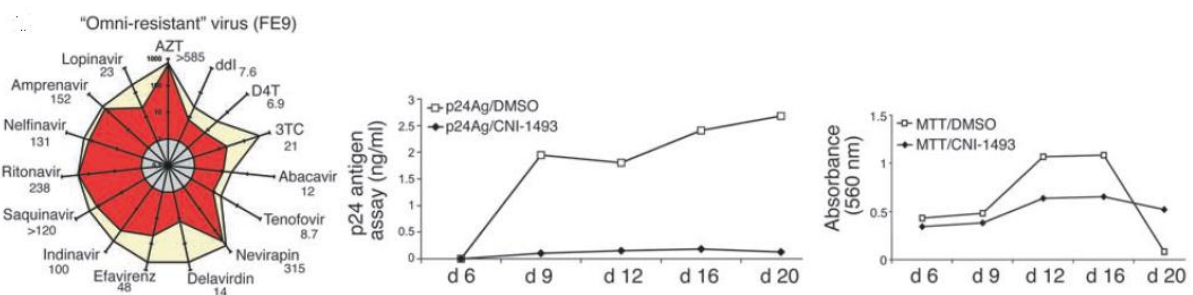


Abb. 9: Inhibition der HIV-1 Replikation durch CNI-1493 **2** (mod.)^[55]

Wie in Abb. 9 dargestellt, zeigte CNI-1493 auch bei aus Patienten isolierten, multiresistenten Virusstämmen eine signifikante Inhibition der Virusreplikation. Durch Untersuchung des Einflusses von CNI-1493 **2** auf Apoptose, Zellzyklus und Vitalität gesunder Zellen wurde bestätigt, dass bei den eingesetzten Konzentrationen keine Toxizität auftrat.

2.2.3 eIF-5A als potentielles Therapieziel für verschiedene Erkrankungen

Basierend auf der Beobachtung, dass unter zellulärem Stress eine Hochregulation der Aktivierung von eIF-5A stattfindet,^[37] sind neben der Inhibition von HIV-1 in der Literatur weitere Ergebnisse über den potentiellen Einfluss von eIF-5A auf verschiedene andere Krankheiten publiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass bei chronischer myeloischer Leukämie in infizierten Zellen ebenfalls eine verstärkte Aktivierung von eIF-5A stattfindet.^[56] Das synthetische Guanylhydrazon CNI-1493 **2** wurde von *Specht et al.* an Malaria infizierten Mäusen getestet. Dabei wurde ein deutlicher Rückgang der Parasitenzahl sowie der Sterblichkeit beobachtet.^[57]

Ein weiteres interessantes Krankheitsbild in Zusammenhang mit eIF-5A ist Diabetes. Sowohl Typ 1 als auch Typ 2 sind durch einen zu hohen Glukosespiegel aufgrund fehlenden Insulins im Blut gekennzeichnet. Diabetes steht in direktem Zusammenhang mit einer Zerstörung oder Abnahme der insulinproduzierenden β -Zellen in der Pankreas. Im Jahre 2010 konnten *Maier et al.* im Mausmodell zeigen, dass eIF-5A ein sehr wichtiger Regulator der Reaktion von β -Zellen auf die pro-inflammatorischen Zytokine, die zu oben erwähnter Zerstörung der Zellen führen, zu sein scheint.^[58]

Die Vielfältigkeit der hier erwähnten Krankheiten in Zusammenhang mit eIF-5A macht die Anreize einer Entwicklung und potentiellen Anwendung von Inhibitoren der DHS deutlich.

2.3 Wirkstoffentwicklung in der Medizinischen Chemie

Im Durchschnitt dauert die Entwicklung eines neuen Medikaments 12 Jahre und kostet zwischen 500 Mio. und 2 Mrd. USD.^[59] Aufgrund der Laufzeit eines Patents von 20 Jahren bleiben so nur noch acht Jahre, damit sich die Investitionen amortisieren können. Die Suche nach neuen Wirkstoffen ist oft mit der

sprichwörtlichen Suche nach der Nadel im Heuhaufen zu vergleichen. Traditionell bieten Naturstoffe einen möglichen Zugang und wurden oft durch Beobachtung einer Wirkung, z. B. Salicin aus der Weidenpflanze und metabolischer Vorläufer der Salicylsäure, oder zufällig, z. B. Penicilin, identifiziert.^[60-62] Neben Naturstoffen spielen partial- oder totalsynthetisch hergestellte chemische Substanzen eine wichtige Rolle.

Hinsichtlich der Anwendung des späteren Arzneistoffes ist gerade in der HIV-Therapie eine Verabreichungsform notwendig, die dem Patienten eine gleichmäßige und zuverlässige Einnahme so einfach wie möglich macht. Die orale Einnahme in Tablettenform ist dafür ideal geeignet. Um eine gewisse Voreinschätzung zur oralen Bioverfügbarkeit zu geben, hat C. A. Lipinski 1997 folgende empirisch bestimmte Regeln für Wirkstoffe aufgestellt:^[63]

- ≤ 5 Wasserstoffbrückendonatoren
- ≤ 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren
- Molmasse < 500 g/mol
- $\log P \leq 5$

Zwei Jahre später wurden diese Regeln von Ghose *et al.* folgendermaßen erweitert:^[64]

- Molmasse zwischen 160 und 480 g/mol
- $\log P$ zwischen - 0.4 und + 5.6
- Gesamtzahl der Atome zwischen 20 und 70

Jedoch führen auch diese Regeln nicht zur kategorische korrekten Einteilung, so dass immer erst experimentelle Tests Sicherheit über die Bioverfügbarkeit geben können. Es zeigte sich zudem, dass viele Stoffe trotz Verletzung der obigen Faustregeln oral verfügbar sind. Generell können auch Derivate des aktiven Wirkstoffs verabreicht werden, z. B. Prodrugs.^[65] Bevor die Bioverfügbarkeit beurteilt werden kann, müssen die pharmakologisch aktiven Substanzen identifiziert werden. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze, die sich auch synergistisch kombinieren lassen: Unter anderem gibt es den sogenannten Screening-Ansatz $\rightarrow$ „zufällig“ und andererseits das gezielte, bioinformatische Design neuer Moleküle $\rightarrow$ „rational“. Auf beide Ansätze wird im Folgenden näher eingegangen.

2.3.1 Hochdurchsatz-Screening

Das *High Throughput Screening* (HTS) wurde ursprünglich zum schnellen, parallelen und automatisierten Testen von sehr großen Substanzbibliotheken niedermolekularer Verbindungen gegen ein bestimmtes Target in einem vorher etablierten Assay entwickelt. Zur Kontrolle des Screenings werden bekannte inaktive und aktive Verbindungen mitgetestet, aus deren Ergebnissen sich dann Fehler und Abweichungen im System erkennen lassen. Zeigt eine Substanz wiederholt Aktivität, bezeichnet man sie als *Hit*. Nach der Strukturaufklärung der *Hits* werden diese Substanzen näher untersucht und hinsichtlich ihrer Eignung als mögliche Leitstruktur überprüft. Die Technik hat sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt, so dass nun neben der Automation und des hohen Durchsatzes auch Assays für komplexe Fragestellungen implementiert werden können. Neben zellfreien oder zellbasierten Assays lassen sich im HTS mittlerweile auch Phänotyp Analysen z. B. an Zebrafisch-Embryonen durchführen.^[66] Bezogen auf die DHS gelang *Sommer et al.* im Jahre 2004 die Etablierung eines Screening-Assays von potentiellen Inhibitoren der DHS.^[53]

Das Hochdurchsatz-Screening setzt große Substanzbibliotheken voraus, welche Naturstoffe, Moleküle aus anderen Forschungsprojekten und neue Substanzen, die z. B. durch kombinatorische Chemie zugänglich sind, enthalten können.^[67] In der kombinatorischen Chemie werden meist festphasengebundene Edukte mit verschiedenen Reaktanden parallel umgesetzt, was „schneller“ zu einer großen Anzahl von Molekülen führt (siehe Abb. 10).^[68]

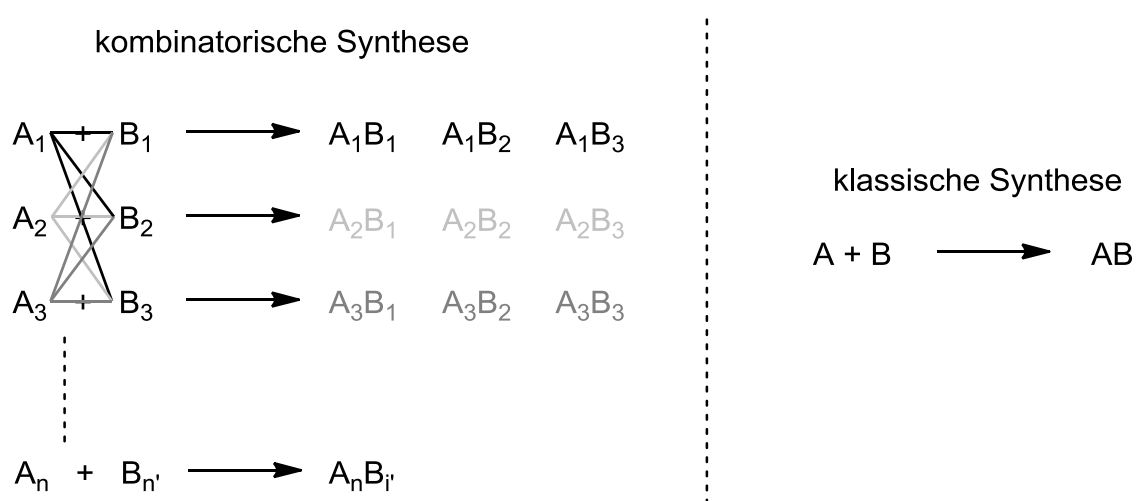


Abb. 10: Prinzip der kombinatorischen Chemie im Vergleich zur klassischen Synthese. Jede Variante von Substanz A reagiert mit jeder Variante von Substanz B. Aus $n+n'$ Reagenzien entstehen $n \cdot n'$ Produkte.

Bei einer kombinatorisch hergestellten Bibliothek muss zum Screening neuer Hits auf eine ausreichende Diversität der Bibliothek geachtet werden, da die verschiedenen Reaktanden (A_n, B_n) ähnliche funktionelle Gruppen aufweisen. Für die Leitstrukturoptimierung ist die kombinatorische Chemie gut geeignet, da hier eine definierte Grundstruktur vielfältig substituiert wird. Auch in der Flüssigphasensynthese werden vermehrt polymergebundene Reagenzien und Fällungsmittel eingesetzt, um viele parallele Reaktionen effizienter durchführen zu können.^[69] Gute Kontrollmöglichkeiten (DC, LCMS) können so mit den Vorteilen der Festphasensynthesen (Reinigung, Isolierung der Produkte) verbunden werden.

2.3.2 Virtuelles Wirkstoffdesign

Im Gegensatz zum experimentellen Hochdurchsatz-Screening benötigt man beim virtuellen Wirkstoffdesign genaue Kenntnis des Targets. Dies schränkt die Anwendbarkeit ein, ist jedoch ein rationalerer Ansatz, da der sprichwörtliche Heuhaufen deutlich kleiner ausfällt und so die „Nadel“ leichter gefunden werden kann.

Ist die Kristallstruktur des Zielproteins bekannt, so kann mit Hilfe von Computerprogrammen gezielt nach potentiell aktiven Substanzen gesucht werden. Idealerweise ist in der Struktur ein bekannter Inhibitor co-kristallisiert. Dieser Ansatz wird als Struktur-basiertes Wirkstoffdesign bezeichnet.^[70] Die virtuell (*in silico*) getesteten Moleküle stammen aus großen Datenbanken, wie z. B. ZINC^[71] und sind real existierende oder theoretische Verbindungen. Bevor die „virtuellen Hits“ gekauft bzw. synthetisiert und anschließend *in vitro* getestet werden, müssen sie hinsichtlich ihrer Struktur überprüft werden, z. B. können Bindungen chemisch unmögliche Winkel aufweisen oder funktionelle Gruppen falsch protoniert sein. Diese falschen Ergebnisse der Computerberechnungen hätten *in vitro* inaktive Moleküle zur Folge.

Beim Fragment-basierten Wirkstoffdesign wird ein kleines Molekül mit eher geringerer Bindungsaffinität als Basis genommen und anschließend sukzessive mit weiteren passenden Fragmenten zu einem vollwertigen Molekül mit hoher Bindungsaffinität zusammengesetzt. Die Fragmente werden untereinander so kombiniert, dass die potentiellen Interaktionsstellen im aktiven Zentrum möglichst effizient adressiert werden (siehe Abb. 11).

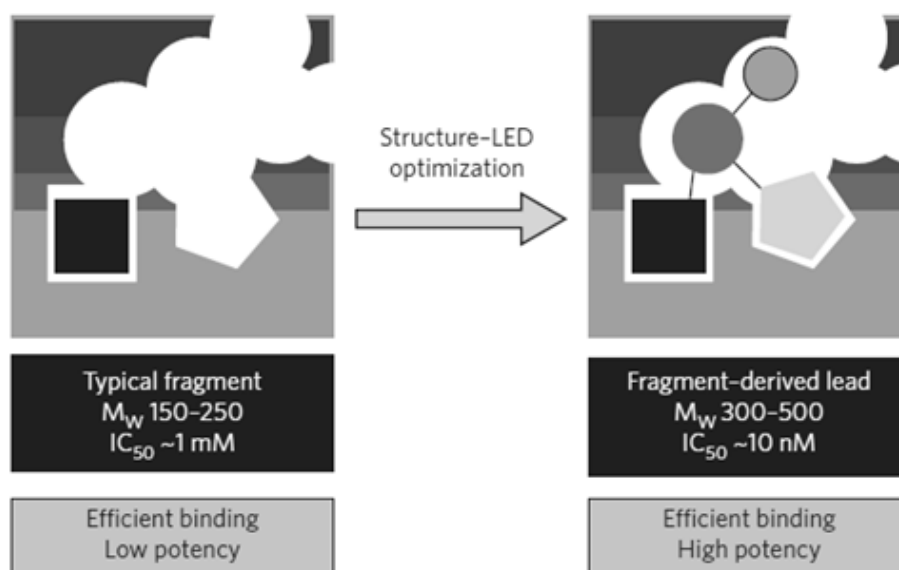


Abb. 11: Fragment-basiertes Wirkstoffdesign (mod.)^[72]

Die Bindungsaffinität der zusammengesetzten Moleküle wird anschließend *in silico* getestet. Auch hier müssen die vom Computer präsentierten Lösungen intensiv hinterfragt werden, bevor die Verbindungen chemisch synthetisiert und *in vitro* getestet werden. Mit den realen Testergebnissen werden entweder die *in silico* Berechnungen optimiert oder es wird bei bereits sehr guten Ergebnissen zur weiteren Leitstrukturoptimierung übergegangen. Generell bieten *in silico* Screening Methoden den Vorteil, dass ein deutlich geringerer experimenteller Aufwand nötig ist und somit die Effizienz erhöht werden kann. Trotz der Vorteile gibt es auch einige erwähnenswerte Nachteile der virtuellen Wirkstoffsuche, so dass oft auf HTS zurückgegriffen wird.

Ein großes Problem ist, dass sich nicht alle Targets kristallisieren lassen, wie beispielsweise membrangebundene Proteine (z. B. Ionenkanäle). Bei anderen interessanten Targets sind noch keine Kristallstrukturen publiziert (z. B. DOHH) oder nur in schlechter Auflösung verfügbar. In diesen Fällen lassen sich die Methoden des virtuellen Wirkstoffdesigns nicht erfolgreich anwenden. Außerdem kann die Enzymstruktur im Einkristall ungleich der in Lösung sein. Als Hilfsmittel werden zur besseren Vorhersage des Verhaltens der Proteine in Lösung zusätzlich *molecular dynamics* (MD) Simulationen durchgeführt.^[73]

2.4 Toxizität chemischer Verbindungen

Mit den beschriebenen Techniken (HTS oder virtuelles Screening) lassen sich potentielle Hits bzw. Leitstrukturen für viele Targets identifizieren. Neben der Affinität zum Target spielen die so genannten ADME Eigenschaften (*Administration, Distribution, Metabolism* und *Excretion*) der Verbindung für die Eignung als potentieller Arzneistoff eine entscheidende Rolle.^[74] Um Tierversuche so weit wie möglich zu vermeiden, werden immer bessere zellbasierte Assays zur Simulation der biochemischen Prozesse entwickelt.^[75]

Die Gefahr toxischer Effekte ist bei zelleigenen Targets oft größer als z. B. bei NRTIs als Inhibitoren der RT (vgl. Kapitel 2.1.1, S. 4). Das Schmerzmittel 4-Ethoxyacetanilid (Phenacetin) wurde beispielsweise aufgrund der nierenschädigenden Wirkung in den 80er Jahren vom Markt genommen und durch seinen Metaboliten Paracetamol (4-Acetaminophenol) ersetzt.^[76]

Generell können chemische Substanzen neben direkter Toxizität auch indirekt schädigen, wenn sich Metaboliten des Moleküls als gesundheitsschädlich erweisen. Dies trifft teilweise auf die Gruppe der aromatischen Amine zu, deren Stoffwechselprodukte zur Entstehung von Krebs führen können (siehe Kap. 2.5.1, S. 18). Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen des zweiten Themas dieser Dissertation dargestellt.

2.5 Krebs

Unter Krebs versteht man eine Vielzahl von Erkrankungen mit unkontrolliertem Zellwachstum. Man unterscheidet hierbei zwischen gutartigen (benignen) und bösartigen (malignen) Tumoren. Eine Schätzung der *American Cancer Society* geht für das Jahr 2008 von 560 000 Krebstoten und 1.43 Millionen Neuerkrankungen allein in den USA aus.^[77]

Die Tatsache, dass die entarteten Zellen körpereigene Zellen sind, macht eine Therapie sehr schwierig. In den meisten Fällen kann der Tumor operativ entfernt werden, wenn dieser rechtzeitig erkannt wird. Eine Chemotherapie mit Zytostatika, die alle sich schnell teilenden Zellen abtöten, und die Bestrahlung der Tumorregion sind weitere Behandlungsmöglichkeiten, die aber oft mit starken Nebenwirkungen

verbunden sind. Neben dem eigenen Wachstum gibt ein Tumor maligne Zellen an den Blutkreislauf ab, was im ungünstigsten Fall zu Metastasen führen kann.^[78]

Als Auslöser von Krebs werden hauptsächlich UV-Strahlung und chemische Substanzen verantwortlich gemacht. Die carcinogenen Eigenschaften einer Substanz beruhen meist auf einer mutagenen Wirkung. Diese Art der Toxizität bezeichnet man als Genotoxizität. Zur Untersuchung der Carcinogenität einer Substanz gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben umstrittenen Tierversuchen hat sich der nach *B. N. Ames* benannte Ames-Test als wichtigster Test etabliert und wird z. B. in der präklinischen Prüfung bei der Wirkstoffentwicklung eingesetzt.^[79] Bei diesem Test wird die mutagene Wirkung der Substanz auf histidinauxotrophe Bakterienstämme untersucht.

2.5.1 Carcinogenese durch aromatische Amine

Die Exposition mit chemischen Substanzen gilt als ein Hauptauslöser von Krebs. So stehen aromatische Amine in Zusammenhang mit der Bildung von z. B. Harnblasenkarzinomen (s. Abb. 12).^[80,81]

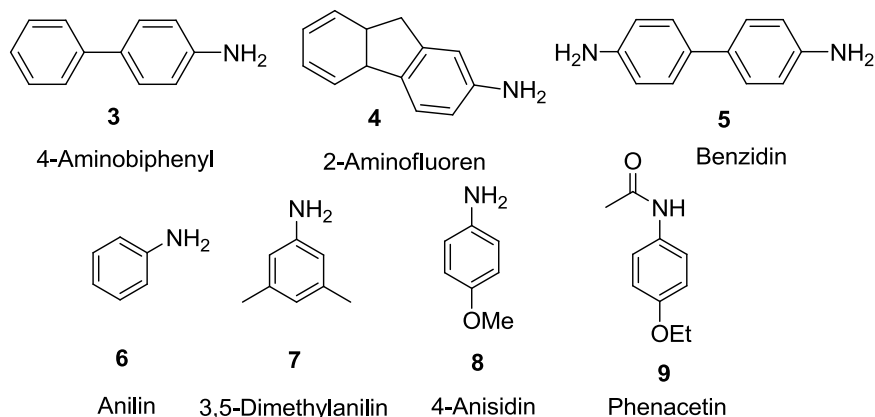


Abb. 12: Exemplarisch ausgewählte aromatische Amine

Trotz der unterschiedlich starken Carcinogenität der aromatischen Amine ist der zur Krebsentstehung führende Metabolismus in allen Fällen identisch, wobei der genaue Mechanismus *in vivo* noch nicht vollständig aufgeklärt ist. In der Leber kann das aromatische Amin in einer Cytochrom-P₄₅₀-vermittelten Reaktion zum Hydroxylamin oxidiert werden (siehe Abb. 13, S. 19). Nach anschließender *N*-Glucuronidierung kann das aromatische Amin als wasserlöslicher Glucuronsäureester ausgeschieden werden. Jedoch können die aromatischen Amine auch durch unerwünschte,

enzymatische Reaktionen zu elektrophilen Aminierungsreagenzien („ultimale Carcinogene“) umgewandelt werden.

Gelangt das Hydroxylamin in die Harnblase, kann es zur Bildung des ultimalen Carcinogens kommen, da es aufgrund des geringen pH-Wertes protoniert wird und dann unter nicht-enzymatischer Wasserabspaltung das hochreaktive Nitreniumion liefert. Dieses ultimale Carcinogen kann kovalent an die DNA oder andere Biomoleküle binden. Neben dem nicht-enzymatischen Aktivierungsschritt gibt es je nach Spezies und Organ eine Reihe von enzymatisch katalysierten Wegen.^[82,83] Je nach Carcinogen sind die Anzahl, die Struktur und die Menge der mit den DNA-Basen gebildeten Produkte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterschiedlich, so dass die angegebenen Häufigkeiten relative Zahlen sind und nur Indizien für bevorzugt gebildete Addukte darstellen.

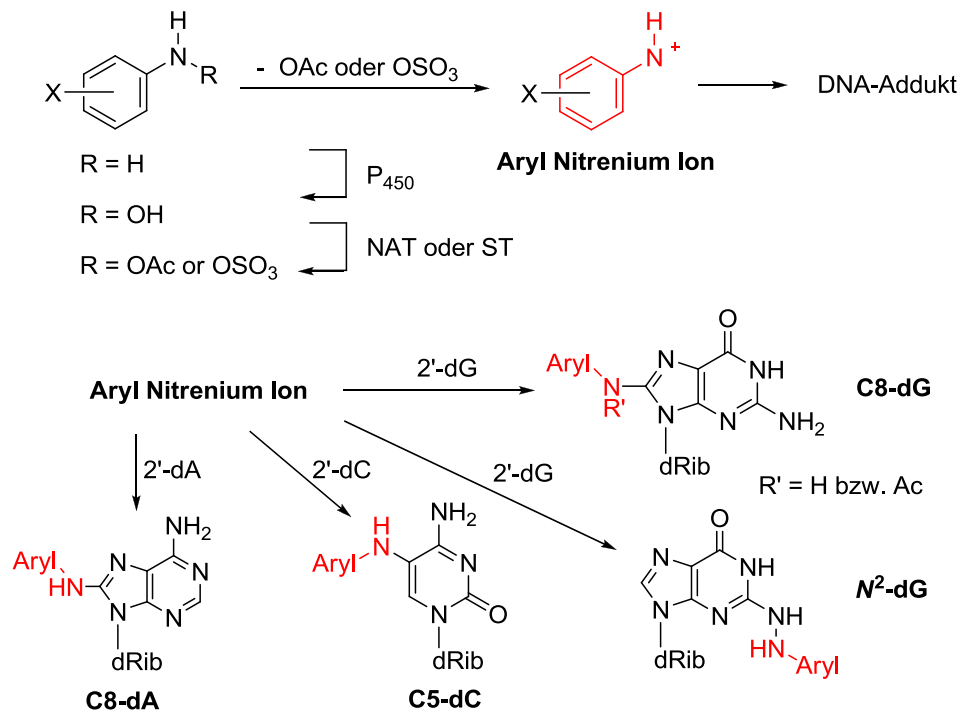


Abb. 13: Schematischer Metabolismus aromatischer Amine und Beispiele für *in vitro* bzw. *in vivo* gefundene Addukte mit der DNA

In vivo bilden die gezeigten C8-Addukte mit einer Häufigkeit von ca. 90% die Hauptprodukte.^[84] Die *N*²-Hydrazino-2'-desoxyguanosin-Addukte spielen mit < 5% eine mengenmäßig untergeordnete Rolle, besitzen aber trotzdem biologische Relevanz, da sie *in vivo* persistenter als die C8-Addukte des 2'-Desoxyguanosins zu sein scheinen.^[85] Im Jahre 2007 wurden nach Inkubation von Zellen mit

3,5-Dimethylanilin **7** *in vitro* auch C5-2'-dC-Addukte gefunden (s. Abb. 13).^[86] Zur chemischen Synthese dieser Addukte ist bis heute keine Syntheseroute bekannt.

Versagen nach der Reaktion der ultimalen Carcinogene mit der DNA die Reparatur- und Apoptosemechanismen der Zelle, kann es zu Mutationen des Genoms und damit zur Entartung der Zelle kommen. Um die zur Mutation führenden, biochemischen Prozesse möglichst detailliert zu verstehen, ist eine gezielte chemische Synthese der *in vivo* relevanten Addukte notwendig. Mittels festphasengestützter, chemischer DNA-Synthese lassen sich die modifizierten Nucleoside anschließend gezielt in Oligonucleotide einbauen und deren Einfluss auf die räumliche Struktur, Stabilität der Doppelhelix und Erkennung durch Enzyme z. B. bei der Replikation untersuchen.

2.5.2 Darstellung von N^2 -Arylamin-Addukten

Nach erfolgreicher Darstellung der C8-Addukte wuchs das Interesse an den N^2 -Arylamin-2'-dG-Addukten. Von N. Böge wurde 2008 eine Syntheseroute zu den N^2 -modifizierten 2'-dG-Addukten **11** entwickelt und auch deren erfolgreiche Überführung in die entsprechenden Phosphoramidite **10** gezeigt.^[87]

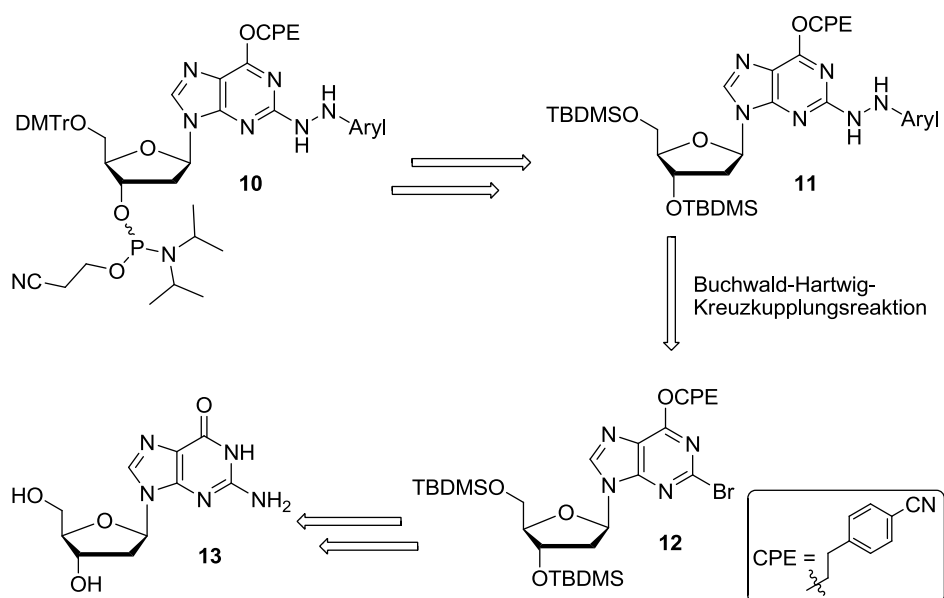


Abb. 14: Retrosynthese der N^2 -Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **10** nach Böge *et al.*

Schlüsselschritt dieser Syntheseroute ist die so genannte Buchwald-Hartwig-Reaktion, eine C-N-Kreuzkupplungsreaktion, die in diesem Fall mit einem C2 bromierten 2'-dG **12** und dem entsprechenden Arylhydrazin durchgeführt wird (s. Abb. 14). Problematisch bei dieser Reaktion ist zwar die Reinigung der

Substanzen, jedoch konnten die Phosphoramidite **10** isoliert und exemplarisch in Oligonucleotide eingebaut werden.^[87] Nach der Etablierung der Syntheseroute wurde in meiner Diplomarbeit die Anwendbarkeit der Buchwald-Hartwig-Reaktion durch Einsatz verschiedener Hydrazine untersucht^[88] und erste Assays hinsichtlich des Einflusses von *N*²-Hydrazinoaryl-modifizierten Oligonucleotiden auf die Erkennung durch das *Eco*RI Restriktionsenzym durchgeführt (s. Abb. 15).

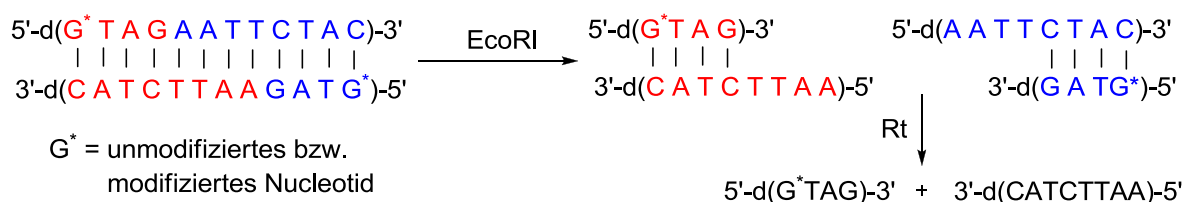


Abb. 15: Restriktionsabbau der modifizierten Oligonucleotide durch das *Eco*RI-Enzym^[88]

Es konnte gezeigt werden, dass eine *N*²-Arylamin-Modifikation an der dritten Base neben der palindromischen (GAATTC)-Erkennungssequenz des *Eco*RI-Enzyms zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Restriktionsabbaus von 2.6 auf bis zu 4.5 Stunden führt.^[88] Eine Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz führte zu keinem Verdau des DNA-Stranges.

2.5.3 Polymerase-Tests mit den Arylamin-modifizierten Oligonucleotiden

Die Arylamin-Addukte können je nach Amin und Bindungsstelle einen großen Einfluss auf die Struktur der DNA haben, z. B. hinsichtlich des π -stackings zwischen den Nucleobasen.^[89] Hinsichtlich der Carcinogenese durch aromatische Amine ist ihr Einfluss auf Polymerasen ein wichtiger Punkt. Da die C8-Arylamin-modifizierten Addukte schon länger synthetisch zugänglich waren,^[90,91] wurden an ihnen bereits Untersuchungen in Primer-Verlängerung-Assays mit verschiedenen Polymerasen durchgeführt (ein Beispiel siehe Abb. 16).

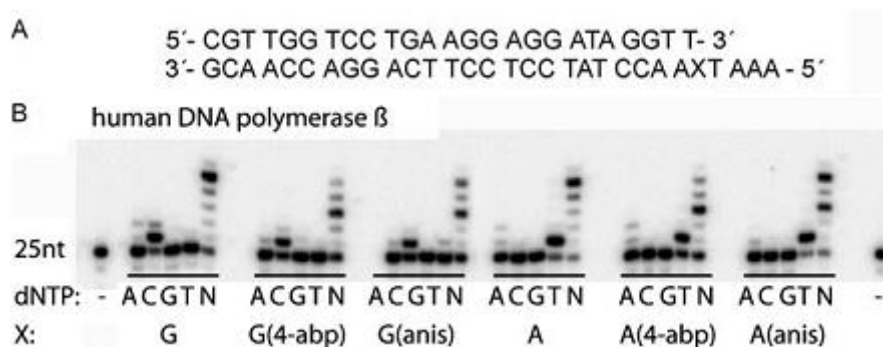


Abb. 16: A) Sequenz der Oligonucleotide (X = C8-Arylamin-modifiziertes Nucleotid), B) PAGE-Gele zur Analyse der Primer-Verlängerung durch die humane DNA Polymerase β ^[92]

Die humane DNA Polymerase β ist in die DNA-Reparatur involviert und ermöglichte in den Tests eine nahezu vollständige Korrektur, da in allen Fällen erkennbar das kanonische Nucleotid eingebaut wurde. Jedoch ist anhand der Gele auch zu erkennen, dass die Polymerase bei der fortlaufenden Kettenverlängerung eher stehen blieb, vor allem bei den 4-Aminobiphenyl-modifizierten Nucleobasen (s. Abb. 16).^[92] Das bedeutet, dass es trotz erfolgreichem Einbau des richtigen Nucleosids zu Folgefehlern bei der Kettenverlängerung oder gar zu einem Stopp der Replikation kommen kann.

Ein weiterer zu untersuchender Punkt ist, ob Arylamin-modifizierte Nucleosid-triphosphate als Substrate von Polymerasen erkannt werden und nach ihrem Einbau in die DNA Schäden hervorrufen können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung ist die chemische Synthese Arylamin-modifizierter Nucleosid-Triphosphate nötig, damit diese als Substrate in Primer-Verlängerungsexperimenten eingesetzt werden können. Die entsprechenden Triphosphate konnten bislang jedoch noch nicht erfolgreich synthetisiert werden.

3 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Die ersten beiden Projekte stellen den Hauptteil dieser Arbeit dar und standen vor dem Hintergrund, neue Inhibitoren der Desoxyhypusinsynthase (DHS) zu identifizieren. Vor dem Hintergrund der Carcinogenese durch aromatische Amine stand der dritte Teil. Hier sollten Nucleosidaddukte aromatischer Amine chemisch synthetisiert und nach Einbau in Oligonucleotide untersucht werden.

Da die DHS als potentiell Target gegen HIV-1 identifiziert wurde (s. S. 11),^[55] lag das Hauptaugenmerk des ersten Teils dieser Arbeit auf der Entwicklung neuer, verbesserter *active-site* Inhibitoren der DHS und damit auf der Synthese neuer, potentieller Leitstrukturen für Wirkstoffe gegen HIV-1. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um M. Rarey sollte hierzu ein rationaler Ansatz angewendet werden: Basierend auf den Strukturinformationen aus der Kristallstruktur der DHS und dem bekannten Inhibitor der DHS GC7 **1** sollte eine Kombination aus Struktur- und Fragment-basiertem Wirkstoffdesign angewendet werden, um neue, DHS bindende Moleküle zu identifizieren.

Die *in silico* gefundenen, „aktiven“ Moleküle sollten zuerst nach ihrer synthetischen Zugänglichkeit bewertet und danach über geeignete Syntheserouten dargestellt werden. Anschließend sollten die synthetisierten Substanzen *in vitro* von der Arbeitsgruppe um J. Hauber getestet werden. Anhand der Testergebnisse sollte das virtuelle Screening optimiert und auf diese Weise weiter verbesserte Inhibitoren identifiziert werden. Anschließend sollten zur Darstellung der ausgewählten Verbindungen erneut effiziente Syntheserouten entwickelt und durchgeführt werden.

Neben der Entwicklung neuer *active-site* Inhibitoren war das Ziel im zweiten Abschnitt, den literaturbekannten DHS-Inhibitor CNI-1493 **2** hinsichtlich seiner Struktur-Aktivitäts-Beziehung und seiner Hydrolyse-Eigenschaften zu untersuchen. Da der Bindungsmechanismus und somit auch der exakte Wirkmechanismus noch nicht vollständig bekannt ist, sollten verschiedene CNI-Derivate synthetisiert werden, um weitere Informationen über die zur Aktivität benötigten Strukturelemente von CNI-1493 **2** zu erhalten (s. Abb. 17).

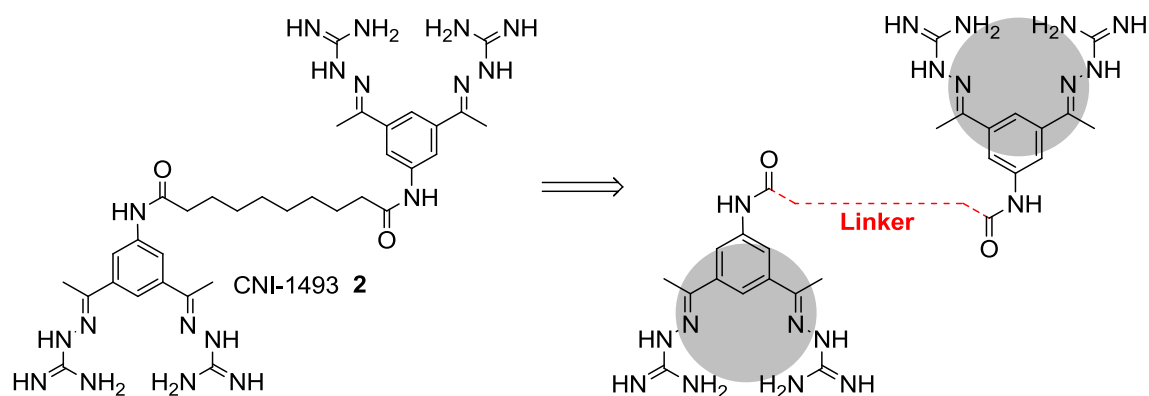


Abb. 17: Schematische Darstellung der zu synthetisierenden CNI-1493 Derivate

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Carcinogenese durch aromatische Amine. Hinsichtlich der Synthese der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte **14** sollte eine Alternative zur bekannten Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion entwickelt werden, um unter anderem die chromatographische Reinigung dieser Verbindungen zu vereinfachen. Im Anschluss sollten die N^2 -Arylamin-modifizierten Phosphoramidite und entsprechend modifizierte Oligonucleotide synthetisiert und untersucht werden.

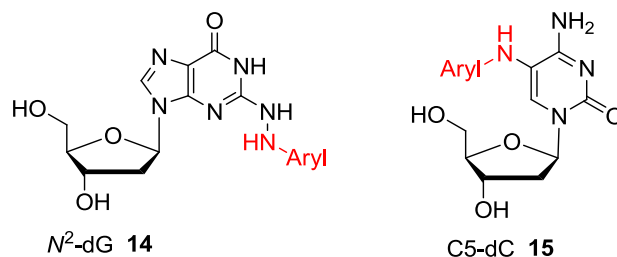


Abb. 18: Schematische Darstellung der zu synthetisierenden Arylamin-Addukte **14** und **15**

Ein weiteres Ziel stellte die Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu den C5-Arylamin-2'-desoxycytidin Addukten **15** dar, da diese chemisch noch nicht zugänglich waren und somit nicht gezielt untersucht werden konnten (s. Abb. 18). Als Startpunkt zur C-N-Bindungsknüpfung sollte die bereits für Addukte von 2'-Desoxyadenosin bzw. 2'-Desoxyguanosin **13** erprobte Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung verwendet werden.

Schließlich sollte mit der erstmaligen Darstellung eines N^2 -Arylamin-modifizierten Nucleosidtriphosphates eine neue Verbindungsklasse erschlossen werden. Als Synthesemethode sollte zunächst die in der Arbeitsgruppe bewährte *cycloSal*-Methode zur Darstellung von Nucleosid-Triphosphaten erprobt werden.

4 Entwicklung neuer *active-site* Inhibitoren der DHS

4.1 Erste Generation potentieller DHS-Inhibitoren

Die Desoxyhypusinsynthese stellt ein interessantes, potentielles Wirkstoff-Target dar. Das zelluläre Enzym dient zur spezifischen Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A, welcher eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen zu spielen scheint (s. Kap. 2.2.3, S. 12).

Es sind bereits Inhibitoren dieses Enzyms bekannt (s. Abb. 8, S. 11). Um neue Verbindungen als verbesserte Inhibitoren der DHS zu entwickeln, wurde ein rationaler Ansatz zum Design verwendet. Die Anwendung von Struktur-basiertem Wirkstoffdesign war möglich, da die DHS hochaufgelöst und mit dem bekannten Inhibitor *N*-1-Guanyl-1,7-diaminoheptan (GC7) **1** co-kristallisiert werden konnte.^[47] Nach Identifizierung der virtuellen *Hits* sollten diese hinsichtlich kommerzieller Verfügbarkeit überprüft werden und, falls diese nicht gegeben war, über geeignete Syntheserouten dargestellt werden. Anschließend sollte die biologische Aktivität untersucht werden und diese Ergebnisse unter anderem als Rückkopplung zur Optimierung der *in silico* Berechnungen dienen (s. erste und zweite Reihe, Abb. 19).

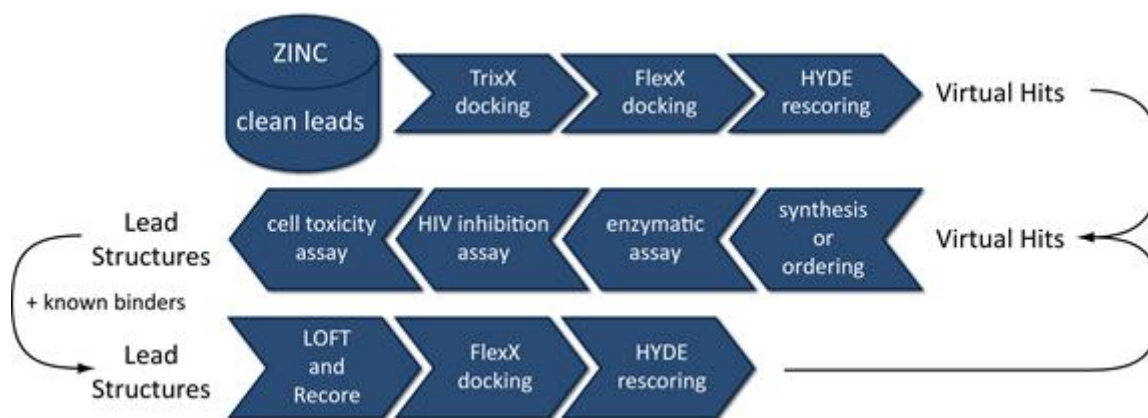


Abb. 19: Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der durchgeführten Leitstruktursuche^[48]

Die Kristallstruktur der DHS mit dem im aktiven Zentrum gebundenen, bekannten Inhibitor GC7 **1** wurde von *Adrian Kolodzik* (Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg) als Basis für Struktur-basiertes Screening verwendet. Als virtuelle Substanzbibliothek wurde die ZINC-Datenbank^[71] eingesetzt. Diese Datenbank besteht aus mehreren Millionen Substanzen, von denen die meisten zumindest theoretisch kommerziell erhältlich sein sollen. Jedoch bezieht sich diese Angabe in vielen Fällen auf Anbieter, die leider auf wiederholte Anfragen zur Bestellung nicht

reagiert haben. Die von A. Kolodzik durchgeführten Berechnungen ergaben 16 virtuelle *Hits* aus der ZINC-Datenbank (s. Abb. 20, Gruppe **A**). Die restlichen 13, in Abb. 20 dargestellten Verbindungen stellen rational modifizierte GC7 Derivate dar, in denen die Guanidinogruppe durch neutrale Gruppen ersetzt wurde, um die Polarität der Verbindungen zu reduzieren und so ihre Verfügbarkeit in den Zellen möglicherweise zu erhöhen (Gruppe **B**).

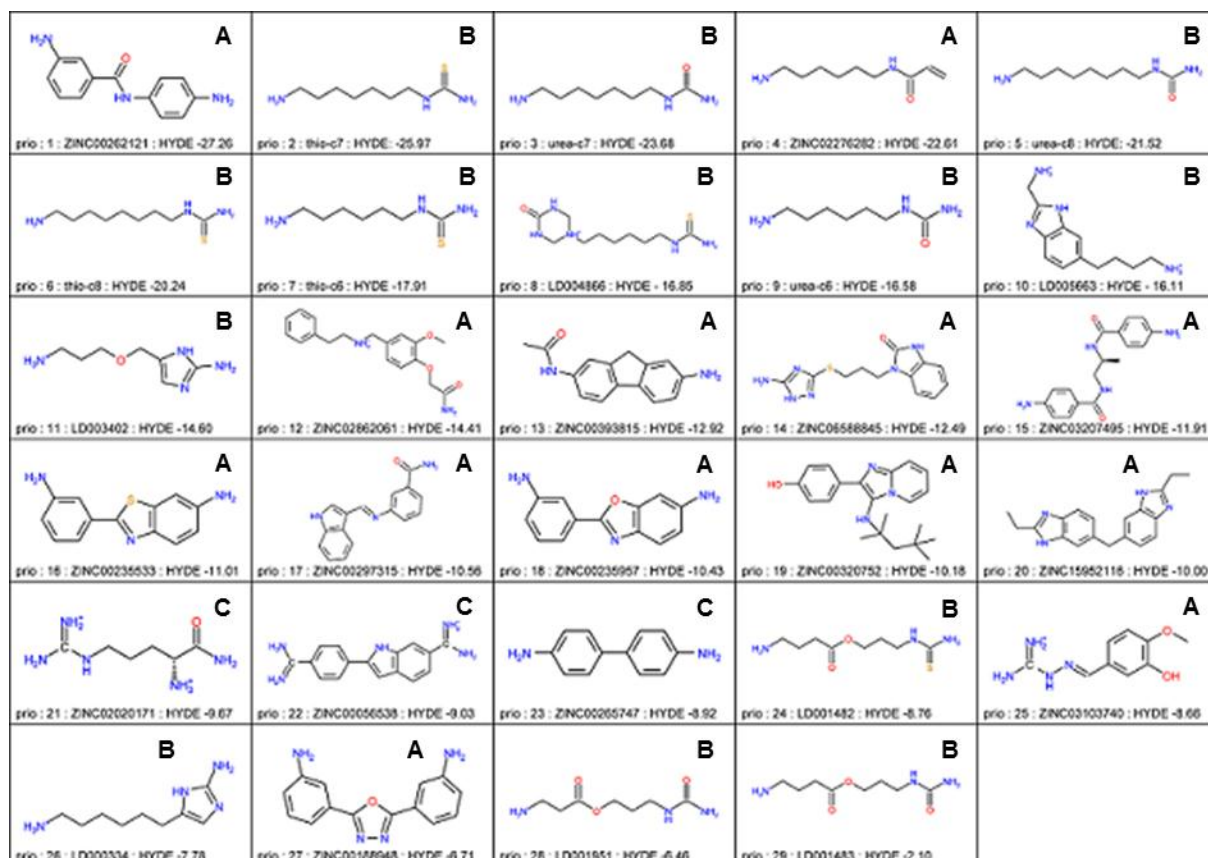


Abb. 20: Übersicht der virtuellen *Hits* in absteigender Bindungsaffinität zur DHS (mod.)^[48]

Da der Tunnel zur aktiven Tasche und das aktive Zentrum der DHS viele negativ geladene Aminosäureseitenketten tragen (s. Abb. 7C, S. 10), ist allen Verbindungen gemein, dass sie selbst keine negativ geladenen Gruppen tragen. In allen Fällen wurde die Bindungsaffinität mittels der HYDE *scoring function* berechnet, die das Verhalten in Lösung möglichst realistisch widerspiegeln soll.^[93] Je negativer der HYDE-Score ist, desto größer ist die Bindungsaffinität (vgl. Abb. 20).

Von den 29 virtuellen *Hits* waren von den Verbindungen aus der ZINC-Datenbank nur drei kommerziell verfügbar (s. Abb. 21 und Abb. 20, Gruppe **C**): die Hydrochloride von Argininamid, **16**, und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), **17**, sowie Benzidin **5**. Obwohl Benzidin **5** aufgrund seiner Carcinogenität als potentieller

Wirkstoff wegfällt, wurde es trotzdem getestet, da möglichst viele Informationen zur anschließenden Optimierung des virtuellen *Screenings* gesammelt werden sollten.

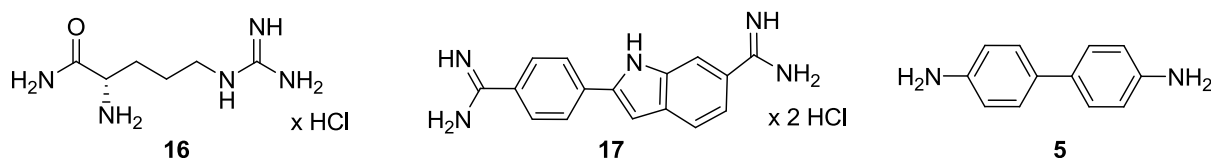


Abb. 21: Die drei kommerziell verfügbaren Verbindungen **5**, **16** und **17** aus der ersten Berechnung

Es wurden nun weitere Verbindungen aus Abb. 20 ausgewählt, welche synthetisch dargestellt werden sollten. Das erste Kriterium war eine möglichst hohe, berechnete Bindungsaffinität. Die weitere Auswahl erfolgte nach der synthetischen Zugänglichkeit, weil noch keine experimentellen Daten für die berechneten Strukturen aus Abb. 20 vorlagen. Es konnte demnach nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die Verbindungen *in vitro* bzw. *in vivo* eine Aktivität zeigen. Deswegen wurde bei der Auswahl auf möglichst effiziente Syntheserouten großer Wert gelegt. Auf diese Weise wurden aus den restlichen Verbindungen aus Abb. 20 11 weitere zur Synthese ausgewählt, so dass mit den drei kommerziell erhältlichen insgesamt 14 Verbindungen für den *in vitro* DHS-Assay und die HIV-1 Inhibitionstests zur Verfügung stehen sollten (aus Gruppe **B** ausgewählte siehe Abb. 22 und aus Gruppe **A** siehe Abb. 26, S. 30).

4.1.1 Synthese der GC7-analogen, potentiellen DHS-Inhibitoren

Im Folgenden wurden Syntheserouten für die in Abb. 22 dargestellten Verbindungen entworfen. Diese Verbindungen **18-23** haben zwar strukturell eine hohe Ähnlichkeit zum bekannten Inhibitor GC7 **1**, sind aber durch den Austausch der Guanidinogruppe durch Harnstoff bzw. Thioharnstoff unpolarer, weshalb eine verbesserte Bioverfügbarkeit errechnet wurde (vgl. Gruppe **B**, S. 26). Außerdem ermöglichen die Verbindungen eine Abschätzung des Einflusses der Alkylkettenlänge auf die biologische Aktivität, wobei das erwartete Optimum bei der C₇-Kette liegen sollte. **20** bzw. **23** sollten als eine Art „Negativkontrolle“ dienen, da deren C₈-Ketten anhand der *Modelling*-Ergebnisse sterisch etwas zu anspruchsvoll für die aktive Tasche der DHS sein müssten.

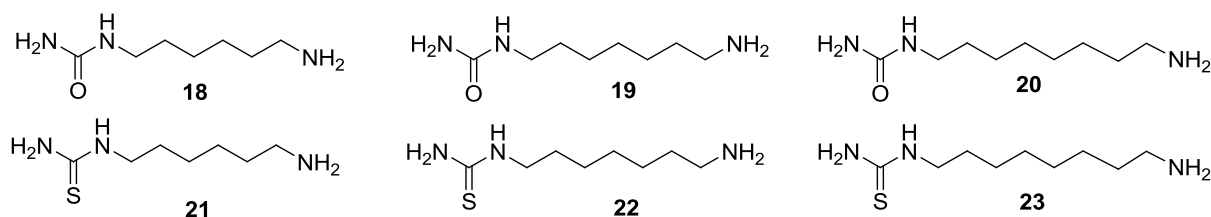


Abb. 22: Zur Synthese ausgewählte, GC7-analoge und *in silico* aktive DHS-Inhibitoren **18-23**

Zur Synthese der Harnstoffderivate **18-20** wurde eine Synthese von *Boden et al.* zur Darstellung von (7-Aminoheptyl)-harnstoff **19** genutzt und auf die anderen Verbindungen übertragen.^[94] In diesen Synthesen wurden die Harnstoffgruppen aus primären Aminogruppen über die Reaktion mit Trimethylsilylisocyanat dargestellt.

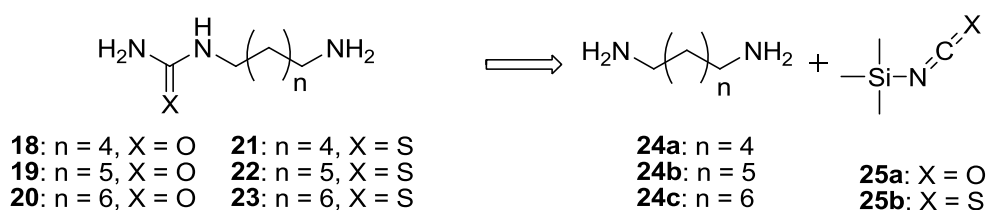


Abb. 23: Retrosynthese zur Darstellung der GC7-analogen, potentiellen DHS-Inhibitoren **18-23**

Da die chemische Differenzierung zwischen den beiden primären Aminogruppen von **24a-24c** nicht möglich war, aber auf eine aufwendige Schutzgruppenstrategie verzichtet werden sollte, wurde mit einem Überschuss von Trimethylsilylisocyanat **25a** gearbeitet (s. Abb. 24). Dadurch, dass der Überschuss an **25a** in verdünnter Lösung langsam zum Diamin getropft werden sollte, sollte der Anteil an unerwünschter Doppelsubstitution möglichst weitgehend verhindert werden. Vollständig lässt sich selbst dadurch die Nebenreaktion nicht vermeiden.

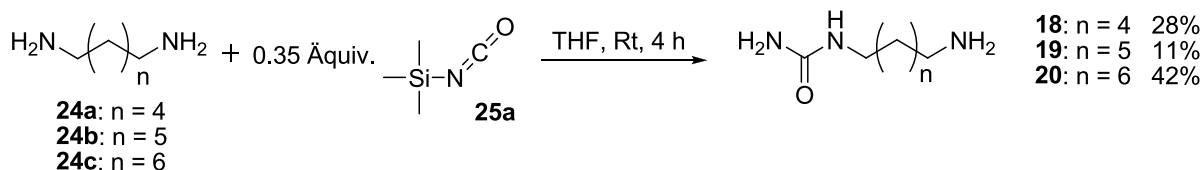


Abb. 24: Synthese der Harnstoffderivate **18-20** (Ausbeute bezogen auf das TMS-Isocyanat **25a**)

Das entsprechende Diamin **24a-24c** wurde in absolutem THF vorgelegt. Im Tropftrichter wurden 0.35 Äquivalente des Isocyanats **25a** im dreifachen Volumen THF gelöst und langsam zum Amin getropft. Die Reaktionsverfolgung mittels DC war über den Nachweis mit Ninhydrin möglich, jedoch aufgrund der hohen Polarität der Reaktanden schwierig. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt in heißem Ethylacetat suspendiert und filtriert. Der Rückstand wurde mit dest. Wasser gewaschen und anschließende Gefriertrocknung der wässrigen Phase lieferte das

Produkt **18-20** als farblosen Feststoff in Ausbeuten von 11-42%. Problematisch waren hier die verschiedenen Waschvorgänge zur Produktreinigung, da auf diese Weise auch erhebliche Mengen an Produkt verloren gingen. Jedoch waren die schlechten Ausbeuten zu diesem Zeitpunkt des Projektes nicht relevant, da nur ausreichende Mengen für die ersten *in vitro* Tests zur Verfügung stehen sollten.

Für die Darstellung der Thioharnstoffderivate **21-23** wurden anfangs die Reaktionsbedingungen von *Muccioli et al.* erprobt.^[95] Dazu wurde 1 Äquiv. des Alkylamins mit einem Äquivalent Ammoniumisothiocyanat in Brombenzol als Lösungsmittel umgesetzt. Nach 90 Minuten unter Rückfluss, konnte das Produkt in der Kälte ausgefällt werden. Die Übertragung der *Muccioli*-Reaktionsbedingungen auf die entsprechenden Diamine gestaltete sich schwierig, da sich das Thioisocyanat **25b** nicht in Brombenzol löste und somit nicht zugetropft werden konnte. Nach 18 h Reaktionszeit konnte kein Produkt isoliert werden (Abb. 25).

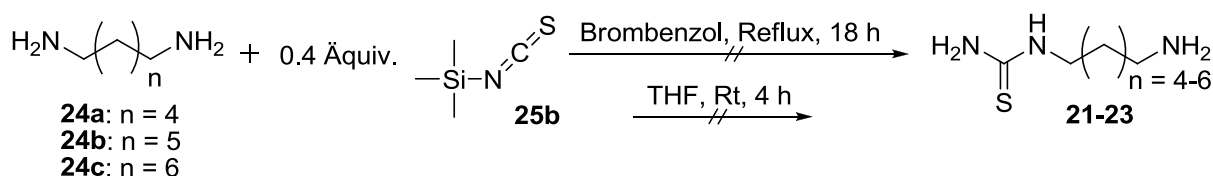


Abb. 25: Versuche zur Darstellung der Thioharnstoffderivate **X**

Als Alternative wurden die Reaktionsbedingungen von *Boden et al.* verwendet, jedoch führten auch diese nicht zum Erfolg (s. Abb. 25). Zusammenfassend konnten nur die drei Harnstoffderivate **19-20** erfolgreich synthetisiert werden und standen für biochemische Tests zur Verfügung.

4.1.2 Synthese der virtuellen *Hits* aus der ZINC-Datenbank

Aus den Ergebnissen des von *A. Kolodzik* durchgeführten, Struktur-basierten Screenings mit der ZINC-Datenbank zur Identifizierung neuer Inhibitoren der DHS als potentielle Leitstrukturen gegen HIV-1 wurden fünf Verbindungen zur Synthese ausgewählt (Abb. 26). Diese unterscheiden sich bis auf **28** strukturell deutlich von GC7 **1**. Die aromatischen Ringe schränken die Molekülflexibilität ein und könnten *in vivo* zu einer spezifischeren Bindung an die DHS führen.

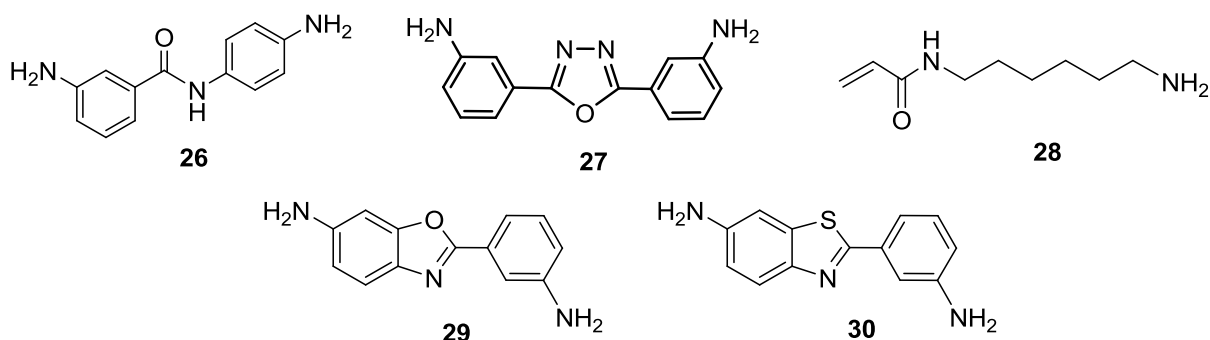


Abb. 26: Zur Synthese ausgewählte, *in silico* aktive, neue DHS-Inhibitoren aus der ZINC-Datenbank

Da noch keine experimentellen Daten für die berechneten **26-30** Strukturen vorlagen und somit nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die Verbindungen auch *in vitro* bzw. *in vivo* eine Aktivität zeigen, sollten die Verbindungen **26-30** über möglichst wenige Stufen zugänglich gemacht werden. Im Folgenden sind die durchgeführten Synthesen der einzelnen Verbindungen dargestellt.

Darstellung von 3-Amino-N-(4-aminophenyl)-benzamid **26**

Das Zielmolekül wurde an der Amidbindung retrosynthetisch zerlegt, welche aus einem Säurechlorid und einem Amin gebildet werden sollte. Die Verwendung von 4-Aminoanilin und 3-Aminobenzoylchlorid war nicht möglich, da die Amidbindung dann nicht selektiv gebildet werden kann. Die Aminogruppen der Zielverbindung mussten blockiert oder durch Funktionelle-Gruppen-Umwandlung (FGU) dargestellt werden. Dazu wurden Nitrogruppen eingesetzt, die sich durch Reduktion in das entsprechende Amin überführen lassen sollten (Abb. 27).

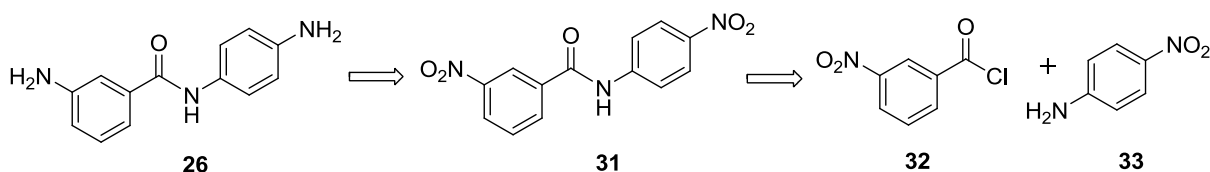


Abb. 27: Retrosyntheseschema zur Darstellung von 3-Amino-N-(4-aminophenyl)-benzamid **26**

Im ersten Schritt wurde 3-Nitrobenzoylchlorid **32** mit 4-Nitroanilin **33** nach *DeRuiter et al.* in CH_2Cl_2 in Anwesenheit von Triethylamin umgesetzt.^[96] Die Reinigung mittels zirkulärer präparativer Dünnschichtchromatographie (Chromatotron) war aufgrund der niedrigen Löslichkeit des Rohproduktes nicht erfolgreich. Mit dem übriggebliebenen Rohprodukt wurde eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ angeschlossen und so das Produkt **31** in immerhin noch 17% Ausbeute erhalten. Auch hier wurde vor ersten, positiven *in vitro* Ergebnissen keine Optimierung der Synthese vorgenommen, sondern direkt die Reduktion durchgeführt.

Zur Reduktion der aromatischen Nitrogruppen wurden verschiedene Methoden erprobt (Abb. 28). Als erstes wurde die Reduktion mit Wasserstoff an Palladium/Kohle getestet. Nach 24 h zeigte die Dünnschichtchromatographie den vollständigen Umsatz des Eduktes **31** an. Allerdings waren mehrere neue Spots entstanden, welche möglicherweise von nicht vollständig reduzierten Verbindungen resultierten. Das Produkt **26** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 23% Ausbeute erhalten werden. Als Alternative wurde die Reduktion an Raney-Nickel in Anwesenheit von Hydrazinhydrat getestet. Bei dieser Reaktion wurden 15% Ausbeute erzielt, da die Reaktion auch nach erneuter Raney-Nickel und Hydrazinhydrat Zugabe nicht vollständig war.

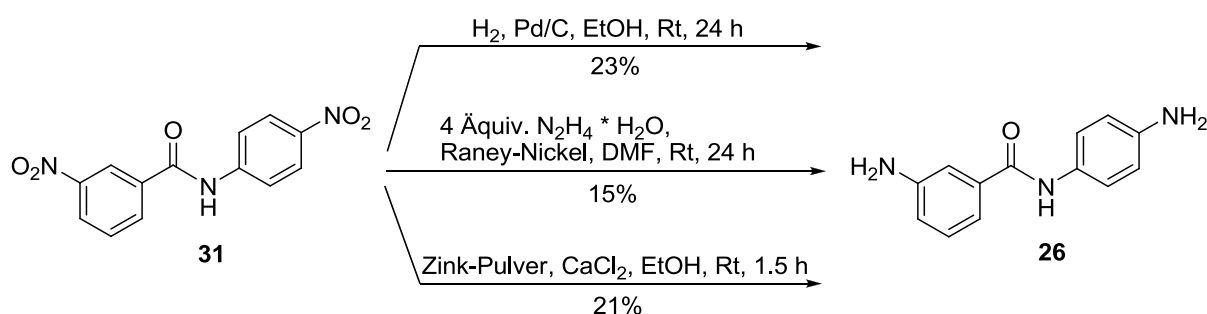


Abb. 28: Verwendete Reduktionsmethoden zur Darstellung von **26**

Als dritte Möglichkeit wurde die Reduktion mit Zink-Pulver in Anlehnung an *Wang et al.* erprobt.^[97] Hier konnte das Produkt **26** nach Reinigung in 21% Ausbeute erhalten werden. Da das Produkt **26** relativ polar ist, war die säulenchromatographische Reinigung sehr problematisch und führte zu vielen Mischfraktionen. Angegeben sind in Abb. 28 die Ausbeuten aus den jeweils reinen Fraktionen. Im Zuge der Reaktionsoptimierung konnte dieses Problem der schwierigen Trennung gelöst werden (s. S. 32f).

Nachdem in ersten Tests eine gute Aktivität von **26** gegen HIV-1 gezeigt wurde (s. Kap. 4.1.3, S. 46), sollte die zweistufige Synthese optimiert werden. Dazu wurde im ersten Schritt Pyridin als Lösungsmittel und Base eingesetzt und 18 h zum Rückfluss erhitzt.^[98] Danach konnte mittels Dünnschichtchromatographie ein vollständiger Umsatz detektiert werden und nach der Aufarbeitung das 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)-benzamid **31** in einer sehr guten Ausbeute von 91% erhalten werden (Abb. 29). Möglicherweise führte die höhere Siedetemperatur des Pyridins im Vergleich zum Dichlormethan zu einem besseren Reaktionsumsatz.

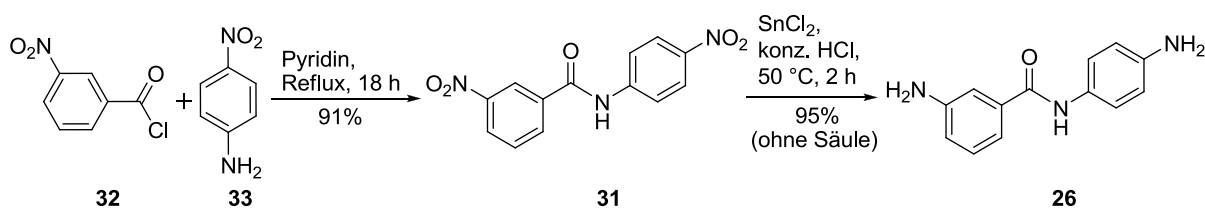


Abb. 29: Optimierte Synthese der Zielverbindung **26**

Zur Optimierung der Reduktion wurde dieselbe Methode wie bei der Synthese der CNI-Derivate verwendet (vgl. Kap. 5.1, S. 98f), wobei hier die Anzahl der Äquivalente an Zinn(II)chlorid erhöht wurde. Zuerst wurden 11 Äquivalente SnCl_2 in konz. HCl gelöst und auf 50 °C erwärmt, dann erfolgte die portionsweise Zugabe von **31** und schließlich wurde 2 h bei 50 °C gerührt. Nach der Aufarbeitung konnte 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamid **26** in einer Ausbeute von 95% erhalten werden. Im ^1H -NMR-Spektrum ist zu sehen, dass die Reinheit ca. 96% betrug (s. Abb. 30). Da auch massenspektrometrisch keine Verunreinigungen außer dem Rest Edukt **31** detektiert wurden, war in diesem Fall keine säulenchromatographische Reinigung mehr notwendig.

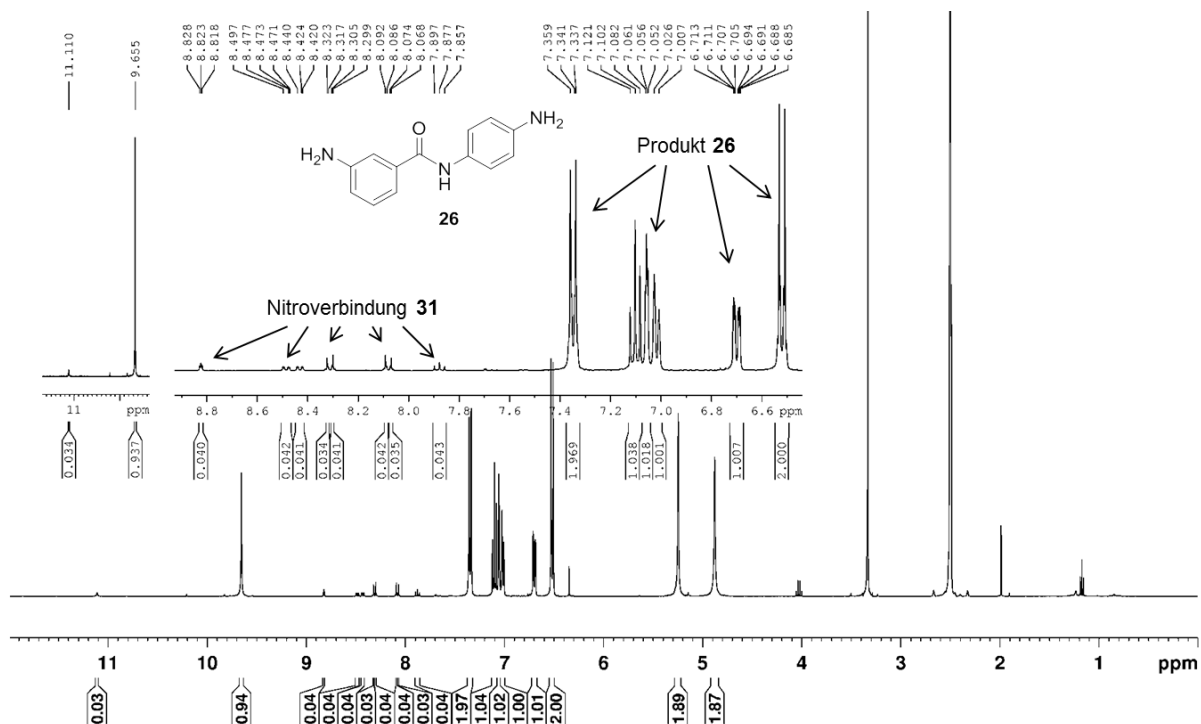


Abb. 30: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamid **26** in $\text{DMSO}-d_6$ nach der Reduktion mit Zinnchlorid ohne säulenchromatographische Reinigung (4% Edukt **31**)

Die NMR-Probe in $\text{DMSO}-d_6$ wurde vor der Messung bei Raumtemperatur gelagert und nach der Messung zurück in den Kolben gefüllt und lyophilisiert, damit keine Substanz verloren ging. Anschließend wurde die Verbindung **26** am Heinrich-Pette-

Institut (HPI) in biochemischen Tests untersucht. Die dort angesetzte Stammlösung war eine 10 μM Lösung dieser Substanz in DMSO. Hierbei zeigte sich, dass sich die Stammlösung von **26** nach zwei Tagen von leicht gelblich nach dunkelbraun verfärbte. Daraufhin wurden sowohl von der Stammlösung des HPIs als auch von der gefriergetrockneten Rückstellprobe NMR-Spektren aufgenommen und mit dem NMR-Spektrum einer Probe direkt nach der Synthese verglichen (s. Abb. 31).

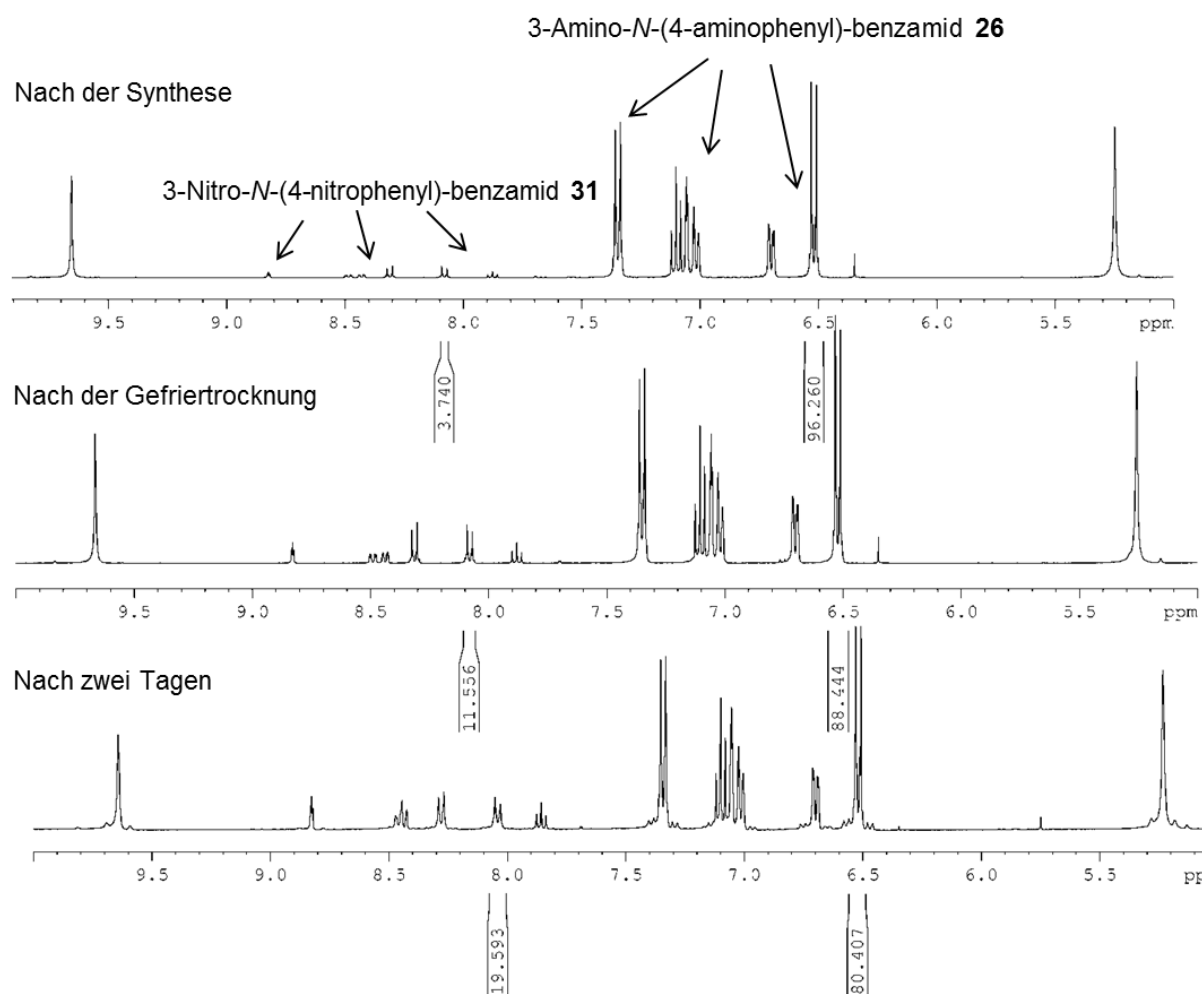


Abb. 31: ^1H -NMR spektroskopische Verfolgung der Oxidation von **26** in DMSO- d_6

Es ist zu erkennen, dass der Anteil der Nitroverbindung **31** über die Zeit von 3.7% auf 19.6% anstieg. Die Kombination aus DMSO als Lösungsmittel mit oxidativen Eigenschaften, Raumtemperatur und Luftsauerstoff führte anscheinend zu einer schrittweisen Oxidation der Aminogruppen von **26**. Zur Vermeidung der Oxidation wurde in nachfolgenden Reaktionen das Produkt **26** in DMSO sofort wieder eingefroren und nur möglichst kurz zur Probenentnahme aufgetaut. Im Gegensatz zum ersten Versuch waren nach der Reaktion mehr Verunreinigungen vorhanden, so dass nun doch eine Optimierung der säulenchromatographischen Reinigung

notwendig war. Dazu wurde das Rohprodukt in CH₃OH gelöst und mit grobem Kieselgel versetzt. Nach Entfernen des Methanols am Rotationsverdampfer ließ sich das grobe Kieselgel mit dem gebundenen Rohprodukt auf das Kieselgel einer Glassäule auftragen und mit einem unpolaren Gradient erfolgreich reinigen. Es konnten 74% reines Produkt **26** isoliert werden (s. Abb. 32).

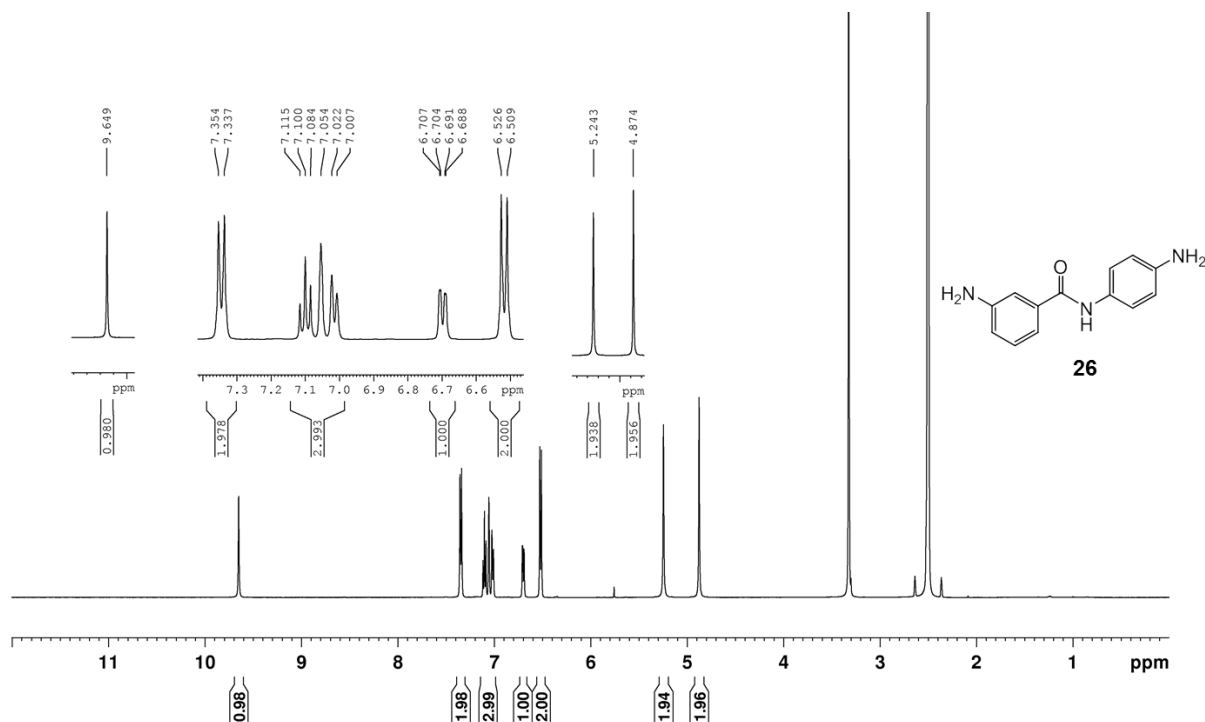


Abb. 32: ¹H-NMR-Spektrum des 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamids **26** in DMSO-*d*₆ nach der Reduktion mit Zinnchlorid und anschließender säulenchromatographischer Reinigung

Zusammenfassend konnte die Zielverbindung **26** nach Optimierung erfolgreich und in hoher Reinheit dargestellt werden.

Darstellung von 2,5-Di-(3-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazol **27**

Zur Synthese der Zielverbindung **27** wurde die in Abb. 33 gezeigte Route geplant. Die Aminogruppen von **27** sollten wie bei **26** im letzten Schritt durch Reduktion der entsprechenden Nitrogruppen dargestellt werden. Da C-C-Bindungen schwer zu knüpfen sind, sollte stattdessen der Oxadiazol-Fünfring aus geeigneten Vorläufern synthetisiert werden.

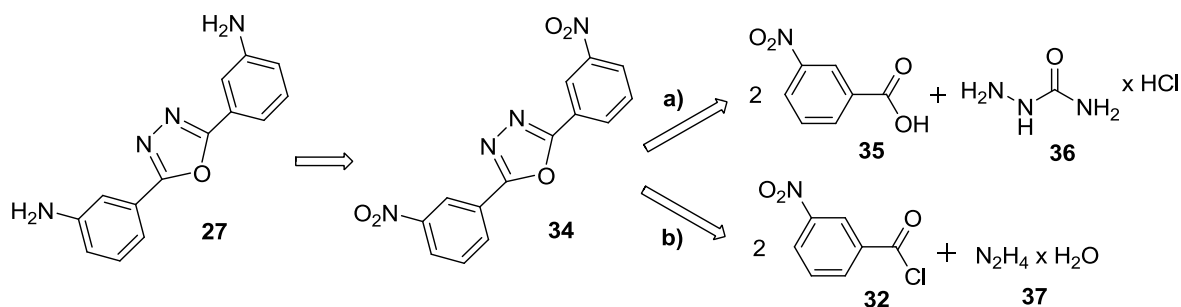


Abb. 33: Retrosyntheseschema zur Darstellung von 2,5-Di-(3-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazol **27**

Generell lassen sich 1,3,4-Oxadiazol-Fünfringe durch Zyklisierung aus einem Hydrazinderivat und einer Carbonsäure bzw. einem Carbonsäurechlorid darstellen (s. Abb. 33, Weg **a** bzw. **b**). Jedoch sind hierbei in den meisten Fällen recht drastische Reaktionsbedingungen mit z. B. hohen Temperaturen notwendig.

Zunächst wurde für Weg **b** eine Methode von *Tandon et al.* unter Verwendung von Bortrifluoriddietherat und 1,4-Dioxan als Lösungsmittel erprobt.^[99] 3-Nitrobenzoylchlorid **32** wurde mit Hydrazinhydrat **37** versetzt und anschließend $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zugegeben. Jedoch wurden nach den in der Literatur angegebenen 2 h unter Rückfluss immer noch große Mengen der Edukte detektiert. Nach weiteren 2 h in der Siedehitze wurde die Reaktion abgebrochen und nach der Aufarbeitung und Reinigung am Chromatotron konnte das Produkt **34** in einer Ausbeute von nur 7% isoliert werden. Als Alternative zu Weg **b** wurde eine Methode angelehnt an *Wang et al.* getestet (s. Abb. 33, Weg **a**).^[97] Dazu wurde 3-Nitrobenzoesäure **35** mit Aminoharnstoff-Hydrochlorid **36** in Gegenwart von polyphosphoriger Säure in der Siedehitze umgesetzt (s. Abb. 34). Auf diese Weise konnte 2,5-Di-(3-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol **34** nach der Aufarbeitung und Kristallisation in Essigsäure mit immerhin 26% Ausbeute erhalten werden.

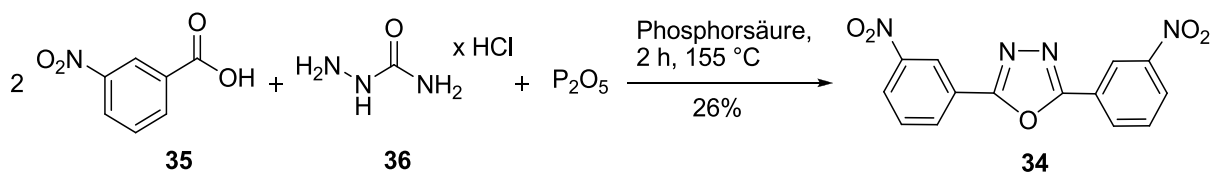


Abb. 34: Erfolgreiche Darstellung von **34** in polyphosphoriger Säure

Die anschließende Reduktion wurde wie bei 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamid **31** mit verschiedenen Reagenzien erprobt (s. Abb. 35). Bei der Reduktion mit Zink-Pulver konnte das Produkt **27** nicht rein erhalten werden. Es wurden diverse Umkristallisationsversuche durchgeführt, die jedoch nicht erfolgreich waren. Die Verwendung von Raney-Nickel und Hydrazinhydrat **37** führte nach säulenchromatographischer Reinigung zum Produkt **27** in 33% Ausbeute.

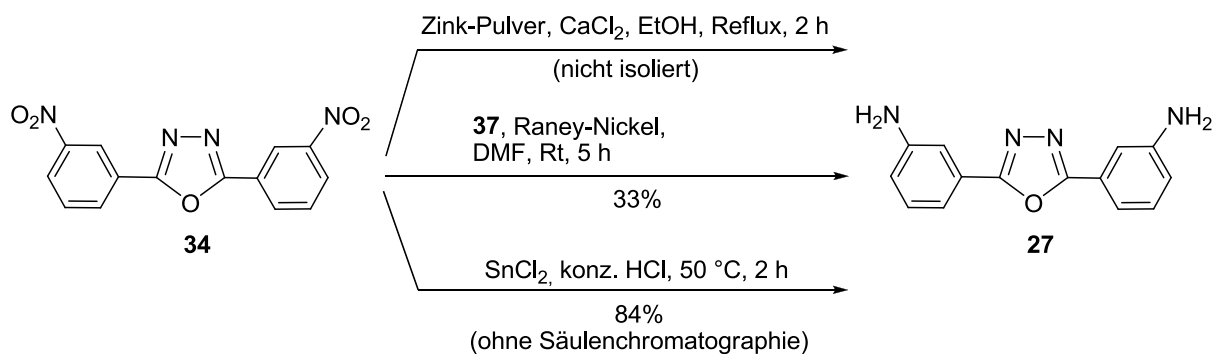


Abb. 35: Übersicht der erprobten Reduktionsmethoden zur Darstellung von **27**

Bei Wiederholung der Reduktion von **34** mit Raney-Nickel kam es zur Bildung mehrerer Spots auf der DC-Folie und das Produkt konnte nicht mehr vernünftig isoliert werden. Daraus folgt, dass auch diese Methode keine verlässliche Methode zur Reduktion von 2,5-Di-(3-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol **34** darstellt. Sehr gute Ausbeuten und hohe Reproduzierbarkeit wurden, wie bei **26**, durch die Verwendung von Zinn(II)chlorid in konz. HCl bei 50 °C erzielt (s. Abb. 35, vgl. S. 32). Aufgrund der beim 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamid **26** beobachteten Oxidation der Aminogruppen in DMSO (s. Abb. 31, S. 33) wurde von Beginn an darauf geachtet, die NMR-Probe in DMSO-*d*₆ sowie die Stammlösung für die biochemischen Assays sofort bei mindestens -26 °C zu lagern. Exemplarisch ist anhand des ¹H-NMR-Spektrums die hohe Reinheit der Zielverbindung **27** zu erkennen (s. Abb. 36).

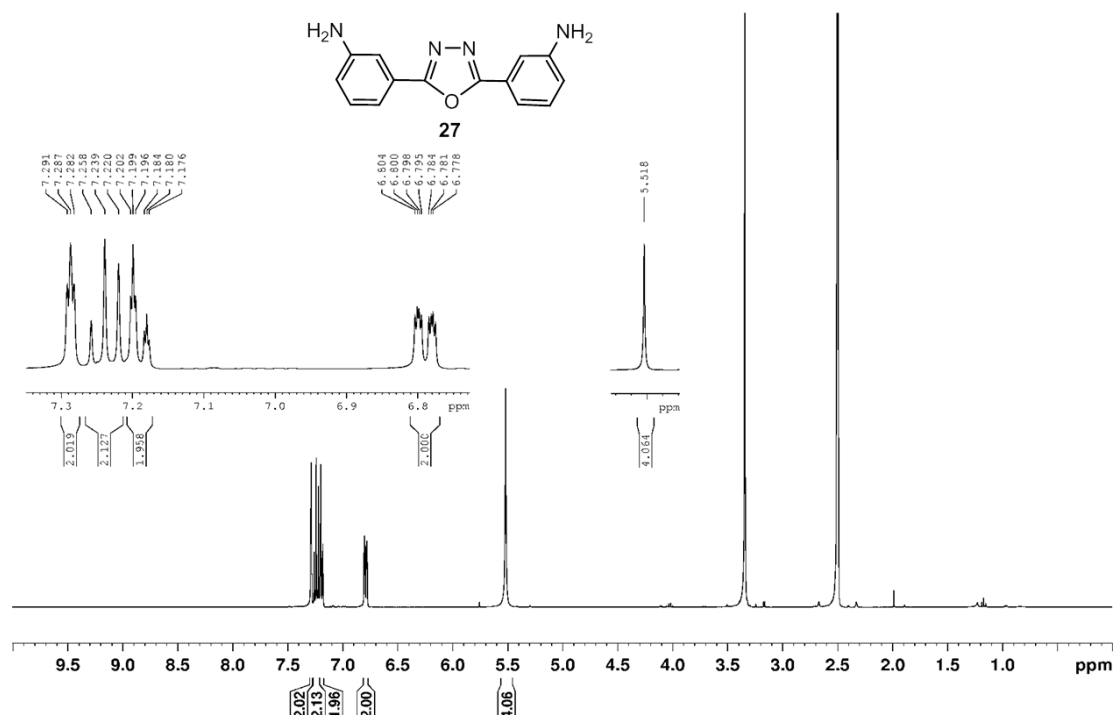


Abb. 36: ¹H-NMR-Spektrum des 2,5-Di-(3-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazols **27** in DMSO-*d*₆ nach der Reduktion mit Zinnchlorid ohne säulenchromatographische Reinigung

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte 2,5-Di-(3-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazol **27** über zwei Stufen erfolgreich und ohne benötigte chromatographische Reinigung in reiner Form dargestellt werden und stand für die biochemischen Tests zur Verfügung.

Darstellung von *N*-(6-Aminohexyl)prop-2-enamid **28**

Von den durch das Struktur-basierte Screening aus der ZINC-Datenbank erhaltenen Verbindungen weist **28** die größte strukturelle Ähnlichkeit zum GC7 **1** auf. Wie schon bei den GC7-analogen Verbindungen **18** und **21** sollte zur Synthese von **28** vom entsprechenden 1,6-Diaminohexan **24a** ausgegangen werden (vgl. S. 28f). Die Acroleingruppe sollte in diesem Fall mittels Acrylsäurechlorid **38** eingeführt werden (s. Abb. 37). Die Gefahr der Doppel-Acylierung war in diesem Fall noch größer als bei den Harnstoffderivaten **18-20**, da Acrylsäurechlorid deutlich reaktiver ist als das für die anderen Verbindungen benötigte Trimethylisocyanat **25a** (vgl. S. 28f, Abb. 23).

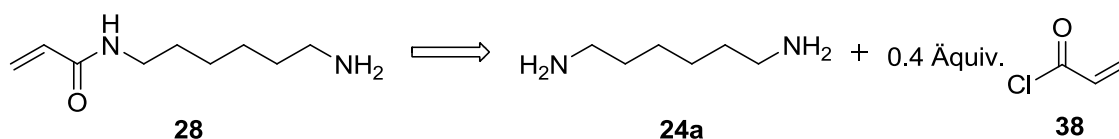


Abb. 37: Retrosynthese von *N*-(6-Aminohexyl)prop-2-enamid **28**

Um die Stufenanzahl der Synthese möglichst gering zu halten, wurde auf die Entwicklung geeigneter Schutzgruppenstrategien verzichtet. In der Literatur wurden drei Vorschriften zur direkten Darstellung von *N*-(6-Aminohexyl)prop-2-enamid **28** gefunden und diese wurden im Folgenden erprobt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten Reaktionen zur Darstellung von **28**

Rkt.	Äquiv.	Lösungsmittel	Base	Zeit	Ausbeute	
					Produkt 28	doppelt acyliert
1	0.4	Pyridin	Pyridin	16 h	---	---
2	0.4	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	20 h	minimal ^a	Hauptprodukt ^a
3	0.4	THF	Et ₃ N	48 h	minimal ^a	Hauptprodukt ^a
4	0.9	Methanol	-	16 h	35%	n.b. ^b

^a aus dem ¹H-NMR-Spektrum/Massenspektrum des Rohproduktes, ^b n.b. = nicht bestimmt

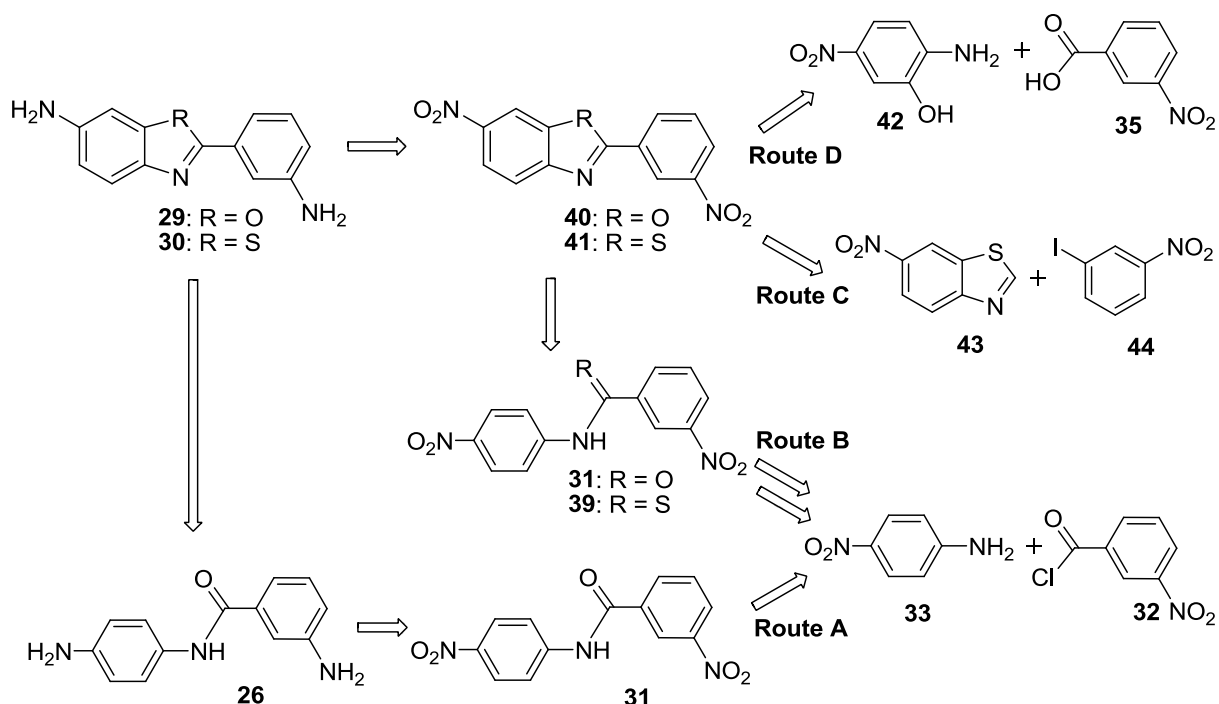
In allen Fällen wurde 1,6-Diaminohexan **24a** im Lösungsmittel gelöst und mit der Base vorgelegt. Anschließend wurde ebenfalls im entsprechenden Lösungsmittel gelöstes Acrylsäurechlorid **38** bei 0 °C langsam zum Diamin **24a** getropft. Die Umsetzung nach *Manchanda et al.* (Rkt. 1) in Pyridin war nicht erfolgreich, da die Reaktionsmischung direkt fest wurde.^[100]

Besser funktionierten die Umsetzungen in Dichlormethan bzw. THF mit Triethylamin als Base (Rkt. 2 und 3).^[101,102] Jedoch wurde bei diesen Reaktionen das doppelt acylierte Produkt im deutlichen Überschuss erhalten. Die Reaktion nach *Miyagawa et al.* (Rkt. 4) führte schließlich in immerhin 35% zum *N*-(6-Aminohexyl)prop-2-enamid **28**, wobei auch hier doppelt acyliertes Nebenprodukt erhalten wurde.^[103] Bei der Verbindung **28** wurde auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen verzichtet, da sich *in vitro* keine Aktivität gegen HIV-1 zeigte (vgl. Kap. 4.1.3, S. 47).

Darstellung von 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzoxazol **29** und versuchte Darstellung von 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzothiazol **30**

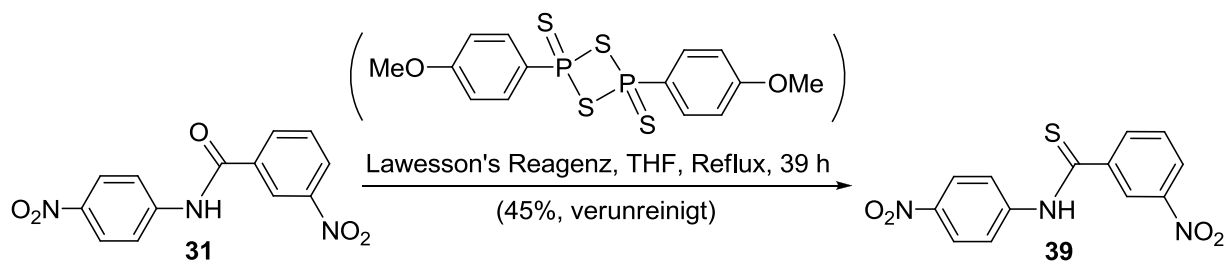
Zur Darstellung zweier weiterer, möglicherweise aktiver Substanzen aus der Liste der virtuellen *Hits* (s. Abb. 20, S. 26 und Abb. 26, S. 30) wurde die Synthese der Verbindungen **29** und **30** erprobt. Dazu sollte zunächst das Oxazol- bzw. Thiazolgerüst aufgebaut werden (s. Abb. 38, Route A, B und D). Die Aminogruppen der Zielverbindungen **29** und **30** sollten dann durch Reduktion der entsprechenden Nitrogruppen dargestellt werden. Der Einsatz der Nitrogruppen hat zudem den Vorteil, dass so auf den Einsatz aufwendiger Schutzgruppenchemie verzichtet werden kann (Route A bis D). Die Aminogruppen konnten nicht direkt verwendet werden, da dann zwei gleichwertige Aminogruppen im Edukt **33** vorliegen würden (s. Abb. 38, Route A und B).

Als Alternative zum Aufbau des Thiazolgerüsts wurde auch die Palladium-katalysierte direkte C-C-Kreuzkupplungsreaktion des Iodaryls **44** mit dem Benzothiazol **43** erprobt (Route C).


 Abb. 38: Retrosynthese der Verbindungen **29** und **30**

Route A und B:

Zuerst wurde **32** mit **33** in absolutem Pyridin umgesetzt und lieferte in 91% Ausbeute Produkt **31** (s. Abb. 29, S. 32). Zur Synthese der Schwefelverbindung **39** wurde Lawesson's Reagenz verwendet (s. Abb. 39). Mit diesem milden Thionierungsmittel lassen sich Ketone, Amide und Ester in deren Thioderivate überführen, ohne auf die harschen Reaktionsbedingungen mit P₄S₁₀ angewiesen zu sein.^[104] Jedoch konnte das Produkt **39** nach der durchgeführten Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung nur in verunreinigter Form isoliert werden (s. Abb. 39). Nach wiederholtem Versuch wurde der Ansatz, die Schwefelverbindung aus der entsprechenden Sauerstoffverbindung zu synthetisieren, nicht weiter verfolgt. Möglicherweise erschweren die elektronenziehenden Nitrosubstituenten von **31** dessen nucleophilen Angriff auf das Thionierungsreagenz.


 Abb. 39: Versuchte Darstellung des Thioamides **39**

Stattdessen wurde zunächst der Ringschluss von **31** zu **40** untersucht. *Ueda et al.* berichteten im Jahre 2009 über die Verwendung von Kupfertriflat als Katalysator zur Zyklisierung von donorsubstituierten Benzaniliden.^[105] Als unreaktiv stellten sich in der Literatur Edukte mit elektronenziehenden Substituenten auf der Anilinseite (z. B. 3-Nitroanilin) heraus. Dennoch wurden die Reaktionsbedingungen von *S. Ueda* auf die Verbindung **31** übertragen (s. Abb. 40).

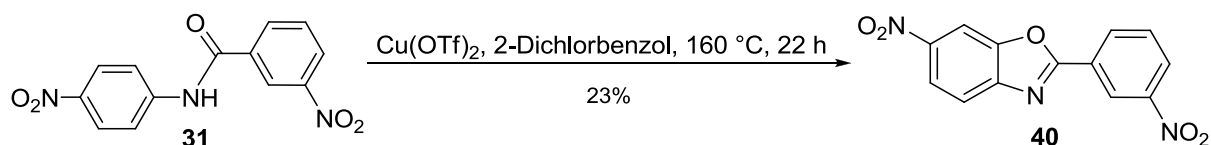


Abb. 40: Darstellung von **40** durch den Kupfertriflat-katalysierten, oxidativen Ringschluss von **31**

6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazol **40** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 23% Ausbeute erhalten werden. Die unvollständige Umsetzung des Eduktes und die daraus bedingte relativ geringe Ausbeute könnten, in Analogie zur Literatur, auf die Nitrosubstituenten zurückzuführen sein.

Zur Reduktion der Nitrogruppen wurde Zinn(II)chlorid als Reduktionsmittel verwendet, da sich dieses bereits am Geeignetsten zur Reduktion von **31** und **34** herausgestellt hatte (vgl. S. 31f). Jedoch kam es bei der Umsetzung von 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazol **40** mit SnCl_2 in konz. HCl zwar zur erfolgreichen Reduktion der Nitrogruppen, aber auch zur Ringöffnung des Oxazols. Somit konnte 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzoxazol **29** auf diese Weise nicht erhalten werden.

Als Alternative zu Route B wurde erprobt, ob der oxidative Ringschluss mit Kupfertriflat auch nach der Reduktion durchgeführt werden könnte (s. Route A, Abb. 38, S. 39; Darstellung von **26** s. Abb. 29, S. 32). Jedoch konnte nach Umsetzung von 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)-benzamid **26** mit Kupfertriflat nur die Zersetzung von **26** beobachtet werden (s. Abb. 41).

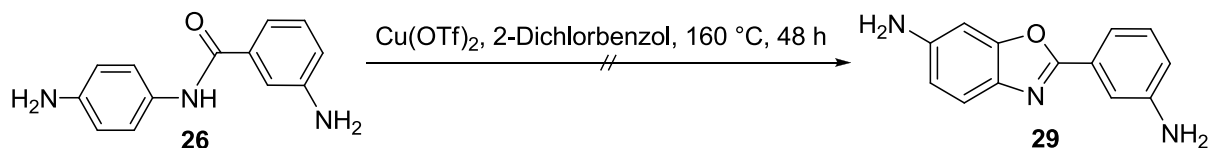


Abb. 41: Versuchte Darstellung von **29** durch oxidativen Ringschluss von bereits reduziertem **26**

Route C:

Da die Thionierung des Benzanilids **31** nicht erfolgreich war (s. S. 39), wurde nach einer Alternative gesucht. In der Literatur sind verschiedene Methoden bekannt, Benzothiazole an der 2-Position mit Aromaten zu verknüpfen. Meistens werden

Übergangsmetalle als Katalysatoren verwendet, z. B. Kupfersalze oder Palladiumverbindungen.^[106]

Zwei in der Literatur beschriebene Reaktionsbedingungen wurden auf Kupplung von 3-Iod-nitrobenzol **44** und 6-Nitrobenzothiazol **43** übertragen.^[107,108] Jedoch führte die direkte C-C-Kreuzkupplung nur in einem Fall und da auch nur in einer äußerst niedrigen Ausbeute zum Produkt **41** (s. Abb. 42). Die Verwendung von Kupfer(I)iodid als Katalysator führte nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung zu folgendem Ergebnis: Es konnten 84% des eingesetzten 3-Iod-nitrobenzols **44** reisoliert werden. In einer weiteren Fraktion wurden 80% des eingesetzten 6-Nitrobenzothiazols **43** erhalten. Aus diesem Ergebnis ist zu erkennen, dass die Reaktion nur einen ungenügenden Umsatz aufwies, obwohl die Reaktionszeit von 10 Min auf 60 Min in der Mikrowelle verlängert wurde. Neben den Edukten konnte eine dritte Fraktion isoliert werden, in der eine ungefähre 1:1-Mischung aus 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzothiazol **41** und dem Homokupplungsprodukt von **44** gefunden wurde.

Für die C-C-Kreuzkupplungen von **43** und **44** mit Palladium als Katalysator wurde zum einen Wasser und zum anderen Acetonitril als Lösungsmittel verwendet (s. Abb. 42, S. 41). Bei Verwendung von Wasser als Lösungsmittel konnte nach 40 h Reaktionszeit und säulenchromatographischer Reinigung **41** in einer Ausbeute von nur 4% (7 mg) isoliert werden. Zudem konnten 31 mg einer Mischfraktion aus überwiegend 6-Nitrobenzothiazol **43** und einem geringen Anteil an Produkt **41** erhalten werden. In Acetonitril als Lösungsmittel konnte auch nach Zugabe weiteren Katalysators und Erhitzen für 86 Stunden kein Umsatz zum Produkt **41** detektiert werden.

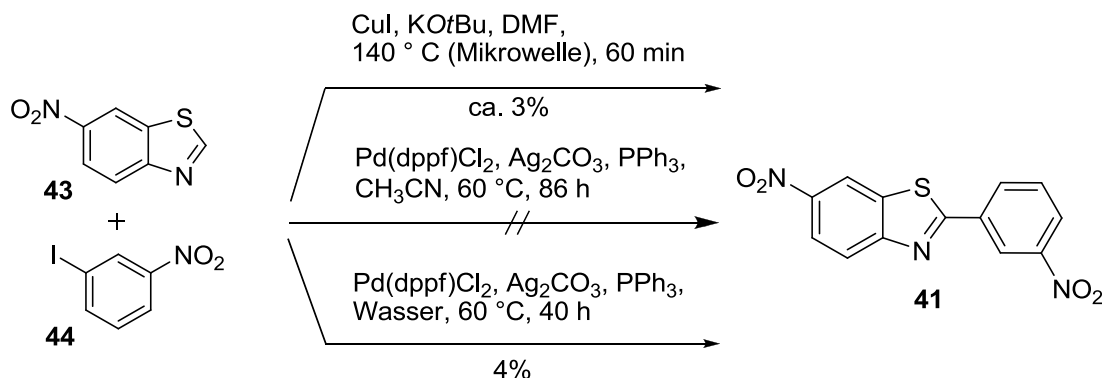


Abb. 42: Darstellung von 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzothiazol **41** durch C-C-Kreuzkupplung

In allen Fällen reagierten die Edukte nur äußerst ungern miteinander, was vermutlich auf die elektronenziehenden Eigenschaften der Nitrosubstituenten zurückzuführen ist. Aufgrund der nicht erfolgreichen Reaktionen mit Lawesson's Reagenz (s. Abb. 39, S. 39) und der C-C-Kreuzkupplungen (s. Abb. 42, S. 41) wurde der Fokus wieder auf die Synthese des 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzoxazol **29** gelegt. Sollte sich diese Verbindung als aktiv gegen die DHS herausstellen, wäre das nächste Ziel, weitere Reaktionsbedingungen zur Synthese des Benzothiazols **30** zu erproben.

Route D:

Als weitere Alternative zum Aufbau des Benzoxazolgerüsts nach Route A bzw. B wurde auf eine klassische Synthese zur Darstellung substituierter Benzoxazole zurückgegriffen.^[109] Die doppelte Kondensation einer geeignet substituierten Benzoessäure **35** mit geeignet substituiertem 2-Aminophenol **42** ist eine weitere Möglichkeit das Benzoxazolgerüst **40** in einem Schritt aufzubauen und auf diese Weise im Vergleich zu Route A bzw. B eine Stufe zu sparen (vgl. Route A und B, Abb. 38, S. 39).

Hausner et al. berichteten über die Verwendung von Borsäure als stöchiometrischer Zusatz zur Eintopf-Zyklisierung von 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzoessäure mit nitrosubstituiertem 2-Aminophenol.^[110] Obwohl aufgrund fehlender Ausbeute-Angaben der Erfolg der Reaktion nicht abgeschätzt werden konnte, wurden diese Reaktionsbedingungen erprobt (s. Abb. 43, S. 43). Nach Erhitzen der Reaktionsmischung zum Sieden, färbte sich diese schwarz. In einem ersten Versuch wurde das schwarze Rohprodukt nach wässriger Aufarbeitung und Extraktion mit Ethylacetat an Kieselgel gereinigt. Jedoch konnte nur eine Mischfraktion aus 2-Amino-5-nitrophenol **42** und dem Produkt **40** erhalten werden.

Im zweiten Versuch wurde die Reaktionsmischung nicht gewaschen sondern direkt säulenchromatographisch gereinigt. Aus dem schwarzen, teerartigen Rohprodukt konnten so 229 mg (16%) des sauberen 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazols **40** isoliert werden (s. Abb. 43). Wie in den zuvor durchgeführten Reaktionen unter Verwendung der elektronenziehenden Nitrogruppen als Aminovorläufer wurden eine niedrigere Reaktivität der Aromaten und eine möglicherweise daraus resultierende geringere Ausbeute in Kauf genommen.

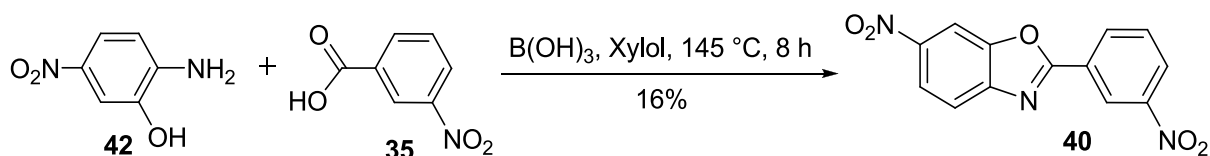


Abb. 43: Borsäure-katalysierte Darstellung des 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazols **40**

Nachdem die Reduktion mit Zinn(II)chlorid zur unerwünschten Ringöffnung des Oxazols geführt hatte (vgl. S. 40), wurde nun Wasserstoff an Palladium/Kohle als milderes Reduktionsmittel zur Reduktion von **40** getestet.

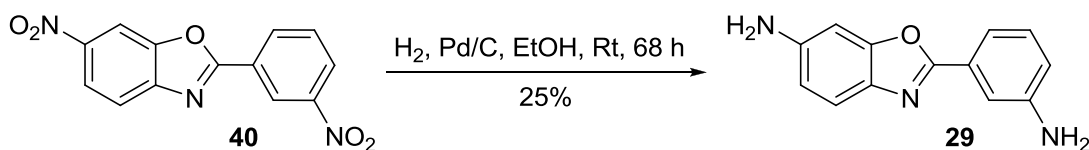


Abb. 44: Reduktion der Nitrogruppen von **40** zu **29** mit Wasserstoff an Pd/C

Nach 40 h war mittels Dünnschichtchromatographie nur noch wenig Edukt detektierbar und auf der DC-Folie waren ein großer und ein kleinerer Spot entstanden. Zur vollständigen Umsetzung des Eduktes wurde die Reaktion weitere 18 Stunden in der Wasserstoffatmosphäre gerührt. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie war nun kein Edukt mehr zu erkennen, jedoch war auf der DC-Folie zu den zwei neuen Spots noch ein dritter hinzugekommen, was eventuell auf unerwünschte Nebenreaktionen schließen ließ. Nach zweimaliger säulenchromatographischer Reinigung konnte die Zielverbindung **29** in einer Ausbeute von immerhin 25% isoliert werden (s. Abb. 45).

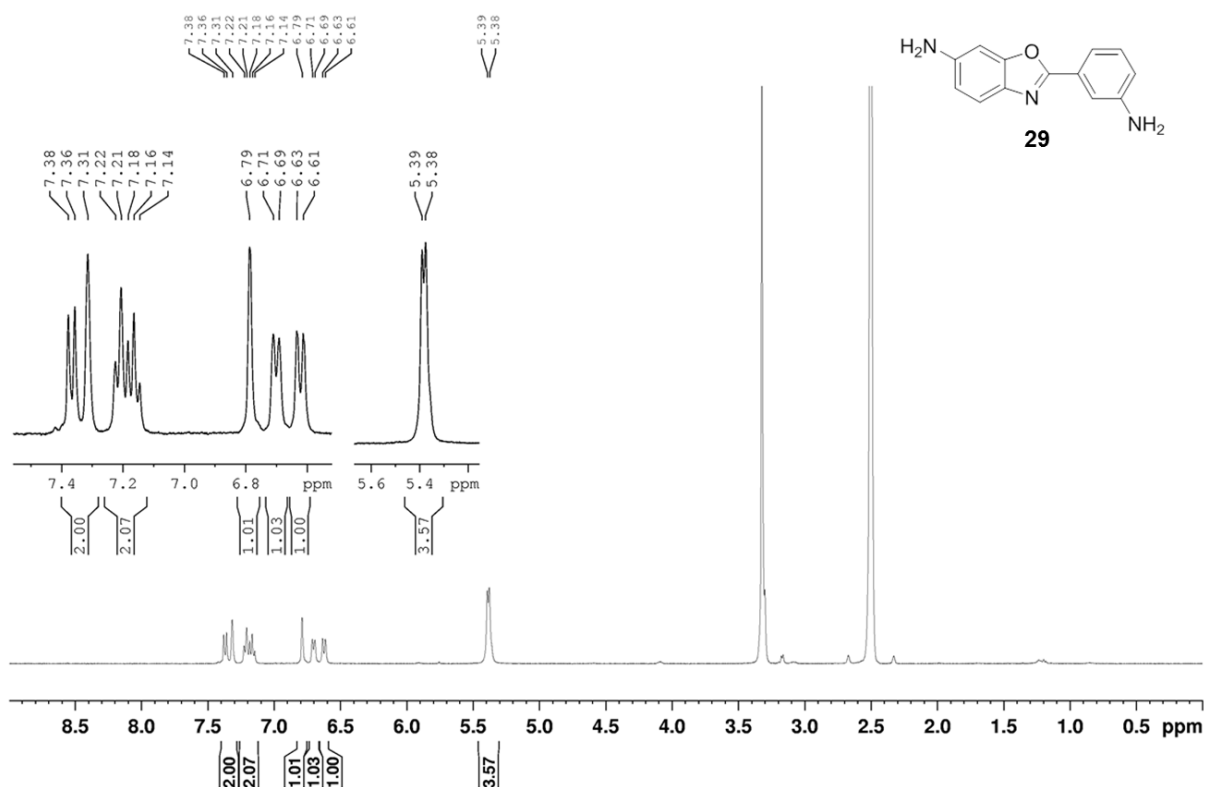


Abb. 45: ^1H -NMR-Spektrum des 6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzoxazols **29** in $\text{DMSO-}d_6$

Auch hier wurde zunächst auf eine weitere Optimierung der einzelnen Syntheseschritte hinsichtlich einer besseren Ausbeute verzichtet und das Ergebnis der *in vitro* Tests abgewartet. Sollte sich die vermutete Aktivität von **29** bestätigen, wäre neben der Entwicklung einer erfolgreichen Synthesestrategie für das Benzothiazol **30** (vgl. Abb. 38, S. 39) auch die Benzoxazolsynthese zur Verbindung **29** zu optimieren (s. Abb. 43 bzw. Abb. 44, S. 43).

4.1.3 Biochemische Tests der ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren

Nachdem die sieben Verbindungen **18-20**, **26-29** erfolgreich dargestellt werden konnten, wurden diese mit den drei kommerziell verfügbaren Verbindungen **5**, **16** und **17** (s. Abb. 46) im Hinblick auf deren inhibitorische Wirkung gegenüber der DHS und HIV-1 von *P. Priyadarshini* und *M. Krepstakies* (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) getestet (s. Kap. 9.2, S. 169f).

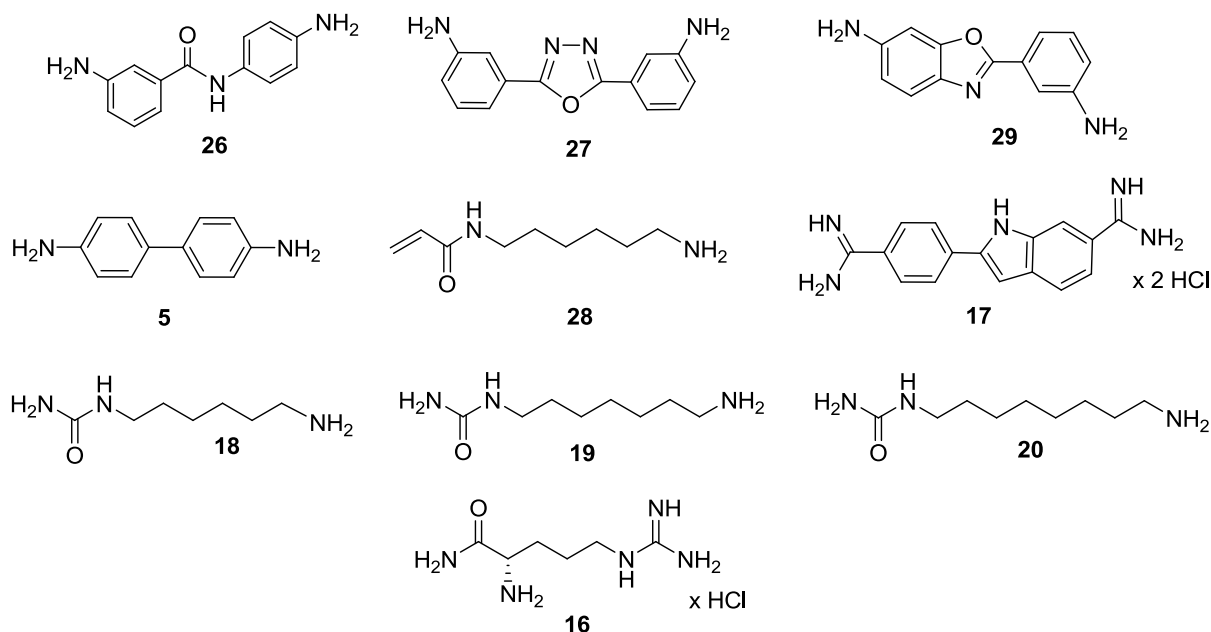


Abb. 46: Übersicht der getesteten ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren

Erster, schneller Test gegen HIV-1 in HeLa-Zellen:

Als ersten, schnellen Test wurden HIV-1 infizierte HeLa-Zellen in Gegenwart von jeweils einer der Verbindungen **5**, **17**, **20**, **26** und **27** inkubiert und die HIV-1 Replikation nach 4, 10 und 17 Tagen durch Messung der p24-Antigen-Konzentration im Überstand bestimmt (s. Abb. 47). Nach 17 Tagen wurde für **17**, **26** und **27** jeweils eine gute Inhibition festgestellt (50-90% Inhibition). Daraufhin wurden die Syntheseschritte zur Verbindung **26** hinsichtlich besserer Ausbeuten erfolgreich optimiert (s. Kap. 4.1.2, S. 32f). Währenddessen wurden die Verbindungen in HIV-1 infizierten PM1- und in infizierten CEM-ss-Zellen getestet, um die Ergebnisse der ersten Tests verifizieren zu können (s. S. 47). Benzidin **5** wurde in diesem, ersten Test noch mitgetestet, anschließend aber aufgrund der gemessenen Inaktivität und des carcinogenen Potentials aus den weiteren Assays entfernt.

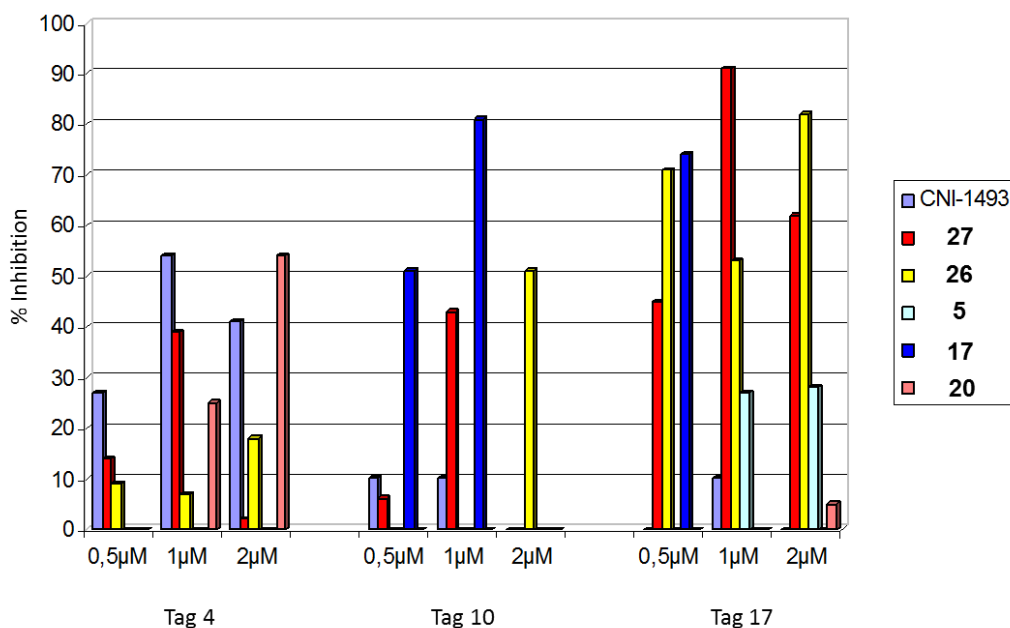


Abb. 47: Erste *in vitro* Tests der neuen, potentiellen DHS-Inhibitoren gegen HIV-1 in HeLa-Zellen^[111]

Inhibition von HIV-1 in PM1- und CEM-ss-Zellen

Da es sich bei dem zuvor durchgeführten, *in vitro* Test nur um einen ersten, schnellen Assay handelte, wurden weitere Experimente mit anderen Zelllinien durchgeführt. Die entsprechenden Zellkulturen wurden für sechs Tage mit den jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert und anschließend nach Infektion der Zellen mit HIV-1 in Gegenwart der neuen, potentiellen Inhibitoren oder CNI-1493 **2** (als Positivkontrolle) für 18 Tage gehalten. Viruslasten im Zellüberstand und die zelluläre Viabilität (AlamarBlue-Assay) wurden jeden dritten Tag bestimmt. Die lange Vorinkubationszeit der Zellen in Gegenwart der Inhibitoren beruht auf der Tatsache, dass der bereits aktivierte eIF-5A eine sehr lange Halbwertszeit besitzt.

Über den AlamarBlue-Assay konnte in beiden Zelllinien für **17-19**, **26** und **27** keine Toxizität der jeweiligen Verbindungen bis zu einer Konzentration von 4 μM detektiert werden. Jedoch konnte die erhoffte Bestätigung der zuvor erhaltenen, hohen Aktivität gegen HIV-1 für die Verbindungen **26** und **27** nicht erhalten werden (vgl. Abb. 47, S. 46 und Abb. 46, S. 45). Zusätzlich wurde für die Verbindungen **18** und **19** leider ebenfalls keine Aktivität gegen HIV-1 gemessen.

Erfreulicherweise bestätigten sich die guten Inhibitionswerte für **17** aus dem ersten Test (s. Abb. 48). Bei 4 μM **17** zeigte sich in CEM-ss-Zellen beispielsweise eine sehr gute Inhibition der HIV-Replikation, ohne toxische Effekte auf die Zelle zu haben.

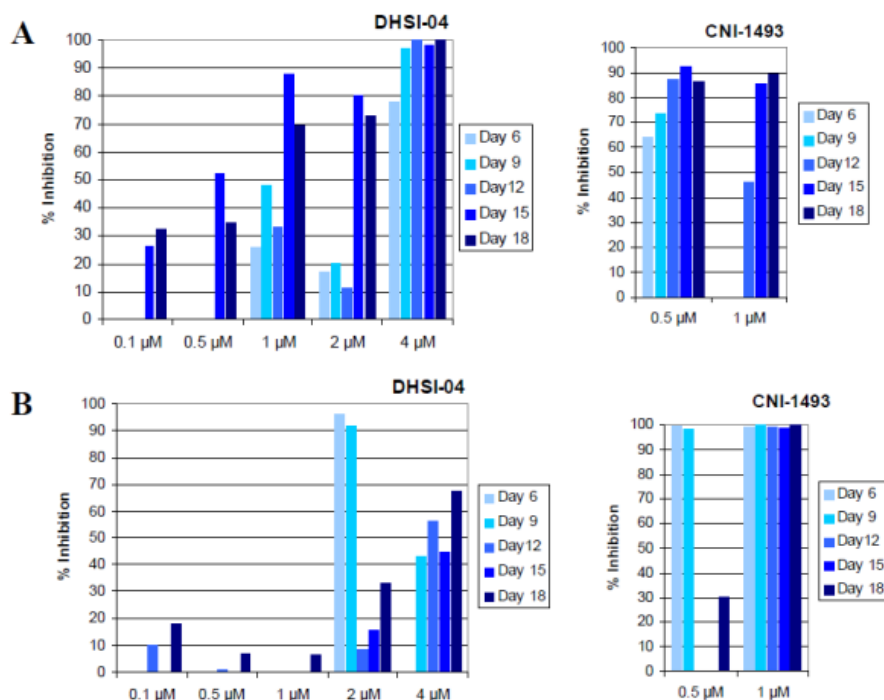


Abb. 48: Aktivität von **17** gegen HIV-1 in (A) CEM-ss-T-Zellen und (B) PM1-Zellen mit CNI-1493 als Referenz^[111]

Inhibition der Desoxyhypusinsynthese

Die Inhibition der Desoxyhypusinsynthese wurde *in vitro* am isolierten Enzym überprüft. Durch radioaktiv markiertes Spermidin wurde die DHS-vermittelte Übertragung der Aminobutyleinheit des Spermidins auf das Lysin an Position 50 im eIF-5A gemessen (vgl. Abb. 6, S. 9 und Kap. 9.2.1, S. 169). Bei diesen Versuchen wurden GC7 **1** und CNI-1493 **2** als Referenzverbindungen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt und zeigen leider für fast alle Verbindungen keine Aktivität gegen die DHS. Zu erkennen ist, dass nur **17** und **28** mit 11 bzw. 14% Inhibition eine geringe Aktivität besitzen. Aufgrund der terminalen Doppelbindung von **28** ist auch eine unerwünschte, chemische Reaktion mit der DHS, aus der die gemessene Inhibition resultiert, nicht auszuschließen. Generell schließt die Doppelbindung eine spätere Verwendung von **28** als Wirkstoff aufgrund von Nebenreaktionen eher aus.

Erstaunlich war, dass in dem zuvor durchgeführten, ersten, schnellen Test gegen HIV-1 für **17**, **26** und **27** eine vielversprechende Aktivität gefunden wurde (vgl. Abb. 47). Jedoch haben sich die Ergebnisse für **26** und **27** nicht bestätigt. Bei **17** handelt es sich mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) um einen fluoreszierenden Interkalationsfarbstoff für DNA.^[112,113] Obwohl diese Verbindung bei 360 µM eine

nahezu 100%ige Inhibition der DHS zeigte (s. Abb. 49), kann aufgrund der DNA-interkalierenden Eigenschaften von **17** nicht ausgeschlossen werden, dass ein antiviraler Effekt zusätzlich zur DHS-Inhibition auf andere Weise hervorgerufen werden könnte.

Tabelle 2: DHS-Inhibition bei Inkubation mit 80 μM der neuen, potentiellen DHS-Inhibitoren (mod.)^[114]

Verbindung	relative Inhibition in % ^a
GC7 1	45
CNI-1493 2	36
5	–
16	≤ 0
17	11
18	≤ 0
19	≤ 0
20	≤ 0
26	≤ 0
27	≤ 0
28	14
29	≤ 0

^a Absolute Inhibition minus Negativkontrolle

Für **17** wurde eine moderat dosis-abhängige Aktivität gemessen, die bei 360 μM zu einer 99%igen Inhibition der DHS führte (s. Abb. 49). Da die Verbindungen bis 80 μM keine messbare Inhibition, bzw. kein dosis-abhängiges Aktivitätsprofil zeigten, wurde in diesen Fällen auf Tests mit noch höheren Konzentrationen verzichtet.

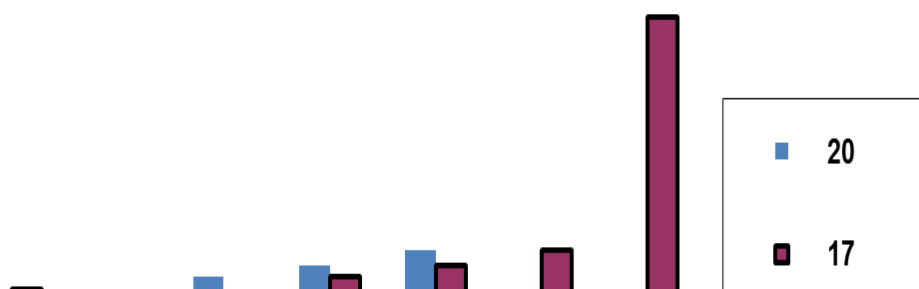


Abb. 49: *In vitro* Inhibition der DHS in Abhängigkeit der Konzentrationen von **17** und **28**^[114]

4.1.4 Fazit: Erste Generation potentieller DHS-Inhibitoren

Über Struktur-basiertes Wirkstoffdesign wurden von *A. Kolodzik* 29 virtuelle Hits als potentielle, neue Inhibitoren der DHS errechnet (s. Abb. 20, S. 26). Von diesen waren drei Verbindungen kommerziell erhältlich, und aus den restlichen 26 Verbindungen wurden nach synthetischen Überlegungen 11 Verbindungen ausgewählt, die anschließend chemisch synthetisiert werden sollten (s. Abb. 22, S. 28 und Abb. 26, S. 30).

Über effiziente Syntheserouten konnten sieben der ausgewählten Verbindungen erfolgreich synthetisiert werden (s. Kap. 4.1.1 bzw. 4.1.2, S. 27ff). Die mit den drei kommerziell erhältlichen insgesamt 10 neuen, potentiellen DHS-Inhibitoren **5**, **16-20** und **26-29** wurden von *M. Krepstakies* und *P. Priyadarshini* eingehenden *in vitro* Tests hinsichtlich der DHS-Inhibition und der Inhibition der HIV-1 Replikation unterzogen (s. Kap. 4.1.3, S. 45ff). Dabei wurde für **17** und **28** eine Inhibition der DHS festgestellt (s. Tabelle 2, S. 48). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die bioinformatischen Rechnungen einer Optimierung bedürfen, da die als aktiv vorausgesagten, anderen Verbindungen **16**, **18-20**, **26**, **27** und **29** *in vitro* keine Aktivität zeigten. Die DHS-Assay-Ergebnisse bestätigten sich weitgehend in den Untersuchungen zur Inhibition der HIV-1 Replikation (s. S. 47). Nur **17** zeigte signifikante Aktivität gegen HIV-1. Bei **17** (DAPI), der als DNA-Farbstoff in der Biochemie genutzt wird, spielen eventuell hinsichtlich der guten Werte für die HIV-1 Inhibition zusätzlich zur DHS-Inhibition auftretende Wirkmechanismen eine Rolle. Positiv ist, dass alle getesteten Verbindungen bis zu einer Konzentration von 4 μM keine toxischen Effekte auf die Zellen hatten.

Zusammengefasst mit der *in vitro* DHS-Inhibition von **17** ist die Aktivität dieser Verbindung als einzige von den bioinformatischen Berechnungen korrekt vorausgesagt worden. Jedoch zeigte das Dosis-Wirkungsprofil von **17**, dass noch weiter optimierte Berechnungen notwendig sind. Außerdem muss durch strukturelle Veränderungen von **17** verhindert werden, dass ein potentieller Wirkstoff DNA-interkalierende Eigenschaften hat.

In den beiden folgenden Kapiteln wird dargestellt, wie die in diesem Kapitel beschriebenen, gewonnen Erkenntnisse zu einer Optimierung des *molecular modellings* genutzt wurden und somit erfolgreich, neue DHS-Inhibitoren entwickelt werden konnten.

4.2 Zweite Generation neuer, verbesserter DHS-Inhibitoren

Nach der erfolgreichen Darstellung und Testung von Verbindungen aus der ersten Generation neuer, potentieller Inhibitoren der Desoxyhypusinsynthese wurde mit **17** eine *in silico* und *in vitro* aktive Verbindung erhalten (s. Abb. 50).

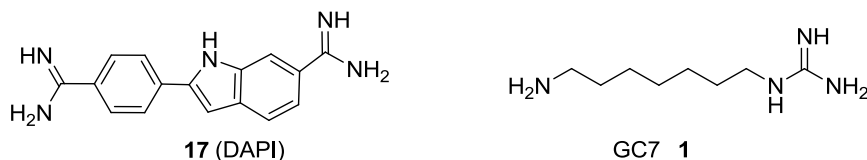


Abb. 50: Identifizierter *in vitro* bzw. *in silico* Hit **17** und der bekannte Inhibitor GC7 **1** für weitere Optimierung des virtuellen Screenings

Vergleicht man die Struktur dieser Verbindung mit den anderen, *in vitro* inaktiven Verbindungen, stellt man große strukturelle Unterschiede fest (s. Abb. 51). In den meisten inaktiven Verbindungen sind die Aminogruppen direkt an den Aromaten gebunden und weisen somit ganz andere physikochemische Eigenschaften z. B. hinsichtlich des pK_B -Wertes im Bezug auf die Ausbildung von Ionenpaarbindungen oder der Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen auf.

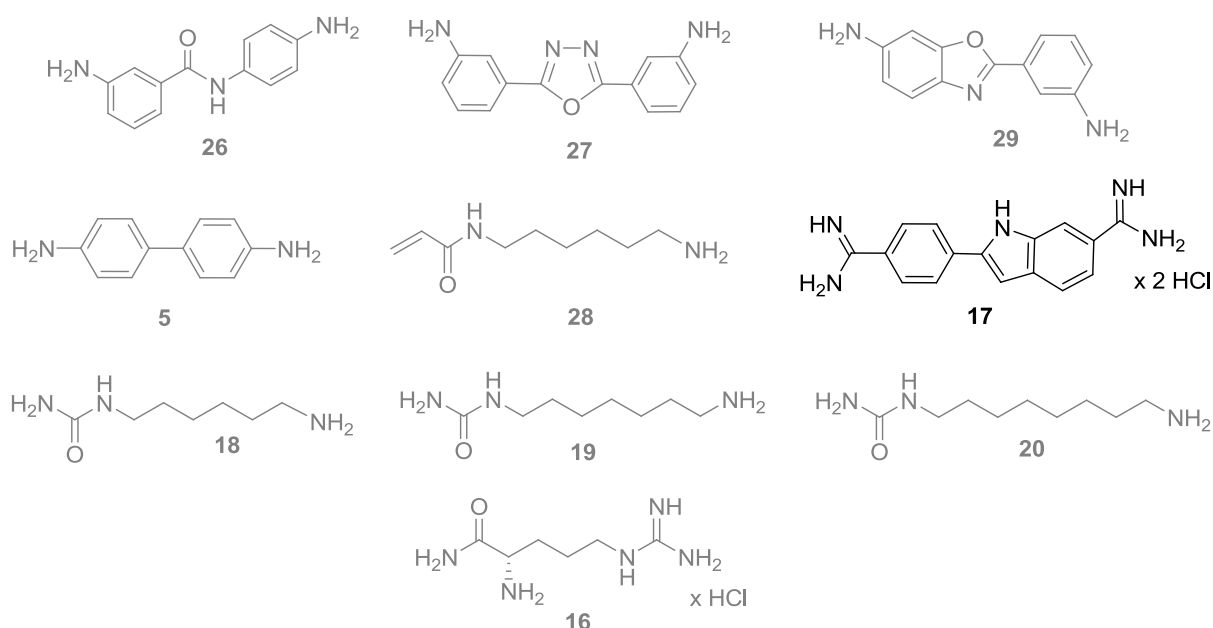


Abb. 51: Übersicht der getesteten, ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren (grau eingefärbt: *in vitro* inaktive oder nur minimal aktive Verbindungen)

Gemeinsam ist allen Verbindungen, dass sie selbst keine negativ geladenen Gruppen tragen. Da jedoch das aktive Zentrum der DHS viele negativ geladene Aminosäureseitenketten besitzt (s. Abb. 7C, S. 10), ist für eine erfolgreiche Bindung die Fähigkeit zur Ausbildung von Ionenpaar- und/oder Wasserstoffbrückenbindungen notwendig. Daraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für die Inaktivität der

Verbindungen **26**, **27** und **29**. Deren aromatische Aminogruppen liegen eventuell unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert vor und können deswegen nicht effizient mit den Carboxylat-Seitenketten der Aminosäuren im aktiven Zentrum der DHS wechselwirken.

Von A. Kolodzik wurden die möglichen Interaktionen von **17** (DAPI) mit den Aminosäuren im aktiven Zentrum der DHS berechnet (s. Abb. 52). Wahrscheinlich sind die protonierbaren Amidinogruppen für eine erfolgreiche Ausbildung von Wasserstoffbrücken verantwortlich. Außerdem ermöglichen die Aromaten π - π -Wechselwirkungen mit dem Tryptophan327 im aktiven Zentrum.

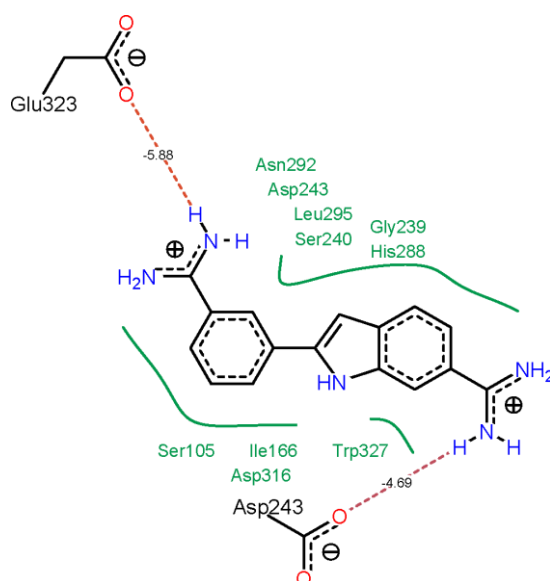


Abb. 52: Bioinformatische Berechnung des aktiven Zentrums der DHS mit gebundenem **17**^[48]

Für eine Neuberechnung bzw. Optimierung des virtuellen Screenings neuer, potentieller DHS-Inhibitoren wurden folgende Bedingungen aufgestellt: Es sollte

- die Rigidität des 2-Phenyl-indols vermieden werden,
- trotzdem eine deutlich höhere Rigidität als bei GC7 erhalten werden,
- eine aromatische Kernregion für Wechselwirkungen mit Trp327 vorhanden sein,
- eine Verbindung mit leicht protonierbare Gruppen erhalten werden und
- der Abstand der funktionellen Gruppen besser auf das aktive Zentrum abgestimmt sein.

Aufgrund der DNA-interkalierenden Eigenschaften von DAPI **17**^[112] kann diese Verbindung nicht als „Wirkstoff“ verwendet werden, sondern wurde in diesem Fall als *Hit* zusammen mit GC7 **1** als Basis für weitere potentielle DHS-Inhibitoren verwendet. Für die Berechnung dieser zweiten Generation von Verbindungen befinden wir uns in

dem in Abb. 53 dargestellten Arbeitsablauf in der unteren Reihe („LOFT^[115] und Recore^[116]“ bis „HYDE^[93] rescoring“). Mit diesen Computerprogrammen wurde von A. Kolodzik zusätzlich zum Struktur-basierten Screening auch Fragment-basiertes Wirkstoffdesign angewandt.^[48] Dazu wurden **1** und **17** virtuell in Fragmente zerlegt („LOFT“), diese Fragmente modifiziert („Recore“), zufällig wieder kombiniert und von allen Kombinationen die *in silico* Bindungsaffinität zur DHS bestimmt („FlexX docking“ und „HYDE rescoring“).

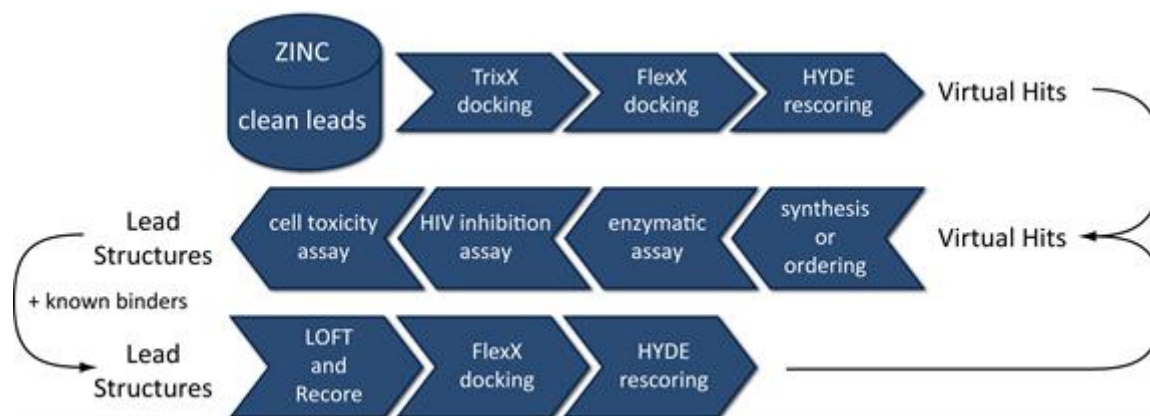


Abb. 53: Schematische Darstellung der durchgeführten Leitstruktursuche^[48]

Von den aus den verschiedenen Fragmenten konstruierten Verbindungen wiesen 72 neuartige Moleküle eine höhere, kalkulierte Bindungsaffinität als GC7 **1** und **17** zur DHS auf. Eine Übersicht der vier theoretisch aktivsten Verbindungen ist in Abb. 54 dargestellt.

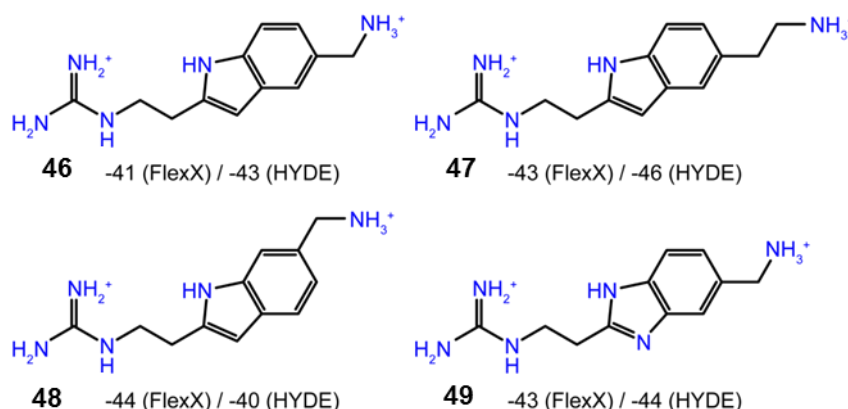


Abb. 54: Auf Ergebnissen der ersten Generation basierende, berechnete zweite Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren (*in silico* aktivste Verbindungen)^[48]

Da diese Verbindungen alle ähnlich verbesserte Aktivitäten im Vergleich zu GC7 **1** und DAPI **17** (FlexX-Wert: -32 bzw. -31) besaßen, wurde für eine Darstellung Verbindung **46** (2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1H-indol) nach synthetischen Gesichtspunkten ausgewählt. Es wurde zunächst nur die Synthese für eine

Verbindungen entwickelt, da zu diesen Verbindungen noch keine *in vitro* Daten bekannt waren und noch nicht klar war, ob sich nun die *in silico* Aktivität auch im biologischen Assay bestätigen lassen würde.

4.2.1 Synthesestrategie für den neuen DHS-Inhibitor der zweiten Generation

Aus den neu berechneten Verbindungen wurde 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** zur Synthese ausgewählt. Wie schon bei den Verbindungen der ersten Generation, sollte eine möglichst kurze und effiziente Syntheseroute entwickelt werden (vgl. Kap. 4.1.2, S. 29ff). Jedoch zeigte sich im Verlauf der Arbeit, dass hier deutlich mehr Syntheseaufwand betrieben werden musste. In Abb. 55 ist die Zielverbindung mit synthetisch vorstellbaren Bindungsbrüchen dargestellt.

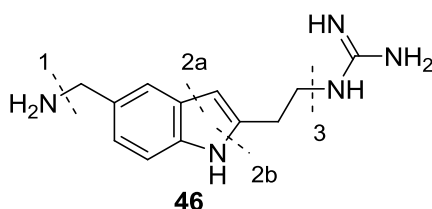


Abb. 55: Synthetisch vorstellbare Bindungsbrüche 1 bis 3 bei der Zielverbindung **46**

In der Literatur existieren verschiedenste Möglichkeiten zur Indolsynthese.^[117] Eine der bekanntesten ist die Fischer-Indol-Synthese, bei der Arylhydrazine mit Ketonen umgesetzt und unter sauren Bedingungen zum Indol zyklisiert werden (2a).^[118] Viele neuere Reaktionen nutzen Übergangsmetalle als Katalysatoren (2a/2b). Bekannt ist auch, dass sich Nitrile zu Methylaminen reduzieren lassen (1).^[119-121]

Literaturbekannt ist, dass sich primäre aliphatische Alkohole unter Mitsunobu-Reaktionsbedingungen mit geschütztem Guanidin umsetzen lassen.^[122-124] Auch ist es möglich, Alkylguanidine durch die nucleophile Substitution von Alkylhalogeniden (Bromid, Iodid) mit deprotoniertem Guanidin darzustellen (3).^[125]

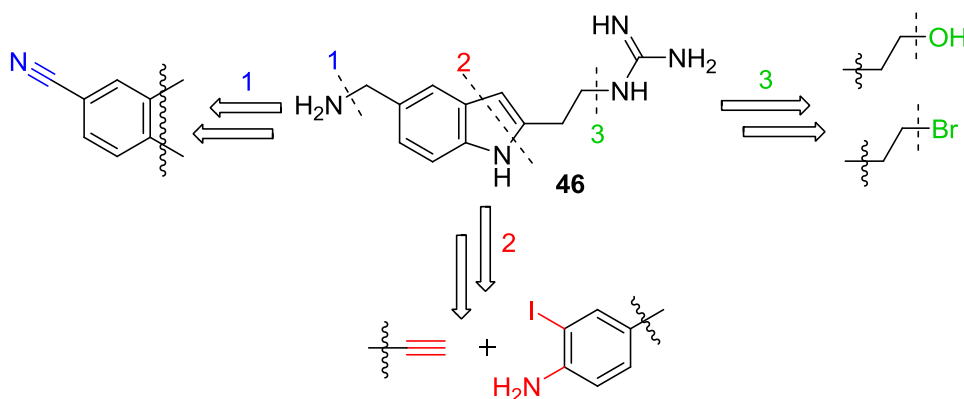


Abb. 56: Schematische Darstellung der Retrosynthese von **46** (Schutzgruppen nicht gezeigt)

Das Substitutionsmuster der Zielverbindung **46** schränkte die Auswahl an den Edukten ein und machte die Anwendung geeigneter Schutzgruppenchemie notwendig. So galt es, die Aminomethylfunktion zu blockieren oder durch Funktionelle-Gruppen-Umwandlung einzuführen (1). Hierzu sollte die Reduktion eines entsprechenden Nitrils erprobt werden. Beim Aufbau des Indolgerüsts war es wichtig, dass die 2-Guanidinoethylfunktion selektiv in der 2-Position des Indols eingeführt werden konnte (2). Für die Guanidinogruppe sollten geeignete Schutzgruppen verwendet werden, die einen direkten Einsatz in der Syntheseroute ermöglichen. Alternativ sollte die Guanidinogruppe aus entsprechenden Vorläufern nach der Indolsynthese eingeführt werden (3). Es war nicht bekannt, in welcher Abfolge die Schritte (1) bis (3) am effizientesten durchzuführen sind (s. Abb. 56). Dies sollte ebenfalls untersucht werden.

Bei den literaturbekannten Darstellungsmöglichkeiten von Alkylguanidinen war unbekannt, inwieweit sich solche Reaktionen auf die zur Darstellung von **46** benötigten Edukte übertragen ließen und inwieweit z. B. eine Hydroxygruppe zu Nebenreaktionen bei der Indolsynthese führen könnte. In diesem Fall müssten zusätzliche Schutzgruppen für die OH-Gruppe verwendet werden. Denkbar war auch, die Guanidinogruppe vor der Indolsynthese einzuführen, um so die lineare Syntheseroute zu verkürzen.

Bei der Schutzgruppenauswahl musste die orthogonale Kompatibilität berücksichtigt werden. Da die meisten Ringschlüsse und Indolsynthesen unter basischen Bedingungen stattfinden, war eine basenstabile Schutzgruppe an der Guanidino- bzw. der Aminomethylfunktion notwendig. Entsprechend der genannten Voraussetzungen wurde die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe gewählt (vgl. Abb. 57, S. 55). Diese ist zum einen basenstabil und bietet den Vorteil, dass sie relativ leicht im Sauren spaltbar ist und in die gasförmigen Nebenprodukte Kohlenstoffdioxid und *Isobuten* zerfällt. Die Abspaltung war im organischen Lösungsmittel unter Einleitung von Chlorwasserstoffgas geplant, was dazu führen sollte, dass das reine Produkt **46** als entsprechendes Hydrochlorid aus der Reaktionslösung ausfiel und durch einfache Filtration erhalten werden sollte.

4.2.2 Erste Gehversuche zur Darstellung von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1H-indol 46

Die Syntheseroute sollte mit dem kommerziell erhältlichen 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und dem Aufbau des Indolgerüsts beginnen. Die Einführung der Boc-modifizierten Guanidinogruppe wurde über die auf Seite 53 beschriebenen Wege erprobt. Die Reduktion der Nitrilfunktion war als vorletzte Stufe geplant, da so die Schutzgruppenchemie an der Aminomethyl-Position vermieden werden sollte (s. Abb. 57). Im letzten Schritt sollte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen unter Fällung der gewünschten Zielverbindung **46** als Hydrochlorid erfolgen. In den von mir angeleiteten Bachelorarbeiten von *K. Pfaff* und *D. Hieke* wurden einige der in Kap. 4.2.2 und Kap. 4.3 (S. 71-93) vorgestellten Reaktionen durchgeführt.^[126,127]

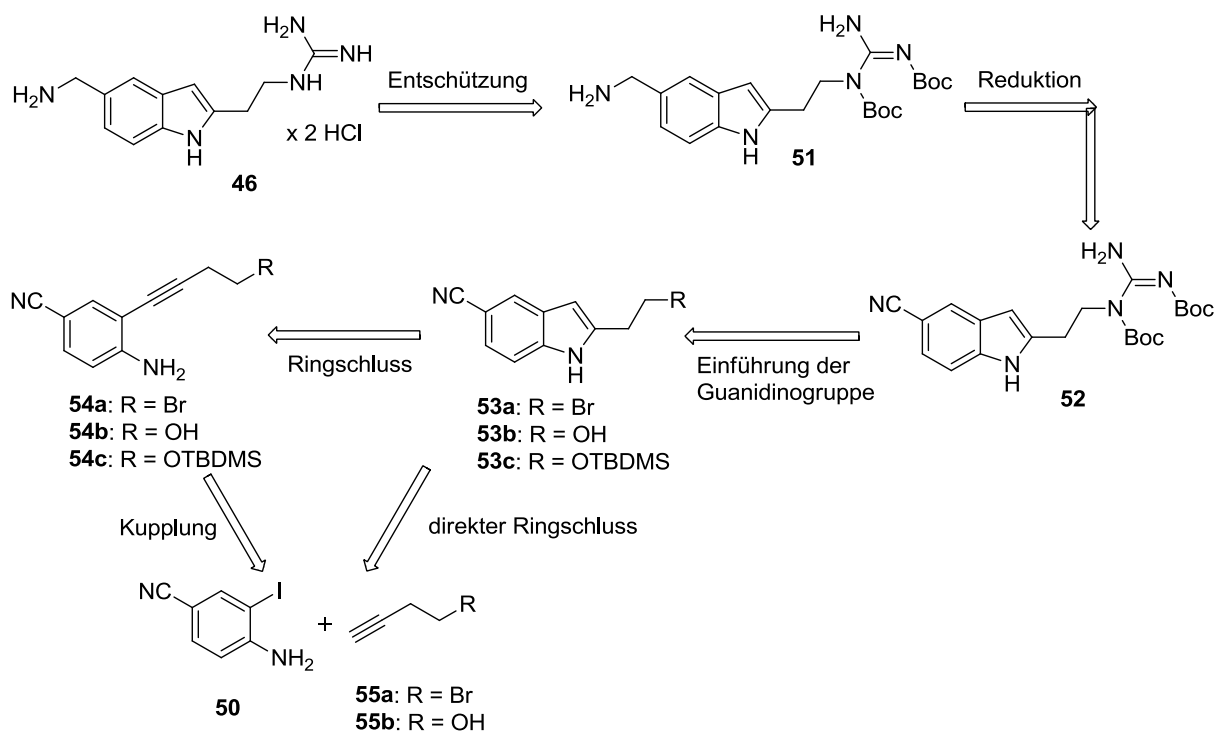


Abb. 57: Erste Syntheseroute zur Darstellung von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1H-indol **46**

Insgesamt wäre diese Route mit fünf Stufen schon relativ effizient. Zusätzlich sollte erprobt werden, ob sich die Kreuzkupplung und der anschließende Ringschluss zum Indol auch in einer Eintopf-Reaktion durchführen lassen und so die Route um eine Stufe auf vier Reaktionsschritte weiter verkürzt werden kann.

C-C-Kreuzkupplungsreaktion:

Für den ersten Schritt der Syntheseroute wurde eine C-C-Kreuzkupplungsreaktion nach *Sonogashira et al.* verwendet (s. Abb. 57).^[128] In dieser Reaktion werden Arylhalogenide mit terminalen Alkinen unter Palladiumkatalyse und Kupferiodid als Zusatz in Gegenwart einer Base umgesetzt. Nachteile sind eine oft schwierige Abtrennung der Metalle und auch die hohen Kosten der Katalysatoren. Im Jahr 2009 berichteten *Sedelmeier et al.* über eine kupferfreie Sonogashira-Variante, die polymergebundenes Pd(PPh₃)₄ als Katalysator sowie DBU als Base verwendet.^[129] Dieser Pd EnCat TPP30[®] soll den Vorteil bieten, den Katalysator durch einfache Filtration zurückzugewinnen und wiederzuverwenden.^[130] Beide Varianten wurden für die Reaktion von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** mit den Alkinen **55a** bzw. **55b** getestet (s. Tabelle 3).

Interessanterweise konnte das Kupplungsprodukt **54a** mit 4-Brombut-1-in **55a** nach keinem der zwei Verfahren erhalten werden. Bei Rkt. 1 wurden keine sauberen Fraktionen erhalten, jedoch deuteten die Signale im ¹H-NMR-Spektrum einer Fraktion auf eine entstandene C-C-Doppelbindung hin. Deutlich bessere Ergebnisse wurden mit 3-Butin-1-ol **55b** erzielt. Sowohl nach der klassischen Variante mit Kupferiodid als auch nach der kupferfreien Variante wurde **54b** nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute 94% bzw. 85% isoliert.

Tabelle 3: Durchgeführte C-C-Kreuzkupplungen von 4-Amino-3-iod-benzonitril **50** mit **55a** bzw. **55b**

Rkt.	Alkin	Katalysator	Kupfer(I)iodid	Base	Ausbeute
1	55a	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	ja	Et ₃ N	-
2	55a	Pd(PPh ₃) ₄	ja	DIPEA	- ^a
3	55a	Pd EnCat TPP30 [®]	nein	DBU	- ^b
5	55b	Pd (PPh ₃) ₂ Cl ₂	ja	Et ₃ N	94% 54b
6	55b	Pd EnCat TPP30 [®]	nein	DBU	85% 54b

^a keine charakterisierbaren Fraktionen, ^b diverse Nebenprodukte, z. B. dehalogeniertes Edukt

Bevor der Ringschluss zum Indol untersucht werden sollte, wurde die Hydroxyfunktion von **54b** mit der *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe blockiert. Auf diese Weise sollten eventuelle Nebenreaktionen beim Ringschluss vermieden werden, z. B. ein Angriff der OH-Gruppe auf das gebildete Indol unter möglicher Fünfringbildung.

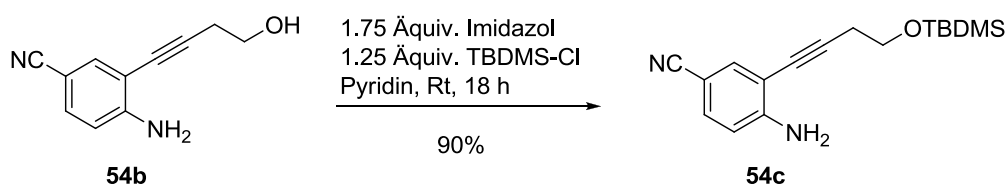


Abb. 58: Darstellung von 4-Amino-3-(4-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxybut-1-ynyl)-benzonitril **54c**

Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen für die Einführung von Silylschutzgruppen durchgeführt. Mit TBDMS-Cl als Silyldonor und Imidazol als Aktivator konnte das Produkt **54c** in einer Ausbeute von 90% erhalten werden. Mit den zwei erfolgreich synthetisierten Verbindungen **54b** und **54c** wurde im nächsten Schritt der Ringschluss zum Indol erprobt. Außerdem ist im Folgenden beschrieben, wie die *in situ* Indolsynthese getestet wurde.

Ringschluss zum Indol:

Der Aufbau des Indolgerüsts kann als Schlüsselschritt der Syntheseroute angesehen werden. Der Substituent wurde selektiv in der 2-Position am Indol benötigt, da auf diese Weise die Position der späteren Guanidinoethyl-Einheit festgelegt wird. Deshalb wurde zunächst die Überlegung der zweistufigen Synthese aus Kreuzkupplung und anschließendem Ringschluss verfolgt (s. Abb. 57, S. 55). Auf diese Weise ist die Position der späteren Guanidinoethyl-Einheit festgelegt. Die Zyklisierung von Alkinen mit aromatischen Aminogruppen wird in vielen Fällen mit Übergangsmetallen unter basischen Bedingungen katalysiert.

Zunächst wurden Reaktionsbedingungen von *Hiroya et al.* erprobt.^[131] In einer Stickstoffatmosphäre wurde **54b** mit Kupfer(II)Acetat als Katalysator umgesetzt (s. Abb. 59).

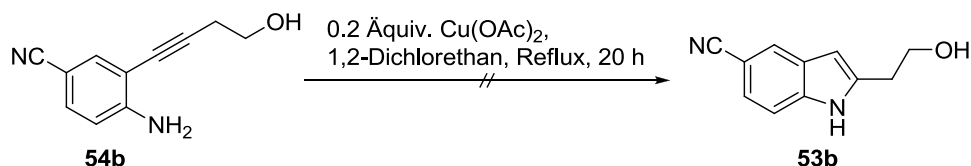


Abb. 59: Versuchter Ringschluss nach *Hiroya et al.*

Nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. In einem zweiten Versuch wurde, wie von *Castro et al.* beschrieben, Kupferiodid als Katalysator verwendet.^[132] Zuerst wie in der Literatur angegeben ohne Basenzusatz, da jedoch dünnschichtchromatographisch nach 18 h bei 100 °C kein Umsatz detektiert werden konnte, wurden im weiteren Verlauf zuerst DBU und dann *t*-BuOK zugegeben (s. Abb. 60). Nach 4 Tagen Reaktionszeit konnte

das Indol **53b** auf diese Weise erfolgreich und mit einer Ausbeute von immerhin 60% isoliert werden.

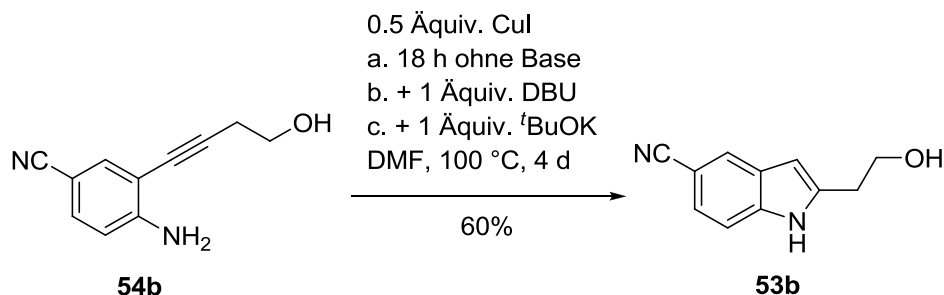


Abb. 60: Erfolgreicher Ringschluss nach *Castro et al.* zum Indol **53b**

Für die lineare Syntheseroute sollte jedoch die Ausbeute weiter verbessert werden. So wurde untersucht, ob die Verwendung von OTBDMS-geschütztem Kupplungsprodukt **54c** zum Ringschluss besser geeignet ist. Mit **54c** wurden anschließend vier weitere Ringschlussreaktionen durchgeführt und die Rohprodukte säulenchromatographisch gereinigt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Erprobte Synthesen zur Darstellung von **53c** aus **54c**

Rkt.	Kat.	Base	Lösungsmittel	T [°C]	t [d]	Ausbeute
1	CuI	DBU	DMF	80	5	54% 54c ^a
2	CpTiCl ₃	Et ₃ N	THF	Rt	3.5	69% 54c
3	Cu(OAc) ₂	KH	1,2-Dichlorethan	70	2	100% ^b 56
4	-	KH	NMP	Rt	1	23% 54c / 2% 53b

^a zusätzlich **15** und **16** im Verhältnis 0.5:1 detektiert, ^b verunreinigt durch Ethylacetat

Auffällig sind die teilweise langen Reaktionszeiten, was möglicherweise auf das reaktionsträge Edukt **54c** zurückzuführen ist. Die Gefahr, dass sich die Elektronegativität der Nitrilgruppe negativ auf die Synthesen auswirken könnte, wurde in Kauf genommen, da die Syntheseroute möglichst kurz sein sollte. Die bei diesen Syntheseversuchen entstandenen Produkte sind in Abb. 61 dargestellt.

Bei den Reaktionen 1 (nach *Castro et al.*) und 2 (nach *McGrane et al.*^[133]) wurden trotz der langen Reaktionszeit recht hohe Anteile des Eduktes **54c** reisoliert. Reaktion 1 führte außerdem zu den Verbindungen **53b** und **54b**, die als Mischfraktion im ¹H-NMR-Spektrum im Verhältnis von 1 zu 0.5 erkennbar waren. Das heißt, es kam zwar zu einer Ringschlussreaktion, aber nur unter Abspaltung der TBDMS-Gruppe, die sehr wahrscheinlich durch die Verwendung von DBU verursacht wurde.

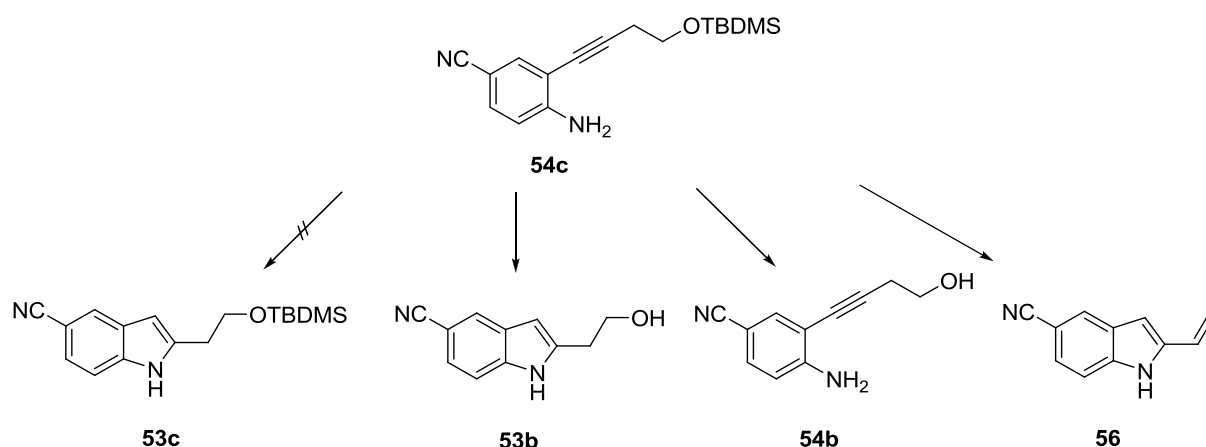


Abb. 61: Erhaltene Produkte **53b**, **54b** und **56** bei den Zyklisierungsversuchen von **54c**

Bei Reaktion 3 (nach *Hiroya et al.*) wurde nur Verbindung **56** erhalten, dessen hohe berechnete Ausbeute auf eine nicht ausreichende Trocknung im Ölpumpenvakuum zurückzuführen war, die in diesem Fall noch Ethylacetat von der Chromatographie im Produkt hinterließ. Die Eliminierung von *tert*-Butyldimethylhydroxysilan ist vermutlich auf die stark basischen Bedingungen sowie die hohe Reaktionstemperatur zurückzuführen. Das ^1H -NMR-Spektrum des Eliminierungsproduktes **56** ist in Abb. 62 dargestellt.

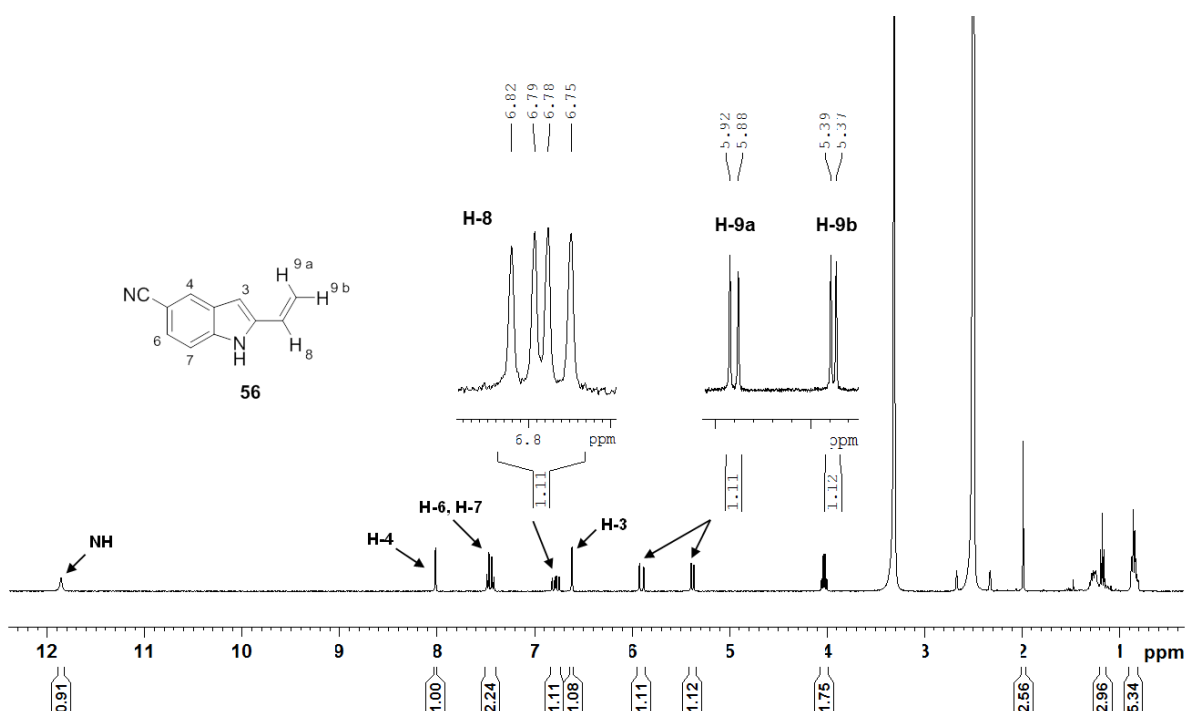


Abb. 62: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Cyano-2-vinyl-1H-indol **56** in $\text{DMSO}-d_6$

Die letzte Reaktion 4 (nach *Rodriguez et al.*^[134]) lieferte einen Teil des Eduktes **54c**, sowie einen sehr geringen Anteil der ringgeschlossenen Verbindung **53b** ohne TBDMS-Gruppe. Diese teilweise unerwarteten Reaktionsprodukte zeigen, dass von

einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Schützung der Hydroxylgruppe abzuraten ist. Auch konnte nach der Methode nach *Castro et al.* mit Kupferiodid das 5-Cyano-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **53b** in immerhin 60% Ausbeute isoliert werden, so dass davon auszugehen ist, dass die freie Hydroxylgruppe keine fatalen Einflüsse auf die Reaktion hat.

Um die Ausbeute bzw. die Effizienz der Syntheseroute zu steigern, wurde als nächstes versucht, die Kreuzkupplung und den Ringschluss in einem Schritt durchzuführen. Dabei sollte auch erprobt werden, wie sich die Selektivität im Hinblick auf die 2- bzw. 3-Position der Alkylkette verhält.

C-C-Kreuzkupplung und in situ Ringschluss:

Theoretisch hätten die in Tabelle 3 (S. 56) erprobten Reaktionsbedingungen zur C-C-Kreuzkupplungsreaktion mit Palladium-Katalysator und Kupferiodid einen auf die Kupplung folgenden Ringschluss ermöglichen können. Dieser konnte jedoch in keinem der Fälle beobachtet werden. Bei der Suche nach Alternativen wurde eine von *Larock et al.* veröffentlichte Reaktion entdeckt.^[135] Die Reaktion ermöglicht die Darstellung von 2,3-disubstituierten Indolen über die Palladium-katalysierte Zyklisierung von internen Alkinen mit 2-Iodanilin. Diese Reaktionsbedingungen sollten nun auf 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und die Alkine **55a** und **55b** angewendet werden. Da die Reaktion Palladium-katalysiert verläuft, wurde in dieser Arbeit neben verschiedenen homogenen Palladiumkatalysatoren (s. Tabelle 5, S. 62) auch Pd EnCat TPP30[®] erprobt, der eine heterogene Form von Pd(PPh₃)₄ darstellt (s. S. 56). Zusätzlich wurden 5 Äquiv. Natriumcarbonat als Base, sowie 1 Äquiv. Lithiumchlorid zur Aktivierung des Katalysators benötigt.

Der vermutete Reaktionsmechanismus der Indolsynthese nach *R. C. Larock* ist in Abb. 63 (A) dargestellt. In den ersten beiden Schritten **I** und **II** erfolgt die Aktivierung des Katalysators durch Koordination eines Chlorid-Liganden. Nach *Amatore et al.* ist dieser Schritt **II** für die kinetischen Phänomene der folgenden oxidativen Addition verantwortlich.^[136] In Schritt **III** findet eine oxidative Addition des Aryliodids an die aktive Spezies statt, worauf die Koordination des Alkins an das Palladium-Atom des Intermediates folgt (Schritt **IV**). Das Alkin inseriert anschließend regioselektiv und in *syn*-Orientierung in die Aryl-Palladiumbindung, es kommt zur Substitution des Iodids durch das Stickstoff-Atom unter Ausbildung eines sechsgliedrigen Heteroatom-

beinhaltenden Palladacyclus (Schritt V). Die darauffolgende reduktive Eliminierung VI führt zur Freisetzung des 2,3-substituierten Indols sowie des Katalysators.^[135]

Die aus den Synthesen erhaltenen Ergebnisse der regioselektiven *syn*-Insertion des Alkins werden von *R. C. Larock* in Abb. 63 (B) so interpretiert, dass es günstiger ist, wenn sich der sterisch anspruchsvollere Rest R^L auf der Palladiumseite befindet. Interessanterweise widerspricht dieses Modell anderen Ergebnissen, bei denen unsymmetrische Alkine in Arylpalladiumbindungen mit der entgegengesetzten Orientierung inserieren.^[137] Möglicherweise spielen auch sterische Effekte im sechsgliedrigen Palladazyklus (Schritt V) eine Rolle, so dass sich R^L so weit wie möglich von der sich bildenden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung entfernt orientiert.^[135]

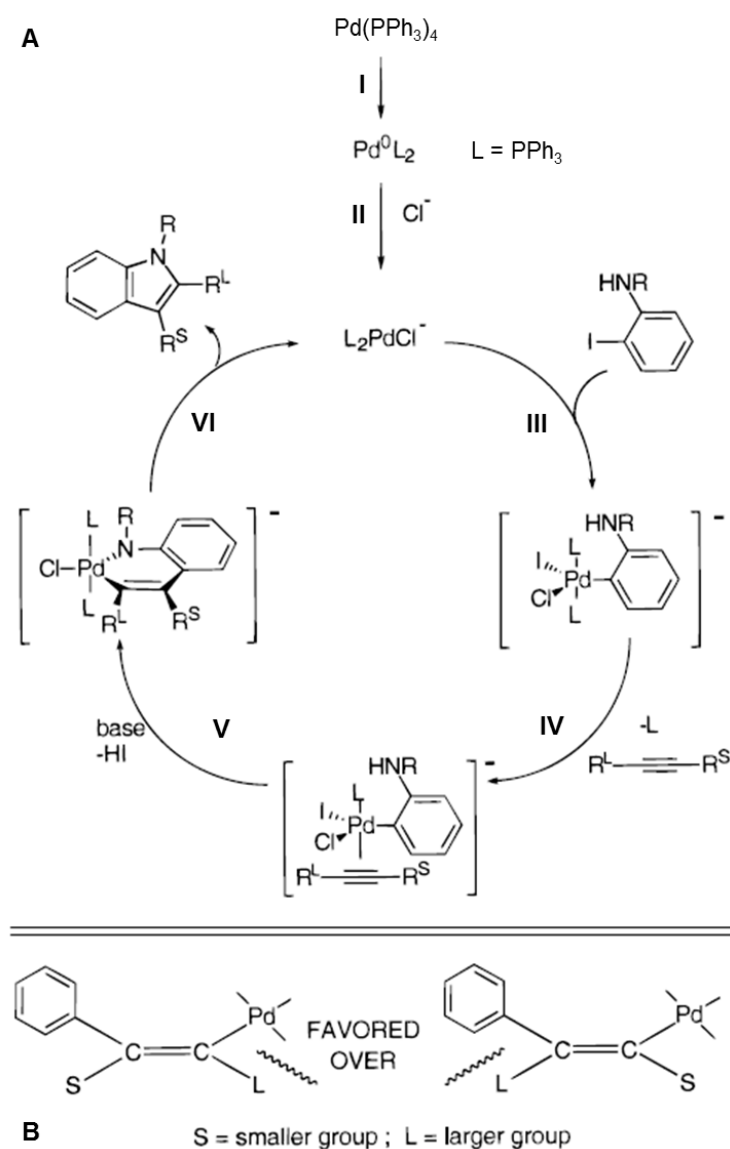


Abb. 63: A) Postulierter Mechanismus der regioselektiven Ringschlussreaktion und B) schematische Darstellung der bevorzugten Alkinorientierung nach *Larock et al.* (mod.)^[135]

Als Aryliodid wurde 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** eingesetzt und als Alkine wurden 1.5 Äquiv. sowohl 4-Brombut-1-in **55a** als auch 3-Butin-1-ol **55b** erprobt. Zusätzlich wurden 5 Äquiv. Natriumcarbonat, 1 Äquiv. Lithiumchlorid und 5-6mol% des entsprechenden Palladiumkatalysators eingesetzt (s. Abb. 64 und Tabelle 5).

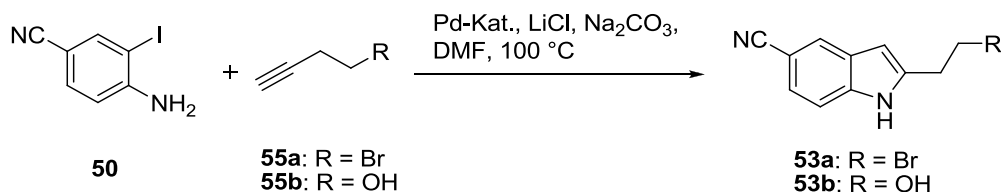


Abb. 64: Darstellung der substituierten Indole **53a** und **53b**

Tabelle 5: Indolsynthesen unter *Larock*-Reaktionsbedingungen

Rkt.	Alkin	Katalysator	Zeit	Ausbeute
1	55b	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	20 h	31% 53b + 45% 57
2	55b	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$	15 h	15% (53b/54b/57) ^a + 22% 54b ^b
3	55b	$\text{PdCl}_2(\text{dppf})$	19 h	16% 53b + 35% 57
4	55a	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	24 h	13% 56
5	55a	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	24 h	14% 56

^a Trennung der entstandenen Isomere und nicht zyklisiertem **54b** nicht erfolgreich, ^b C-C-Kreuzkupplungsprodukt **54b**

Nach beendeter Reaktion wurde die jeweilige Reaktionsmischung im Vakuum eingengt, in wenig Wasser aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde nochmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Die anschließenden säulenchromatographischen Reinigungen führten zu interessanten Ergebnissen.

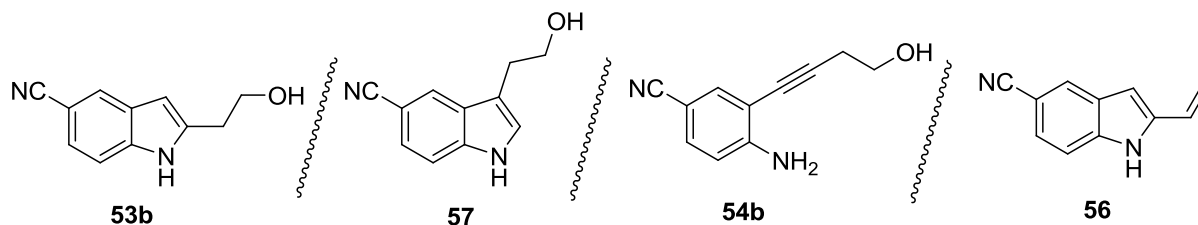


Abb. 65: Erhaltene Produkte nach Anwendung der *Larock*-Reaktionsbedingungen

Die erste Reaktion war eigentlich schon die Beste, da eine Gesamtausbeute von 76% erzielt wurde (Rkt. 1). In allen Fällen wurde mit 3-Butin-1-ol **55b** keine signifikante Regioselektivität beobachtet (Reaktionen 1 bis 3). Es wurde stets eine Mischung der 2- bzw. 3-substituierten Indole **53b** und **57** erhalten. Bei Reaktion 2 wurden zusätzlich 22% des Kupplungsproduktes **54b** erhalten, da hier anscheinend

die Reaktion vor der Zyklisierung stehen geblieben ist. Die erprobten Katalysatoren hatten sowohl einen Einfluss auf die Ausbeute als auch auf die Reinigung. So konnten die Produkte **53b**, **54b** und **57** bei Reaktion 2 nicht sauber getrennt werden und auch bei Reaktion 3 wurden zunächst viele Mischfraktionen erhalten, so dass dort zweimal chromatographiert werden musste. Die Gesamtausbeuten sind mit 37% (Rkt. 2) und 51% (Rkt. 3) geringer als bei Reaktion 1, so dass $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ der Katalysator der Wahl für diese Reaktion ist. Exemplarisch ist im Folgenden das ^1H -NMR-Spektrum des in Reaktion 1 isolierten 5-Cyano-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indols **53b** abgebildet. Erkennbar ist, dass neben dem 2-substituierten Indol **53b** noch ca. 7% des 3-substituierten Indols **57** enthalten sind, die nicht abgetrennt werden konnten.

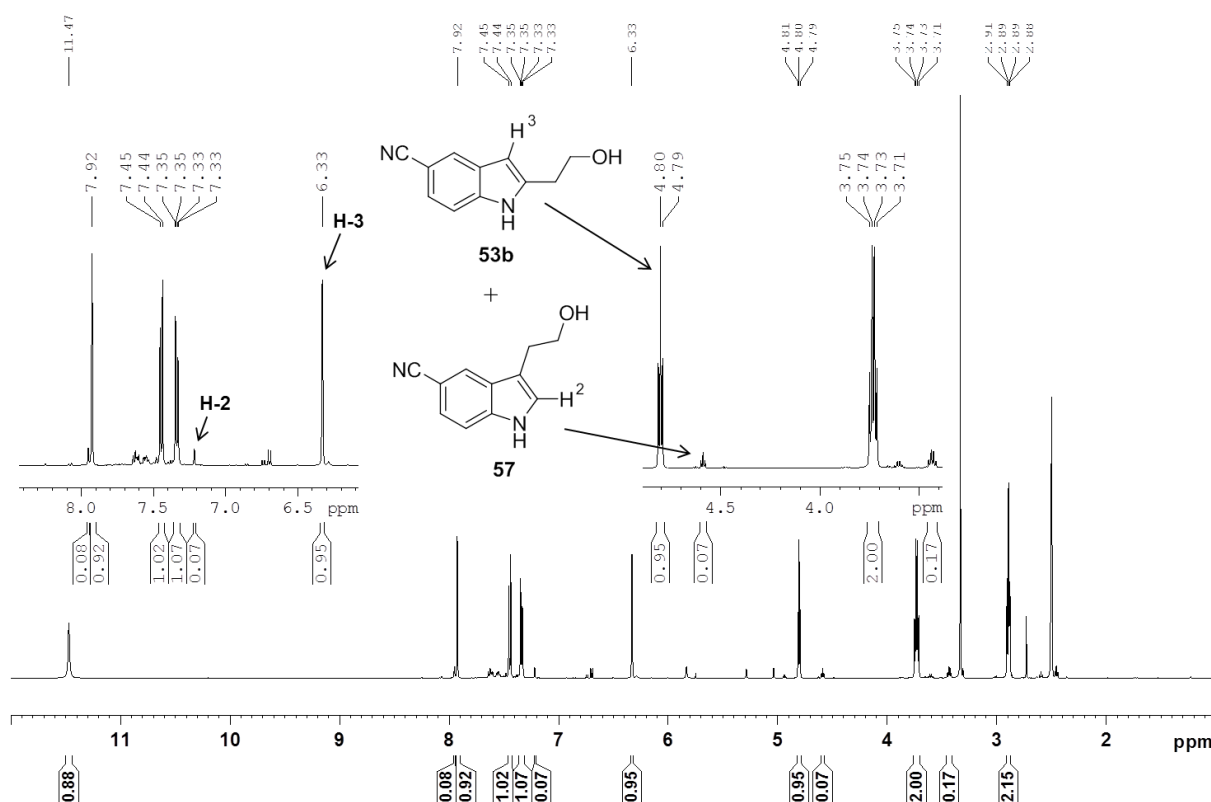


Abb. 66: ^1H -NMR-Spektrum des 5-Cyano-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indols **53b** in $\text{DMSO}-d_6$

Im Gegensatz zu den Synthesen mit 3-Butin-1-ol **55b** wurde beim zweimalig versuchten Umsatz von 4-Brombut-1-in **55a** mit **50** nur 5-Cyano-2-vinyl-1*H*-indol **56** in einer Ausbeute von um die 13% erhalten (s. Tabelle 5, S. 62). Anscheinend kommt es zur Eliminierung von HBr aus dem gebildeten Indol oder schon während des Ringschlusses. Das Edukt **50** oder andere Nebenprodukte konnten in diesen Synthesen nicht reisoliert werden.

Die *Larock*-Reaktionsbedingungen konnten demnach erfolgreich auf die direkte Indolsynthese ausgehend von **53b** übertragen werden. Da in allen Fällen Mischungen der 2-/3-substituierten Regioisomere erhalten wurden, scheint der sterische Anspruch der 2-Hydroxyethylgruppe nicht auszureichen, um die Insertion des Alkins zu steuern (vgl. Abb. 63, S. 61). Als Alternative ist eine direkte Kupplung des geschützten Alkins *O*-*tert*-Butyldimethylsilyloxybut-3-in denkbar. Jedoch hatte sich die TBDMS-Schutzgruppe in vorigen Versuchen bereits als ungeeignet erwiesen (s. S. 58f). Zusätzlich zum Problem der Selektivität sind die erzielten Ausbeuten bei Verwendung von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** generell nicht zufriedenstellend. Für die Selektivität könnte man noch größere Schutzgruppen an der Hydroxygruppe verwenden oder direkt das geschützte Guanidinoalkin **58** kuppeln, das durch die zwei Boc-Gruppen sterisch anspruchsvoller ist (vgl. Abb. 68, S. 66). Fragwürdig ist aber, ob sich hierdurch die Ausbeuten verbessern lassen, da die sterische Information relativ weit weg vom Reaktionsgeschehen positioniert ist. Andererseits könnte auch die aromatische Aminogruppe von **50** modifiziert werden, um die Reaktivität und möglicherweise auch die Ausbeute zu steigern.

Bevor sich diesen Überlegungen praktisch genähert wurde, wurden untersucht, ob die auf die Kupplung und Indolsynthese folgenden Reaktionen wie geplant funktionierten (s. Abb. 57, S. 55).

Einführung der Guanidinogruppe:

Die C-C-Kreuzkupplung und der Ringschluss zum Indol **53b** waren erfolgreich bedürfen jedoch noch weiterer Optimierung. Als nächste Schritte zur Darstellung der Zielverbindung 2-(2-Guanidinoethyl)-6-aminomethyl-1*H*-indol **46** sollten zum einen die Reduktion der Cyanogruppe und zum anderen die Einführung der geschützten Guanidinogruppe erprobt werden (vgl. Abb. 57, S. 55). Die Einführung der Guanidinogruppe wurde zuerst am entsprechenden Alkin **55a** und **55b** getestet. Anschließend sollten die Reaktionsbedingungen auf die Indolebene übertragen werden.

Ausgehend von Bromalkanen wurde von *Vaidyanathan et al.* ein genereller Zugang zu Alkylguanidinen publiziert.^[125] Die dort verwendeten Reaktionsbedingungen wurden auf **55a** übertragen (s. Abb. 67). Dazu wurde *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** in absolutem DMF suspendiert und mit einem Äquivalent gewaschenem Natriumhydrid portionsweise versetzt. Nach ca. 15 min deutete die

nun klare Lösung eine vollständige Deprotonierung von **59** an. Die Lösung wurde anschließend zu einer Lösung von **55a** in abs. DMF getropft und bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **55a** mit einer Ausbeute von 10% erhalten werden (s. Rkt. 1, Tabelle 6). Möglicherweise war **59** doch nicht vollständig deprotoniert worden, so dass in Zukunft 1.2 Äquiv. Natriumhydrid getestet werden könnten. Da die angegebene Ausbeute aus nur einem Versuch resultierte, könnte sie durch Optimierung wahrscheinlich gesteigert werden.

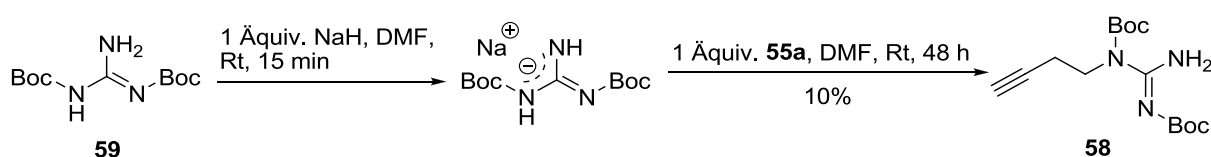


Abb. 67: Synthese von **X** in Anlehnung an *Vaidyanathan et al.*

Da sich bereits im vorigen Abschnitt gezeigt hatte, dass das Bromid **55a** sowohl in der C-C-Kreuzkupplung als auch beim Ringschluss versagte, wurde die obige Synthese nicht weiter optimiert (vgl. Tabelle 3, S. 56 und Tabelle 5, S. 62).

Tabelle 6: Darstellung von *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58**

Rkt.	Alkin	Äquiv. 59	Reagenz	T [°C]	Zeit	Ausbeute
1	55a	1	NaH	Rt	48 h	10% ^a
2	55b	2	DIAD & PPh ₃	Rt	72 h	91% ^b
3	55b	2	DIAD & PPh ₃	70 (μ-Welle)	0.75 h	61%
4	55b	1.5	DIAD & PPh ₃	Reflux	4 h	94%

^a Keine Nebenprodukte isoliert (evtl. nicht vollständig umgesetzt), ^b analog zu *Dodd et al.*^[123]

Als Alternative sollte die geschützte Guanidinogruppe aus einer Hydroxygruppe unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen synthetisiert werden (s. Abb. 68). Zuerst wurden die Reaktionsbedingungen von *D. S. Dodd* auf das Alkin **55b** übertragen (s. Rkt. 2, Tabelle 6).^[123] Zu einer Lösung aus Triphenylphosphin und *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** in trockenem THF wurde 3-Butin-1-ol **55b** zugetropft. Nach Kühlen auf 0 °C wurde DIAD langsam zugetropft. Bei Raumtemperatur wurde anschließend bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **58** in 91% Ausbeute erhalten werden.

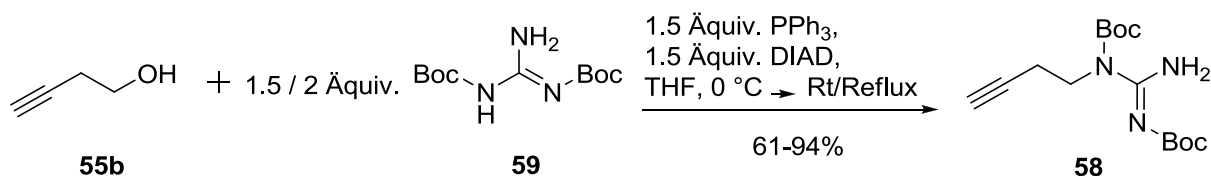


Abb. 68: Darstellung von **58** aus **55a** mittels *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen

Um die doch lange Reaktionszeit von 72 h (Rkt. 2) zu verkürzen, wurde eine Mikrowellen-gestützte Reaktion erprobt (Rkt. 3). Dadurch, dass *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** im Überschuss eingesetzt wurde (2 Äquiv.), war es schwierig, die Reaktion via Dünnschichtchromatographie zu verfolgen. Nach 45 Minuten wurde kein weiterer Umsatz detektiert und das Produkt **58** konnte nur in 61% Ausbeute erhalten werden. Möglicherweise war die Reaktionszeit zu kurz. Als weitere Alternative wurde die Reaktion wieder im „klassischen“ Rundkolben, aber in der Siedehitze durchgeführt. Nach nur 4 Stunden Reaktionszeit konnte das Produkt **58** in einer sehr guten Ausbeute von 94% erhalten werden. In Folgeversuchen konnten die Äquivalente an *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** bei gleichbleibend guter Ausbeute zudem noch von 2 auf 1.5 reduziert werden (Rkt. 4).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Verwendung von 4-Brombut-1-in **55a** nach den gesammelten, unerfreulichen Ergebnissen endgültig aufgegeben wurde. Erfreulicherweise gelang die Einführung der geschützten Guanidinogruppe unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen ausgehend von **55b** in reproduzierbaren und sehr guten Ausbeuten. Da die Reaktion sehr hohen Umsatz zum Produkt zeigte und keine Nebenreaktionen festgestellt wurden, sollten sich diese Reaktionsbedingungen auf das Indol **53b** übertragen lassen. Da auch nur eine begrenzte Menge **53b** zur Verfügung stand, wurden mit dem vorhanden 5-Cyano-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **53b** zunächst Versuche zur Reduktion der Nitrilgruppe durchgeführt, bevor die Einführung der Boc-geschützten Guanidinogruppe an **53b** durchgeführt werden sollte.

Reduktion der Cyanogruppe zur Aminomethylgruppe:

Die Reduktion der Nitrilfunktion zur Aminomethylgruppe war als vorletzter Schritt der Syntheseroute geplant (s. Abb. 57, S. 55). Zunächst wurde anhand des 4-Amino-3-iodbenzonitrils **50** erprobt, welche Reagenzien prinzipiell zur Reduktion des Nitrils geeignet sind.

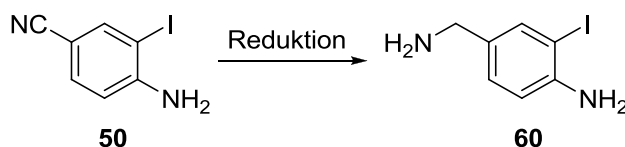


Abb. 69: Schematische Darstellung der Synthese von 4-(Aminomethyl)-2-iodanilin **60**

Es wurden die in Tabelle 7 dargestellten Reduktionsmittel getestet. Bei der Verwendung von Wasserstoff an Palladium/Kohle konnte nach 12 Tagen keine Umsetzung von **50** beobachtet werden. Ebenso führte die Verwendung von Zinn(II)chlorid in konz. Salzsäure zu keinem isolierbaren Produkt, es konnten nur 83% des Eduktes **50** zurückerhalten werden.

Tabelle 7: Erprobte Reduktionsmittel zur Darstellung von 4-(Aminomethyl)-2-iodanilin **60**

Rkt.	Reagenz	Lösungsmittel	T [°C]	Zeit	Ausbeute
1	H ₂ + Pd/C	1,4-Dioxan	Rt	12 d	- ^a
2	SnCl ₂	konz. HCl	50	1 h	- ^b
3	BH ₃ *THF	THF	67	5 h	76% ^c

^a keine Umsetzung, ^b 83% Edukt reisoliert, ^c über zwei Stufen nach *Li et al.*^[138]

Der Boran*THF-Komplex ist ein weiteres Reagenz zur Reduktion und wurde z. B. von *Li et al.* zur Reduktion aromatischer Nitrile verwendet.^[138] Zur Reduktion wurden 3 Äquiv. einer 1 molaren Lösung von Boran in THF verwendet. Nach 5 h in der Siedehitze wurde 2 molare Salzsäure zur Hydrolyse der Borane zugegeben und anschließend für eine weitere Stunde bei Rückfluss gerührt (s. Abb. 70). Das entstandene Hydrochlorid des reduzierten Amins **61** wurde ohne weitere Aufarbeitung in Dichlormethan suspendiert und mit 3 Äquivalenten Triethylamin versetzt. Anschließend wurden 0.2 Äquiv. 4-(*N,N'*-Dimethylamino)pyridin (DMAP) als Katalysator und 3 Äquiv. Di-*tert*-butyldicarbonat zugesetzt.

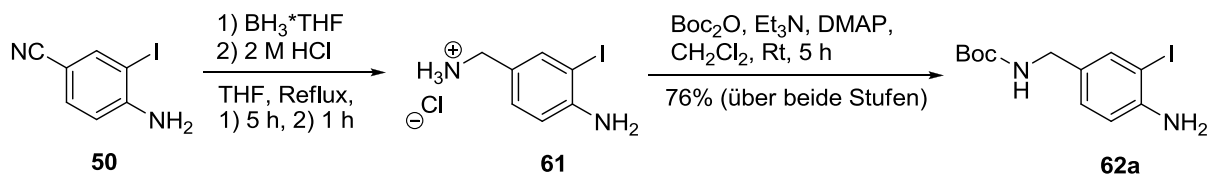


Abb. 70: Reduktion von **50** mit BH₃*THF und anschließende Einführung der Boc-Schutzgruppe

Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das reduzierte und geschützte *O-tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamat **62a** in einer Ausbeute von 76% über beide Stufen erhalten werden.

Diese Reaktionsbedingungen wurden im Folgenden auf die Reduktion des Indols **53b** übertragen (s. Abb. 71). Jedoch konnte nach den zwei Stufen kein Produkt **63a** isoliert werden. Da das Hydrochlorid direkt weiter umgesetzt wurde, kann nicht sicher gesagt werden, welche Reaktion nicht funktioniert hat. Die Reaktionsverfolgung der Reduktion mittels Dünnschichtchromatographie war nicht möglich und im ^1H -NMR-Spektrum des Rohprodukts war ebenfalls nicht erkennbar, ob die Reduktion erfolgreich war und ob das Indolgerüst noch intakt war.

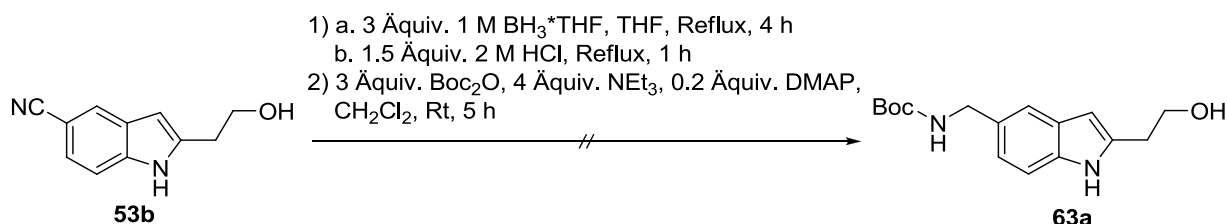


Abb. 71: Versuchte Reduktion des Indols **53b**

Eventuell kam es zur unerwünschten Reduktion des Indolgerüsts zum Indolin. Da die Möglichkeit zur Reduktion von Indolen literaturbekannt ist,^[139] wurde nach einem Weg gesucht, diese hier unerwünschte Nebenreaktion zu umgehen.

Von *R. R. Schmidt* wurde berichtet, bei Boran-Reduktionen vor der hydrolytischen Aufarbeitung Aceton zuzugeben und so den Hydridüberschuss zu entfernen.^[140] Da nicht mehr genug des Indols **53b** vorhanden war, wurde für diesen Test die 3-substituierte Indolverbindung **57** verwendet, die bei den *Larock*-Reaktionen als Nebenprodukt erhalten wurde (vgl. S. 62f). Jedoch führte dieses Vorgehen hier ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt **64** (s. Abb. 72).

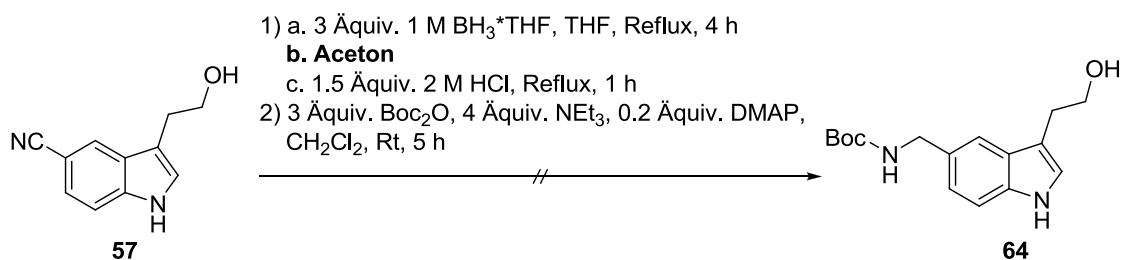


Abb. 72: Versuch der Darstellung von **64** unter Zusatz von Aceton nach der Reduktion mit $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$

Diese Ergebnisse waren unerfreulich, bedeuteten sie doch das Scheitern der Syntheseroute an dieser späten Stelle. Möglicherweise wäre mit weiterführenden Versuchen eine Lösung dieses Problem möglich gewesen. Jedoch überwogen die Nachteile, so dass die Syntheseroute komplett umgestellt wurde. Bevor die verbesserte Syntheseroute beschrieben wird, sind im folgenden Kapitel die

erhaltenen Resultate zu der ersten Syntheseroute (vgl. Abb. 57, S. 55) kurz zusammengefasst.

4.2.3 Fazit: Erste Syntheseveruche zur Darstellung von 46

Die in Kap. 4.1, S. 25ff, beschriebenen Ergebnisse zur ersten Generation neuer, potentieller DHS-Inhibitoren führten zur Optimierung des von A. Kolodzik durchgeführten virtuellen Screenings (s. S. 50-52). Aus den berechneten, *in silico* aktiven Verbindungen wurde 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** zur Synthese ausgewählt (s. Abb. 54, S. 52). Die entwickelte Syntheseroute war über fünf bzw. vier Stufen geplant und ging von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** aus, das zunächst mit entsprechenden Alkinen umgesetzt wurde (s. Abb. 73)

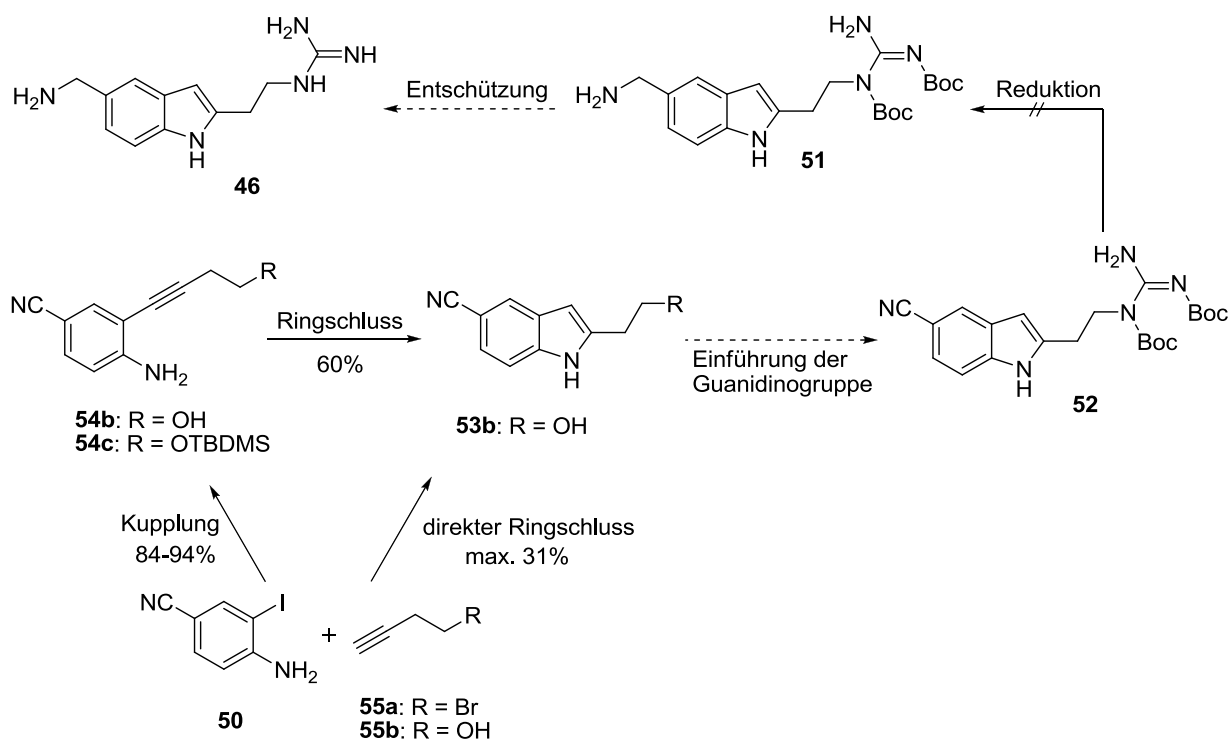


Abb. 73: Erste Syntheseroute zur versuchten Darstellung von **46**

Es konnte gezeigt werden, dass nur 3-Butin-1-ol **55b** zum Aufbau des Indolgerüsts geeignet war. Hier konnten für die *Sonogashira*-Kreuzkupplungsreaktion Ausbeuten von 84-94% zur Darstellung von **54b** erreicht werden (s. S. 56). Auch der Ringschluss zum Indol **53b** gelang mit immerhin 60% Ausbeute (s. S. 57).

Interessanterweise konnte für die TBDMS-geschützte Verbindung **54c** kein Produkt **53c** isoliert werden. Stattdessen wurden Mischungen aus entschütztem **54c**, dem Edukt und 5-Cyano-2-vinyl-1*H*-indol **56** erhalten (s. Abb. 61, S. 59). Das gleiche Eliminierungsprodukt **56** wurde auch bei der direkten Zyklisierung von 4-Amino-3-

iodbenzonitril **50** mit 4-Brombut-1-in **55a** unter *Larock*-Reaktionsbedingungen erhalten (s. S. 62). Dagegen gelang die direkte Zyklisierung von **50** mit **55b** in zufriedenstellenden Gesamtausbeuten. Problematisch war die nicht vorhandene Selektivität der Reaktion (s. S. Tabelle 5, S. 62). Es wurde sowohl das gewünschte 2-substituierte Indol **53b** als auch das 3-substituierte Produkt **57** erhalten. Durch die sehr ähnliche Polarität gelang die säulenchromatographische Trennung nur in Ausnahmefällen. Zusätzlich wurde die Reinigung durch den gewählten Palladiumkatalysator beeinflusst.

Erfreulich war das Ergebnis der durchgeführten Tests zur Einführung der Di-Boc-geschützten Guanidinogruppe. Ausgehend vom 3-Butin-1-ol **55b** wurde *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen mit bis zu 94% Ausbeute erhalten (s. Tabelle 6, S. 65). Es zeigte sich weiter, dass das Bromid als Vorläufer erneut nicht gut geeignet war und nicht weiter verwendet wurde.

Aus diesen Erkenntnissen folgt, dass die Hydroxygruppe ein guter Vorläufer der Guanidinogruppe ist und auch keine Nebenreaktionen beim Aufbau des Indolgerüsts zeigt. Hierzu wurden im nächsten Kapitel weitere Optimierungen hinsichtlich Ausbeute und Selektivität durchgeführt.

Geeignete Reduktionsbedingungen wurden am Beispiel des 4-Amino-3-iodbenzonitrils **50** erfolgreich erprobt (vgl. Tabelle 7, S. 67). Jedoch scheiterte die Übertragung auf das Indol **53b**, da es hier möglicherweise zur Reduktion des Indolgerüsts als Nebenreaktion kam (s. S. 68). Bevor diese Reaktion weiter optimiert wurde, fiel die Entscheidung auf die Umstellung der Syntheseroute. Die verbesserte Syntheseroute wird im folgenden Kapitel eingehend diskutiert.

4.3 Verbesserte Syntheseroute zur Darstellung von 46

Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen der ersten, durchgeführten Syntheserversuchen (s. Kap. 4.2.1, S. 53f und Kap. 4.2.2, S. 55ff) wurde die Syntheseroute folgendermaßen verändert:

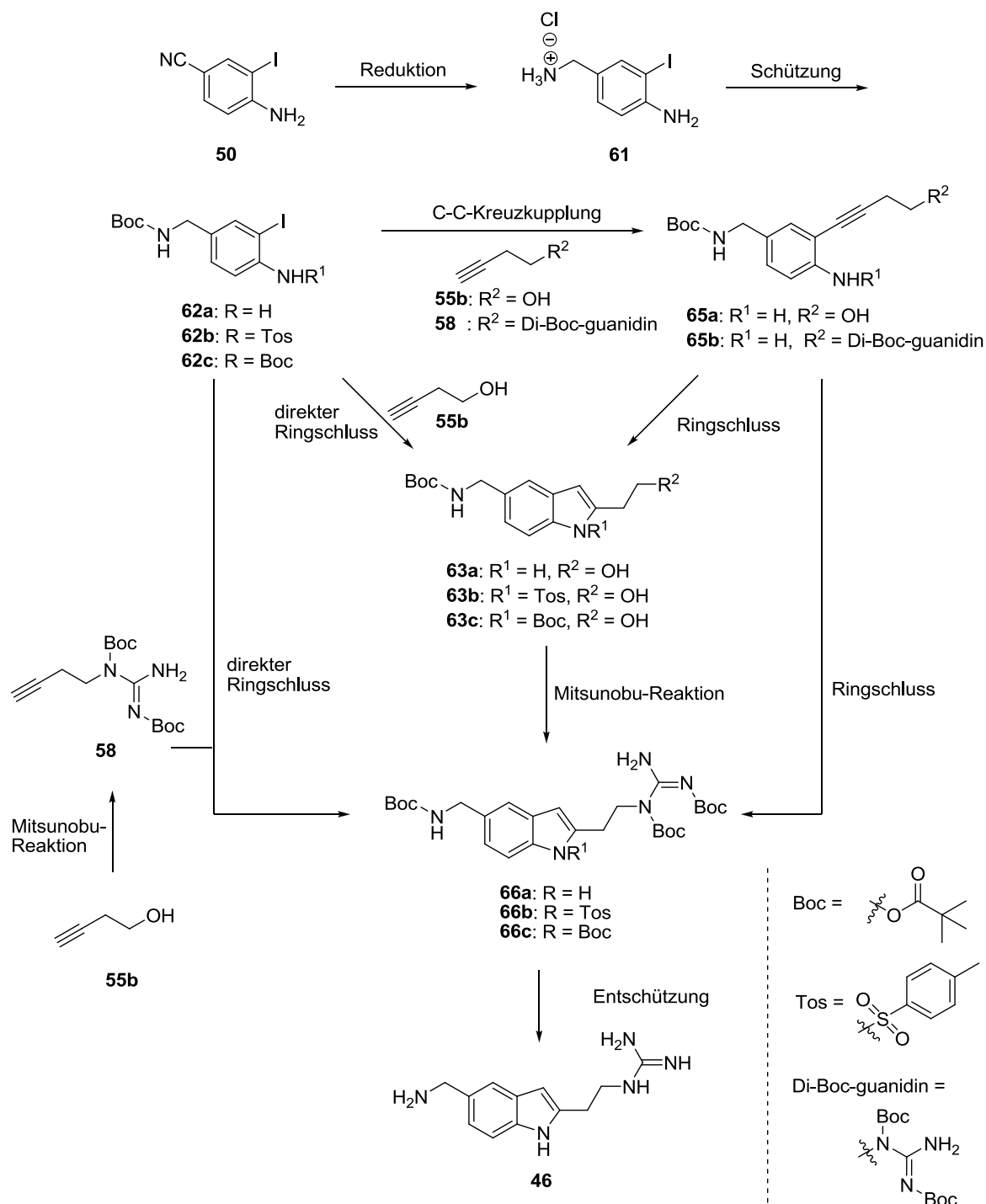


Abb. 74: Optimierte Synthesestrategie zur Darstellung von **46**

Die Syntheseroute wurde erneut mit dem kommerziell erhältlichen 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** begonnen, dessen Nitrilfunktion unter Verwendung von Boran-THF-

Lösung zu einer Aminogruppe reduziert und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat zur *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten (Boc) Verbindung **62a** umgesetzt wurde. In vorherigen Versuchen wurde festgestellt, dass dieser Reaktionsschritt als erstes durchgeführt werden muss, da eine Reduktion nach erfolgtem Ringschluss unter anderem wahrscheinlich zu einer teilweisen Reduktion des Indols zum entsprechenden Indolin (2,3-Dihydroindol) führte, das zusammen mit den weiteren Nebenprodukten nicht zufriedenstellend abgetrennt werden konnte (s. S. 67f).

Im nächsten Reaktionsschritt wurde entweder eine direkte Ringschluss-Reaktion mit dem entsprechenden Alkin zur Indolverbindung durchgeführt, oder der Ringschluss durch eine zuvor durchgeführte Übergangsmetall-katalysierte Kreuzkupplungsreaktion erleichtert. Von *Hiroya et al.* wurde berichtet, dass die Acidität des Wasserstoffatoms der aromatischen Aminogruppe einen großen Einfluss auf die Reaktivität in der kupferkatalysierten Ringschlussreaktion hat.^[131] Es sollte nun erprobt werden, ob sich diese These auch auf die Reaktanden dieser Arbeit übertragen ließ. Das Ziel war so eine Steigerung der Ausbeuten zu erreichen. Dazu sollte nach der Reduktion und vor dem Aufbau des Indolgerüsts eine Umsetzung von **62a** zur *N*⁴-Tos- bzw. *N*⁴-Boc-geschützten Verbindung **62b** bzw. **62c** durchgeführt werden. Bei den auf Seite 58 diskutierten Ringschlussreaktionen wurde vermutet, dass auch die elektronenziehenden Eigenschaften der Nitrilfunktion einen negativen Einfluss auf den Ringschluss zum Indol haben könnten. Dies soll im Folgenden überprüft werden, indem für den Ringschluss die schon reduzierten Verbindungen **62a-62c** eingesetzt werden.

Zur Einführung der Guanidinogruppe sollte die Hydroxygruppe mittels *Mitsunobu*-Reaktion substituiert werden. Im letzten Schritt sollte die Abspaltung der Tosyl- und Boc-Schutzgruppen unter Fällung der gewünschten Zielverbindung **46** als Hydrochlorid erfolgen.

Alternativ zu dieser Syntheseroute wurde die Einführung der Guanidinogruppe auch zuerst am Alkin **55b** durchgeführt, um dieses dann direkt mit **62a** in einer Ringschlussreaktion zum 2-(2-Guanidinoethyl)-indol **66a** umzusetzen.

Durch die beschriebenen Veränderungen verlängert sich die Syntheseroute zur Zielverbindung **46** auf bis zu acht Stufen (vgl. Abb. 74, S. 71 und Abb. 57, S. 55). Im kürzesten Fall wäre immer noch eine Synthese über fünf Stufen möglich. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse vorgestellt und diskutiert.

4.3.1 Reduktion von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und Einführung der Schutzgruppen

Der erste Schritt war die Reduktion von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** mit $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ zum 4-(Aminomethyl)-2-iodanilin, dessen Hydrochlorid **61** nicht isoliert wurde, sondern analog zu *Li et al.* direkt Boc-geschützt wurde (s. Abb. 70, S. 67).^[138] Obwohl drei Äquivalente Di-*tert*-butyldicarbonat eingesetzt wurden, fand unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen keine Reaktion an der aromatischen Aminogruppe statt.

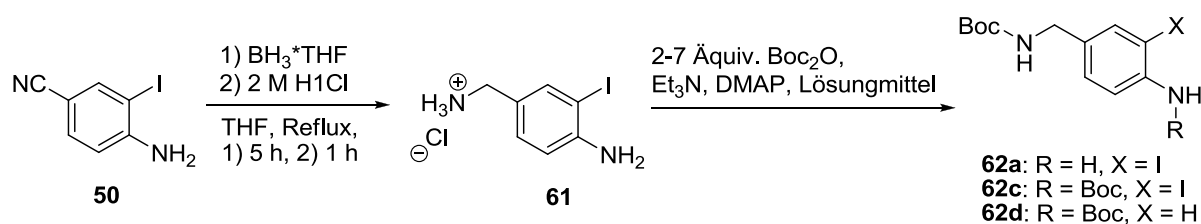


Abb. 75: Reduktion von **50** mit $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ und anschließende Einführung der Boc-Schutzgruppe mit dem Versuch der doppelten Boc-Schätzung zu **62c**

Durch Einsatz eines höher siedenden Lösungsmittels, längeren Reaktionszeiten und bis zu sieben Äquivalenten Di-*tert*-butyldicarbonat sollte die aromatische Aminogruppe zur Reaktion gezwungen werden (s. Tabelle 8). Jedoch konnte auch nach 24 h bei 120 °C kein Produkt **62c** erhalten werden (Rkt. 3). Interessanterweise wurde in allen Fällen nach säulenchromatographischer Reinigung 2% einer zwar doppelt Boc-geschützten, aber dehalogenierten Verbindung **62d** isoliert (Rkt. 2-4). Wahrscheinlich ist diese Verbindung auch schon bei Rkt. 1 entstanden, wurde dort aber nicht bemerkt.

Tabelle 8: Versuchte Darstellung von **62c**

Rkt.	Lösungsmittel	Äquiv. Boc_2O	T [°C]	Zeit	Ausbeute ^a
1	CH_2Cl_2	3	Rt	5 h	76% 62a ^b
2	CH_3CN	7.2	80	24 h	61% 62a / 2% 62d ^c
3	DMF	7.3	120	24 h	80% 62a / 2% 62d ^c
4	CH_2Cl_2	2.1	40	5 h	72% 62a / 2% 62d ^c

^a über zwei Stufen, ^b siehe Tabelle 7, S. 67 (analog zu *Li et al.*^[138]), ^c dehalogeniertes **62c**

Zusammenfassend war die versuchte, zweifache Boc-Blockierung nicht erfolgreich. Jedoch konnten die Äquivalente des giftigen Boc-Reagenzes auf 2 reduziert werden, ohne zu große Ausbeuteverluste (nur 4%) bei der einfachen Boc-Schätzung zu erleiden (vgl. Rkt. 3 und Rkt. 4).

Es wurde anschließend eine weitere Möglichkeit zur Blockierung der aromatischen Aminogruppe gesucht, auch wenn hierdurch die Syntheseroute um zwei Stufen länger werden würde. Als Gruppe der Wahl wurde die 4-Toluolsulfonylgruppe über einen Additions-Eliminierungsmechanismus eingeführt (s. Abb. 76). Die Umsetzung von *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamat **62a** mit Tosylchlorid zu *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamate **62b** wurde nach *Adachi et al.* durchgeführt.^[141] Es wurden drei Äquivalente Pyridin zugegeben um den entstehenden Chlorwasserstoff als Pyridiniumchlorid abzufangen. Nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das tosylierte Produkt **62b** in einer Ausbeute von 92% isoliert werden.

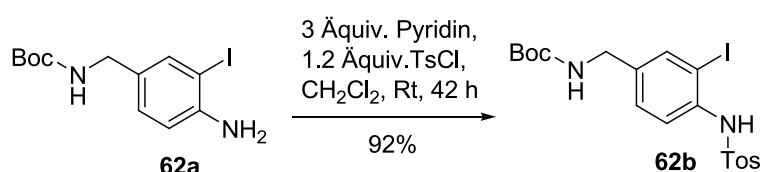


Abb. 76: Einführung der Tosyl-Gruppe zur Darstellung von **62b**

Wie im weiteren Verlauf noch gezeigt werden wird, war diese Gruppe an der aromatischen Aminogruppe für den direkten, Palladium-katalysierten Ringschluss von essentieller Bedeutung (s. Kap. 4.3.2 und 4.3.3, S. 74-79).

4.3.2 Aufbau der Indoleinheit - direkter Ringschluss (Teil 1)

Zunächst wurde untersucht, ob die *Larock*-Reaktionsbedingungen bei Verwendung des reduzierten, Boc-geschützten Edukts **62a** oder des zusätzlich *N*⁴-tosylierten Carbamates **62b** zu einer Bevorzugung der Orientierung der Hydroxyethylkette in der 2-Position führt.

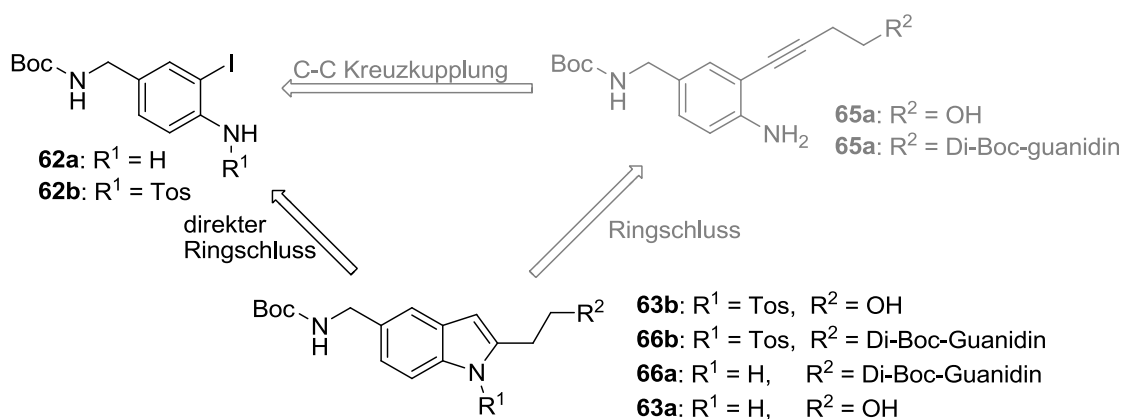


Abb. 77: Retrosynthese des Indolgerüsts über den direkten Ringschluss (grau hinterlegt sind die in Kap. 4.3.6, S. 83 diskutierten Alternativen)

Die Umsetzung von **62a** mit 3-Butin-1-ol **55b** führte in 41% Ausbeute zum Ringschluss (s. Abb. 78).

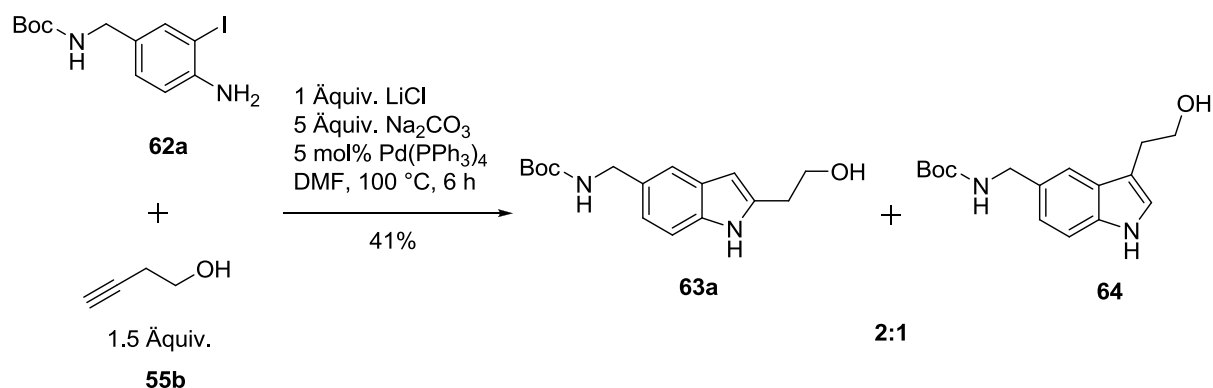


Abb. 78: Direkte Indolsynthese mit freier Aminogruppe von **62a** unter Larock-Reaktionsbedingungen

Wie zuvor beobachtet, entstand jedoch erneut eine Mischung der 2- bzw. 3-substituierten Indole **63a** und **64**, die mittels Säulenchromatographie an Kieselgel nicht getrennt werden konnte. Das Verhältnis von **63a** zu **64** betrug ungefähr 2:1. Dies ist im ¹H-NMR-Spektrum daran zu erkennen, dass alle Signale doppelt vertreten sind, und dass das H-3-Proton eine andere Verschiebung als das H-2-Proton aufweist (s. Abb. 79).

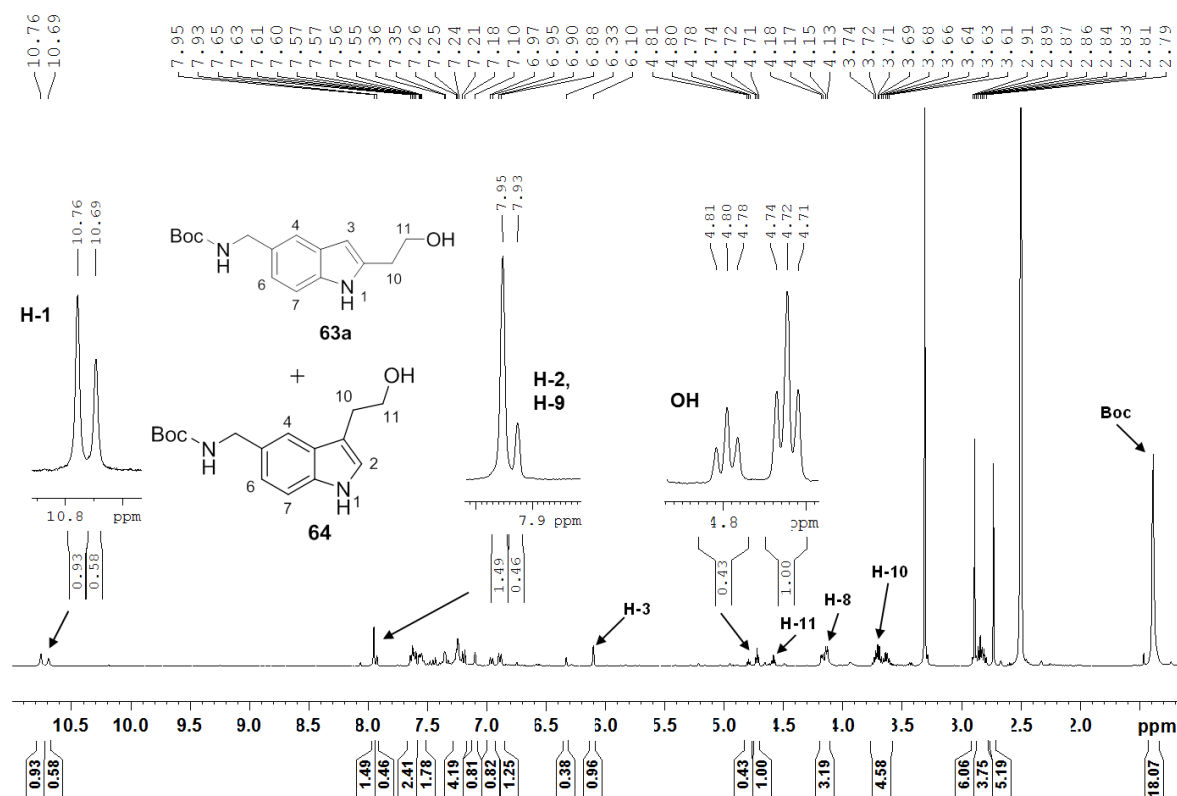


Abb. 79: ¹H-NMR-Spektrum von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **63a** und 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **64** in DMSO-*d*₆

Aus diesem Resultat folgt, dass eine freie, dem Iod benachbarte Aminogruppe für den geforderten Zweck der direkten, 2 -selektiven Ringschlussreaktion nach *Larock et al.* nicht geeignet ist.

Parallel zu den beschriebenen Synthesen wurde versucht, das *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** direkt einzusetzen, was eine Synthesestufe sparen würde (s. Abb. 80). Ausgehend vom 3-Butin-1-ol **55b** wurde *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen in bis zu 94% Ausbeute erhalten (s. Tabelle 6, S. 65). Durch Einsatz dieses Alkins **58** in der Ringschlussreaktion nach *Larock et al.* sollte erprobt werden, ob die sterisch deutlich anspruchsvollere *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinogruppe ausreicht, um die Selektivität in Richtung 2-Substitution zu verschieben.

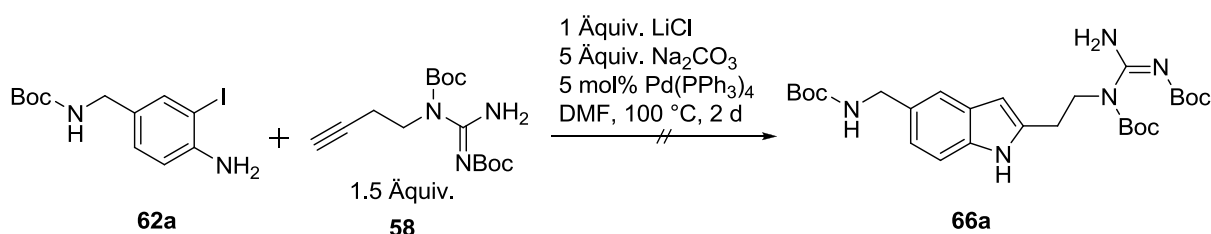


Abb. 80: Versuch der direkten Darstellung von **66a** aus **62a** und **58**

Dünnschichtchromatographisch wurde festgestellt, dass auch nach 2 Tagen noch deutliche Mengen des Eduktes vorhanden waren. Trotzdem wurde die Reaktion abgebrochen, um zumindest das bis dahin eventuell entstandene Produkt **66a** zu isolieren. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte **66a** jedoch nicht erhalten werden. Eventuell entstandenes 3-substituiertes Indol konnte ebenfalls nicht isoliert werden. Es wurden nur geringe Mengen der Edukte erhalten. Da auch dieser Versuch nicht erfolgreich war, wurde als Alternative nicht der sterische Anspruch des Alkins, sondern der des anderen Reaktionspartners **62a** erhöht. Wie auf S. 72 beschrieben, könnte dies den zusätzlichen Vorteil einer erhöhten Reaktivität der aromatischen Aminogruppe bieten.

Bei Verwendung von *O-tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbammat **62b** unter *Larock*-Reaktionsbedingungen wurde ein deutlich besseres Ergebnis erzielt. Das Produkt **63b** konnte in 77% Ausbeute erhalten werden (s. Abb. 81).

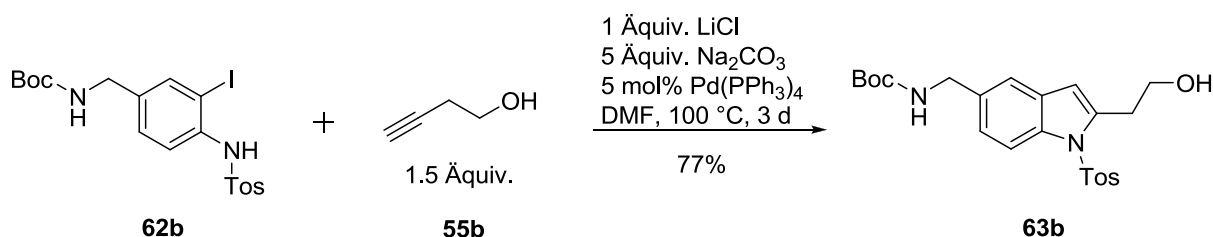


Abb. 81: Erfolgreiche Darstellung von **63b** unter *Larock*-Reaktionsbedingungen

Diese Ausbeute ist deutlich höher als die ohne Tosyl-Gruppe erreichten Ausbeuten. Außerdem wurde kein 3-substituiertes Nebenprodukt erhalten, was durch den sterisch höheren Anspruch der Tosyl-Gruppe im Vergleich zum freien Amin erklärt werden könnte (vgl. Mechanismus von *Larock et al.* in Abb. 63, S. 61f). Somit war es erstmals gelungen, unter *Larock*-Reaktionsbedingungen den direkten Ringschluss 2-selektiv zu erreichen. Trotzdem wurde diese Reaktion im Folgenden nicht weiter verwendet, da in parallel durchgeführten Versuchen eine effektivere Methode zur direkten Synthese des Indolgerüsts gefunden wurde. Im folgenden Kapitel sind die erzielten Ergebnisse dieser Alternativ-Methode zusammengefasst.

4.3.3 Aufbau der Indoleinheit - direkter Ringschluss (Teil 2)

Das Ergebnis aus dem vorigen Kapitel zeigte, dass die Tosyl-Gruppe am aromatischen Stickstoffatom des *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamate **62b** für einen selektiven, direkten Ringschluss unter *Larock*-Reaktionsbedingungen notwendig und zudem gut geeignet war (vgl. Abb. 81). In diesem Zusammenhang war es interessant, dass die anfangs durchgeführten C-C-Kreuzkupplungsreaktionen von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 3-Butin-1-ol **55b** unter Verwendung von Palladiumkatalysator, Kupferiodid und Base bis dato nur zum Kupplungsprodukt führten (vgl. Tabelle 3, S. 56). Auch bei den Kupfer-katalysierten Ringschlussreaktionen wurden teilweise sehr lange Reaktionszeiten beobachtet (s. S. 58). An der Stelle wurde versucht, dies vor allem mit den elektronenziehenden Eigenschaften der Cyanogruppe zu erklären. Von *Hiroya et al.* wurde postuliert, dass die Acidität des Wasserstoffatoms der aromatischen Aminogruppe einen großen Einfluss auf die Reaktivität in der kupferkatalysierten Ringschlussreaktion hat.^[131]

Hierzu wurde eine Veröffentlichung von *Adachi et al.* gefunden, bei der 2-Iodanilin zunächst tosyliert und in der nächsten Reaktion mit 3-Butin-1-ol **55b** unter Einsatz von $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI und Et_3N in absolutem DMF zum entsprechenden 2-substituierten Indol direkt zyklisiert wurde.^[141] Es sollte also möglich sein, mit diesen

Reaktionsbedingungen auch die zur Darstellung der Zielverbindung **46** benötigten Edukte über die Kaskade aus C-C-Kreuzkupplung und *in situ* Ringschluss direkt und selektiv zu zyklisieren.

Als Kontrolle, ob die Cyanogruppe von **50** wirklich einen Einfluss auf den Ringschluss hat, wurde zu Beginn der Ringschluss in Anlehnung an *Adachi et al.* mit dem reduzierten, Boc-geschützten **62a** ohne Tosyl-Schützung des N^4 -Stickstoffatoms durchgeführt (s. Abb. 82). Dazu wurden 6 Äquivalente 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt. Dieser erste Versuch blieb ohne Erfolg, da die Reaktion beim Kreuzkupplungsprodukt stoppte und nicht zum Indol weiterging. Es wurde nur das C-C-Kreuzkupplungsprodukt **65a** in 74% Ausbeute isoliert und kein Indol **63a** (s. Tabelle 9, S. 78). Es scheint also so zu sein, dass die Cyanogruppe zumindest nicht ausschließlich für den nicht erfolgten Ringschluss verantwortlich ist.

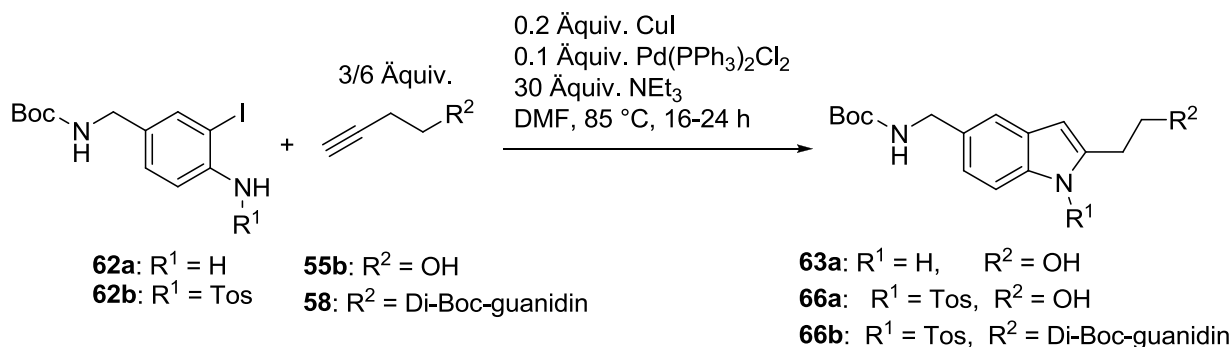


Abb. 82: Reaktionsbedingungen und Edukte beim Ringschluss in Anlehnung an *Adachi et al.*

Daher wurde beim anschließenden Versuch wieder das tosylierte Amin **62b** eingesetzt (s. Abb. 82). Als Alkin wurde 3-Butin-1-ol **55b** mit sechs bzw. drei Äquivalenten im Überschuss eingesetzt (Rkt. 2 und 3). Hierbei wurden 97 bzw. 90% Ausbeute des selektiv 2-substituierten Indols **66a** erhalten.

Tabelle 9: Durchgeführte Tests der Indolsynthese in Anlehnung an *Adachi et al.*

Rkt.	Arylhalogenid	Alkin	Äquiv. Alkin	Ausbeute
1	62a	55b	6	74% 65a ^a
2	62b	55b	6	97% 66a
3	62b	55b	3	90% 66a
4	62b	58	3	62% 66b

^a Kreuzkupplungsprodukt ohne Ringschluss

Mit **62b** und 3-Butin-1-ol **55b** als Reaktanden gelang der Ringschluss nach *Adachi et al.* zuverlässig und in sehr guten Ausbeuten. Um die Syntheseroute um den Schritt der anschließenden Einführung der Guanidinogruppe zu verkürzen, wurde *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** aus 3-Butin-1-ol **55b** dargestellt (Synthese siehe Tabelle 6, S. 65). Dieses Alkin wurde dann für den Ringschluss unter *Adachi*-Reaktionsbedingungen eingesetzt. Dabei konnte die hohe Ausbeute des Ringschlusses mit 3-Butin-1-ol **55b** nicht erreicht werden, sie betrug jedoch noch immerhin 62% (Rkt. 4).

Ein möglicher Grund für die geringere Ausbeute bei Verwendung von *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** könnte der für die Kupplung zu große Raumbedarf der zwei *tert*-Butoxycarbonylgruppen an der Guanidinogruppe sein. Diese könnten eine Annäherung des Alkins an das Stickstoffatom stören und die Reaktion so verlangsamen. Zusätzlich könnte die freie Aminogruppe am Guanidin einen störenden Einfluss auf den Katalysezyklus haben.

Da der Ringschluss mit unsubstituierter, aromatischer Aminogruppe scheiterte und die Einführung der Boc-Gruppe am *N*⁴-Stickstoffatom nur zum dehalogenierten Produkt **62d** führte (s. Kap. 4.3.1, S. 73f), kann abschließend festgehalten werden, dass eine Tosyl-Schützung des *N*⁴-Stickstoffatoms für den Ringschluss unter den Reaktionsbedingungen von *Adachi et al.* vorerst notwendig bleibt. Im Vergleich zu der in Kapitel 4.3.2 (S. 74ff) vorgestellten Indolsynthese nach *Larock et al.* ist die Synthese angelehnt an *Adachi et al.* die Ausbeuten betreffend deutlich überlegen und stellt die Methode der Wahl für die weiteren Synthesen dar.

4.3.4 Einführung der Guanidinogruppe auf Indolstufe

In Kapitel 4.2.2 (S. 65-67) wurde gezeigt, wie die zweifach Boc-geschützte Guanidinogruppe unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen erfolgreich mit bis zu 94% Ausbeute in das Alkin **55b** eingeführt werden konnte. Da im vorigen Kapitel ausgehend von **62b** und 3-Butin-1-ol **55b** sehr gute Ausbeuten für die Indolsynthese erreicht wurden (s. Rkt. 2 und 3 in Tabelle 9, S. 78), sollte erprobt werden, die Guanidinogruppe direkt in das Indol **63b** einzuführen.

Die Kupplung von 1.5 Äquiv. *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** mit 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **63b** unter

Mitsunobu-Reaktionsbedingungen konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 95% durchgeführt werden (s. Abb. 83).

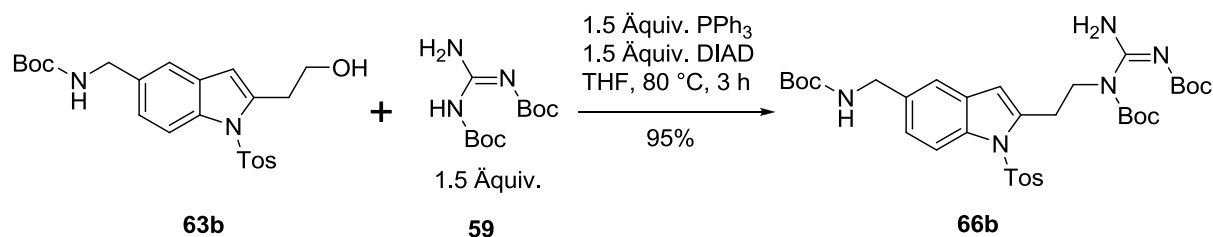


Abb. 83: Darstellung von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b**

Vergleicht man die Ausbeuten, so ist die Sequenz, die die Einführung der Guanidinogruppe *nach* der Indolsynthese vorsieht, sinnvoller, da die Ausbeute über die beiden Schritte mit 86-92% sogar höher ist, als die des Ringschluss von *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-3-in **58** mit *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamate **62b** (62%, vgl. Rkt. 4 in Tabelle 9, S. 78). Exemplarisch für das vollständig aufgebaute Gerüst der Zielverbindung ist in der folgenden Abbildung das ^1H -NMR-Spektrum der noch geschützten Verbindung **66b** dargestellt.

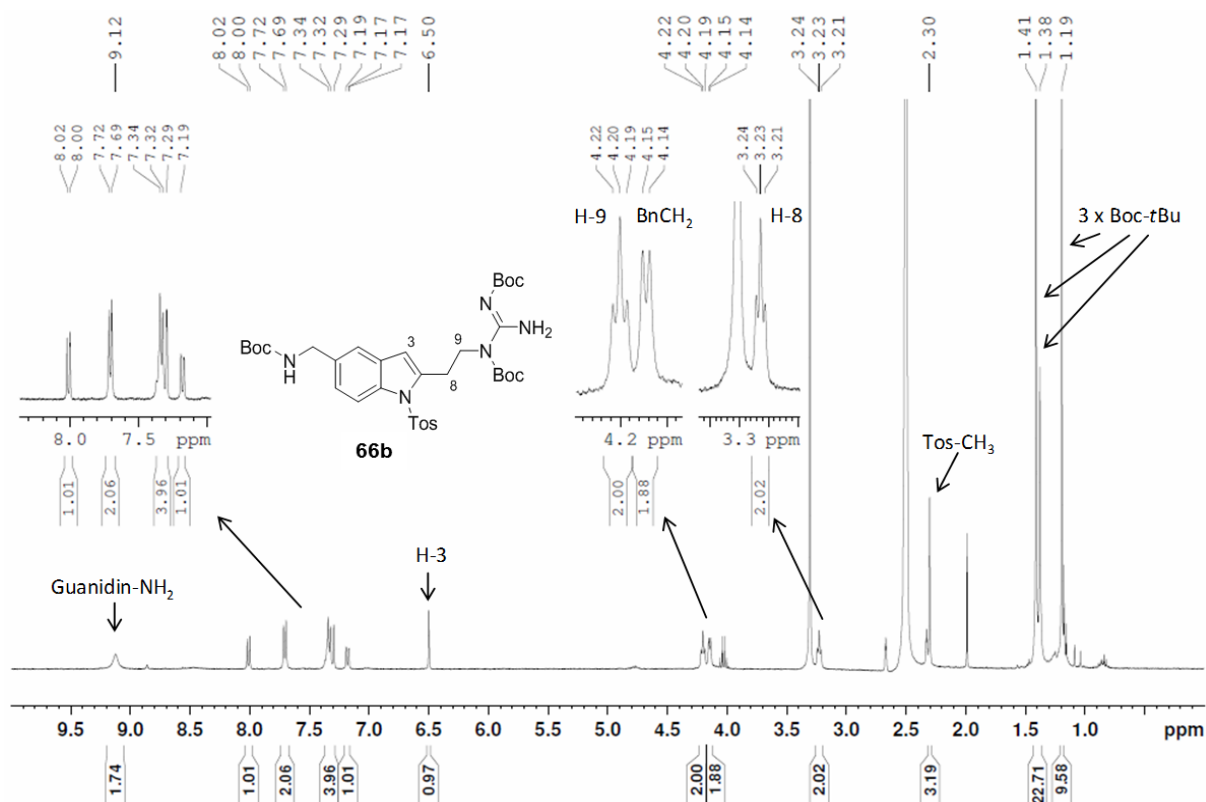


Abb. 84: ^1H -NMR-Spektrum von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b** in $\text{DMSO}-d_6$

Da der Ringschluss nach *Adachi et al.* nur mit dem Tosyl-geschütztem N^4 -Stickstoffatom erfolgreich durchgeführt werden konnte, bestand bei dieser *Mitsunobu*-Variante nicht das Problem eines freien Indolstickstoffs, sodass damit verbundene, eventuelle Nebenreaktionen nicht auftreten konnten und **66b** in einer Ausbeute von 95% erhalten wurde.

4.3.5 Abspaltung der Tosyl-Schutzgruppe

Nach erfolgreicher Einführung der geschützten Guanidinogruppe war die Struktur der Zielverbindung **46** vollständig aufgebaut und es galt nun geeignete Bedingungen für die Abspaltung der Tosyl- und Boc-Schutzgruppen zu finden.

Generell ist die Verwendung einer Base gelöst in einem Alkohol die Methode der Wahl für die Abspaltung von *N*-gebundener Tosyl-Gruppen. In dieser Arbeit sollten verschiedene Reaktionsbedingungen erprobt werden, um durch Detosylierung von **66b** eine effiziente Darstellung von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** zu etablieren (s. Abb. 85 und Tabelle 10).

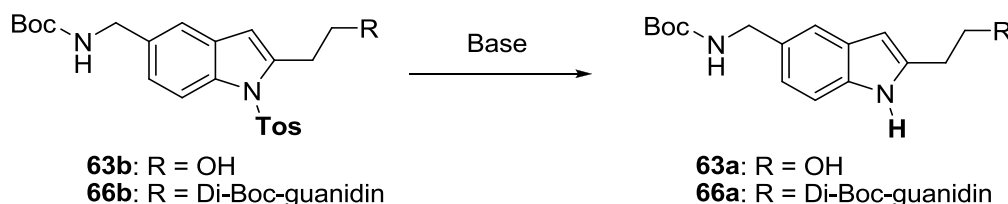


Abb. 85: Abspaltung der Tosyl-Gruppe zur Darstellung von **63a** und **66a**

Zuerst wurde die Synthese nach *Liu et al.* erprobt, in der mit Hilfe des Phasentransferkatalysators *N,N,N*-Trimethylhexadecylammoniumbromid (CTAB) und einem nichtalkoholischen Lösungsmittel die Bildung eines *N*-Alkyl-Nebenproduktes am Indol-Stickstoffatom vermieden werden soll.^[142] In Reaktion 1 wurde jedoch nur das Edukt **63b** isoliert. In Reaktion 2 mit Verbindung **66b** als Ausgangssubstanz konnte nach säulenchromatographischer Reinigung keine Verbindung anhand der ^1H -NMR-Spektren identifiziert werden.

Des Weiteren wurden die klassischen Abspaltbedingungen erprobt. Dazu wurden Kaliumhydroxid und Natriumhydroxid in Methanol als Lösungsmittel verwendet und die Äquivalente sowie Reaktionszeit und -temperatur variiert (s. Reaktion 3-9, Tabelle 10).

Tabelle 10: Erprobte Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der Tosyl-Gruppe

Rkt.	Edukt	Base (Äquiv.)	Solvens	T	t	Ausbeute
1	63b	KOH (5) ^a	THF/H ₂ O	Reflux	16 h	100% ^b 63b
2	66b	KOH (5) ^a	THF/H ₂ O	Reflux	1.5 d	-
3	66b	5 M KOH (256)	CH ₃ OH	Reflux	2 h	1% 66a
4	66b	2 M KOH (84)	CH ₃ OH	35 °C	2 h	21% 66a + 34% ^c
5	66b	2 M KOH (66)	CH ₃ OH	Rt	4 h	75% 66b
6	66b	5 M KOH (164)	CH ₃ OH	Rt	24 h	60-68% 66a
7	66b	5 M KOH (164)	CH ₃ OH	Rt	43 h	54% 66a
8	66b	5 M NaOH (164)	CH ₃ OH	Rt	29 h	78% 66a
9	66b	5 M NaOH (164)	CH ₃ OH	Rt	40 h	99% 66a

^a + 5 mol% CTAB, ^b verunreinigt durch Ethylacetat, ^c Edukt minus eine Boc-Gruppe

Als erstes wurden 256 Äquiv. KOH eingesetzt und die Reaktionslösung für 2 Stunden in der Siedehitze gerührt (Rkt. 3). Dabei kam es zur Zersetzung des Eduktes **66b**, und es wurde nach säulenchromatographischer Reinigung nur ein sehr geringer Anteil des Produktes **66a** erhalten, sodass in Versuch 4 weniger Basenäquivalente sowie eine tiefere Temperatur gewählt wurden. Dünnschichtchromatographisch wurde dabei kein Edukt-Spot mehr detektiert, stattdessen waren zwei Spots mit höherer Polarität zu erkennen. Nach säulenchromatographischer Reinigung und ¹H-NMR-spektroskopischer Analyse stellte sich heraus, dass eine Fraktion scheinbar das Produkt enthielt (21%) und eine andere scheinbar das Edukt (34%), wobei beide Verbindungen der zwei Fraktionen nur zwei statt drei Boc-Gruppen aufwiesen. Es wurde vermutet, dass die Reaktionsbedingungen für die erfolgreiche Abspaltung der Tosyl-Gruppe von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b** immer noch zu harsch waren und zur teilweisen Zersetzung führten.

Beim Versuch, mit 2 M Kaliumhydroxid in Methanol eine niedrigere Konzentration der Base zu wählen, konnte kein Produkt **66a** sondern nur 75% des Eduktes **66b** reisoliert werden (Rkt. 5). Bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 24 Stunden konnten mit 5 M Kaliumhydroxid in Methanol erstmalig Ausbeuten zwischen 60-68% erzielt werden (Rkt. 6). Eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit brachte hier keine Verbesserung (Rkt. 7, 54% **66a**).

In einem weiteren Versuch wurde 5 M NaOH in Methanol statt des vorher verwendeten 5 M Kaliumhydroxids in Methanol eingesetzt. Da mittels Dünnschichtchromatographie nach 24 Stunden noch immer keine Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde für weitere 16 Stunden gerührt. Überraschenderweise konnte dann das saubere Produkt **66a** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 99% isoliert werden. Anschließend wurde bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen nur 29 Stunden gerührt und das Produkt **66a** in einer Ausbeute von 78% isoliert. Mit Natriumhydroxid wurde somit eine gute Base zu Abspaltung der Tosyl-Gruppe von Edukt **66b** gefunden. In allen Fällen konnte nach der säulenchromatographischen Reinigung keine Fraktion isoliert werden, die ein *N*-alkyliertes Indol als Nebenprodukt enthielt.

Zusammenfassend ist also eine niedrige Reaktionstemperatur bei relativ hoher Basenkonzentration zur Abspaltung der *N*-Tosyl-Gruppe am besten geeignet. Jedoch benötigt diese mit 40 Stunden eine relativ lange Reaktionszeit und bedeutet auch, dass durch die Einführung und Abspaltung zwei Stufen mehr bei dieser Synthese nötig sind (vgl. S. 71f). Deswegen wurde parallel zu den beschriebenen Arbeiten weiter an einer Synthesemethode geforscht, nach der die Zielverbindung **46** ohne Tosyl-Gruppe mit freiem Indolstickstoffatom erfolgreich dargestellt werden kann. Hierzu können im folgenden Kapitel ebenfalls erfreuliche Ergebnisse präsentiert werden. Im Anschluss daran wird schließlich die Abspaltung der Boc-Gruppen diskutiert werden.

4.3.6 C-C-Kreuzkupplung und anschließender Ringschluss

Parallel zu den zuvor beschriebenen Reaktionen wurde weiter an einer Möglichkeit gearbeitet, auf eine Tosylierung an der aromatischen Aminogruppe zu verzichten und trotzdem die Boc-geschützte Zielverbindung **66a** zu erhalten. Da sich zuvor gezeigt hatte, dass für eine Kupplung und den *in situ* Ringschluss die Tosyl-Gruppe zwingend benötigt wird, blieb als mögliche Alternative nur der zweistufige Prozess aus C-C-Kreuzkupplung und anschließender Ringschlussreaktion (s. Abb. 86). Welche Syntheseroute besser ist, sollte ein Vergleich der erreichten Ausbeuten zeigen und wird in Kapitel 4.3.9 (S. 93-90) diskutiert.

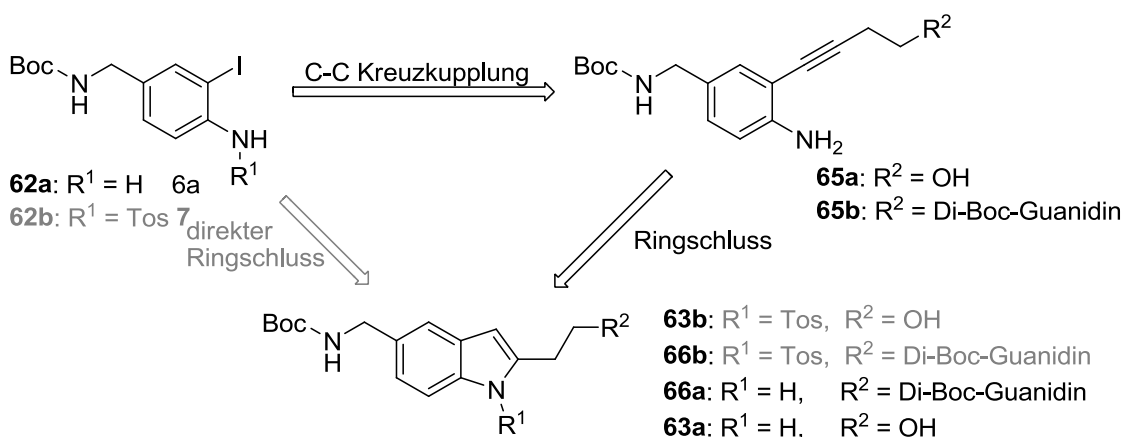


Abb. 86: Retrosynthese des Indolgerüsts über die Kreuzkupplung und den anschließendem Ringschluss (grau hinterlegt sind die in Kap.4.3.2 und 4.3.3, S. 74-79 bereits diskutierten Alternativen)

Verschiedene Kreuzkupplungsreaktionen von 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** mit 3-Butin-1-ol **55b** als Alkinkomponente wurden bereits in Kap. 4.2.2 erfolgreich erprobt (s. S. 55f). Sowohl $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$ als auch der heterogene Pd EnCat TPP30[®] führten dort in guten Ausbeuten zum 4-Amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzonitril **54b**. Der einfacheren Handhabung wegen, wurde zur Erprobung dieser Syntheseroute der Pd EnCat TPP30[®] verwendet. Die Kupplung von **55b** mit *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamate **62a** führte nach säulenchromatographischer Reinigung zum Produkt **65a** in einer Ausbeute von 90% (s. Abb. 87).

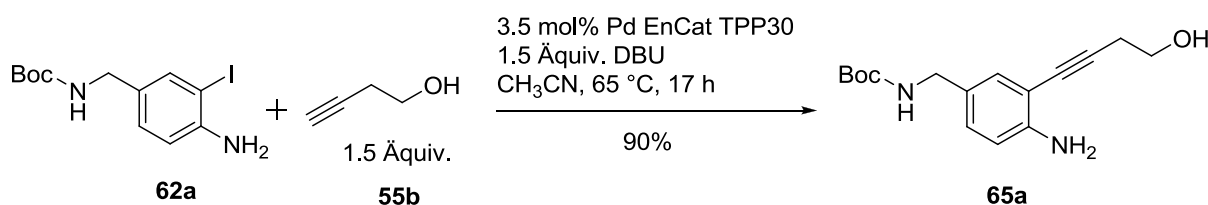


Abb. 87: Synthese von *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)-benzyl]carbamate **65a**

Die Kupplung von *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamate **62a** mit *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonyl-guanidinobut-3-in **58** gelang mit 51% in einer etwas niedrigeren Ausbeute (s. Abb. 88).

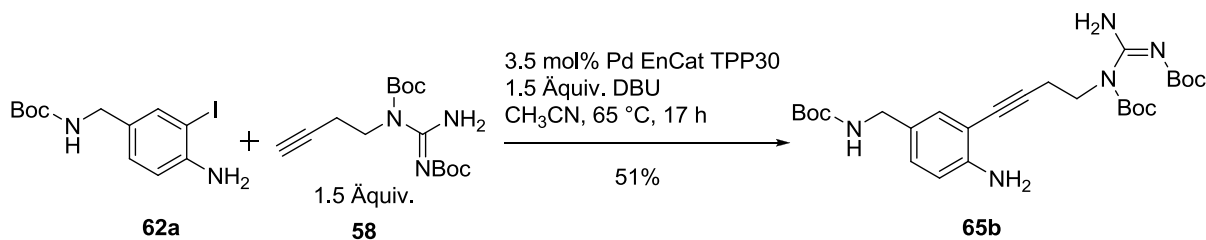


Abb. 88: Synthese von *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-1-yn-1-yl)-benzyl]carbamate **65b**

Im Folgenden sind die verwendeten Ringschlüsse nach zuvor bereits erfolgreich erprobten Reaktionsmethoden dargestellt (vgl. Kap. 4.2.2, S. 57ff). Der Ringschluss wurde mit **65a** bzw. **65b** zum 1*H*-Indol **63a** bzw. **66a** erprobt (s. Abb. 86, S. 84 und Tabelle 11). Bei Versuch 1 in Anlehnung an *Castro et al.*^[132] wurde zum einen das Eliminierungsprodukt erhalten, sowie Produkt **63a** mit einem geringen Anteil Edukt **65a**, die säulenchromatographisch nicht voneinander getrennt werden konnten. In Anlehnung an *Hiroya et al.* wurden bei Rkt. 2 79% des sauberen Produktes **63b** isoliert.^[131]

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen beim Ringschluss in Anlehnung an *Castro et al.* und *Hiroya et al.*

Rkt.	Edukt	Kat.	Base	Solvens	T [°C]	Zeit	Ausbeute
1	65a	CuI	<i>t</i> BuOK	DMF	100	24 h	n. b. ^a (65a/63a)
2	65a	Cu(OAc) ₂	KH	C ₂ H ₄ Cl ₂ ^b	70	72 h	79% 63a
3	65b	Cu(OAc) ₂	KH	C ₂ H ₄ Cl ₂ ^b	70	96 h	57% 66a

^a n. b. = nicht bestimmt, ^b 1,2-Dichlorethan

Die Hydroxygruppe des Indols **63a** sollte nach erfolgtem Ringschluss mittels der zuvor erfolgreich verwendeten *Mitsunobu*-Reaktion in die Boc-geschützte Guanidinogruppe überführt werden (vgl. Abb. 83, S. 80). Dazu bilden Triphenylphosphin und DIAD ein Betain, das Verbindung **59** deprotoniert. Unter Abspaltung von Triphenylphosphinoxid sollte es daraufhin zur Bildung der Verbindung **66a** kommen (s. Abb. 89).

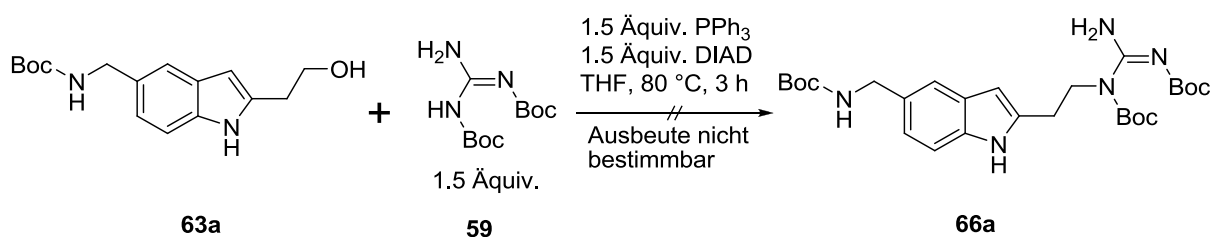


Abb. 89: Versuchte Darstellung von 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen

Bereits auf der DC-Folie war zu erkennen, dass sich verschiedene Reaktionsprodukte gebildet hatten. Das Produkt **66a** wurde durch die Reaktion zwar erhalten, konnte jedoch aufgrund der ähnlichen *R_F*-Werte auch nach säulenchromatographischer Reinigung nicht sauber isoliert werden. Möglicherweise führt die freie NH-Funktion im Indol zu den Nebenreaktionen.

Um eine spätere Einführung der Guanidinogruppe und daraus eventuelle resultierende Nebenreaktionen zu umgehen, wurde der Ringschluss mit den erfolgreichen Reaktionsbedingungen nach *Hiroya et al.* mit *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-1-in-1-yl)-benzyl]carbammat **65b** getestet (s. Reaktion 3 in Tabelle 11, S. 85). Auch bei dieser Synthese konnte das Produkt **66a** erhalten werden. Jedoch war die Ausbeute an **66a** mit 57% geringer. Aber immerhin konnte die fertig aufgebaute Zielverbindung auf diese Weise erfolgreich erhalten werden. Von diesem Produkt **66a** mussten zum Erhalt der Zielverbindung **46** nun noch die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen abgespalten werden (s. Kap. 4.3.7, S. 86ff).

Somit wurde eine alternative Syntheseroute zum Ringschluss nach *Adachi et al.* gefunden. Auf die zusätzlichen Stufen für die Einführung der Tosyl-Gruppe zur Reaktivitätssteigerung der aromatischen Aminogruppe und deren spätere Abspaltung konnte so verzichtet werden (vgl. S. 78f). Die Einschätzung, welche Syntheseroute besser ist, wird in Kap. 4.3.9 (S. 93-90) diskutiert. Im folgenden Kapitel wird mit der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen und Isolierung der Zielverbindung **46** zunächst die letzte Stufe der Syntheseroute vorgestellt.

4.3.7 Abspaltung der Boc-Gruppen: Darstellung von **46**

An diesem Punkt liefen die verschiedenen, zuvor beschriebenen Syntheserouten wieder zusammen, da auf allen Routen die Boc-Schutzgruppen als letztes abgespalten werden müssen. Die Boc-Schutzgruppen sollten mittels Chlorwasserstoff unter Abspaltung von *iso*Buten und Kohlenstoffdioxid hydrolysiert werden (s. S. 53f). Das Produkt sollte dabei als Hydrochlorid ausfallen und somit die Reinigung erleichtern, welche durch die gasförmigen Spaltprodukte der Schutzgruppe zusätzlich vereinfacht wird.

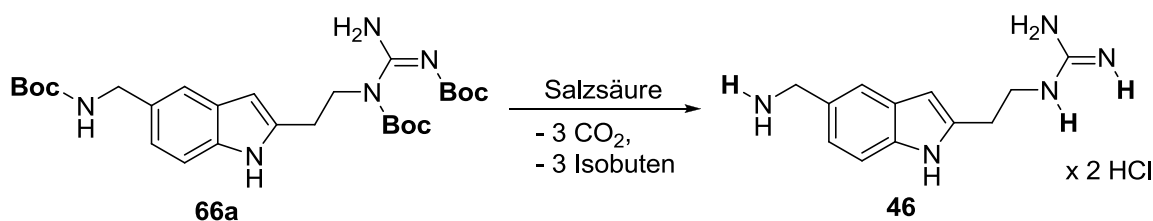


Abb. 90: Darstellung von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46**

Als Erstes wurde eine Vorschrift von *Adrio et al.* zur *in situ* Herstellung von Chlorwasserstoffgas erprobt.^[143] Dabei wurde der bei der Reaktion von konzentrierter

Schwefelsäure und Ammoniumchlorid freiwerdende gasförmige Chlorwasserstoff bei Raumtemperatur durch die Reaktionslösung geleitet (Rkt. 1, Tabelle 12). Als Lösungsmittel wurde Ethylacetat verwendet. Das Einleiten von gasförmiger HCl sollte die Fällung des Hydrochlorids von **46** ermöglichen und somit eine ansonsten nötige Abtrennung von Wasser vermeiden. Ein Problem dabei war jedoch, dass die Substanz schon in Ethylacetat ausfiel, sobald auch nur eine Boc-Gruppe abgespalten war und dann nicht weiterreagierte. Im ^1H -NMR-Spektrum konnte keine Bildung des Produktes **46** festgestellt werden (Rkt. 1). In Tabelle 12 sind die weiteren Versuche zur Entschützung dargestellt.

Tabelle 12: Versuche zur Darstellung von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46**

Rkt.	Reagenz	Lösungsmittel	T	t	Ausbeute
1	HCl _(g)	Ethylacetat	Rt	2 h	-
2	HCl (>25%) ^a	CH ₃ CN/H ₂ O (7:3)	Heißluftfön	5 min	> 100% ^b
3	Amberlite [®]	Methanol	Heißluftfön/Rt	24 h	-
4	Amberlite [®]	H ₂ O/Dioxan (1:1)	Rt	92 h	-
5	3 M HCl	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1:1)	Rt	120 h	57%
6	2 M HCl	CH ₃ CN (1:1)	Rt	28 h	73%
7	4 M HCl	CH ₃ CN (1:1)	Rt	5 h	53%
8	4 M HCl	CH ₃ CN (1:1)	Rt	72 h	67%

^a 5 Tropfen, ^b Rohausbeute (vermutlich mit anorganischen Salzen verunreinigt)

In einem weiteren Versuch wurde das Edukt in Acetonitril und Wasser im Verhältnis 7:3 gelöst, mit 5 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und nach *H. Jessen* für fünf Minuten mit dem Heißluftfön erwärmt.^[144] Dabei färbte sich die Reaktionslösung rötlich. Tatsächlich wurde mit dieser Methode nach anschließender Gefriertrocknung die Zielverbindung **46** als Hydrochlorid erhalten (Rkt. 2). Jedoch wurden mehr als 100% Ausbeute erhalten, sodass der lyophilisierte Feststoff vermutlich noch anorganische Salze enthält.

Um eine Verunreinigung der Zielverbindung **46** mit Salzen zu vermeiden, wurde versucht, die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen nicht mit Salzsäure, sondern durch einen sauren Ionenaustauscher (Amberlite[®] IR 120+) abzuspalten. Wie bereits bei Rkt. 2 beobachtet, änderten die Ionenaustauscherkügelchen mit fortschreitender Reaktionsdauer ihre Farbe zu einem satten Rot. Was zunächst als Indiz für den

Reaktionsumsatz angesehen wurde. Auf der DC-Folie konnte zudem ein Verbrauch des Edukts **66a** detektiert werden. Jedoch konnte auch nach dem Erwärmen mit dem Heißluftfön keine Produktbildung beobachtet werden. Daraufhin wurden die Ionenaustauscherkügelchen trotzdem mit Wasser gespült und vom Lösungsmittel getrennt. Im ^1H -NMR-Spektrum des Rohproduktes konnten jedoch weder Signale der Protonen des Eduktes **66a** noch des Produktes **46** detektiert werden. Möglicherweise haben die Ionenaustauscherkügelchen das Edukt **66a** und/oder das Produkt **46** absorbiert und/oder an ihrer Oberfläche gebunden (Rkt. 3 und 4).

Da diese Methode nicht erfolgreich war, wurde auf die bereits zuvor getestete Methode der *tert*-Butoxycarbonylabspaltung mit Salzsäure zurückgegriffen und eine anschließende Reinigung der Zielverbindung **46** erprobt. Im ersten Ansatz wurden 15 mg 5-(*O-tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** in 3 mL Acetonitril/Wasser 1:1 gelöst und mit einem Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte nur ein geringer Umsatz beobachtet werden, sodass ein weiterer Tropfen konz. HCl zugegeben wurde. Als nach 42 Stunden immer noch kein vollständiger Umsatz des Eduktes **66a** beobachtet werden konnte, wurde auch dieser Ansatz mit 2 M Salzsäure versetzt und 120 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an RP-Kieselgel mit dest. Wasser als Eluent gereinigt. Das reine Produkt **46** konnte auf diese Weise als farbloser Feststoff (Hydrochlorid von **46**) in einer Ausbeute von 57% isoliert werden (Rkt. 5).

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, mit 2 M Salzsäure/ CH_3CN 1:1 und 28 Stunden Reaktionszeit die Ausbeute in einem größeren Ansatz zu reproduzieren. Dabei wurde das Produkt **46** als Hydrochlorid nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel sogar in einer noch besseren Ausbeute von 73% isoliert (Rkt. 6). In der folgenden Abbildung ist das ^1H -NMR-Spektrum der reinen Zielverbindung **46** dargestellt.

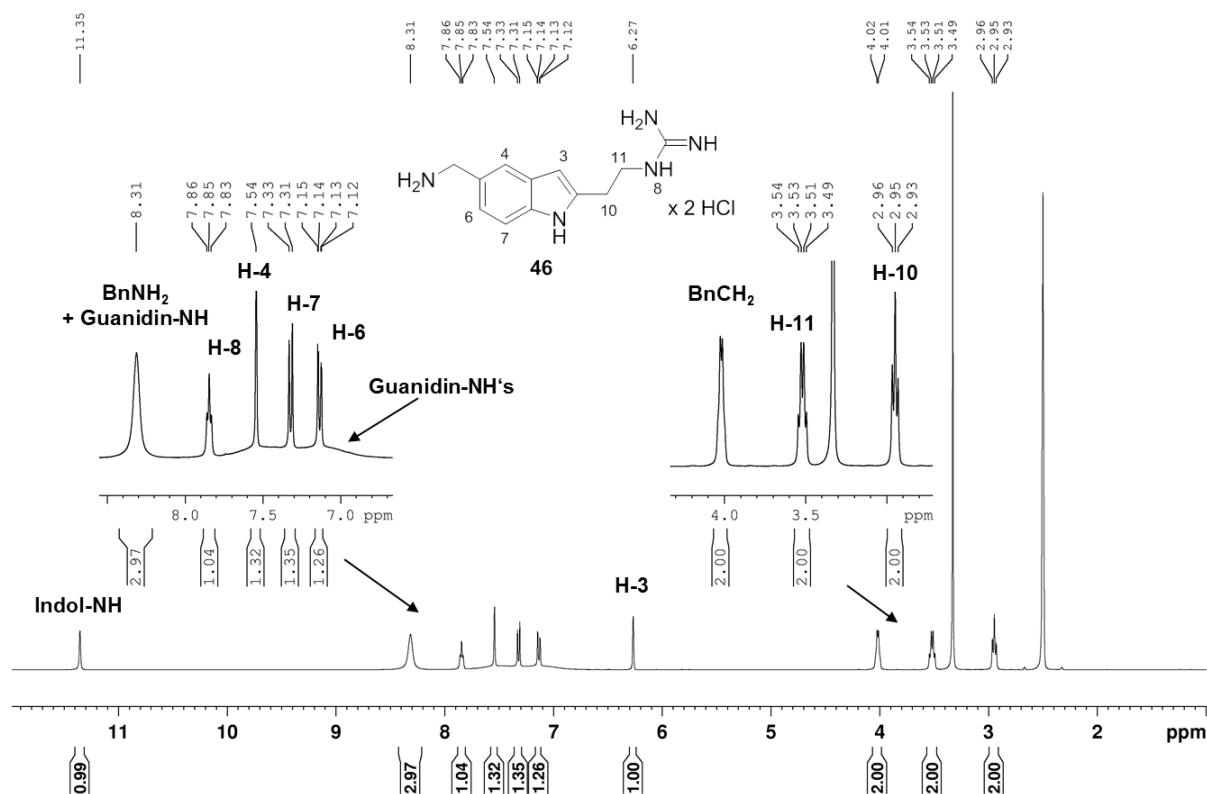


Abb. 91: ^1H -NMR-Spektrum der Zielverbindung 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1H-indol **46** in DMSO- d_6

Erkennbar sind alle Protonen der Zielverbindung, und neben dem DMSO- und Wasser-Signal sind keine weiteren Signale vorhanden. Zunächst sorgte die erkennbare, breite Erhebung zwischen 7.70 und 6.80 ppm für Verwirrung (s. Abb. 91). Jedoch zeigte sich bei genauerem Hinsehen, dass es sich hierbei um das Signal für die Guanidin-Protonen handelt. Diese tauschen sogar in DMSO- d_6 stark aus, so dass das beobachtete breite Signal auftritt. In der Literatur wurde dies z. B. von *Solter et al.* bei der terminalen Guanidinogruppe eines Naturstoffs des marinen Schwamms *Geodia baretii* beobachtet.^[145] Auch mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte **46** eindeutig identifiziert werden..

Die vor Aufnahme des obigen ^1H -NMR-Spektrums durchgeführte Reinigung mittels RP-Säule offenbarte eine rote und eine violett-farbene Verunreinigung, welche jedoch nicht identifiziert werden konnten. In einem weiteren Versuch wurde die Konzentration der Salzsäure auf 4 M erhöht und die Reaktionszeit auf 5 Stunden verkürzt. Dabei entstand keine rote Verunreinigung. Die Ausbeute des gewünschten Produktes **46** als Hydrochlorid betrug bei diesem Versuch 53% (Rkt. 7). In einem weiteren Versuch mit 4 M Salzsäure/ CH_3CN 1:1 und 3 Tagen Reaktionszeit konnte die Zielverbindung **46** als Hydrochlorid in einer Ausbeute von 67% isoliert werden

(Rkt. 8). Bei diesem Versuch färbte sich die Reaktionslösung mit der Zeit erneut rötlich.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mit den hier beschriebenen Methoden eine verlässliche und reproduzierbare Abspaltung der Boc-Gruppen gefunden wurde. Die Reinigung an RP-Kieselgel ist aufgrund der hohen Polarität nicht sehr zeitaufwendig. Nach einigen gescheiterten, aber letztlich auch vielen erfolgreichen Versuchen konnte in der Summe 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** erstmalig synthetisiert werden. Die somit erfolgreich dargestellte Verbindung **46** konnte nun auf ihre *in vitro* Aktivität als DHS-Inhibitor sowie gegen HIV-1 getestet werden. Bevor die zahlreichen Synthesen möglichst übersichtlich zusammengefasst werden, werden im folgenden Kapitel zunächst die biologischen Testergebnisse beschrieben.

4.3.8 Biochemische Tests der Verbindung 46 aus der zweiten Generation neuer DHS-Inhibitoren

Die Synthese der neuen Verbindung **46** wurde erfolgreich entwickelt und gelang in guten, reproduzierbaren Ausbeuten (s. Kap. 4.3.9, S. 93ff). Nach der Synthese wurde die biologische Aktivität von **46** als DHS-Inhibitor und gegen HIV-1 getestet. Diese Tests wurden von *I. Hauber* und *M. Krepstakies* (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) durchgeführt (s. Kap. 9.2.1, S. 169).

Inhibition der Desoxyhypusinsynthase

Die Inhibition der Desoxyhypusinsynthase wurde *in vitro* am isolierten Enzym überprüft. Durch radioaktiv markiertes Spermidin wurde die DHS-vermittelte Übertragung der Aminobutyleinheit des Spermidins auf das Lysin an Position 50 im eIF-5A gemessen (vgl. Abb. 6, S. 9 und Kap. 9.2.1, S. 169). Bei diesen Versuchen wurden GC7 **1** und CNI-1493 **2** als Positivkontrollen verwendet (jeweils 1 μ M). Die Ergebnisse sind in Abb. 92 dargestellt.

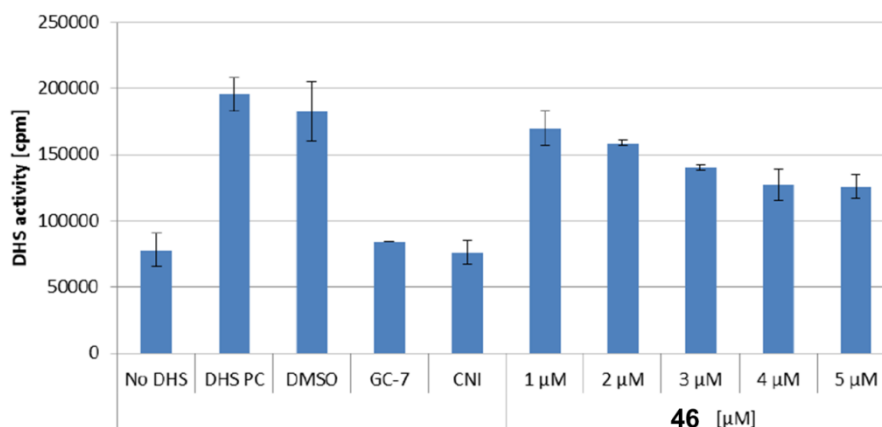


Abb. 92: Inhibition der DHS durch **46** (1 μ M GC7 **1** und 1 μ M CNI-1493 **2** wurden jeweils als Positivkontrolle eingesetzt)^[111]

Es zeigte sich, dass **46** die DHS-Reaktion dosisabhängig hemmt und die Substanz etwa halb so aktiv wie GC7 **1** ist. Die bioinformatischen Berechnungen hatten eine deutlich höhere Bindungsaffinität von **46** zur DHS im Vergleich zu DHS gebundenem GC7 **1** ergeben (vgl. S. 52), jedoch bestätigte sich dieses Ergebnis in der Realität nicht. Trotzdem ist das erhaltene Aktivitätsprofil von **46** ein sehr erfreuliches Resultat, da eine dosisabhängige Inhibition gefunden wurde und somit durch rationales Wirkstoffdesign ein neuartiger *Hit* identifiziert werden konnte. Das Ergebnis im DHS-Assay war übereinstimmend mit der gemessenen Inhibition der HIV-1 Replikation, deren Bestimmung in Zellkultur durchgeführt wurde.^[111]

Inhibition von HIV-1 in PM1-Zellen

Das Ergebnis des Tests gegen HIV-1 ist in Abb. 93 gezeigt. PM1-Zellen wurden für eine Woche in den angezeigten Inhibitor-Konzentrationen vorinkubiert, mit dem CCR5-tropen HIV-1 Isolat BaL infiziert und für eine weitere Woche in Gegenwart der jeweiligen Inhibitoren kultiviert. Die lange Vorinkubationszeit der Zellen in Gegenwart der Inhibitoren ist damit begründet, dass der aktivierte Faktor eIF-5A eine sehr lange Halbwertszeit besitzt.

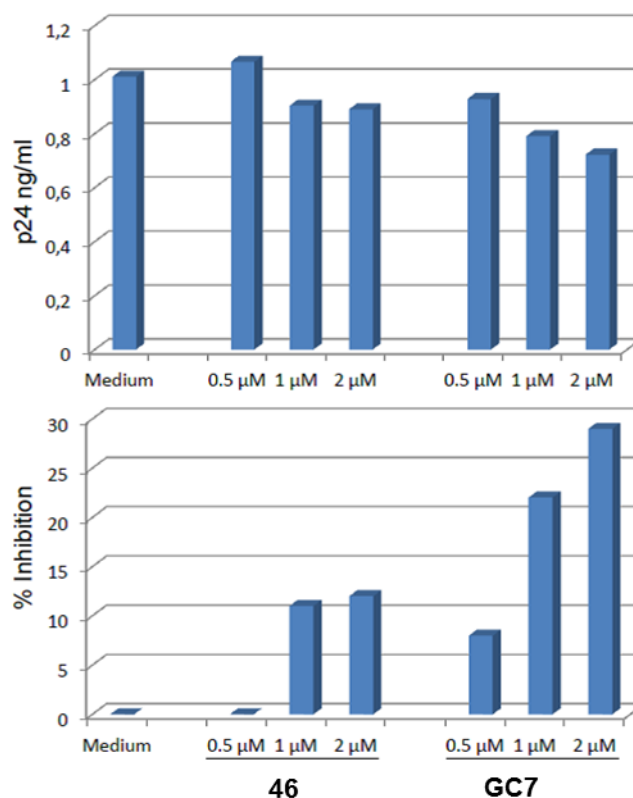


Abb. 93: Aktivität von **46** gegen HIV-1 in PM1-Zellen mit GC7 **1** als Positivkontrolle^[111]

Die Viruslast wurde aus dem Überstand durch Messung des p24-Antigen-Levels bestimmt. Parallel dazu wurde die zelluläre Viabilität durch den AlamarBlue-Assay gemessen, wobei keine toxischen Effekte festgestellt wurden.

Da dieser Assay an intakten Zellen durchgeführt wurde, muss **46** zumindest in geringer Konzentration die Zellwand passiert haben. Dies ist erfreulich, da **46** aufgrund seiner Guanidinogruppe doch relativ polar ist. Zwar ist GC7 **1** aktiver als der neue DHS-Inhibitor **46**, aber beide zeigten eine dosisabhängige Wirkung. Vergleicht man die Ergebnisse des DHS-Assays mit denen des Tests gegen HIV-1, stellt man eine große Ähnlichkeit fest. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die inhibitorische Wirkung von **46** auf HIV-1 tatsächlich auf die Inhibition der DHS zurückzuführen ist.

4.3.9 Fazit: Synthesen zur erstmaligen Darstellung von 46

Nach der Berechnung, Synthese und dem Testen der ersten Generation, neuer, potentieller DHS-Inhibitoren wurden die erhaltenen Ergebnisse für eine Optimierung der bioinformatischen Berechnungen verwendet (vgl. Kap. 4.1.4, S. 49). Von A. Kolodzik wurde mittels Struktur- und Fragment-basiertem Wirkstoffdesign eine zweite Generation neuartiger, potentieller Inhibitoren der DHS *in silico* generiert, deren virtuelle Bindungsaffinitäten zur DHS im Vergleich zu GC7 **1** und der ersten Generation potentieller DHS-Inhibitoren deutlich verbessert waren (s. Kap. 4.2, S. 50-53).^[48]

Aus den neu berechneten Verbindungen wurde 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** nach synthetischen Gesichtspunkten zur Darstellung ausgewählt. Um die bioinformatischen Rechnungen zu veranschaulichen, wurden die Interaktionen des neuen, potentiellen DHS-Inhibitors **46** mit dem aktiven Zentrum der DHS von A. Kolodzik simuliert (s. Abb. 94). Erkennbar sind die gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen der Aminomethyl- und der Guanidinogruppe, sowie die π - π -Wechselwirkungen des Indols mit der Indoleinheit des Tryptophans an Position 327 der DHS.

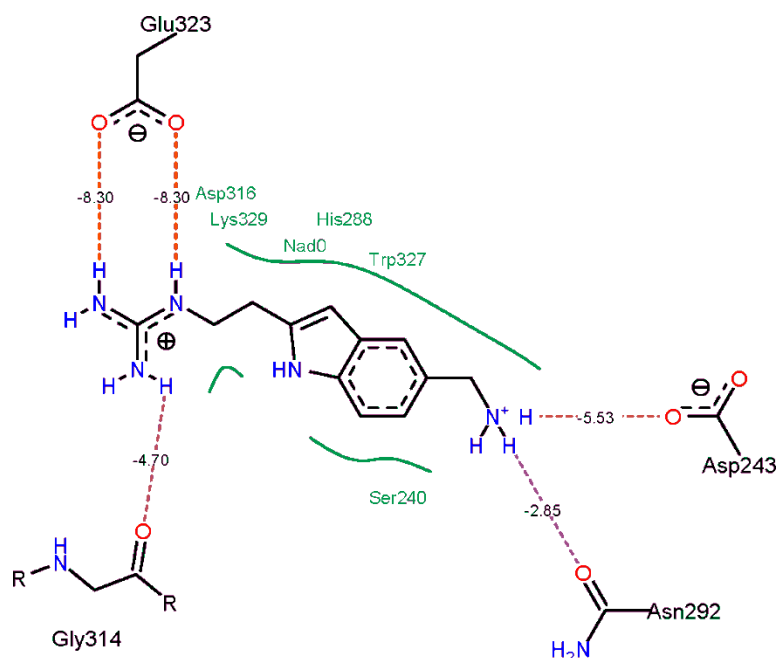


Abb. 94: Bioinformatische Berechnung des aktiven Zentrums der DHS mit gebundenem **46**^[48]

Die erste geplante und durchgeführte Syntheseroute scheiterte an der Reduktion der Nitrilfunktion auf Stufe des Indols (s. Kap. 4.2.3, S. 69f). Nachdem die Syntheseroute daraufhin umgestellt wurde, konnte die Zielverbindung **46** nach Optimierung der

Synthesen auf zwei verschiedene Wege erstmalig erfolgreich dargestellt werden (s. Abb. 95, S. 94 und Abb. 96, S. 95).

Syntheseroute 1:

Die Zielverbindung **46** konnte über sieben Stufen erfolgreich synthetisiert werden (s. Abb. 95). Nach Reduktion und Einführung der Boc-Gruppe wurde die Tosyl-Gruppe an der aromatischen Aminogruppe eingeführt, da der direkte Ringschluss des Alkins **55b** mit freier NH₂-Gruppe nicht möglich war (s. S. 77f). Anschließend wurde *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin durch Substitution der Hydroxygruppe unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen eingeführt (vgl. S. 80).

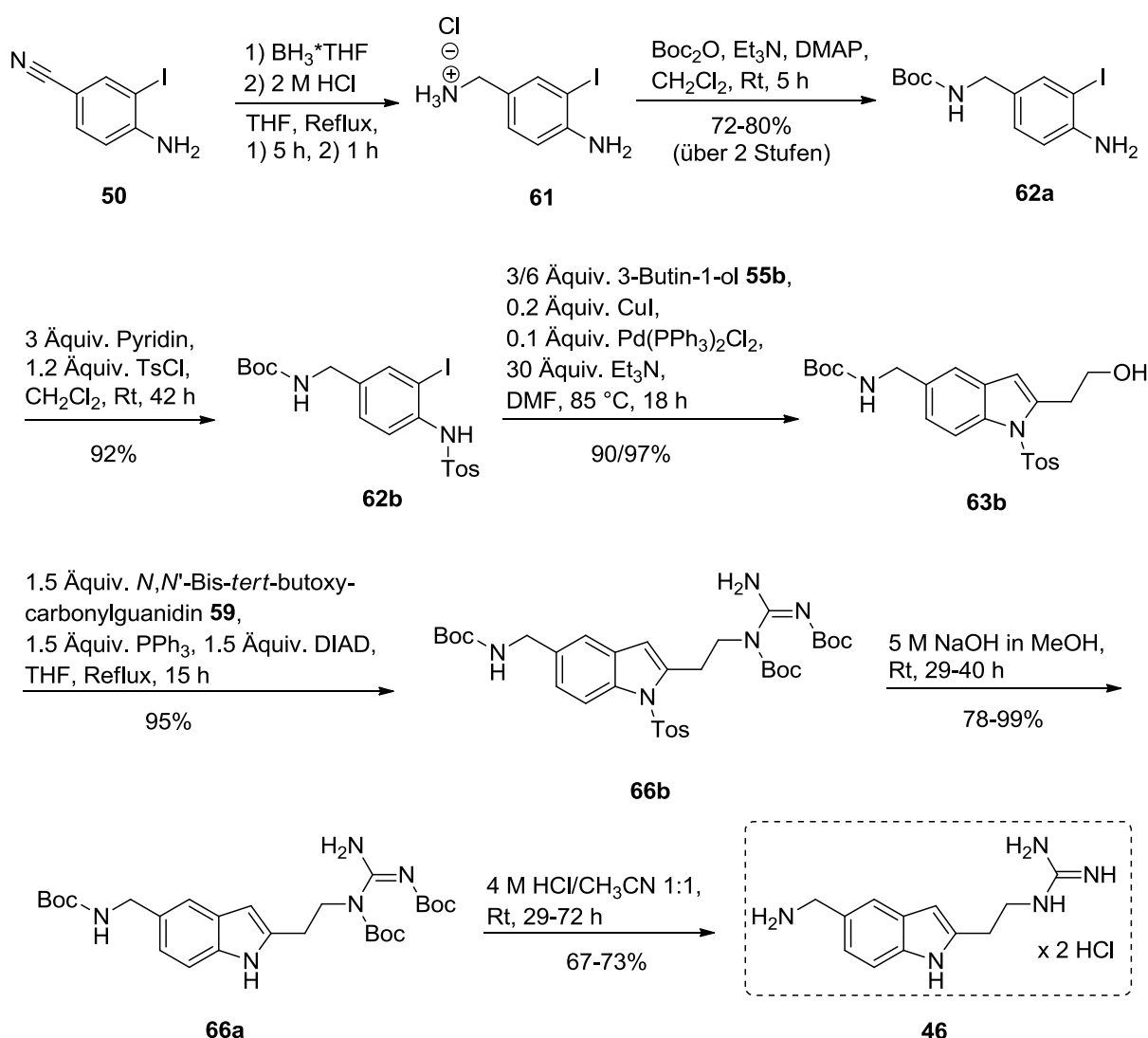


Abb. 95: Darstellung von **46** über den direkten Ringschluss von 3-Butin-1-ol **55b** mit **62b**

Die Struktur der Zielverbindung war damit vollständig aufgebaut. In den letzten beiden Schritten wurden die Tosyl- bzw. Boc-Schutzgruppen orthogonal abgespalten. Zur Abspaltung der Tosyl-Gruppe war eine 5 molare Lösung von NaOH

in Methanol am besten geeignet (s. S. 82). Die Abspaltung der Boc-Gruppen wurde erfolgreich unter Verwendung von 4 M HCl/CH₃CN (1:1) durchgeführt. Über diese sieben Stufen konnte die Zielverbindung **46** als Hydrochlorid in einer Gesamtausbeute von 30-49% erhalten werden.

Syntheseroute 2:

Da die Einführung und spätere Abspaltung der Tosyl-Gruppe zwei zusätzliche, aber notwendige Stufen für Syntheseroute 1 sind, wurde eine alternative Syntheseroute entwickelt, bei der diese zwei Schritte nicht nötig waren (s. Abb. 96).

Die Syntheseroute 2 verlief über die C-C-Kreuzkupplung von *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonyl-guanidinobut-3-in **58** mit **62a** (s. S. 84). Eine nachträgliche Einführung der Guanidinogruppe scheiterte wahrscheinlich an dem freien Indol-NH (s. S. 85). Das Kupplungsprodukt **65b** konnte in einer Ringschlussreaktion zum entsprechenden Indol **66a** zyklisiert werden (s. S. 85).

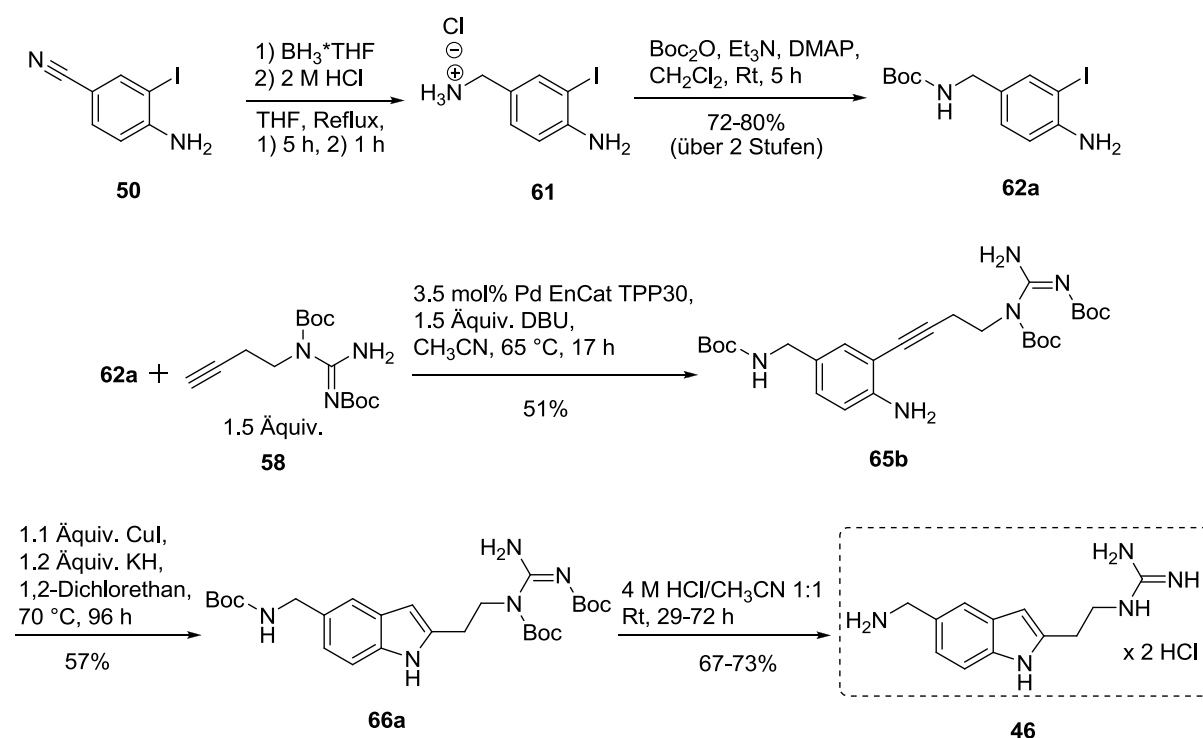


Abb. 96: Darstellung von **46** über die C-C-Kreuzkupplung und anschließenden Ringschluss ohne *N*-Tosyl-Gruppe

Die Abspaltung der Boc-Gruppen wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei Syntheseroute 1 durchgeführt. Die Gesamtausbeute von 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** über diese nicht optimierte Ringschlussvariante betrug trotz

der fünf statt sieben erforderlichen Syntheseschritte nur 14-17% statt der erhaltenen 30-49% über den direkten Ringschluss nach Syntheseroute 1.

Beim Vergleich der Ausbeuten darf nicht vergessen werden, dass die Gesamtausbeute bei Syntheseroute 1 nach durchgeführter Optimierung 49% über alle sieben Stufen ging und Syntheseroute 2 noch nicht optimiert ist. Hier sollte eine Steigerung der Gesamtausbeute möglich sein. Beide Routen bieten Ihre Vorteile und können auch im Hinblick auf weitere Derivate entsprechend eingesetzt werden. Es wurde ein effizienter Zugang zu substituierten Indolen ermöglicht

Da zudem die Reinigung der Zielverbindung **46** an RP-Kieselgel gelang, wurde die *in vitro* Aktivität dieses neuen, potentiellen DHS-Inhibitors getestet. Es zeigte sich, dass **46** die DHS-Reaktion dosisabhängig hemmt und die Substanz etwa halb so aktiv wie GC7 **1** ist (s. S. 91). Vergleicht man die Ergebnisse des DHS-Assays mit denen des Tests gegen HIV-1, stellt man eine große Ähnlichkeit fest. Auch die HIV-1 Replikation wurde durch **46** gehemmt und ungefähr im gleichen Verhältnis geringer als GC7 **1** (s. S. 92). Die, für die erstmalig synthetisierte Verbindung **46**, erhaltenen Testergebnisse sind trotzdem ein sehr erfreuliches Resultat, da eine dosisabhängige Inhibition gefunden wurde und somit durch rationales Wirkstoffdesign ein neuartiger *Hit* zur Inhibition der DHS und HIV-1 identifiziert werden konnte.

5 Untersuchung von CNI-1493 und seiner Derivate

Mit 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** wurde im vorigen Kapitel ein neuartiger DHS-Inhibitor, der im aktiven Zentrum der Desoxyhypusinsynthese binden sollte, identifiziert, erfolgreich synthetisiert und getestet.

In diesem Kapitel werden die durchgeführte Synthese und Untersuchung von CNI-1493 **2**, einem schon bekannten Inhibitor der DHS, sowie neuer CNI-Analoga vorgestellt (vgl. S. 10-12). Mit einem IC₅₀-Wert von 2 µM ist das tetravalente Guanoylhydrazon CNI-1493 **2** relativ potent. Für **2** wurde von *Hauber et al.* durch die DHS-Inhibition eine effiziente Hemmung von HIV-1 gemessen.^[55] Interessant ist, dass **2** zu groß ist, um einerseits durch den schmalen Tunnel zum aktiven Zentrum der DHS zu gelangen und andererseits für die Bindung im aktiven Zentrum selbst (vgl. Abb. 7, S. 10). Es muss also einen anderen Wirkmechanismus für CNI-1493 geben. Bis vor kurzem waren keine Strukturinformationen des gebundenen CNI-1493 bekannt. Das in der vorliegenden Arbeit synthetisierte CNI-1493 (vgl. Kap. 5.1, S. 97ff) wurde von der Arbeitsgruppe um *R. Hilgenfeld* erstmalig mit der DHS co-kristallisiert und zeigte eine mögliche Bindungsstelle auf der Außenfläche der DHS auf (s. S. 11).^[54]

Das Ziel war somit, weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkweise von CNI-1493 zu gewinnen. Dazu wurden verschiedene Derivate synthetisiert, die dann hinsichtlich ihres Inhibitionspotentials getestet werden sollten. Aus den erhaltenen Ergebnissen sollten sich Hinweise auf die zur Aktivität benötigten Strukturelemente ziehen lassen. Zusätzlich sollte eine HPLC-Methode für CNI-1493 und dessen Derivate entwickelt werden, damit beispielsweise Hydrolyse-Studien durchgeführt werden konnten. Bevor die Derivate dargestellt wurden, wurde CNI-1493 **2** synthetisiert, da es als Positivkontrolle für die biochemischen Assays, sowie zur Co-Kristallisation mit der DHS benötigt wurde.

5.1 Synthese von CNI-1493 **2**

Die Synthese von CNI-1493 **2** ist literaturbekannt und wird deswegen im Folgenden nur kurz zusammengefasst. CNI-1493 besteht aus zwei identischen Kopfgruppen (3,5-Bis[1-(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]anilin) die über eine Amidbindung der aromatischen Aminogruppe mit Sebacinsäure (1,10-Decandisäure) verknüpft sind

(s. Abb. 97). Die Alkylkette stellt somit eine Art Linker für die beiden identischen Kopfgruppen dar. Nach der Knüpfung der Amidbindung sollten zur Synthese der Zielverbindung CNI-1493 **2** die Ketone mittels Aminoguanidin-Hydrochlorid unter Säurekatalyse in die entsprechenden Imine überführt werden. Bei Verwendung von Ethanol/Wasser 9:1 als Lösungsmittel sollte das entstehende CNI-1493 aus der Reaktionslösung in der Kälte als Hydrochlorid ausfallen und durch Filtration und Waschvorgänge mit kalten Lösungsmitteln erhalten werden.^[146]

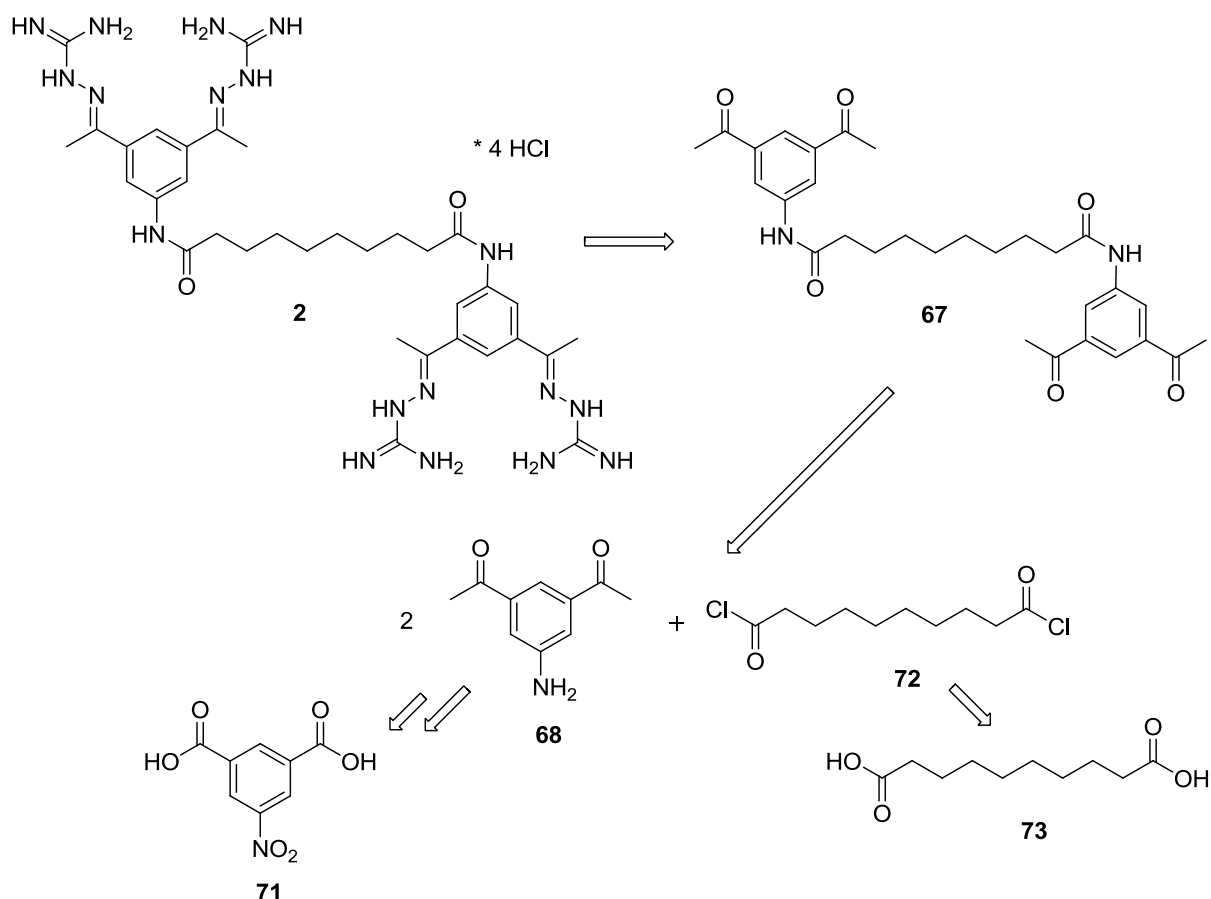


Abb. 97: Retrosynthese von CNI-1493 **2**

3,5-Diacetylanilin **68** wurde nach *Ulrich et al.* durch Reduktion von 1,3-Diacetyl-5-nitrobenzol **69** erhalten (s. Abb. 98).^[147] Bevor diese Reaktion durchgeführt werden konnte, musste zunächst die Nitroverbindung **69** dargestellt werden. Dazu wurde bereits von *U. Görbig* in seiner Dissertation festgestellt, dass die literaturbekannte Synthese über den Diethylmalonat-Grignard nicht funktionierte. Stattdessen wurde von *U. Görbig* Natriumhydrid zum Deprotonieren des Diethylmalonsäureesters **74** verwendet.^[148] Der Reaktionspartner, 5-Nitroisophthalsäurechlorid **70**, wurde aus 5-Nitroisophthalsäure **71** mit Thionylchlorid und 3 Tropfen DMF als Katalysator dargestellt. Nach Addition des Malonats wurde das Zwischenprodukt aufgearbeitet

und anschließend in einem Gemisch aus Eisessig, konz. Schwefelsäure und Wasser zum 1,3-Diacetyl-5-nitrobenzol **69** decarboxyliert. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte **69** in 29% Ausbeute erhalten werden. Diese Ausbeute konnte auch in wiederholten Versuchen nicht gesteigert werden, lag aber sehr nahe an der von U. Görbig maximal erreichten Ausbeute von 34%.^[148]

Anschließend konnte die Reduktion durchgeführt werden. Dazu wurde die Nitroverbindung **69** portionsweise in eine auf 50 °C erwärmte Lösung aus 4 Äquiv. Zinn(II)chlorid und konzentrierter Salzsäure gegeben. Nach 15 Minuten Rühren wurde die Reaktionslösung zur Neutralisation unter sehr starker Gas- und Schaumentwicklung zu einer Lösung aus Kaliumcarbonat in Eiswasser gegeben.^[147] In dieser Reaktion konnte **68** in einer Ausbeute von 98% erhalten werden.

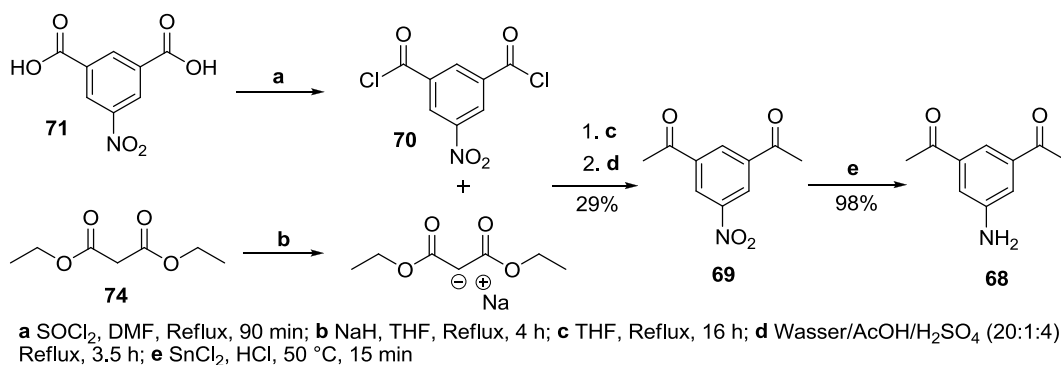


Abb. 98: Darstellung von 3,5-Diacetylanilin **68**

Die Knüpfung der Amidbindung zwischen 3,5-Diacetylanilin **68** und dem Sebacinsäurechlorid **72** wurde unter Zusatz von Pyridin durchgeführt. Erfreulicherweise fiel das gebildete Diamid **67** aus der Reaktionslösung aus. Damit beide Säurechloride vollständig abreagierten, wurden 2 Äquivalente **68** eingesetzt.^[148]

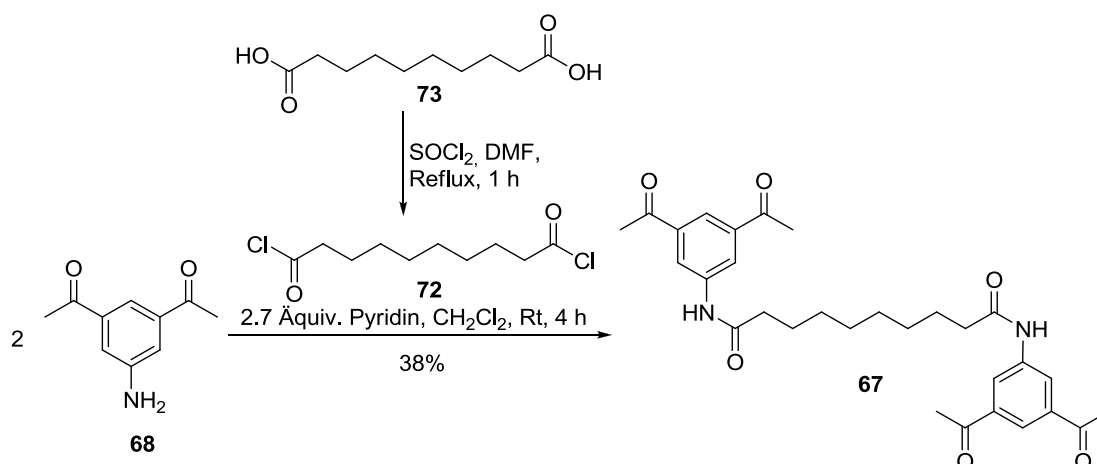


Abb. 99: Darstellung von N,N'-Bis-(3,5-diacetylphenyl)decandiamid **67**

Das ausgefallene Diamid **67** konnte nach Waschen des Niederschlags mit kaltem CH_2Cl_2 in einer Ausbeute von 38% erhalten werden. In der letzten Stufe wurde **67** mit 5 Äquivalenten Aminoguanidin-Hydrochlorid unter Säurekatalyse umgesetzt. Bei Verwendung von Ethanol/Wasser 9:1 als Lösungsmittel fiel das entstehende CNI-1493 **2** als Hydrochlorid aus der Reaktionslösung in der Kälte aus und wurde durch Waschen mit kaltem Ethanol und etwas kaltem Wasser als reiner Feststoff in einer Ausbeute von 76% isoliert (s. Abb. 100).

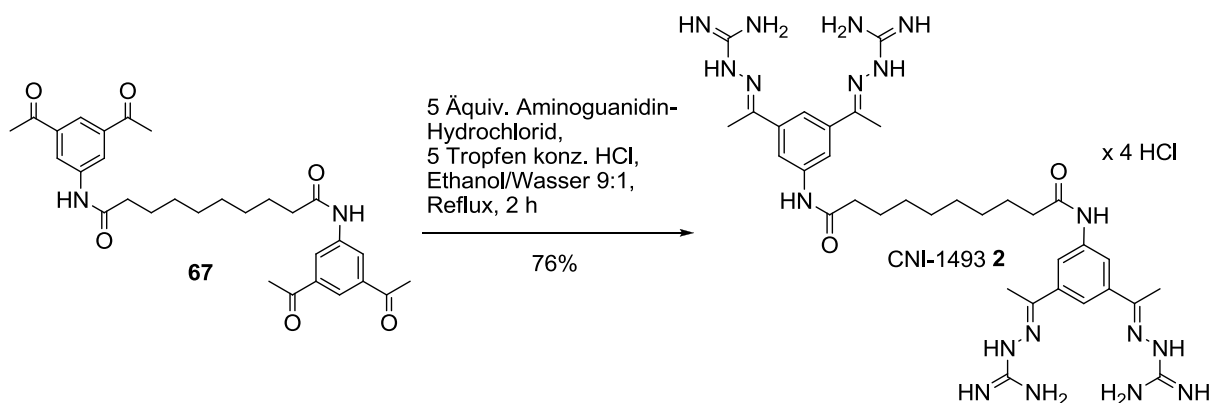


Abb. 100: Letzte Stufe der Darstellung von CNI-1493 **2**

Durch das Waschen mit Ethanol und Wasser wurde noch vorhandenes Aminoguanidin-Hydrochlorid entfernt, wobei sich das Produkt ebenfalls teilweise löste. Das ^1H -NMR-Spektrum des erhaltenen CNI-1493 **2** ist in Abb. 101 abgebildet.

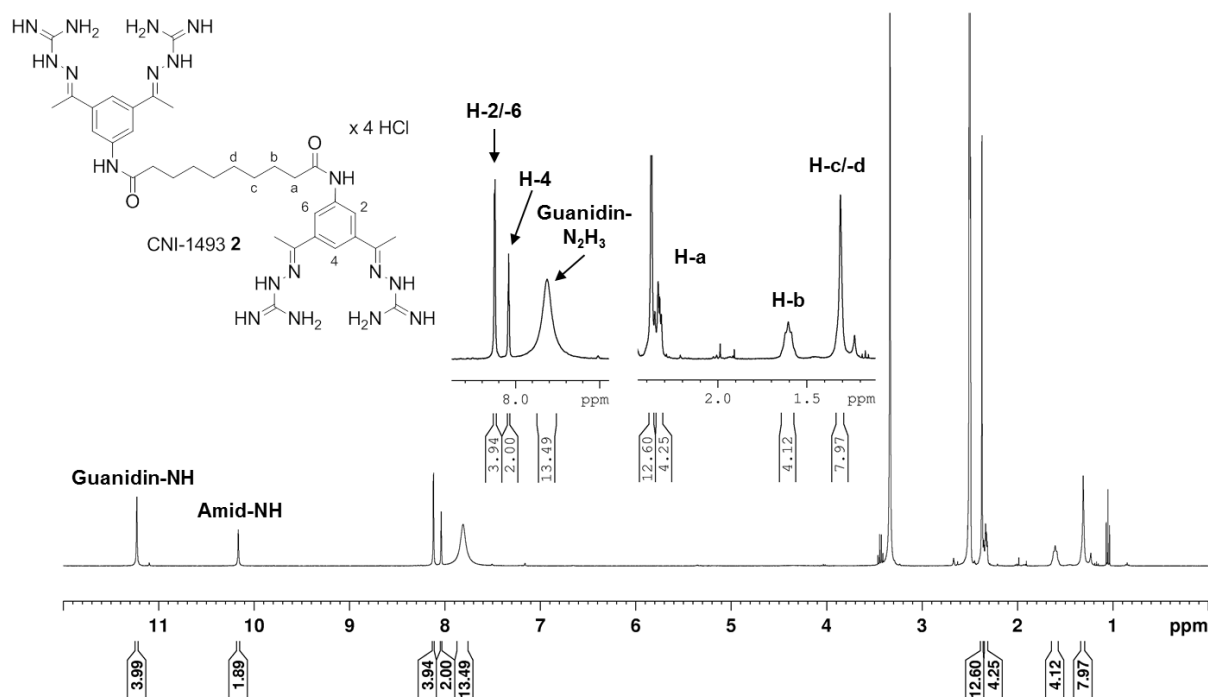


Abb. 101: ^1H -NMR-Spektrum von CNI-1493 **2** in $\text{DMSO}-d_6$

Neben den Signalen der Guanoylhydrazon-Protonen ist das Signal der vier identischen Methylgruppe bei 2.37 ppm für **2** charakteristisch. CNI-1493 **2** wurde erfolgreich dargestellt und konnte für die Co-Kristallisationsversuche und weiteren Tests eingesetzt werden (vgl. Kap. 5.3 und 5.4, S. 103-116).

5.2 Darstellung der CNI-1493 Analoga 75-87

Die Struktur von CNI-1493 **2** wurde variiert, in dem die Sebacinsäure durch andere Dicarbonsäuren als Linker ersetzt wurde (s. Abb. 102). Die Alkylkette wurde verkürzt (**75-78**), verlängert (**79-80**) und auch gegen starrere Linker, wie z. B. 1,4-Phenyl-Gruppen ausgetauscht (**82-86**). Diese Modifikationen wurden ohne bioinformatische Rechnungen vorgenommen.

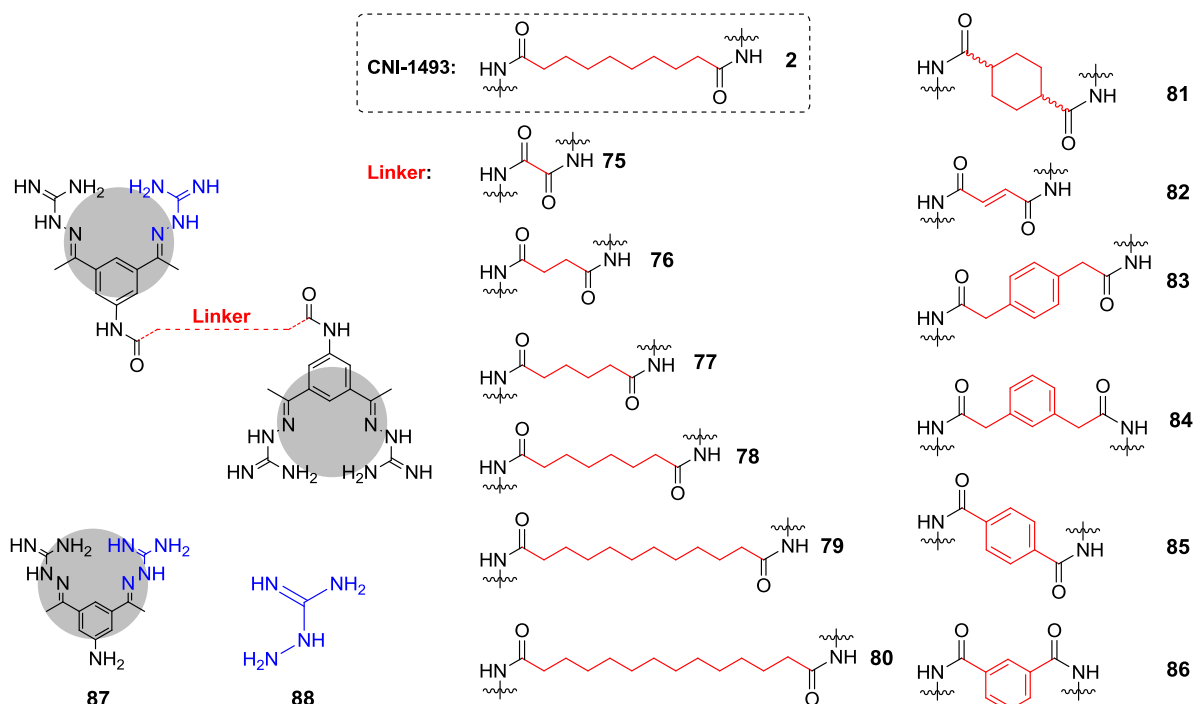
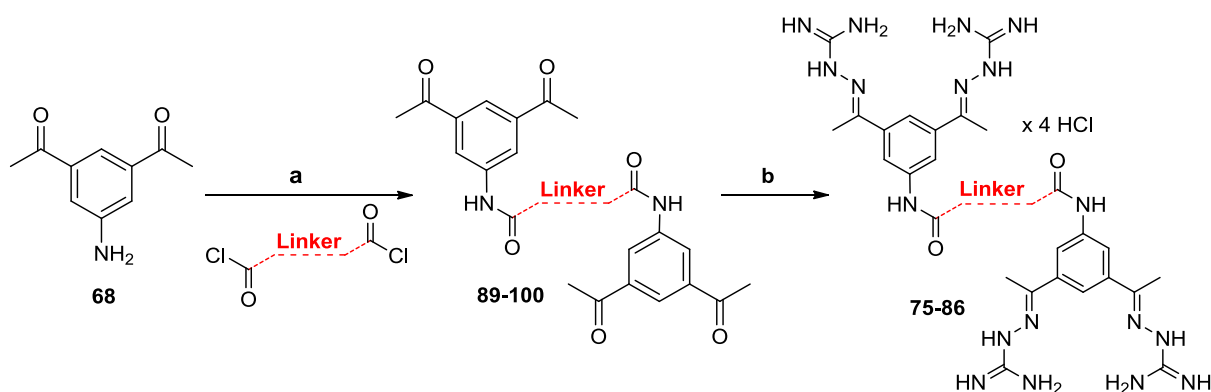


Abb. 102: Übersicht der synthetisierten CNI-1493 Analoga **75-87**^[149]

Neben der Variation des Linkers wurde mit **87** quasi eine einzelne Kopfgruppe synthetisiert. Dies sollte als Test dienen, ob auch nur eine einzelne Kopfgruppe DHS inhibierend wirkt. In der Kristallstruktur des DHS:CNI-1493 Co-Kristalls wurde zusätzlich zur gemessenen Elektronendichte des CNI auf der Außenfläche der DHS ein Aminoguanidin im aktiven Zentrum gefunden.^[54] Deswegen sollte **88** in den späteren *in vitro* Tests ebenfalls getestet werden, um auszuschließen, dass **88** einen inhibierenden Effekt besitzt.

Die Synthese der Diamide **89-100** und der CNI-Analoga **75-87** erfolgte analog der im vorigen Kapitel beschriebenen Synthese von CNI-1493 (vgl. Abb. 103).



a 2.7 Äquiv. Pyridin, CH_2Cl_2 , Rt, 4 h, 38-96%

b 5 Äquiv. Aminoguanidin-Hydrochlorid, 5 Tropfen konz. HCl, Ethanol/Wasser 9:1, Reflux, 2 h, 24-95%

Abb. 103: Schematische Übersicht der Reaktionsschritte zur Darstellung der CNI-Analoga **75-86**

Tabelle 13: Erreichte Ausbeuten bei der Darstellung der CNI-1493 Derivate **75-87**

Linker ^a	Ausbeute (Diamid)	Ausbeute (CNI-Derivat)
$(\text{CH}_2)_8$ (CNI-1493)	38% (67)	76% (2)
nur eine Kopfgruppe	-	64% (87)
$(\text{CH}_2)_0$	63% (89)	55% (75)
$(\text{CH}_2)_2$	75% (90)	95% (76)
$(\text{CH}_2)_4$	52% (91)	49% (77)
$(\text{CH}_2)_6$	63% (92)	58% (78)
$(\text{CH}_2)_{10}$	46% (93)	68% (79)
$(\text{CH}_2)_{12}$	49% (94)	36% (80)
cis/trans-Cyclohexyl	73% (95)	24% (81)
$(\text{CH})_2$	94% (96)	54% (82)
1,4-Dimethylbenzol	48% (97)	84% (83)
1,3-Dimethylbenzol	72% (98)	40% (84)
1,4-Phenyl	94% (99)	60% (85)
1,3-Phenyl	96% (100)	66% (86)

^a Position des Linkers ist in Abb. 102 und Abb. 103 schematisch dargestellt

Die Derivate konnten erfolgreich in Ausbeuten von 37-96% **89-100** und 24-95% für **75-87** dargestellt werden (s. Tabelle 13 und Abb. 102). In Ausnahmefällen waren die

Ausbeuten verhältnismäßig gering, was an der unvollständigen Bildung der Säurechloride oder an der Reinigung der Verbindungen lag, da sich die Produkte bei den Waschvorgängen teilweise ebenfalls lösten. Dagegen gab es beim Analogon **80** bzw. **94** mit Tetradecanoyl-Linker aufgrund der langen Alkylkette schon bei den Edukten Löslichkeitsprobleme.

Die Synthesen der Säurechloride für die Amidbildung machten oft Probleme, so dass auch andere Reaktionsbedingungen erprobt wurden. Es wurden die Standard-Peptidkupplungsreagenzien HOBt, HATU und TBTU ausprobiert, da bei diesen direkt die jeweilige Carbonsäure eingesetzt werden konnte. Jedoch konnte in keinem Fall ein Produkt isoliert werden. Möglicherweise ist die aromatische Aminogruppe des 1,3-Diacetylanilins **68** nicht nucleophil genug für einen Angriff auf die aktivierten Säuren. Wichtiger als eine hohe Ausbeute war die Reinheit der Verbindungen, so dass die Ausbeuteverluste in Kauf genommen wurden. Nachdem alle Verbindungen in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen, konnten sie für die weiteren Tests eingesetzt werden.

5.3 Biochemische Tests der CNI-1493 Analoga 75-87

Zur biochemischen Evaluierung der synthetisierten Verbindungen wurden verschiedene Tests durchgeführt. Der *in vitro* Assay zur Bestimmung der DHS Inhibition durch die jeweiligen CNI-Derivate wurde von *P. Priyadarshini* und *M. Krepstakies* (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) durchgeführt. Die Tests gegen HIV-1 in Zellkulturen wurden von *P. Hartjen* am Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) durchgeführt. Als erstes wurden die 12 CNI-1493 Derivate **75-86**, das verkürzte CNI **87** und Aminoguanidin **88** hinsichtlich ihrer DHS inhibierenden Wirkung untersucht (s. Kap. 9.2.1, S. 169).

5.3.1 Inhibition der DHS durch die CNI-1493 Analoga

Die Inhibition der Desoxyhypusinsynthase wurde wie zuvor *in vitro* am isolierten Enzym überprüft. Durch radioaktiv markiertes Spermidin wurde die DHS-vermittelte Übertragung der Aminobutyleinheit des Spermidins auf das Lysin an Position 50 im eIF-5A gemessen (vgl. Abb. 6, S. 9 und Kap. 9.2.1, S. 169). Bei diesen Versuchen wurde CNI-1493 **2** als Positivkontrolle verwendet.

Das verkürzte CNI-1493 Derivat **87**, sozusagen nur eine Kopfgruppe, zeigte keine Aktivität. Daraus folgt, dass mindestens zwei auf irgendeine Weise verknüpfte Kopfgruppen für die Aktivität von CNI-1493 notwendig sind. Möglicherweise ist ein komplexierender Effekt in den Wirkmechanismus von **2** involviert. Aminoguanidin **88** war in dem Assay ebenfalls inaktiv. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das im aktiven Zentrum der DHS gefundene Aminoguanidin ein Artefakt und kein gebundenes Molekül ist. Es wurde vermutet, dass CNI-1493 **2** unter den Kristallisationsbedingungen instabil ist. Dieser Hypothese sollte nach der Entwicklung einer HPLC-Methode durch Hydrolyse Untersuchungen von CNI-1493 nachgegangen werden (s. Kap. 5.4, S. 111ff).

Nun zurück zu den weiteren Testergebnissen des DHS Assays. Die meisten CNI-1493 Derivate inhibierten die DHS ähnlich effektiv wie CNI-1493 selbst (s. Abb. 104). Bei sehr langen Alkylketten wie z. B. dem Tetradecanoyl-Linker in **80** wurde eine deutlich schwächere Aktivität festgestellt, so dass hier entropische Effekte eine gute Bindung an die DHS verhindern könnten (s. Abb. 104A). Es könnte bei dieser Verbindung aber auch zu Löslichkeitsproblemen im Testmedium gekommen sein.

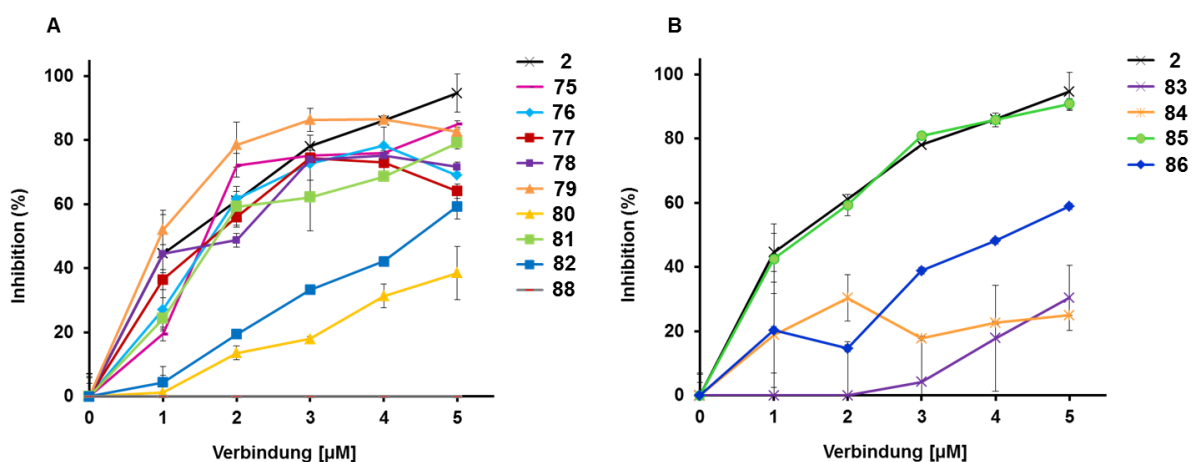


Abb. 104: Inhibition der DHS durch A) die aliphatischen CNI-Analoga **75-82, 87, 88** und B) die aromatischen CNI-Analoga **83-86**

Die Aktivität der CNI-Analoga mit mittleren Alkylkettenlängen (C_6 bis C_{12}) als Linker lag in einem ähnlichen Bereich wie die von CNI-1493. Es wurden IC_{50} -Werte um $1.5 \mu M$ bestimmt. Das Ergebnis war zu erwarten, da diese Linker den beiden Kopfgruppen eine ähnliche räumliche Flexibilität wie im CNI-1493 ermöglichen sollten.

Sehr interessant war die Aktivität von **75**, da hier die Kopfgruppen über Oxalsäure relativ starr fixiert sind. Mit Oxalsäure wurde der kürzest mögliche Linker gefunden,

da beide Kopfgruppen praktisch direkt über die Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Derivate mit dem 1,4-Phenyl- bzw. 1,3-Phenyl-Linker **85** bzw. **86** gehören ebenfalls zu den starren CNI-Analoga und zeigten auch eine gute Aktivität im DHS Assay (s. Abb. 104B, S. 104).

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der erhaltenen Kristallstruktur, da die unflexiblen Analoga nicht die dort gefundene Konformation einnehmen können. CNI-1493 **2** lag dort in einer „sandwichartigen“ Konformation vor, in der die π -Systeme der beiden Aromaten mit einem Abstand von nur 3.6 Å Stapel-Wechselwirkungen miteinander eingehen und die Alkylkette relativ beweglich sein musste, da nur eine sehr diffuse Elektronendichte für den Linker detektiert werden konnte.^[54] Um die im Kristall gefundene räumliche Anordnung von CNI-1493 mit den *in vitro* Ergebnissen des DHS-Assays in Relation zu setzen, wurden von A. Kolodzik Energieminimierungsrechnungen mit den synthetisierten CNI-Analoga **75-86** durchgeführt.^[48] Jedoch wurden dadurch keine gravierenden, neuen Erkenntnisse gefunden. Es zeigte sich allerdings, dass die energetisch günstigste Konformation von **84** der von CNI-1493 **2** in der Kristallstruktur sehr ähnlich ist (s. Abb. 105).

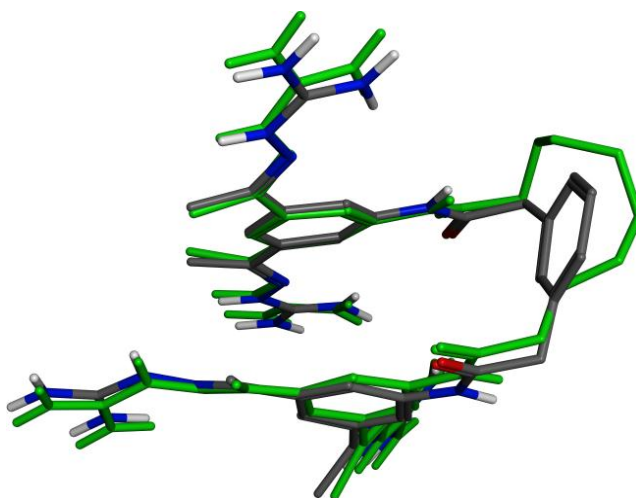


Abb. 105: In grün ist die im Kristall gefundene Konformation von CNI-1493 **2** dargestellt und mit der energetisch günstigsten Konformation von **84** in Farbe übereinandergelegt.^[149]

Jedoch zeigte **84** mit max. 30% Inhibition bis 5 μ M im Test eine niedrige Aktivität. Vielleicht ist die im Kristall gefundene Konformation nicht die biologisch aktive, was für CNI-1493 **2** kein Problem wäre, da die C₁₀-Alkylkette sehr flexibel ist. Für diese Hypothese würde auch sprechen, dass die starren CNI-Analoga **75**, **85** und **86** aktiv sind, obwohl sie die „Sandwich“-Konformation nicht einnehmen können. Möglicherweise haben die starreren CNI-Analoga aber auch einen anderen Wirkmechanismus.

5.3.2 Inhibition von HIV-1 in infizierten PM1-Zellen

Nachdem die Inhibition der DHS durch die synthetisierten CNI-Analoga **75-87** gemessen wurde, wurde die Inhibition von HIV-1 in Zellkultur bestimmt. Dazu wurden zwei Derivate mit variiertem Alkylketten-Linker **76** (C₄) und **79** (C₁₂) sowie zwei Vertreter für die starren CNI-Derivate (1,4-phenyl- **85** und 1,3-phenyl- **86**) ausgewählt. Diese vier Verbindungen besaßen eine hohe Aktivität im DHS Assay (vgl. Abb. 104, S. 104). Zusätzlich wurde CNI-1493 **2** als Positivkontrolle eingesetzt.

PM1-Zellen wurden 8 bis 10 Tage in Gegenwart der jeweiligen Verbindungen in Konzentrationen von 0.5, 1 und 2 µM oder DMSO als Negativkontrolle vorinkubiert. Wie bei den zuvor beschriebenen Tests beruhte die lange Vorinkubationszeit der Zellen in Gegenwart der Inhibitoren auf der Tatsache, dass der aktivierte Faktor eIF-5A eine sehr lange Halbwertszeit besitzt (vgl. Kap 4.1.3, S. 47 und Kap. 4.3.8, S. 91f). Nach Infektion der Zellen mit dem CCR5-tropen HIV-1 Isolat BaL wurden die Zellen für weitere 7 Tage in Gegenwart der Verbindungen kultiviert und die Viruslast durch Messen des p24-Antigen Levels im Überstand bestimmt. Parallel dazu wurde die Viabilität der Zellen über den AlamarBlue-Assay bestimmt. Wie erwartet inhibierte CNI-1493 die Virusreplikation effektiv mit einer dosisabhängigen Wirkung (vgl. Kap. 2.2.2, S. 11). Die in Abb. 106 gezeigten Ergebnisse für die CNI-Analoga **76** und **79** mit variiertem Alkylkette sind teilweise überraschend. Es wurde angenommen, dass beide ungefähr gleiche Aktivitäten zeigen würden. Das Derivat **76** mit dem 1,4-Butandisäure-Linker war mit einem IC₅₀-Wert von 0.5 - 0.7 µM sehr potent. Jedoch zeigte sich für **79** (C₁₂-Linker) keine Aktivität gegen HIV-1, was schwierig zu verstehen, geschweige denn zu erklären ist. Erfreulich war, dass alle Verbindungen in den getesteten Konzentrationen keine toxischen Effekte auf die Zellen hatten (s. untere Balkendiagramme in Abb. 106).

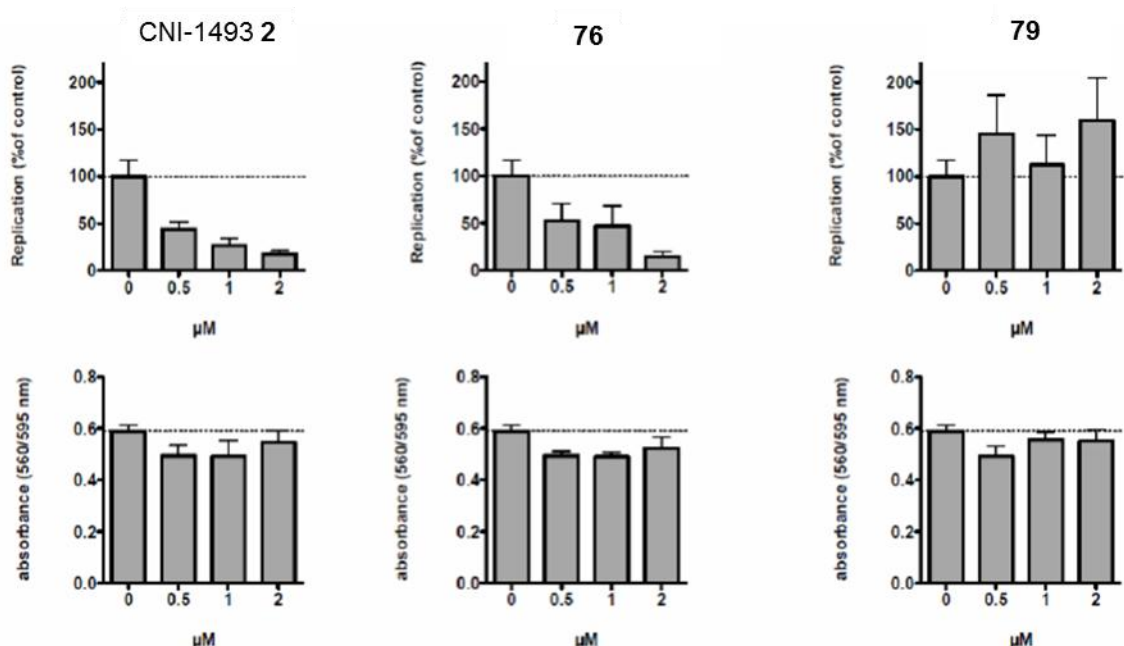


Abb. 106: Die oberen Balkendiagramme zeigen die Aktivität von CNI-1493 2 und die Aktivität der aliphatischen, flexiblen CNI-Analoga 76 und 79; die Ergebnisse aus den AlamarBlue-Assays derselben Zellkulturen sind in der unteren Reihe dargestellt (Ergebnis der Negativkontrolle schematisch durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet)

Die aromatischen, starren CNI-Analoga 85 und 86 zeigten ebenfalls keine zelluläre Toxizität in den getesteten Konzentrationen (s. untere Balkendiagramme in Abb. 107). Zusammen mit den Ergebnissen der aliphatischen CNI-Analoga ist dies ein sehr wichtiges Ergebnis. Mit der DHS wird ein zelluläres Enzym adressiert. Somit werden über die Kaskade aus DHS-Inhibition und der verhinderten Aktivierung des Proteins eIF-5A körpereigene Proteine attackiert, was möglicherweise zelluläre Prozesse negativ beeinflussen könnte. Aus der beobachteten, nicht vorhandenen Toxizität aller Verbindungen in den getesteten Konzentrationen lässt sich folgern, dass die Verbindungen in den wirksamen Konzentrationen keine negativen Einflüsse auf Zellzyklus und -proliferation zu haben scheinen.

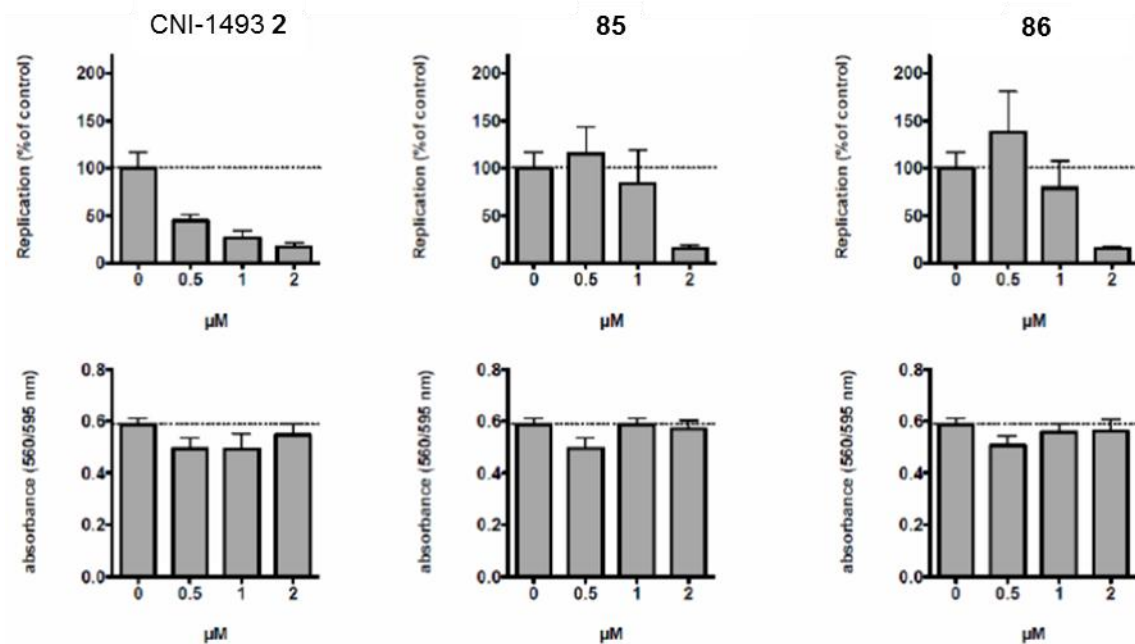


Abb. 107: Die oberen Balkendiagramme zeigen die Aktivität von CNI-1493 **2** und die Aktivität der aromatischen, starren CNI-Analoga **85** und **86**; die Ergebnisse aus den AlamarBlue-Assays derselben Zellkulturen sind in der unteren Reihe dargestellt (Ergebnis der Negativkontrolle schematisch durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet)

Die Aktivität gegen HIV-1 ist bei den beiden getesteten, starren CNI-1493 Derivaten mit IC₅₀-Werten um 1.5 μM etwas niedriger als die von CNI-1493 **2** (s. obere Balkendiagramme in Abb. 107). Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten des DHS-Assays und könnten auf einen abweichenden Wirkmechanismus der starren CNI-Analoga **85-86** hindeuten.

5.3.3 Wirkung von CNI-1493 **2** und dessen Analoga auf Pflanzenpathogene

Aufgrund vielfältiger Forschungsergebnisse scheint der eukaryotische Initiationsfaktor 5A und damit auch die DHS ein mögliches Ziel für die Therapie verschiedenster Erkrankungen zu sein (s. Kap. 2.2.3, S. 12).

Neben den angesprochenen humanen Erkrankungen spielen die Enzyme eIF-5A bzw. DHS auch bei Pflanzenpathogenen eine Rolle. So wurden im Verlauf dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um W. Schäfer (Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) interessante Ergebnisse beim Befall von Mais und Weizen durch den pathogenen Pilz *Fusarium graminearum* gewonnen.^[150] Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der DHS von Weizen sowie der des Pathogenes während der pathogenen Interaktion signifikant hochreguliert werden, vor allem in der frühen Phase der Infektion. Dies ist erneut ein Indiz dafür, dass die Transkription der DHS-Gene und damit auch die Aktivierung des Proteins eIF-5A unter

biologischem Stress erhöht ist. Der Einsatz von CNI-1493 **2** führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Inhibition der Pilzkeimung, die vollständige Inhibition wurde bei 10 μM **2** erreicht. Interessant war, dass sich die Pflanzen trotz Einwirkung von **2** währenddessen ganz normal entwickelten.

In Abb. 108 ist die Wirkung von CNI-1493 **2** am Beispiel von *F. graminearum* infizierten Maiskolben dargestellt. Für diesen Test sind die Maiskolben mit verschiedenen Sprühlösungen behandelt worden. Die gezeigten Bilder wurden vier Wochen nach der erstmaligen Infektion aufgenommen. Aus diesen Ergebnissen folgte, dass eine Inhibition der pilzeigenen DHS zu einer effizienten Inhibition der Keimung dieses Pathogens führt.

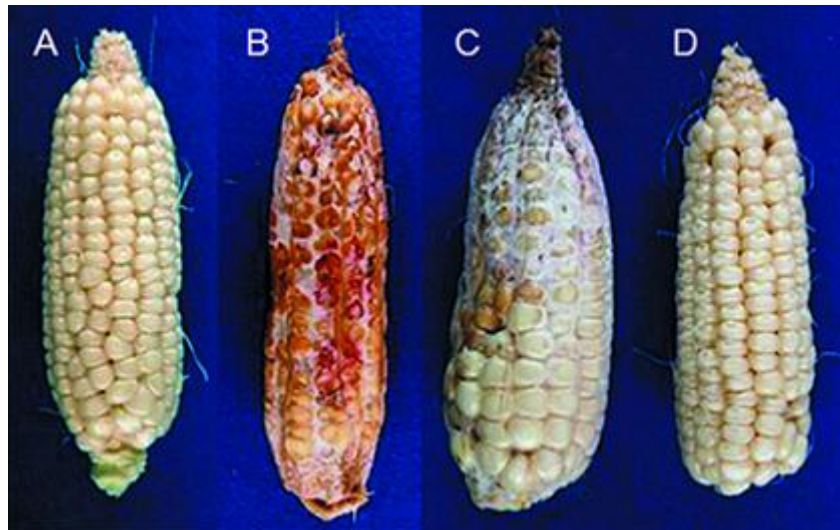


Abb. 108: CNI-1493 **2** inhibiert *F. graminearum* Infektion von Maiskolben: **A)** Negativkontrolle mit 4 mL Wasser als Sprühlösung, **B)** 4 mL 16×10^4 Wildtyp-Keime von *F. g.*, **C)** 4 mL 16×10^4 Wildtyp-Keime von *F. g.* plus 5 μM **2**, **D)** 4 mL 16×10^4 Wildtyp-Keime von *F. g.* plus 10 μM **2**.^[150]

Die synthetisierten CNI-Analoga **75-87** wurden in diesem Zusammenhang ebenfalls von der Forschergruppe am Biozentrum Klein Flottbek getestet. Zunächst wurde die Inhibition des Wachstums von *Fusarium graminearum* in Kultur getestet (s. Kap. 9.2.3, S. 170). Die Analoga wurden in Konzentrationen von 1, 5 und 10 μM eingesetzt und die Messung erfolgte 4 Tage nach der Infektion. Die erhaltenen Werte für die einzelnen CNI-1493 Derivate sind in Tabelle 14 dargestellt und im Folgenden kurz diskutiert.

Tabelle 14: Inhibition des Wachstums von *F. graminearum* durch die CNI-1493 Derivate **75-87**

CNI-Analogon	Pilzwachstum (Konzentration des CNI-Derivates)		
CNI-1493 2	69% (1 μ M)	32% (5 μ M)	0% (10 μ M)
nur eine Kopfgruppe 87	103% (50 μ M)	90% (100 μ M)	117% (200 μ M)
(CH ₂) ₀ 75	70% (20 μ M)	58% (50 μ M)	57% (100 μ M)
(CH ₂) ₂ 76	112% (1 μ M)	47% (5 μ M)	4% (10 μ M)
(CH ₂) ₄ 77	105% (1 μ M)	154% (5 μ M)	5% (10 μ M)
(CH ₂) ₆ 78	100% (5 μ M)	71% (7 μ M)	9% (10 μ M)
(CH ₂) ₁₀ 79	88% (5 μ M)	88% (7 μ M)	26% (10 μ M)
(CH ₂) ₁₂ 80	105% (1 μ M)	82% (5 μ M)	30% (10 μ M)
cis/trans-Cyclohexyl 81	78% (1 μ M)	5% (5 μ M)	0% (10 μ M)
(CH) ₂ 82	102% (20 μ M)	53% (50 μ M)	57% (100 μ M)
1,4-Dimethylbenzol 83	116% (1 μ M)	58% (5 μ M)	0% (10 μ M)
1,3-Dimethylbenzol 84	114% (1 μ M)	78% (5 μ M)	0% (10 μ M)
1,4-Phenyl- 85	143% (20 μ M)	97% (50 μ M)	81% (100 μ M)
1,3-Phenyl- 86	81% (20 μ M)	77% (50 μ M)	65% (100 μ M)

Interessant ist, dass in diesem Fall die starren CNI-Analoga **75**, **85** und **86** nahezu keine Aktivität zeigten, dafür aber **83** und **84**. Obwohl das Enzym DHS ein evolutionär hochkonserviertes Protein ist, könnte es strukturelle Unterschiede geben, durch die andere Derivate hier eine höhere Bindungsaffinität haben als beispielsweise bei der humanen DHS (vgl. Kap. 5.3.1, S. 103ff). Vergleicht man die Wirkung von CNI-1493 **2** auf die verschiedenen Desoxyhypusinsynthesen, so wurde festgestellt, dass CNI-1493 **2** die DHS von *F. graminearum* generell schwächer hemmt als die humane DHS.^[150]

Das verkürzte CNI-1493 Derivat **87** war sogar bei 200 μ M völlig inaktiv, so dass hiermit nochmal bestätigt wurde, dass zwei verknüpfte Kopfgruppen für die Aktivität benötigt werden. Von den getesteten Verbindungen waren vier Verbindungen so aktiv wie CNI-1493 **2**, und mit Verbindung **81** wurde ein CNI-Analogon gefunden, das schon bei 5 μ M eine nahezu vollständige Inhibition der DHS des Pflanzenpathogens zeigte (s. Tabelle 14). Die weiteren Tests von **81** in Pflanzenexperimenten waren zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht beendet und werden in Kürze abgeschlossen.

5.4 Untersuchung der Hydrolyse von CNI-1493 **2**

Die Beobachtung des Aminoguanidinfragments im aktiven Zentrum der DHS im DHS:CNI-1493 Co-Kristall^[54] warf die Frage auf, ob dieses durch Hydrolyse von CNI-1493 **2** entstanden war (s. S. 103). Aus chemischer Sicht ist die Iminfunktion die labilste Stelle von **2** und eine basische Hydrolyse zurück zum Keton eine denkbare Reaktion. Generell war jedoch über die Stabilität von CNI-1493 in den verwendeten Puffersystemen und auch im Zellmedium zur Zeit der Anfertigung dieser Arbeit noch nichts bekannt. Aus früheren Beobachtungen war bekannt, dass die Stammlösung von CNI-1493 in Dimethylsulfoxid nach sehr häufigem Auftauen/Einfrieren ihre Aktivität verlor. Um weitere Informationen zu gewinnen, sollte zunächst eine Analysemethode für die Hydrolyse von **2** etabliert werden. Anschließend sollten Hydrolysestudien in verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden.

5.4.1 Entwicklung einer HPLC-Methode

Als Methode der Wahl wurde die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mit UV-Detektion gewählt. Da das tetravalente Guanoylhydrazon **2** eine sehr polare Verbindung ist, sollte die *Reversed Phase*-Chromatographie (RP-Chromatographie) benutzt werden. Bei dieser Art der HPLC werden mit Alkylketten modifiziertes Kieselgel als unpolare, stationäre Phase und im Normalfall Wasser/Acetonitril-Mischungen als mobile Phase verwendet. Zunächst wurde ein UV-Spektrum von **2** gemessen, wobei eine intensive Absorption im Bereich zwischen 260 und 280 nm festgestellt wurde. Anhand dieses Ergebnisses wurde der interne Standard ausgesucht. In den meisten Fällen wird in unserer Arbeitsgruppe 3'-Azidothymidin (AZT) als interner Standard bei Hydrolysen von Nucleotidprodrugs verwendet. AZT hat ein Absorptionsmaximum bei 264 nm und konnte deswegen auch hier verwendet werden.

Als nächstes konnte die eigentliche HPLC-Methode entwickelt werden. Es zeigte sich, dass Wasser/Acetonitril als Eluent ungeeignet war. Aufgrund der vier geladenen Guanidinogruppen war die Verwendung eines Puffersystems notwendig. Zur Untersuchung der Hydrolyse der von *Jessen et al.* entwickelten Nucleosiddiphosphatprodrugs wird Tetrabutylammoniumhydroxid-Puffer bei pH 7.0 für die HPLC verwendet.^[151] Jedoch war auch dieser Puffer für den gewünschten

Zweck ungeeignet, da nur ein viel zu breiter Peak beim Eluieren des CNI-1493 **2** erhalten wurde. Als Drittes wurde ein 10 mM Ammoniumformiat-Puffer mit pH 3.0 erprobt. In diesem Puffer sollten die Guanidinogruppen vollständig protoniert vorliegen und es zu präzisen Peaks kommen. Die Tendenz war gut, aber die Puffer-Konzentration noch nicht hoch genug. Erst mit 100 mM Ammoniumformiat-Puffer (pH 3.0) wurden reproduzierbar gute Ergebnisse erhalten, wobei CNI-1493 immer ein minimales *Tailing* zeigte. Als Säule wurde eine Nucleodur® C18 Gravity (EC 125/4.6, 5 µm) der Firma Macherey-Nagel benutzt. Das Kieselgel ist vollständig Oktadecyl-modifiziert und bietet durch die hohe Basendesaktivierung eine gute Stabilität gegenüber basischen, Stickstoffhaltigen Analyten wie z. B. **2**.

Nachdem eine geeignete Säule und eine geeignete mobile Phase gefunden worden waren, wurde der Gradient zur Trennung optimiert. Ein Gradient von 5% auf 44% Acetonitril über 12 Minuten bei einer Flussrate von 1.3 mL/min war zur Trennung von AZT und CNI-1493 **2** in scharfe Peaks am besten geeignet. Wie zuvor erwähnt, wurde aber bei **2** stets ein minimales *Tailing* beobachtet. Mit der Methode waren schließlich alle benötigten Bausteine für eine erfolgreiche Analytik der Hydrolyse von CNI-1493 vorhanden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

5.4.2 Hydrolyse von CNI-1493 **2**

Es wurde eine 5 µM CNI-1493 Stammlösung in DMSO angesetzt, bei -26 °C gelagert und zur Entnahme der Aliquote jeweils wieder aufgetaut. Die einzelnen Hydrolyselösungen enthielten 0.1 µM **2** bzw. 0.2 µM AZT. In Tabelle 15 sind die getesteten Puffer aufgelistet (s. Kap. 9.3, S. 171). Als Simulation für die biochemischen Assays in Zellkultur wurde RPMI-Medium verwendet (Nr. 3). Zeile 4 entsprach dem Puffer, der von *Hilgenfeld et al.* für die Kristallisationsexperimente verwendet wurde.^[54] Zusammen mit dem Glycin-Puffer, der in den *in vitro* DHS-Inhibitions-Assays verwendet wurde (Zeile 5), waren die biochemischen Testbedingungen komplett (s. Kap. 5.3, S. 103ff). Um die CNI-Hydrolyse bei verschiedenen pH-Werten, aber in dem gleichen Puffer zu untersuchen, wurde ein Phosphatpuffer verwendet. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur und bei 37 °C statt.

Tabelle 15: Pufferbedingungen zur Untersuchung der Hydrolyse von CNI-1493

Nr.	Puffer	pH-Wert	Nr.	Puffer	pH-Wert
1	DMSO	-	8	PBS ^d	6.0
2	Wasser	7.0	9	PBS ^d	6.8
3	RPMI-1640 ^a	7.2	10	PBS ^d	7.5
4	Tris ^b	8.5	11	PBS ^d	8.5
5	Glycin ^c	9.0	12	PBS ^d	9.0
6	PBS ^d	1.9	13	PBS ^d	11.0
7	PBS ^d	4.0			

^a RPMI-1640/Hitze inaktiviertes FCS (10%), 37 °C; ^b 100 mM Tris, 63% 2-Methyl-2,4-pentandiol, 3 mM NAD⁺, Rt; ^c 300 mM Glycin, 37 °C; ^d 50 mM Phosphatpuffer, 37 °C.

Es zeigte sich, dass für CNI-1493 im Sauren (pH 1.9-6.8) nach 120 h noch keinerlei Hydrolyse detektiert werden konnte. Unter neutralen bis basischen Bedingungen dagegen wurde eine schrittweise Hydrolyse detektiert. Unabhängig vom eingesetzten Puffer waren die Hydrolyseprodukte lipophiler als **2**, sie eluierten stets bei späteren Retentionszeiten an der RP-HPLC (s. Abb. 109 und Abb. 110).

Da die Retentionszeiten der detektierten Hydrolyseprodukte in Abhängigkeit des Inkubationspuffers differierten, wurde zunächst vermutet, dass es sich je nach Puffer um andere Produkte handeln müsste. Um diesen Sachverhalt aufzuklären wurden LC-MS Messungen durchgeführt. Die Peaks der Hydrolyseprodukte ließen sich mittels LC-MS charakterisieren und es zeigte sich, dass diese unabhängig vom Inkubationspuffer identisch waren (vgl. Abb. 111, S. 115).

Über AZT als internem Standard konnte eine relative Bestimmung der Halbwertszeit in den entsprechenden Puffern durchgeführt werden. Es wurden aber nur Einfachbestimmungen vorgenommen, so dass die Halbwertszeiten keine absoluten Werte darstellen. Außerdem wurden in manchen Fällen keine Basislinien-getrennten Peaks erhalten. Mit einer Halbwertszeit von ca. 140 h verlief die Hydrolyse in reinem DMSO bei 37 °C langsamer als in der DMSO/Wasser 1:1 Mischung (ca. 87 h). Exemplarisch sind die Chromatogramme der Hydrolyse von **2** in DMSO/Wasser in Abb. 109 dargestellt. Die Abnahme des Peaks von CNI-1493 über die Zeit ist deutlich zu erkennen.

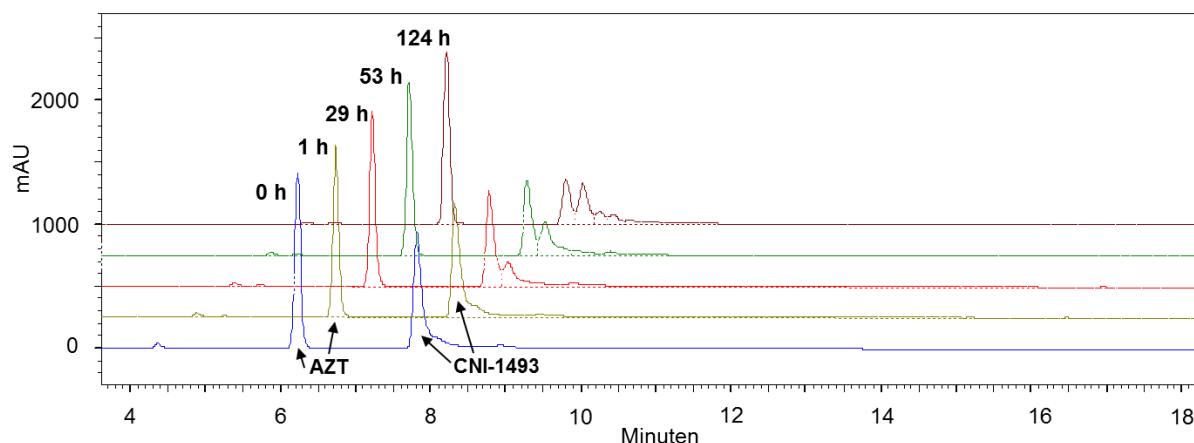


Abb. 109: Chromatogramme der Hydrolyse von **2** in DMSO/Wasser bei 37 °C

Zusammenfassend führten die Hydrolyseuntersuchungen in basischem PBS-Puffer zu ähnlichen Chromatogrammen, nur verlief die Hydrolyse mit Halbwertszeiten bis mindestens 45 h schneller, je höher der pH-Wert des Puffers war. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation bei Rt und bei 37 °C zu erkennen (Puffer-Nr. 10-13, Tabelle 15, S. 113).

Interessant war, dass die Retentionszeiten der Hydrolyseprodukte in Glycin-Puffer weiter auseinander lagen als bei der Inkubation in DMSO/Wasser oder PBS-Puffer (s. Abb. 110). Zusätzlich scheint die Halbwertszeit nicht nur vom pH-Wert sondern auch vom verwendeten Puffer abhängig zu sein. Für den im *in vitro* DHS-Inhibitions-Assay verwendeten Puffer ergab sich eine ungefähre Halbwertszeit von 139 Stunden. Dieser Wert ist relativ groß im Vergleich zu der Halbwertszeit von **2** im PBS-Puffer bei pH 9.0.

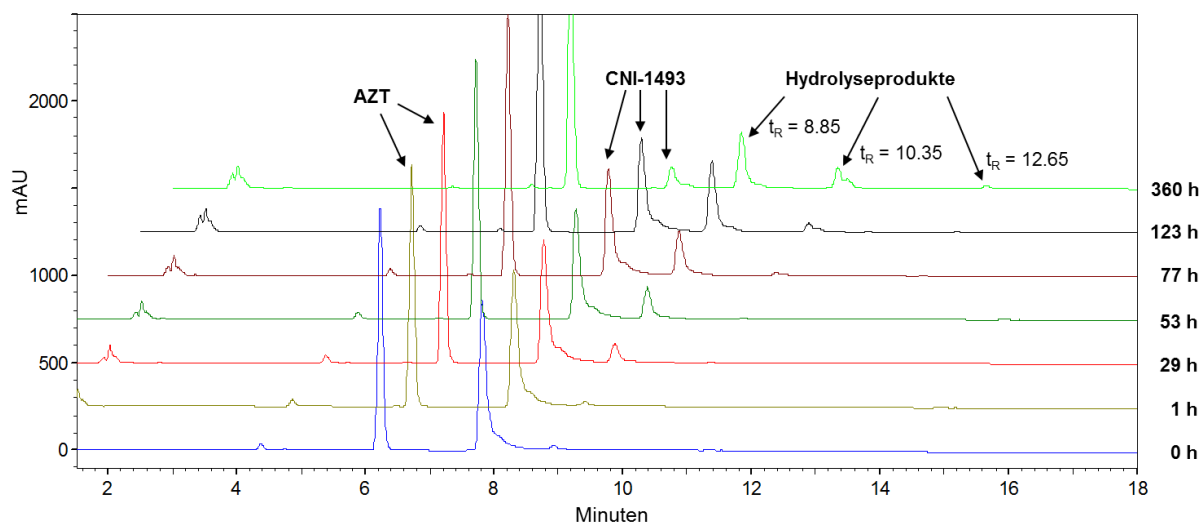


Abb. 110: Chromatogramme der CNI-1493 Hydrolyse in 300 mM Glycin-Puffer (pH 9.0) bei 37 °C

In diesen Chromatogrammen erkennt man deutlich die Bildung von drei lipophileren Hydrolyseprodukten. Über HPLC gekoppelte ESI-Massenspektrometrie konnten zwei der Hydrolyseprodukte identifiziert werden: Mit einer Retentionszeit von $t_R = 8.85$ min handelt es sich um das Monoketon und mit $t_R = 10.35$ min um das Diketon (vgl. Abb. 111). Aufgrund der massenspektrometrischen Analyse konnte nicht genau gesagt werden, welche Iminbindungen sukzessive hydrolysiert wurden. Hierzu müssten MS-MS-Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen die Fragmente der Ionen untersucht werden. Das dritte Hydrolyseprodukt wurde nicht per LC-MS zugeordnet, aber mit einer Retentionszeit von 12.65 Minuten sollte es sich um das Triketon handeln.

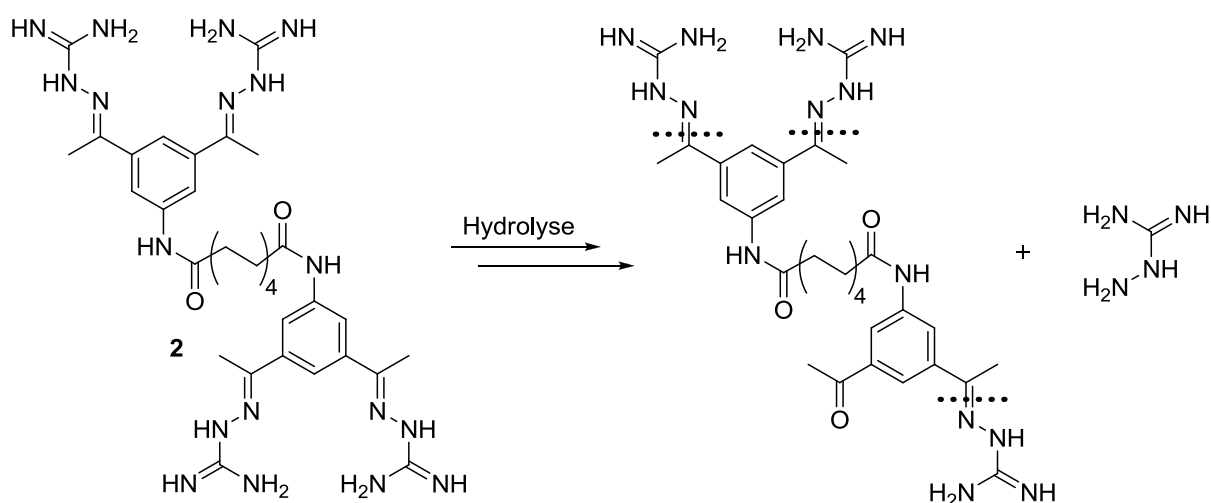


Abb. 111: Schematische Darstellung der Hydrolyse von CNI-1493 **2**

Bei Einsatz des ebenfalls basischen Tris-Puffers, der für die Kristallisation eingesetzt wurde, konnte hingegen eine sehr schnelle Hydrolyse von **2** detektiert werden. Problematisch war die hohe Viskosität des 2-Methyl-2,4-pentandiols sowie der 3 mM NAD, die als Zusätze im Kristallisationspuffer enthalten waren. Dadurch kam es zu einem starken Tailing der Verbindungen und dem dominanten Peak für das NAD. Trotzdem war deutlich zu erkennen, dass schon nach 3.5 Tagen nahezu kein CNI-1493 mehr vorhanden war. Dadurch, dass die Inkubation der kristallisierten DHS mit CNI-1493 in dem gleichen Tris-Puffer über 48 h durchgeführt wurde, lässt sich die Beobachtung des Aminoguanidin-Fragments in der Kristallstruktur mit den durchgeführten Hydrolysestudien erklären.

Die Untersuchungen der Hydrolyse im RPMI-Medium ergaben, dass CNI-1493 mindestens über vier Tage keinerlei Hydrolyse zeigte. Somit ist die Stabilität von CNI-1493 während der biochemischen Tests in Zellkultur gegeben. Abschließend

wurde noch festgestellt, dass die stetige Wiederholung von Einfrieren/Auftauen über die Zeit ebenfalls zur Hydrolyse von **2** führte. Jedoch sind damit lange Zeiträume über ca. 6 Monate gemeint, abhängig von der Häufigkeit des Auftauens. Es ist also ratsam, die Stammlösung zukünftig direkt zu aliquotieren.

5.5 Fazit: Synthese und Untersuchung der CNI-1493 Derivate

Es wurden vierzehn CNI-Analoga, in denen der Linker zwischen den beiden Kopfgruppen variiert wurde, erfolgreich synthetisiert (s. S. 101f). Bei deren Synthesen wurde festgestellt, dass Peptidkupplungsreagenzien zur Synthese der Amidbindungen nicht geeignet waren (s. S. 102).

Die Untersuchung der DHS-Inhibition wurde von *P. Priyadarshini* und *M. Krepstakies* durchgeführt und ergab für die meisten CNI-1493 Derivate mit CNI vergleichbare Inhibitionswerte. In den Tests konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei auf irgendeine Weise verknüpfte Kopfgruppen für die Aktivität von CNI-1493 notwendig waren. Als kürzest-möglicher Linker stellte sich der Oxalyl-Linker heraus (s. S. 104). Eine zu lange Alkylkette (C₁₄) führte möglicherweise durch entropische Effekte zu einer schlechteren Aktivität. Da die aktiven, starren CNI-Analoga **75**, **85** und **86** nicht in der Lage sind, die in der Kristallstruktur gefundene Konformation einzunehmen, ist anzunehmen, dass es noch einen anderen Wirkmechanismus dieser Analoga gibt (S. 104f). Die Inhibition von HIV-1 in Zellkultur durch die CNI-Analoga wurde von *P. Hartjen* durchgeführt und zeigte bis auf eine Ausnahme eine hohe Übereinstimmung in den Aktivitäten der Verbindungen mit den Resultaten des DHS-Assays (s. S. 107f).

Die Tests gegen das Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* zeigten etwas andere Ergebnisse. Eine Inhibition des Pilzwachstums über eine Hemmung der DHS von *F. graminearum* war bei den starren CNI-Analoga nahezu nicht vorhanden (s. S. 110). Von den getesteten Verbindungen waren vier Verbindungen so aktiv wie CNI-1493 und mit **81** wurde eine Verbindung gefunden, die schon bei 5 µM eine nahezu vollständige Inhibition der DHS des Pflanzenpathogens zeigte.

Im dritten Abschnitt wurde eine Methode zur Analyse der Hydrolyse von CNI-1493 **2** mit Hilfe der HPLC entwickelt (s. S. 111f). Im Sauren war **2** über mindestens 5 Tage stabil, dagegen wurde im neutralen bis basischen Milieu eine schrittweise Hydrolyse der Iminbindungen zu den entsprechenden Ketonen beobachtet und mittels LC-MS verifiziert (s. S. 114f). Je höher die Basizität des Puffers, desto schneller verlief die

Hydrolyse. Unterschiedliche Puffer führten bei gleichem pH-Wert zu verschiedenen Halbwertszeiten. Der pH-Wert hatte einen deutlich größeren Einfluss als die Temperatur. Eine Hydrolyse der Amidbindung konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Durch die Untersuchung der Hydrolyse von **2** im Kristallisationspuffer konnte das von *Hilgenfeld et al.* in der Kristallstruktur des DHS:CNI-1493 Co-Kristalls^[54] gefundene Aminoguanidinfragment mit der Hydrolyse der Iminbindungen von CNI-1493 erklärt werden (s. S. 115). Unterstützend kam hinzu, dass für Aminoguanidin **88** keine DHS-Aktivität gemessen wurde, so dass das im aktiven Zentrum der kristallisierten DHS gefundene **2** ein Artefakt aus der Hydrolyse von CNI-1493 unter den Inkubationsbedingungen war (s. S. 104).

6 Carcinogenese durch aromatische Amine

In diesem Kapitel wird ein gänzlich anderer Teil dieser Arbeit beschrieben werden. Im Gegensatz zur HIV-Forschung in den Kapiteln 4 und 5 ist der Hintergrund dieses Kapitels die Entstehung von Krebs durch aromatische Amine. Im Organismus können aromatische Amine durch unbeabsichtigte Giftungsreaktionen zu ultimalen Carcinogenen metabolisiert werden (s. Kap. 2.5.1, S. 18ff). Diese elektrophilen Aminierungsreagenzien können dann kovalent an die DNA oder andere Biomoleküle binden und beispielsweise bei Versagen der zelleigenen Reparaturmechanismen zur Entstehung von Krebs führen. In der Vergangenheit wurden u. a. in unserer Arbeitsgruppe bereits viele Studien zu diesen Arylaminaddukten der Purinbasen durchgeführt.^[87,90,92,152-154] Jedoch gibt es noch immer interessante Ansatzpunkte, zu denen weiterer Forschungsbedarf besteht. In diesem Kapitel werden drei der zu dem Thema der Arylaminaddukte durchgeführten Teilprojekte diskutiert:

- Erstens die Versuche zur Erschließung der neuen Verbindungsklasse der C5-Arylamin-modifizierten 2'-dC-Addukte,
- zweitens die Synthese von N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten und deren Einbau in Oligonucleotide und
- drittens die Darstellung von Triphosphaten der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte

6.1 Versuche zur Darstellung von C5-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxycytidin-Addukten

Neben den bekannteren und teilweise bereits gut untersuchten DNA-Addukten vom 2'-Desoxyguanosin und 2'-Desoxyadenosin berichteten *Skipper et al.* im Jahre 2007 über die massenspektrometrische Identifizierung eines *in vitro* gebildeten C5-(3,5-Dimethylanilin)-2'-dC Adduktes.^[86] Da dieser Addukttyp zuvor noch nicht bekannt war und bis heute noch keine chemische Syntheseroute veröffentlicht war sollte ein Zugang zu den C5-2'-dC Addukten entwickelt werden (s. Abb. 112 und Abb. 118, S. 122).

Da die Buchwald-Hartwig Kreuzkupplungsreaktion bereits zur Darstellung von Purinbasen-Addukten (2'-dG und 2'-dA) etabliert war, sollte diese auch hier zur Einführung der Arylamingruppe erprobt werden (vgl. Kap. 2.5.2, S. 20).

6.1.1 Darstellung von C5-Halogen-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dC

In Abb. 112 ist die ausgehend vom 2'-dC **106** gewählte Route zur Darstellung von geschütztem C5-Arylamin-2'-dC retrosynthetisch dargestellt.

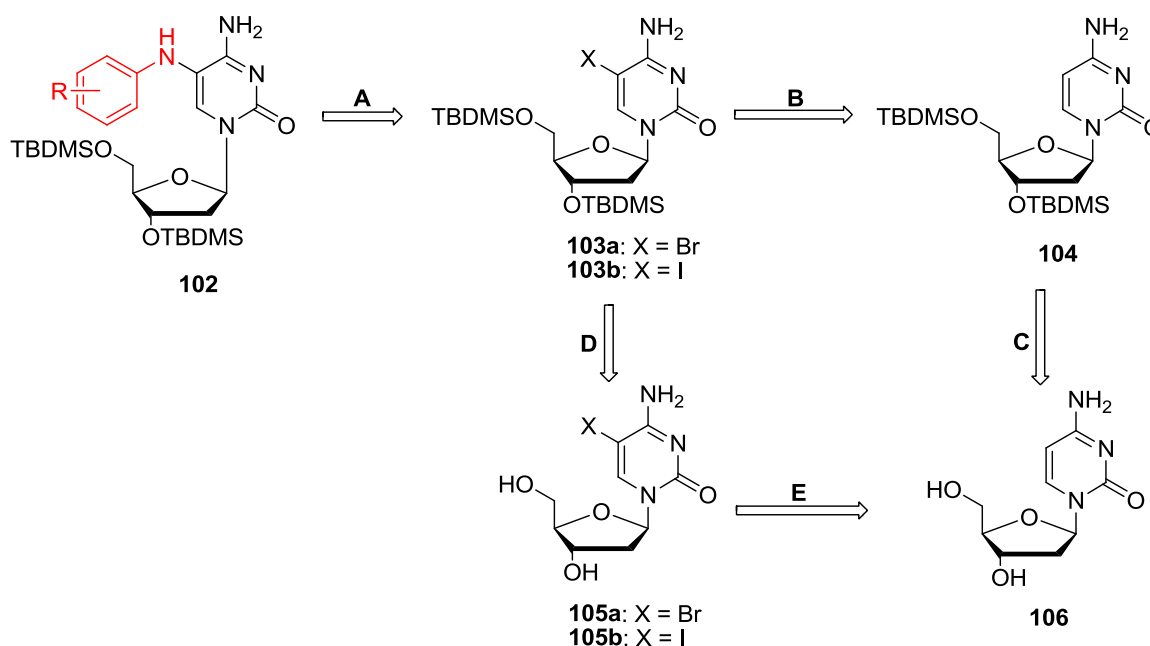


Abb. 112: Retrosyntheseschema zur Darstellung von C5-Arylamin-modifiziertem-2'-dC **102**

Das Arylaminderivat **102** sollte über eine Buchwald-Hartwig-Kupplung aus den geschützten und halogenierten Nucleosiden **103a** und **103b** erhalten werden (**A**). Zur Darstellung von C5-Halogen-3,5-Bis-O-(TBDMS)-2'-dC **103a** bzw. **103b** wurden zwei Wege verfolgt: Zum einen sollte **104** an C5-halogeniert werden (**B**) nachdem die Hydroxylgruppen von 2'-Desoxycytidin **106** mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid geschützt wurden (**C**) und zum anderen sollten die TBDMS-Schutzgruppen nach der Einführung des Halogenids eingeführt werden (**D,E**).

Die Versuche zur Darstellung von 5-Brom-2'-desoxycytidin **105a** konzentrierten sich zunächst auf Darstellungsmethoden, die nach *N. Böge* bei der Darstellung von C8-Brom-2'-dG erfolgreich waren.^[90] Dies war zum einen eine Reaktion unter zu Hilfenahme von Ultraschall und zum anderen ein Ansatz im Lösungsmittel DMF, um die Bromierung mit Hilfe von *N*-Bromsuccinimid (NBS) durchzuführen.^[155]

Ein weiterer Versuch war die Umsetzung von **106** mit NBS in der Mikrowelle bei 100 W und 150 W. Die drei Methoden führten entweder zur Zersetzung oder zu unerwünschten Reaktionen, bei denen das gewünschte Produkt nicht erhalten werden konnte. Ein vierter Ansatz war die Bromierung mit NBS in einer Ionischen Flüssigkeit. Nach *Kumar et al.* können Nucleoside in Ionischen Flüssigkeiten (IF) auf Imidazol-Basis mit Hilfe von *N*-Halogen-Succinimiden halogeniert werden.^[156] Ein Problem war hier die Abtrennung der Reagenzien vom Produkt, so dass **105a** etwas verunreinigt mit einer Ausbeute von 87% erhalten wurde (s. Abb. 113).

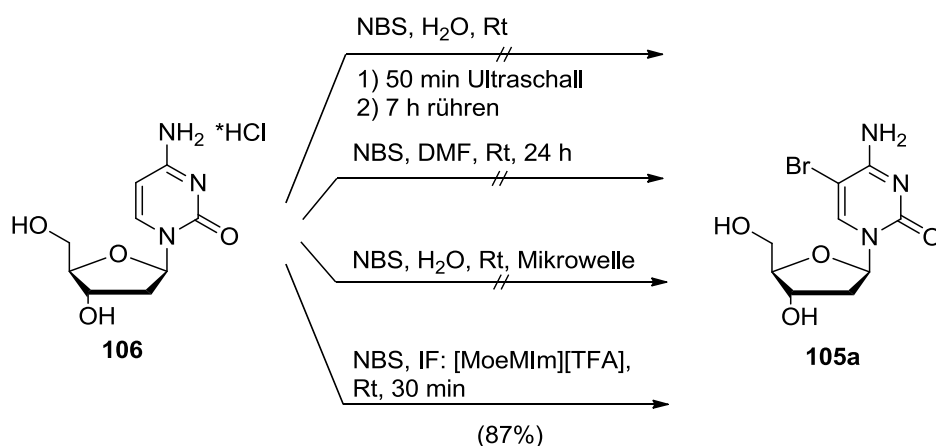


Abb. 113: Darstellung von 5-Brom-2'-dC **105a**

Der Syntheseweg zur Darstellung der ionischen Flüssigkeit ist in Abb. 114 dargestellt. Es wurde zunächst Methylimidazol mit Chlorethylmethylether unter Stickstoffatmosphäre umgesetzt. Die Reaktion erfolgte mit einer Ausbeute von 98% nahezu quantitativ. Im zweiten Reaktionsschritt wurde bei dem erhaltenen 1-(2-Methoxyethyl)-3-methyl-imidazolium-chlorid **107** durch die Umsetzung mit Natriumtrifluoracetat das Gegenion ausgetauscht. Der Austausch der Gegenionen erfolgte mit einer Ausbeute von mindestens 78%, wobei das Produkt **108** aufgrund seiner hohen Polarität auch mit einem hohen Methanol-Anteil in der mobilen Phase nicht vollständig von der Kieselgelsäule eluiert werden konnte.

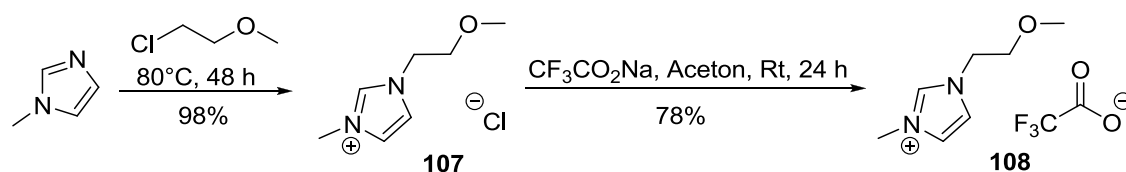


Abb. 114: Darstellung der Ionischen Flüssigkeit [MoeMIm][TFA] **108**

Da sich die Synthese von 5-Brom-2'-dC **105a** als schwierig herausstellte, wurden die Syntheseschritte umgedreht und zunächst die TBMDs-Schutzgruppen unter Standardbedingungen mit einer Ausbeute von 91% eingeführt (s. Abb. 115).

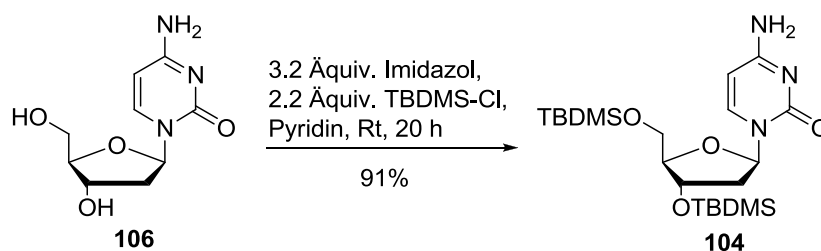


Abb. 115: Darstellung von 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dC **104**

Für die Bromierung von **104** wurden zwei Verfahren gewählt (s. S. Abb. 116). Zum einen wurde ein Reaktionsansatz mit NBS in absolutem DMF in einer Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zum anderen wurde eine Methode nach *Prakash et al.* gewählt, bei dem **104** zunächst in Acetonitril suspendiert wird und anschließend LiBr und Ammoniumcer(IV)nitrat zugesetzt werden. Diese Reaktionsbedingungen zeigten sich mit einer Ausbeute an **103a** von 52% als Methode der Wahl.^[157]

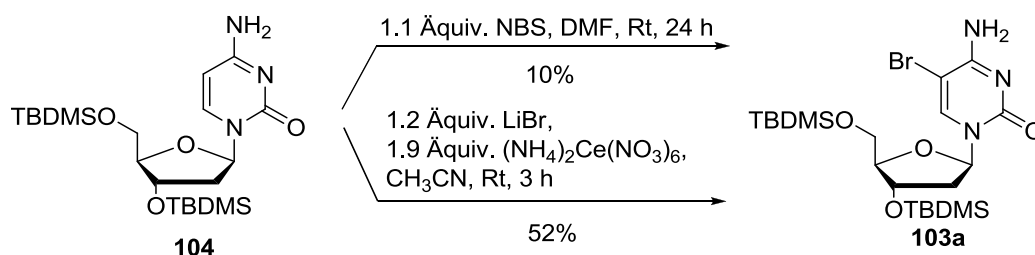


Abb. 116: Bromierung zur Darstellung von 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a**

Aus den Ergebnissen folgt, dass es zur Darstellung von **103a** effektiver ist, zuerst die TBDMS-Schutzgruppen einzuführen und anschließend zu bromieren.

Um einen Überblick über die Möglichkeiten der Buchwald-Hartwig-Kupplung bei diesem System zu erhalten, wurde zusätzlich versucht, auch iodierte Verbindungen als Edukte für die C-N-Kreuzkupplung zu erhalten. Die Iodierung von **104** erfolgte mit Hilfe von Iodmonochlorid unter den Reaktionsbedingungen von *McGuigan et al.* in Methanol bei Raumtemperatur.^[158] Nach anschließender basischer Aufarbeitung wurde **103b** mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 3% isoliert.

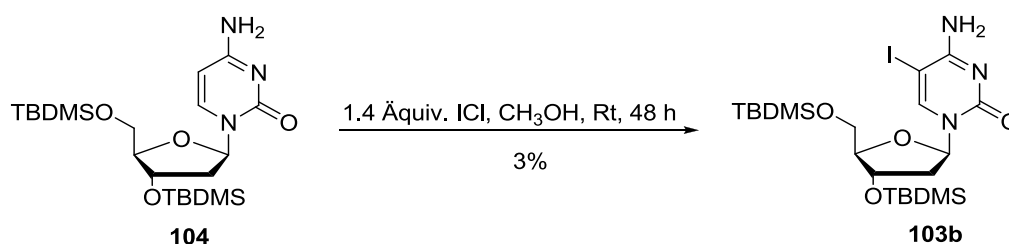


Abb. 117: Iodierung zur Darstellung von 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-dC **103b**

Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Aufarbeitung sollte die Ausbeute erhöhen. Jedoch war die erhaltene Menge zunächst ausreichend für die Erprobung der Kreuzkupplungsreaktion mit dem entsprechenden aromatischen Amin.

6.1.2 Darstellung von C5-Halogen-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dU

Analog zu 2'-Desoxycytidin **104** wurden auch Versuche durchgeführt, um 2'-Desoxyuridin **113** an C5 zu halogenieren um später mittels der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung eine Modifizierung des Nucleosids durchzuführen (**A-E**). Die Reaktionsschritte **A-E** sind im Prinzip mit dem in Kap. 6.1.1 beschriebenen Syntheseweg identisch (vgl. S. 119).

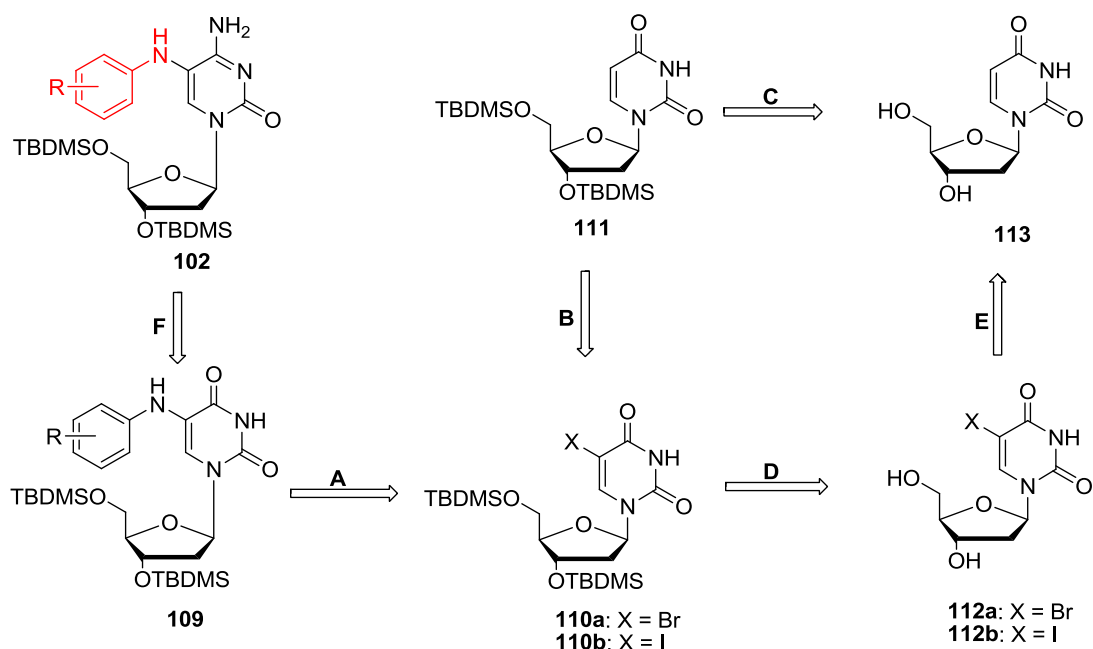


Abb. 118: Retrosynthese von C5-Arylamin-modifiziertem 2'-dC **102** über das 2'-dU-Derivat **109**

Der Vorteil bei Uracil als Nucleobase ist, dass sie über keine exocyclische Aminofunktion verfügt und somit keine Schutzgruppe für die Kreuzkupplung benötigt wird. Allerdings war zu berücksichtigen, dass sich die elektronischen Eigenschaften des Heterozyklus dadurch ebenfalls ändern und möglicherweise die NH-Funktion an der 3-Position der Nucleobase zu Nebenreaktionen führen könnte. Außerdem war nicht bekannt, ob die exocyclische Aminogruppe von 2'-dC **104** überhaupt geschützt werden muss. Die Aminierung von 2'-dU **113** lässt sich mit guten Ausbeuten, z. B. mit 1,2,4-Triazol als Reagenz, durchführen,^[159] so dass eine Überführung von 2'-Desoxyuridin-Derivaten in die entsprechenden 2'-Desoxycytidin-Derivate erfolgreich sein sollte (**F**).

Im ersten Syntheseweg wurde zunächst **111** durch Umsetzung von **113** mit TBDMS-Cl erhalten. Anschließend wurde **111** mit LiBr und Ammoniumcer(IV)nitrat zu **110a** umgesetzt. Die Ausbeute über beide Reaktionsschritte betrug 13% (s. Abb. 119). Der limitierende Faktor war die Bromierung des 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-2'-dU **111**. Die Ausbeute war geringer als bei der Bromierung von 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-2'-dC **104** (vgl. Abb. 116, S. 121).

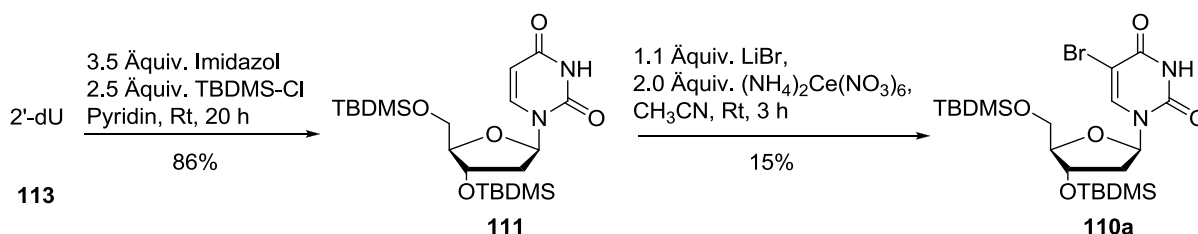


Abb. 119: Darstellung von 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dU **110a** über zwei Stufen

Die zweite Synthesesequenz beginnt mit der Bromierung an der C5-Position mit NBS in der Ionischen Flüssigkeit **108** bei Raumtemperatur zu **112a**. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde **112a** mit TBDMS-Cl umgesetzt. Die Ausbeute über diese beiden Reaktionsschritte betrug 46%.

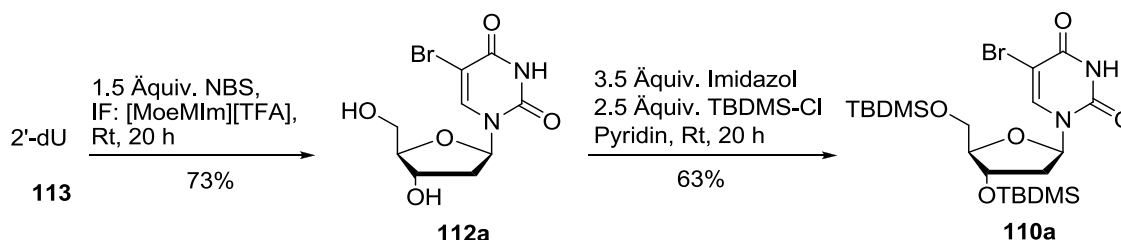


Abb. 120: Darstellung von 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dU **110a** über zwei Stufen

Für die Darstellung von **110b** wurde **112b** mittels TBDMS-Cl unter Standardbedingungen mit einer Ausbeute von 81% 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-geschützt. Somit standen mit **110a** und **110b** sowie den beiden, im vorigen Kapitel synthetisierten, Verbindungen **103a** und **103b** alle vier geplanten Edukte für die nun folgende Erprobung der Buchwald-Hartwig Kreuzkupplungsreaktion zur Verfügung.

6.1.3 Kupplung der halogenierten Nucleoside mittels Buchwald-Hartwig Reaktion

Die Reaktionen wurden im Wesentlichen in Anlehnung an die von N. Böge etablierten Bedingungen zu Darstellung der C8-2'-dG-Addukte durchgeführt.^[90] Zusätzlich wurde Xantphos (9,9-Dimethyl-4,5-bis(diphenylphosphino)xanthen) als ein weiterer Ligand in diesem System untersucht. Ausgehend von C5-Halogen-3',5'-bis-

O-(TBDMS)-2'-dC **103a** und **103b** und C5-Halogen-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dU **110a** und **110b** erfolgte jeweils die Umsetzung mit 4-Anisidin (s. Abb. 121). In absolutem 1,2-Dimethoxyethan wurden $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, der Ligand und das Edukt vorgelegt. Anschließend wurde 4-Anisidin **8** und zuletzt die entsprechende Base hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 3-7 Tage bei 80 °C gerührt.

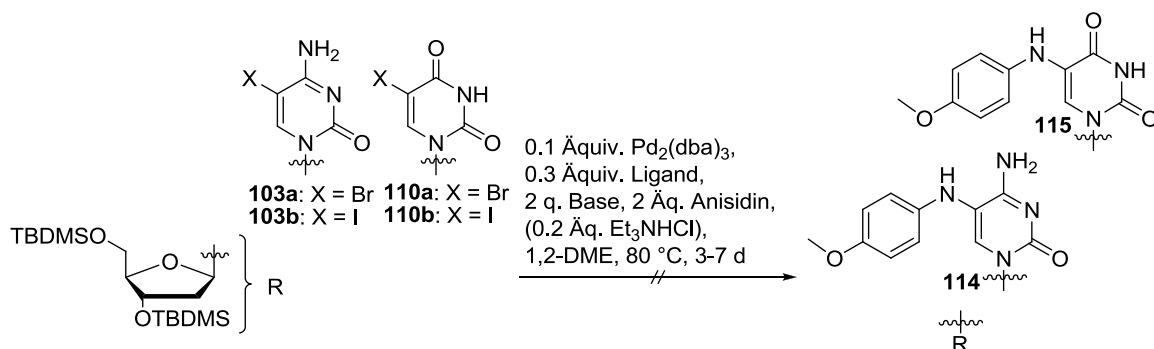


Abb. 121: Erprobung der C-N-Kreuzkupplungsreaktion zur Darstellung der C5-Addukte **114** und **115**

Bei einigen Ansätzen wurde auch Triethylammoniumchlorid zum Reaktionsansatz gegeben. *Cacchi et al.* beobachteten eine signifikante Ausbeutesteigerung durch den Zusatz von Lithiumchlorid als Chlorid-Donor der Kupplung von Hydrazinderivaten als Aminkomponente.^[160] Daher galt es zu untersuchen, ob es beim Zusatz eines Chlorid-Donors in diesem Fall auch zu einer Ausbeutesteigerung kommt. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Versuche zur Darstellung von **114** und **115**

Rkt.	Edukt	Ligand	Base	Reaktionszeit	Ausbeute
1 ^a	103a	<i>rac</i> -BINAP	K_3PO_4	5 d	- ^b
2 ^a	103a	<i>rac</i> -BINAP	KOtBu	5 d	- ^b
3 ^a	103a	<i>rac</i> -BINAP	Cs_2CO_3	5 d ^c	- ^d
4 ^a	103a	Xantphos	K_3PO_4	3 d ^e	- ^b
5	103a	Xantphos	LiHMDS	7 d	- ^d
6	103a	Xantphos	KOtBu	5 d	-
7 ^a	103b	<i>rac</i> -BINAP	K_3PO_4	5 d	- ^b
8	110a	<i>rac</i> -BINAP	Cs_2CO_3	7 d	- ^d
9	110b	Xantphos	K_3PO_4	5 d	- ^d

^a Zusatz von Et_3NHCl , ^b Edukt und dehalogeniertes Edukt (isoliert), ^c Nach 3 Tagen + 10mol% Pd-Kat., ^d Edukt und dehalogeniertes Edukt (DC), ^e Lösungsmittel verdampft

Nach der Aufarbeitung konnte bei keiner der Reaktionen das gewünschte Produkt erhalten werden. Bei der säulenchromatographischen Reinigung der Reaktionsansätze zeigte sich jedoch in fast allen Fällen, dass zum einen ein Teil des Eduktes zurückerhalten werden konnte und zum anderen ein Teil des Eduktes debromiert wurde (9-41%). Generell war eine teilweise Zersetzung des Eduktes über die Zeit zu beobachten. Auch eine Variation des Ligandes, der Base und des Eduktes führte nicht zum Erfolg. Die Beobachtung, dass in vielen Fällen nach der Reaktion dehalogeniertes Edukt isoliert werden konnte, deutet darauf hin, dass die oxidative Addition an das Palladium zumindest in Teilen stattfindet. Möglicherweise ist diese jedoch erschwert, da auch das Edukt reisoliert wurde. Da die C-N-Kreuzkupplungsreaktion zuvor bereits für Arylamine eingesetzt worden war, sollte deren Addition an das Metall funktionieren. Möglicherweise kommt es bei der reduktiven Eliminierung zu Problemen durch die Pyrimidinbasen aufgrund derer im Vergleich zu den Purinen verschiedenen elektronischen Eigenschaften.

6.2 Darstellung von N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten und deren Einbau in Oligonucleotide

Im Folgenden sollten Untersuchungen zu den N^2 -Arylamin-modifizierten-Addukten des 2'-Desoxyguanosins durchgeführt werden. Über die von Böge *et al.* etablierte Syntheseroute sollten weitere N^2 -Arylamin-modifizierte Phosphoramidite **10** dargestellt werden (s. Abb. 122 und S. 20f).^[87] Nach deren Einbau in Oligonucleotide sollten diese modifizierten Oligonucleotide untersucht werden. Der Einfluss der Hydrazinoaryl-Modifikation sollte unter anderem mit *mismatch*-Basenpaarungen der natürlichen DNA-Basen verglichen werden. Diese Basenfehlpaarungen entstehen bei der natürlichen DNA-Replikation, werden aber in der Regel durch die Korrekturlesefunktion der humanen DNA-Polymerase korrigiert. Über einen Vergleich der Schmelzpunkte der synthetisierten Oligonucleotid-Doppelstränge mit den *mismatch*-Doppelhelizes und in vorigen Arbeiten dargestellten DNA-Doppelsträngen anderer Arylaminaddukte sollten die N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte hinsichtlich ihres Einflusses auf die Stabilität der DNA eingeordnet werden.

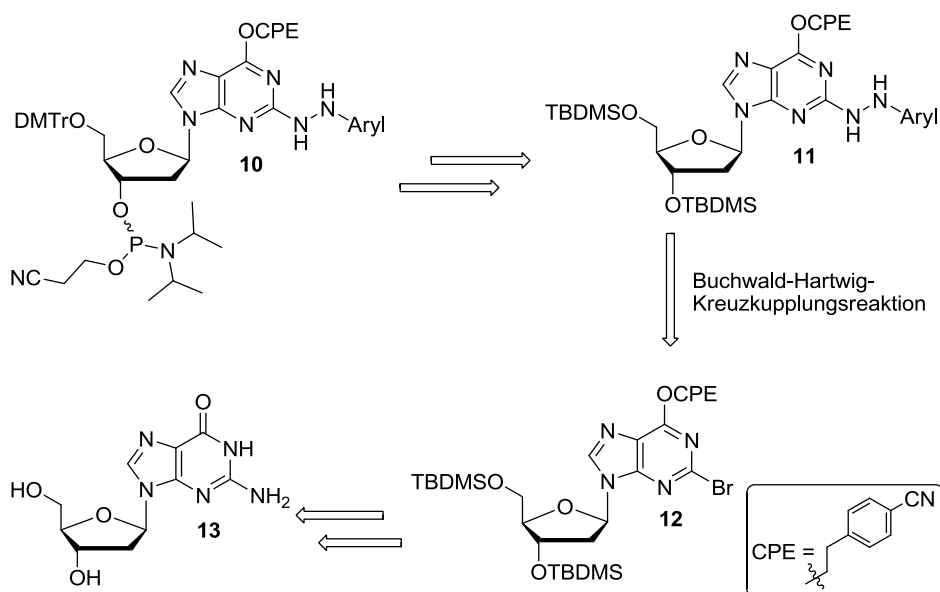


Abb. 122: Retrosynthese der N^2 -Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **10** nach Böge et al.

Neben der hier gezeigten Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion zur C-N-Kreuzkupplung der Arylhydrazine wurde zudem eine neue Alternative erprobt (s. Kap. 6.2.2, S. 129ff).

6.2.1 Darstellung der Edukte für die C-N-Kreuzkupplungsreaktion

Die dreistufige Synthese des Edukts für die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion begann mit 2'-Desoxyguanosin **13**, welches im ersten Schritt mit einer Ausbeute von 92% 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-geschützt wurde (s. Abb. 123). Um die Probleme bei der TBDMS-Schätzung von 2'-dG bei der säulenchromatographischen Reinigung zu umgehen, wurde das Rohprodukt nach der Aufarbeitung in Dichlormethan/Wasser 1:1 aufgenommen und durch Entfernen des Dichlormethans am Rotationsverdampfer ausgefällt. Auf diese Weise konnte das Produkt sauber und wesentlich einfacher als früher erhalten werden, da es aus der wässrigen Phase ausfiel. Parallel dazu wurde 2-(4-Cyanophenyl)ethanol **117** analog zu *Uhlmann et al.* über eine *Sandmeyer*-Reaktion aus 2-(4-Aminophenyl)ethanol **116** mit einer Ausbeute von 71% erhalten.^[161] Die anschließende Umsetzung von **13** mit **117** zur Einführung der CPE-Schutzgruppe gelang unter *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen in einer guten Ausbeute von 85%.

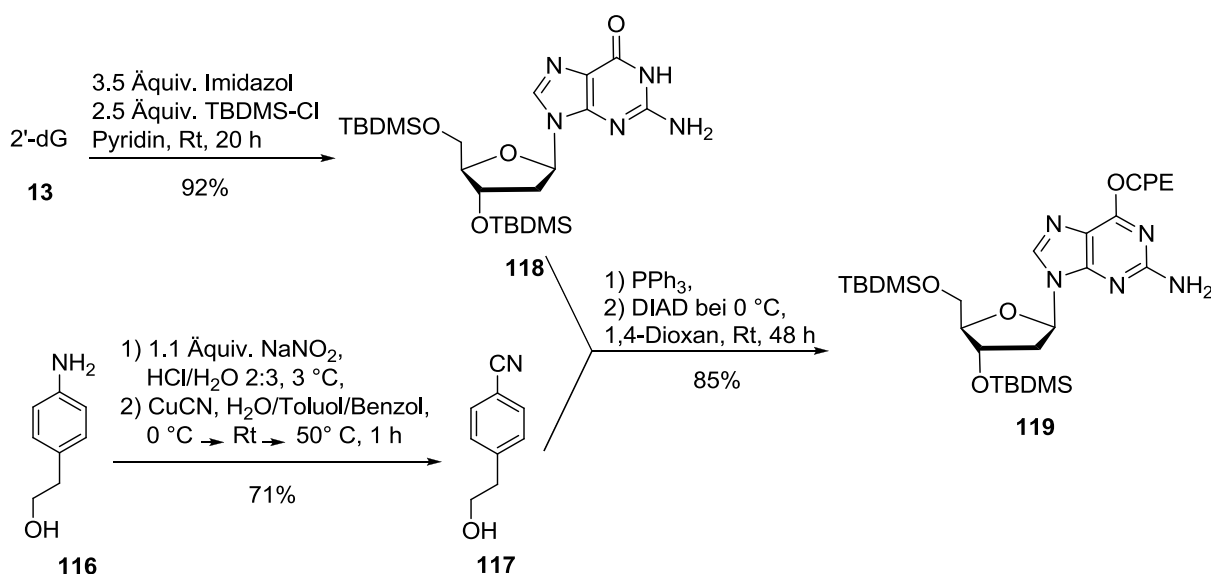


Abb. 123: Darstellung von *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dG **119**

Die letzte Stufe stellte die Bromierung der C2-Position dar und wurde nach einer Methode von *Harwood et al.* durchgeführt (s. Abb. 124).^[162] Das geschützte 2'-dG-Derivat **119** wurde mit Antimon(III) in 0 °C kaltem Dibrommethan suspendiert und bei -10 °C mit *t*-Butylnitrit versetzt. Nach einstündigem Rühren bei -10 °C wurde die Reaktion aufgearbeitet. Im Gegensatz zur ursprünglichen Vorgehensweise wurde der gelbliche, hochviskose Niederschlag so lange mit Dichlormethan extrahiert und das Dichlormethan dekantiert, bis der Niederschlag farblos war. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

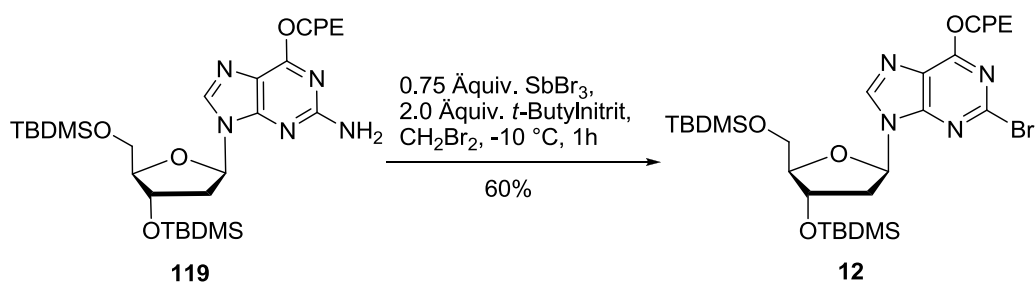


Abb. 124: Dritte Stufe der Synthese des Eduktes **12** für die C-N-Kreuzkupplungsreaktion

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte **12** in einer Ausbeute von 60% erhalten werden. Die Verbindung **12** stand somit für die Kupplung mit den Hydrazinen zur Verfügung.

Von den Hydrazinen mussten 4-Hydrazinobiphenyl **120** sowie 2-Hydrazinofluoren **121** synthetisiert werden. Die anderen Hydrazine waren kommerziell erhältlich. Zur Darstellung wurde zunächst die Reduktion der entsprechenden Diazoniumsalze von 4-Aminobiphenyl **3** bzw. 2-Aminofluoren **4** erprobt (s. Abb. 125).^[163]

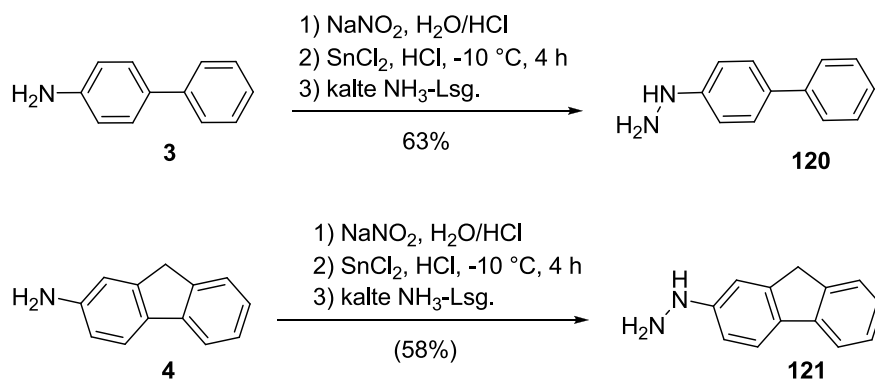


Abb. 125: Darstellung von **120** und **121** durch Reduktion der Diazoniumsalze von **3** und **4**

Bei diesen Synthesen war ein vollständiger Umsatz der Aminogruppen entscheidend, da das Amin nicht vom Hydrazin abgetrennt werden konnte und die Instabilität der Hydrazine keine aufwendige Reinigung zuließ. Im Fall des 4-Hydrazinobiphenyls **120** konnte das reine Hydrazin in 63% Ausbeute erhalten werden. Dagegen wurden bei der Synthese von 2-Hydrazinofluoren **121** auch nach vielen Versuchen nur Gemische aus 2-Aminofluoren **4** und 2-Hydrazinofluoren **121** erhalten. Trotz der zu erwartenden Trennprobleme nach der Buchwald-Hartwig Kreuzkupplungsreaktion wurden die zwei Reaktionen mit dem größten Anteil an Hydrazinofluoren weiter eingesetzt, in der Hoffnung, nach der Reaktion wenigstens einen Anteil des C2-Hydrazinofluoren-2'dG-Adduktes isolieren zu können.

Da die Synthese von sauberem 2-Hydrazinofluoren über die zuvor beschriebene Reaktion nicht möglich war, wurde nach einer Alternative gesucht. Bei der Darstellung von 2-Hydrazinofluoren **121** in Anlehnung an *Demers et al.*^[164] wurde als Edukt 2-Bromfluoren **122** verwendet, welches zunächst mit Magnesium und THF zur Grignard-Verbindung **123** umgesetzt worden ist. Anschließend erfolgte die Zugabe von Di-*tert*-butylazodicarboxylat **124** bei -78°C , sowie die darauffolgende Abspaltung der Boc-Gruppen mit Salzsäure (s. Abb. 126).

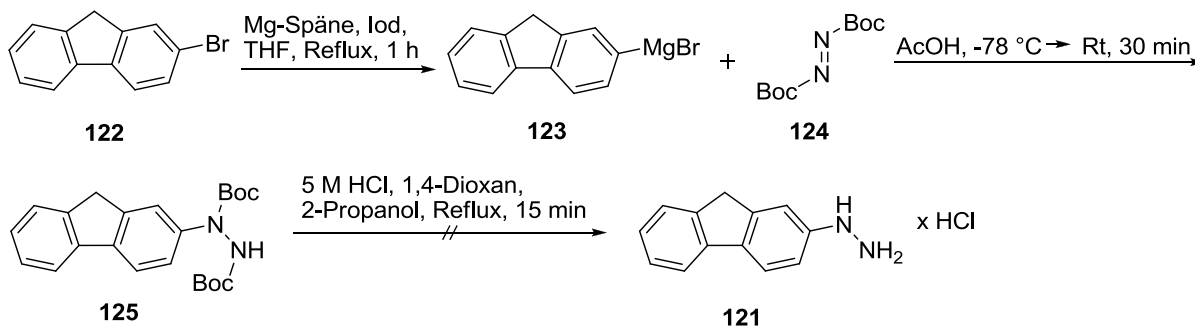


Abb. 126: Versuchte Darstellung von **121** über die Grignard-Reaktion nach *Demers et al.*

Die Verbindung **125** konnte zwar mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, die Abspaltung der Schutzgruppen lieferte jedoch kein isolierbares Produkt. Somit stand nur 4-Hydrazinobiphenyl von den bicyclischen, aromatischen Hydrazinen für weitere Reaktionen zur Verfügung. Die weiteren Reaktionen zu den modifizierten Phosphoramiditen sind in Kapitel 6.2.3 (S. 132ff) beschrieben.

6.2.2 Alternative zur Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion

Die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung der Arylhydrazine mit dem C2-bromierten, geschützten 2'-dG **12** funktioniert als Reaktion zwar gut, jedoch sind die Aufarbeitung und die säulenchromatographische Reinigung sehr aufwendig und zusätzlich sind die Kosten der Reagenzien relativ hoch. Es sollte daher eine alternative Synthesemöglichkeit erprobt werden. Von G. Boche und N. Böge wurde bereits die nucleophile, aromatische Substitution anhand von Triflat als Abgangsgruppe untersucht.^[165,166] Jedoch führte diese Reaktion nur mit niedrigen Ausbeuten zum Produkt, was möglicherweise daran lag, dass eine noch bessere Abgangsgruppe benötigt wird.

Von Bae et al. wurde über die Verwendung von eines C-2-Tris(dimethylamino) phosphonium-hexafluorophosphatsalzes zur Substitution mit aliphatischen Aminen berichtet.^[167] Da die Austrittsgruppe HMPA eine neutrale Verbindung ist, könnte diese eine noch bessere Austrittsgruppe als z. B. Triflate sein. In den Reaktionen von Bae et al. wurden keine aromatischen Amine bzw. Hydrazine eingesetzt. Dies könnte daran liegen, dass diese nicht nucleophil genug sind, oder einfach nicht getestet wurden. Um dieser Fragestellung nachzugehen und um eine alternative Darstellung der *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte zu finden, wurde diese Abgangsgruppe im Folgenden erprobt (s. Abb. 127).

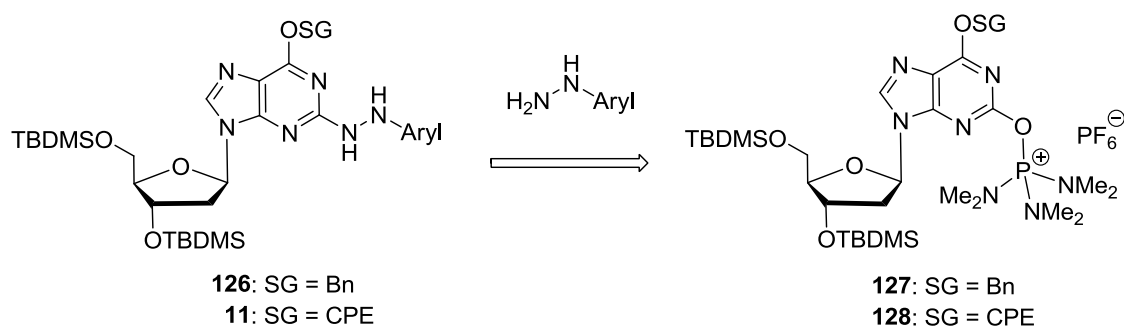


Abb. 127: Nucleophile, aromatische Substitution zur Synthese von **11** und **126**

Zunächst wurde das Phosphoniumsalz **127** bzw. **128** dargestellt. Hierzu wurden zwei verschiedene Schutzgruppe an der O⁶-Position des 2'-dG-Derivates verwendet, zum einen die Benzyl- und zum anderen die 2-(4-Cyanophenyl)ethyl-Schutzgruppe (s. Abb. 128). Über Standardreaktionen wurde 2'-Desoxyguanosin **13** 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-geschützt und die Schutzgruppen an der O⁶-Position eingeführt. Danach wurde eine Diazotierungsreaktion mit anschließender Hydrolyse zur Darstellung der geschützten 2'-Desoxyxanthosine **130** und **131** durchgeführt.

Im letzten Schritt wurde die Synthese der Tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphatsalze **127** und **128** mit 1*H*-Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino) phosphonium-Hexafluorophosphat (BOP) und DIPEA als Base in Dichlormethan durchgeführt.

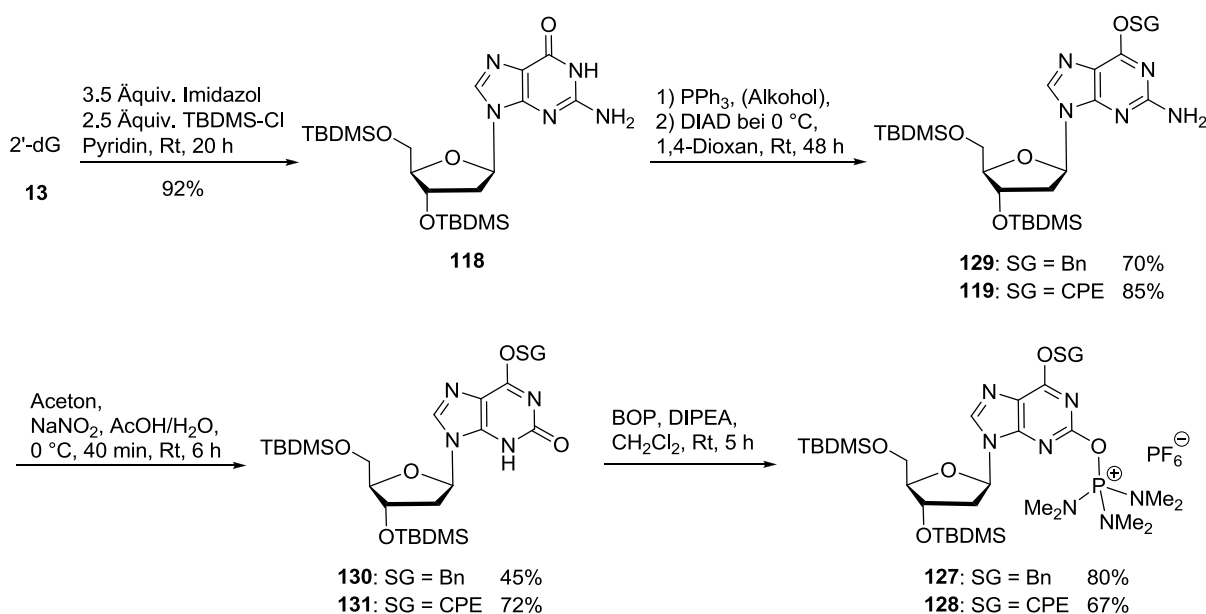


Abb. 128: Darstellung der geschützten 2'-Desoxyxanthosin Hexafluorophosphate **127** und **128**

Die einzelnen Verbindungen konnten jeweils nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung in zufriedenstellenden bis guten Ausbeuten isoliert werden.

Nachdem die beiden Ausgangsmaterialien **127** und **128** für die Erprobung der nucleophilen, aromatischen Substitution durch die Arylhydrazine erfolgreich dargestellt wurden, wurden verschiedene Testreaktionen durchgeführt (s. Abb. 127, S. 129 und Tabelle 17). Generell wurde das Edukt in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst, mit dem Hydrazin und der Base versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei der angegebenen Temperatur gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach der

Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Zunächst wurde mit der Umsetzung von Morpholin eine Reaktion von *Bae et al.* reproduziert, um zu überprüfen, ob die Reaktion prinzipiell funktioniert und keine „Bedienungsfehler“ gemacht wurden (Rkt. 1).^[167] Da das Produkt in einer guten Ausbeute von 71% isoliert werden konnte, war die experimentelle Durchführung in Ordnung.

Tabelle 17: Reaktionen zur Darstellung der *N*²-Addukte mittels nucleophiler, aromatischer Substitution

Rkt.	SG	Äquiv. / Hydrazin	Base	Solvent	T [°C]	t [h]	Ausbeute
1	Bn	4 / Morpholin	-	1,2-DME	Rt	48	71%
2	Bn	4 / 4-Anisidin	-	1,2-DME	80	48	- ^a
3	Bn	4 / 4-Anisidin	Cs ₂ CO ₃	1,2-DME	Rt	24	35% ^b
4	Bn	4 / Anilin	DBU	1,2-DME	Rt	24	8% ^b
5	Bn	4 / Anilin ^c	NaH	1,2-DME	Rt	24	- ^a
6	Bn	2 / 3,5-DMA ^c	<i>n</i> -BuLi	1,2-DME	80	96	- ^a
7	CPE	4 / 4-Anisidin	-	1,2-DME	80	96	-
8	CPE	4 / 4-Anisidin	DBU	1,2-DME	Rt	96	- ^a
9	CPE	12 / 3,5-DMA ^c	NaH	CH ₂ Cl ₂	40	144	- ^a
10	CPE	3 / 3,5-DMA ^c	<i>n</i> -BuLi	CH ₂ Cl ₂	40	5	- ^d
11	CPE	3 / 3,5-DMA ^c	<i>n</i> -BuLi	1,2-DME	80	20	2%

^a keine charakterisierbaren Verbindungen erhalten, ^b O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-desoxyxanthosin **130**, ^c zuvor deprotoniert, ^d nicht-trennbares Gemisch erhalten

Zunächst wurde die Reaktion ohne Base erprobt (Rkt. 2 und 7), jedoch konnten die nach der säulenchromatographischen Reinigung erhaltenen Fraktionen keinen Verbindungen zugeordnet werden. Für das O⁶-Benzyl-geschützte Edukt **127** konnten bei Verwendung von DBU bzw. Cäsiumcarbonat als Base 8% bzw. 35% von O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-desoxyxanthosins **130** erhalten werden. Die Bildung von **130** könnte möglicherweise mit einem Angriff des Nucleophils auf das positiv geladene Phosphor-Atom erklärt werden. Möglicherweise fand auch eine basische Hydrolyse des Phosphoniumsalzes **127** statt, da vielleicht das Cäsiumcarbonat bzw. das DBU Wasser gezogen hatten, oder es bei der Reinigung zu dieser Nebenreaktion kam. Neben den in Tabelle 17 zusammengefassten Versuchen wurde noch eine Vielzahl weiterer Reaktionen mit anderen Basen, Temperaturen und Reaktionszeiten durchgeführt. Jedoch waren diese Versuche

nicht erfolgreich. Anhand dieser Ergebnisse drängte sich der Verdacht auf, dass die zu schwache Nucleophilie der Hydrazine das Hauptproblem sein könnte. Da nucleophile, aromatische Substitutionen meistens einem Additions-Eliminierungsmechanismus folgen, ist der Angriff des Nucleophils der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Zur Erhöhung der Nucleophilie wurden mit Natriumhydrid und *n*-Butyllithium stärkere Basen zur Deprotonierung der Hydrazine eingesetzt (Rkt. 5, 6, 9-11). Dazu wurde das Hydrazin vor der Zugabe zum Phosphoniumsalz in einem Kolben gelöst und mit einem Äquivalent der Base versetzt. Auf diese Weise konnte in einem Fall nach säulenchromatographischer Reinigung erstmals das *N*²-(3,5-Dimethylanilin)-modifizierte 2'-dG **11a** erhalten werden (Rkt. 11). Die Ausbeute war mit 2% jedoch sehr schlecht.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die nucleophile, aromatische Substitution von Hexamethylphosphorsäuretriamid durch Arylhydrazine nicht effizient zu bewerkstelligen war und wahrscheinlich an der unzureichenden Nucleophilie der Hydrazine scheiterte.

6.2.3 Darstellung der *N*²-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite

Da sich die erprobte Alternative zur Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion als nicht erfolgreich herausgestellt hatte, wurde im Folgenden wieder die bekannte Palladium-katalysierte C-N-Kreuzkupplung zur Einführung der Arylhydrazine an der C2-Position von **12** verwendet (s. Abb. 129).^[87] In absolutem 1,2-Dimethoxyethan wurden Pd₂(dba)₃, *rac*-BINAP, Triethylammoniumchlorid und das Edukt **12** vorgelegt. Anschließend wurden das Hydrazin und zuletzt Kaliumphosphat hinzugegeben und die Reaktionsmischung für zwei Tage bei 80 °C gerührt.

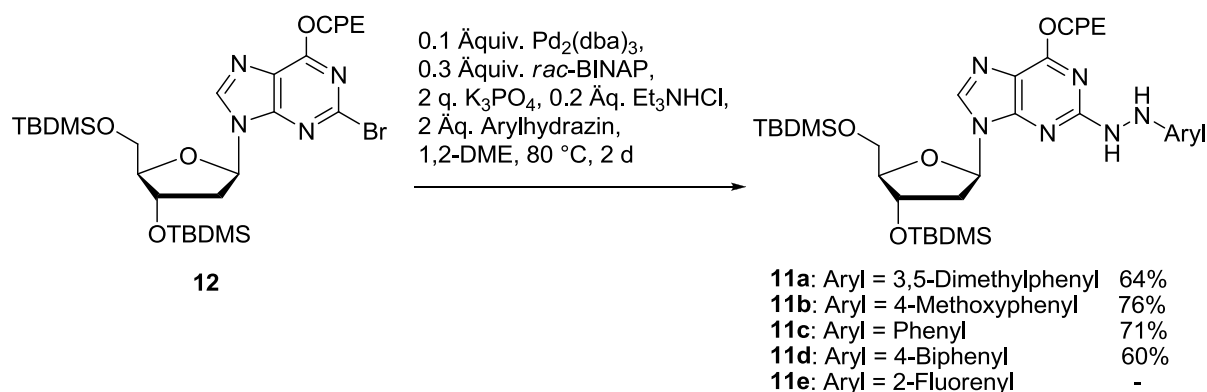


Abb. 129: Synthese der *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte **11a-11e**

Wie zuvor erwähnt war die Aufarbeitung und Reinigung der Kupplungsprodukte **11a-11d** sehr aufwendig und zeitintensiv (s. S. 129). Aber trotzdem konnten die vier Produkte in Ausbeuten von 60-76% erhalten werden. Bedauerlicherweise konnte von den als Gemisch eingesetzten 2-Hydrazinofluorenen jeweils nur das C2-Aminofluorenaddukt **132** erhalten werden (vgl. S. 128). Im nächsten Schritt wurden die TBDMS-Schutzgruppen mit Triethylamin*Trihydrofluorid abgespalten (s. Abb. 130). Dabei wurde die saure Lösung mit Triethylamin gepuffert.

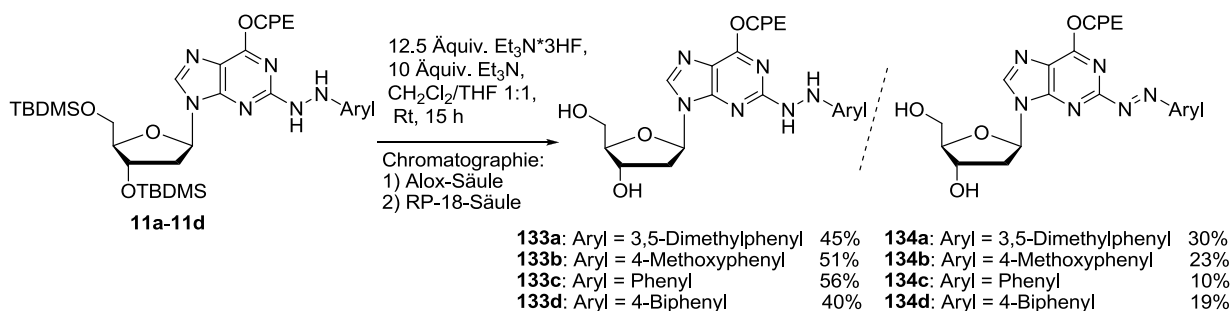


Abb. 130: Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen und partielle Oxidation der Hydrazinofunktion

Hierbei kam es zur, bereits von *Böge et al.* beobachteten, partiellen Oxidation der Hydrazinofunktion zu der entsprechenden Azofunktion.^[87] Durch die Verwendung von neutralem Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III) zur ersten säulenchromatographischen Reinigung wurde versucht, dies so weit wie möglich zu vermeiden. Die Hydrazino- und Azoverbindungen wurden dann über eine zweite, sehr zeitintensive Chromatographie an RP-18-Kieselgel getrennt. Anhand der Ausbeuten sieht man, dass ein deutlicher Überschuss der Hydrazinoverbindungen isoliert werden konnte, die Oxidation aber nicht vollständig verhindert werden konnte.

In Vorbereitung der Festphasen-gestützten, chemischen DNA-Synthese wurde im nächsten Schritt die DMTr-Schutzgruppe an der primären 5'-Hydroxygruppe von **133a-133d** eingeführt (s. Abb. 131).

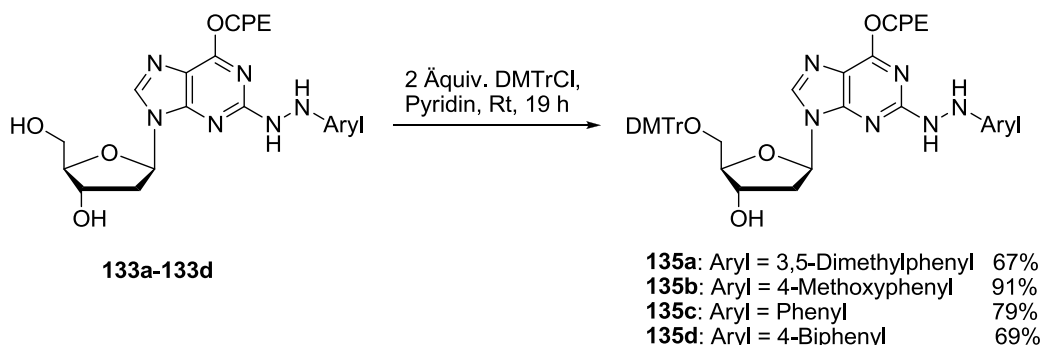


Abb. 131: Einführung der DMTr-Schutzgruppe an der 5'-Position von **133a-133d**

Die Umsetzung der Nucleoside **133a-133d** mit DMTr-Chlorid gelang in Ausbeuten von 67-91%. Auch hier erfolgte die säulenchromatographische Reinigung an neutralem Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III). Der letzte Schritt in der Syntheseroute zu den modifizierten Phosphoramiditen war die Phosphitylierung an der 3'-Hydroxygruppe. Als Phosphitylierungsreagenz wurde Bis-*N,N'*-diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit (DIPP) eingesetzt (s. Abb. 132).

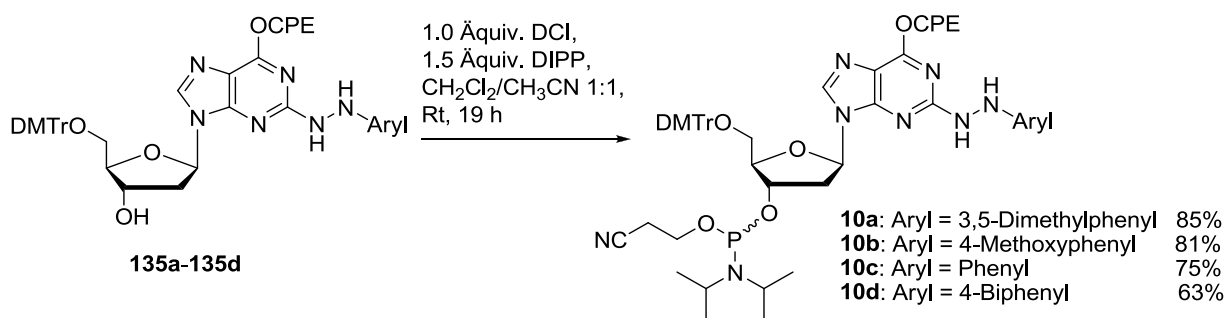


Abb. 132: Phosphitylierung zur Darstellung von **10a-10d**

Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an neutralem Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III) wurden die Zielverbindungen **10a-10d** durch Gefriertrocknung aus Benzol als farblose Schäume in Ausbeuten von 63-85% erhalten. Da nur die Massen für die jeweiligen modifizierten Phosphoramidite **10a-10d** erhalten wurden, ist davon auszugehen, dass keine Oxidation zur entsprechenden Azoverbindung eingetreten war. Die *N*²-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite sollten im Folgenden in Oligonucleotide eingebaut werden.

6.2.4 Untersuchung *N*²-Arylamin-modifizierter Oligonucleotide

Die chemische DNA-Synthese an der festen Phase wurde in den letzten Jahrzehnten zu einer effizienten, standardisierten Technik entwickelt. Die hierfür meist verwendete feste Phase besteht aus speziellen Glasperlen (CPG). Der Linker zwischen dem festen Trägermaterial und dem Startnucleosid ist im Allgemeinen eine Dicarbonsäure (meist Bernsteinsäure), die wiederum an ein langkettiges Alkylamin (Long Chain Amino Alkyl) gebunden ist. Das erste Nucleosid ist mit der 3'-Hydroxygruppe an die feste Phase gebunden. Von den entwickelten Verfahren zur Verknüpfung der einzelnen Nucleotide hat sich die Phosphoramidit-Methode durchgesetzt und ist mit der Zeit zur Standardmethode geworden.^[168,169] Dabei werden basenlabil geschützte Phosphoramidite in Gegenwart eines Aktivators wie Tetrazol oder 4,5-Dicyanoimidazol mit einem 5'-OH-freien Nucleosid zu einem Phosphittriestern

umgesetzt. Die nicht abreagierten 5'-Hydroxygruppen werden mit Essigsäureanhydrid als 5'-Acetate blockiert. Eine nachfolgende Oxidation mit Iod in Pyridin führt zum entsprechenden Phosphatriester. Für den nächsten Schritt wird die DMTr-Gruppe an der 5'-Hydroxygruppe des gekuppelten Nucleosides mit Trichloressigsäure abgespalten und der Kupplungszyklus erneut durchlaufen. Nach erfolgreicher Synthese kann das fertige Oligonucleotid unter basischen Bedingungen von der festen Phase abgespalten werden. Im gleichen Schritt werden ebenfalls alle Schutzgruppen vom Oligonucleotid abgespalten.

Der gezielte Einbau Arylamin-modifizierter Nucleoside in Oligonucleotidsequenzen ist zur Untersuchung von deren Einflüssen auf die Eigenschaften der modifizierten DNA von entscheidender Bedeutung. Erste Hinweise geben die Analyse der Schmelzpunkttemperaturen (T_m -Werte) und die Messung des circularen Dichroismus eines Doppelstranges. Diese Untersuchungen sollten mit den N^2 -Arylamin-modifizierten Oligonucleotiden im Folgenden durchgeführt werden. Als Sequenz für die Untersuchungen wurde die *NarI*-Sequenz gewählt (s. Abb. 133). Dieses Dodecamer stellt eine Hotspot Region für die Bildung von Arylamin-Addukten am 2'-Desoxyguanosin dar.^[170]

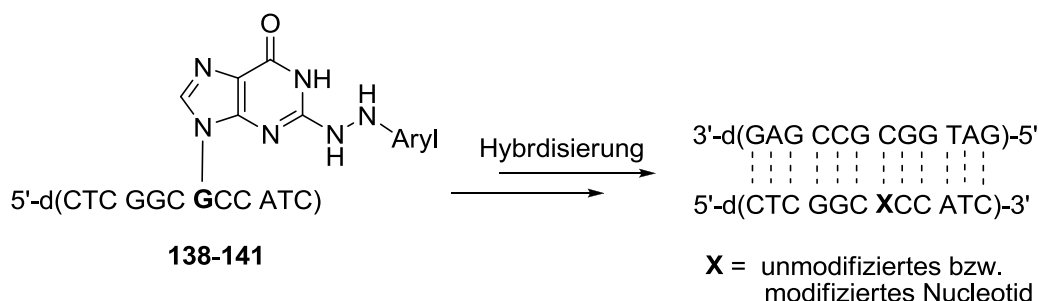


Abb. 133: *NarI*-Sequenz mit dem N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosin → Doppelstrang mit den zusätzlich untersuchten *mismatch*-Modifikationen

Außerdem wurden in früheren Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe bereits verschiedene Modifikationen in diese Sequenz eingebaut, so dass sich die eigens erhaltenen Resultate gut mit den bereits vorliegenden Ergebnissen vergleichen lassen sollten.

Die synthetisierten, modifizierten Phosphoramidite **10a-10d** wurden an die siebte Position der *NarI*-Sequenz eingebaut (s. Tabelle 18), einerseits um möglichst mittig im Dodecamer zu modifizieren und andererseits aufgrund der Vergleichsmöglichkeiten mit den anderen Ergebnissen. Die unmodifizierten, in

Tabelle 18 gezeigten Dodecamere **136**, **137** und **142-144** wurden gekauft und das *abasic*-Oligonucleotid **145** von *M. Jacobsen* zur Verfügung gestellt.

Tabelle 18: Übersicht der synthetisierten bzw. untersuchten Oligonucleotide der *NarI*-Sequenz

Oligonucleotid	Modifikation	Sequenz ^a
136	Gegenstrang	5'-d(GAT GGC GCC GAG)
137	unmodifiziert	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
138	<i>N</i> ² -(3,5-DMA)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
139	<i>N</i> ² -(4-Anisidin)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
140	<i>N</i> ² -(Anilin)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
141	<i>N</i> ² -(4-ABP)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
142	<i>A-mismatch</i>	5'-d(CTC GGC ACC ATC)
143	<i>T-mismatch</i>	5'-d(CTC GGC TCC ATC)
144	<i>C-mismatch</i>	5'-d(CTC GGC CCC ATC)
145	<i>abasic</i>	5'-d(CTC GGC dR ^b CC ATC)

^a modifiziertes Nucleotid der Sequenz in **Fett** hervorgehoben, ^b 2'-Desoxyribose

Die Synthese der Oligonucleotide **138-141** ist im Folgenden kurz beschrieben. Es wurden **10a-10d** in spezielle Synthesizerflaschen eingewogen und in absolutem Acetonitril gelöst, so dass eine 0.1 molare Lösung vorlag. Für den Einbau der unmodifizierten Nucleoside wurden sowohl die Standard-Chemikalien als auch das Standard-Syntheseprotokoll des Herstellers verwendet. Als Trägermaterial wurden kommerziell erhältliche Succinyl-CPG-Träger eingesetzt. Die Kupplungsausbeuten lagen bei jedem Schritt bei ca. 98% (photometrisch über einen Trityl-Assay ermittelt). Für den Kupplungsschritt mit den modifizierten Phosphoramiditen **10a-10d** wurde das Kupplungsprotokoll leicht verändert (s. Kap. 9.7.7, S. 284). Um eine von *N. Böge* beobachtete Acetylierung der Hydrazinofunktion durch das Standard-Capping-Reagenz (Essigsäureanhydrid) zu vermeiden, wurde dieses gegen eine Lösung aus Pivalinsäureanhydrid und 2,6-Lutidin in absolutem THF (1:1:8) ausgetauscht. Außerdem wurde ein dritter Kupplungsschritt eingefügt und die Kupplungszeit bei jedem der drei Schritte von 15 auf 500 sec verlängert.^[166] Trotz dieser Veränderungen konnte die Kupplungsausbeute der modifizierten Phosphoramidite nicht über 80% gesteigert werden.

Für die Synthese von **141** wurde zusätzlich zur Synthese am bisherigen Synthesizer auch ein neuer DNA-Synthesizer verwendet (s. Kap. 9.7.7, S. 284). Hier war die anhand des Tritylmonitors bestimmte Ausbeute mit 70% zwar nicht höher, aber mit drei Kupplungsschritten à 90 Sekunden deutlich schneller. Außerdem war der Oxidationsschritt im Syntheseprotokoll vor den Capping-Schritt geschaltet. Dadurch die Oxidationslösung vor dem nächsten Kupplungszyklus besser aus der Säule gespült werden. Zunächst wurde das zu diesem Synthesizer gehörende Cappingreagenz eingesetzt und erprobt, ob es hier ebenfalls zu einer Acetylierung der Hydrazinofunktion käme.

Die letzte DMTr-Schutzgruppe wurde bereits am Synthesizer entfernt. Die Abspaltung von der festen Phase sowie die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte manuell. Zunächst erfolgte die Abspaltung der CPE-Schutzgruppe durch Aufnahme des synthetisierten Oligonucleotides in 0.9 mL absolutem Pyridin und Zugabe von 0.1 mL DBU. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Thermomixer bei Raumtemperatur wurde die Lösung pipettiert. Die Abspaltung von der festen Phase und die Entfernung der Schutzgruppen der Nucleobasen erfolgten durch Zugabe von 0.8 mL konzentriertem Ammoniak und 20 µL β -Mercaptoethanol für 4 Stunden bei 45 °C. Das anschließend erhaltene Filtrat wurde im Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte der DNA-Synthesen wurden über die bereits etablierte Methode per HPLC gereinigt.^[88,92]

Per Massenspektrometrie wurden die nach der HPLC erhaltenen einzelnen Fraktionen charakterisiert. Für **138** und **140** konnten reine Fraktionen der Dodecamere zugeordnet werden. Bedauerlicherweise konnten **139** und **141** auch nach wiederholter Oligonucleotidsynthese massenspektrometrisch nicht detektiert werden. Neben der Verwendung von ESI-MS wurde MALDI als Ionisationsart eingesetzt. Interessant war, dass im Fall von **141** kein Produkt aber auch kein acetyliertes Hydrazinobipenyl-modifiziertes Oligonucleotid gefunden werden konnte (siehe oben). Bei der massenspektrometrischen Analyse der per HPLC erhaltenen Fraktionen der Reinigung des am neuen Synthesizer synthetisierten Oligonucleotides **141** wurde ein sehr großer Anteil des 5-mers 5'-d(CC ATC) gefunden. Dies ist der Abbruchstrang vor dem Einbau der Modifikation, was möglicherweise bedeutet, dass die Kupplung der N^2 -Arylamin-modifizierten Phosphoramidite am neuen Synthesizer in zukünftigen Arbeiten noch optimiert werden müsste.

Die Untersuchung der Schmelzpunkttemperaturen (T_m -Werte) stellt eine gängige Methode zur Einschätzung der Stabilität einer DNA-Doppelhelix dar und wurde anhand der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Standardmethode durchgeführt (s. Kap. 9.7.7, S. 285). Der T_m -Wert wird von der Basenzusammensetzung, der Länge des Doppelstranges, aber auch von den Eigenschaften des Lösungsmittels sowie der Salzkonzentration beeinflusst. Ebenso können sich auch falsche Basenpaare oder Modifikationen der Nucleotide auf den T_m -Wert auswirken. Bei Oligonucleotiden kann durch Messung der UV-Absorption als Funktion der Temperatur der thermisch induzierte Übergang von einer geordneten, helikalen Struktur in einen ungeordneten, denaturierten Zustand verfolgt werden. Das so genannte π -Stacking, d. h. die elektronische Wechselwirkung der π -Systeme der Basen, die innerhalb der Doppelhelix in Stapeln senkrecht zur Helixachse angeordnet sind, führt zu einer deutlichen Reduktion der UV-Absorption. Diesen Effekt bezeichnet man als Hypochromizität.^[171] Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, bzw. das Maximum der ersten Ableitung, das man durch Auftragung der UV-Absorption gegen die Temperatur erhält, entspricht der Schmelzpunkttemperatur des Doppelstranges.

Tabelle 19: T_m -Werte und thermodynamische Daten der an Position 7 modifizierten *NarI*-Sequenz

Doppelstrang ^a	Modifikation	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]
137	unmodifiziert	62	-124	-343
138	N^2 -(3,5-DMA)	59	-85	-227
139	N^2 -(4-Anisidin)	n. b. ^b	-	-
140	N^2 -(Anilin)	61	-173	-489
141	N^2 -(4-ABP)	n. b. ^b	-	-
142	<i>A-mismatch</i>	47	-104	-297
143	<i>T-mismatch</i>	42	-69	-190
144	<i>C-mismatch</i>	40	-82	-234
145	<i>abasic</i>	35	-74	-213
146^c	C8-NH-Phenyl	49	-140.8	-414.7
147^c	C8-(NH-2-Fluorenyl)	49	-72.8	-197.1
148^c	C8-(N-Ac-Phenyl)	44	-80.2	-223.4
149^c	C8-(N-Ac-2-Fluorenyl)	45	-105.1	-301.4

^a jeweils mit **136** als Gegenstrang, ^b Oligonucleotid konnte nicht identifiziert werden, ^c S. Krüger^[172]

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die in eigenen Vorarbeiten zur Untersuchung eines anderen Dodecamers gewonnenen Resultate.^[88] Auch in der *NarI*-Sequenz führten die *N*²-Anilin- und die *N*²-3,5-Dimethylanilin-Modifikation nur zu einer Absenkung des *T*_m-Wertes um ca. 1 bis 3 °C (s. Tabelle 19). Möglicherweise fügen sich die aromatischen Ringe in die Doppelhelix ein und haben deswegen keinen so stark destabilisierenden Einfluss wie z. B. die C8-NH-Arylamin- oder C8-N-Ac-Arylamin-Addukte am 2'-Desoxyguanosin (s. Abb. 13, S. 19). Von S. Krüger wurde anhand der C8-Modifikationen von 2'-dG gezeigt, dass ein Einbau an Position vier oder Position sieben der *NarI*-Sequenz zu keinem großen Unterschied in der Schmelzpunkttemperatur führt.^[172] Aus diesem Grund wurde sich in dieser Arbeit auf die Modifikation der siebten Position fokussiert.

Setzt man die gemessenen Schmelzpunkttemperaturen in Relation zu den Ergebnissen der untersuchten *mismatch*-Oligonucleotide **143** und **144**, stellt man eine relativ starke Absenkung der *T*_m-Werte zwischen 20-22 °C für die Pyrimidin-Basen fest. Erwartungsgemäß ist die Absenkung im Fall des dA-dC-mismatch-Oligonucleotides **142** mit 15 °C geringer. Für die C8-N-Acetyl-Arylamin Modifikationen wurde von S. Krüger eine *syn*-Konformation der Nucleobase im Nucleosid bestimmt.^[172] Dadurch ist die verhältnismäßig große Absenkung der *T*_m-Werte erklärbar, da die Nucleobase aus der Doppelhelix herausragt. Erstaunlich ist, dass für die C8-(N-Ac-Phenyl)- und C8-(N-Ac-2-Fluorenyl)-Modifikationen **148** und **149** nahezu identische *T*_m-Werte gemessen wurden. Die Messung des circularen Dichroismus zeigte für alle hier untersuchten Dodecamere die natürliche B-Konformation der Doppelhelix an.

Die größte Schwächung verursachte die *abasic-site* mit einem *T*_m-Wert von nur 35 °C (Oligonucleotid **145**). Bedauerlich ist, dass das synthetisierte *N*²-(4-Aminobiphenyl)-modifizierte Oligonucleotid **141** nicht erhalten werden konnte und so kein Vergleich zwischen monocyclischer und bicyclischer Modifikation möglich war. Für zukünftige Arbeiten sollte die erneute Synthese bi- bzw. polycyclisch *N*²-Arylamin-modifizierter Oligonucleotide versucht werden. Außerdem sollte die *abasic-site* auch in den Gegenstrang gegenüber den *N*²-Arylamin-modifizierten Nucleotiden eingebaut werden. Dabei ist sogar eine Stabilisierung der Doppelhelix zu vermuten, da die *N*²-Arylamin-Modifikation den Part der fehlenden Base im π -stacking imitieren könnte.

Die geringe Absenkung des T_m -Werts der monocyclischen N^2 -Arylamin-modifizierten Oligonucleotide **138** und **140** könnte die vermutete, höhere Persistenz dieser Addukte *in vivo* erklären, da sie möglicherweise durch die geringere destabilisierende Wirkung auf die Doppelhelix schwieriger durch die Reparaturmechanismen der Zelle erkannt werden können. Nach dem Abschluss der Untersuchungen zur *NarI*-Sequenz sollten in zukünftigen Arbeiten Primer-Verlängerungsstudien der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte durchgeführt werden (vgl. Kap. 2.5.3, S. 21f).

Im Hinblick auf die Erkennung der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte durch humane DNA-Polymerasen sollte in einem weiteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit ein erstmaliger Zugang zu 5'-Triphosphaten von N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten entwickelt werden.

6.3 Darstellung N^2 -Arylamin-modifizierter 2'-dG-5'-Triphosphate

Das genotoxische Potential aromatischer Amine ist vor allem auf ihren Metabolismus zu sogenannten ultimalen Carcinogenen zurückzuführen (s. Kap. 2.5.1, S. 18ff). So ist die Wechselwirkung der entstandenen DNA-Addukte mit DNA-Polymerasen während der Zellproliferation von entscheidender Bedeutung für die Folgen dieser Adduktbildung. Die Interaktion zwischen Polymerasen und Oligonucleotiden mit gezielt eingebauten, Arylamin-modifizierten Nucleotiden wurde unter anderem in unserer Arbeitsgruppe für die C8-Addukte der Purinbasen bereits untersucht (s. Kap. 2.5.3, S. 21f).^[92,154]

Der Frage, ob DNA-Polymerasen auch N^2 -Arylamin-modifizierte Nucleosidtriphosphate für die Elongation der DNA annehmen, konnte bis dato noch nicht nachgegangen werden, da noch keine Syntheseroute zu entsprechend modifizierten Triphosphaten erschlossen worden war. Ziel dieses Teilprojekts war somit die erstmalige Darstellung N^2 -Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphate. Teile dieses Projekts wurden von S. Otto in ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.^[173] Um N^2 -Arylamin-2'-desoxyguanosin-mono-, -di-, oder -triphosphate zu synthetisieren, werden geeignete reaktive Phosphattriester benötigt. Das von C. Meier entwickelte *cycloSal*-Konzept wurde ursprünglich als Prodrug-System für antiviral aktive Nucleotidanaloga entwickelt.^[65] Als weitere Anwendung wurde gezeigt, dass sich durch elektronenziehende Substituenten am Salicylalkohol die *cycloSal*-Phosphattriester als Aktivester mit einer Vielzahl von Nucleophilen effizient

und in kurzer Reaktionszeit umsetzen lassen.^[174-177] Es sollte im Folgenden erprobt werden, ob sich die N^2 -Arylamin-Addukte zu den entsprechenden *cycloSal*-Phosphattriestern umsetzen lassen und diese anschließend mit einem Pyrophosphat-Salz zu den entsprechenden Triphosphaten umgesetzt werden können (s. Abb. 134).

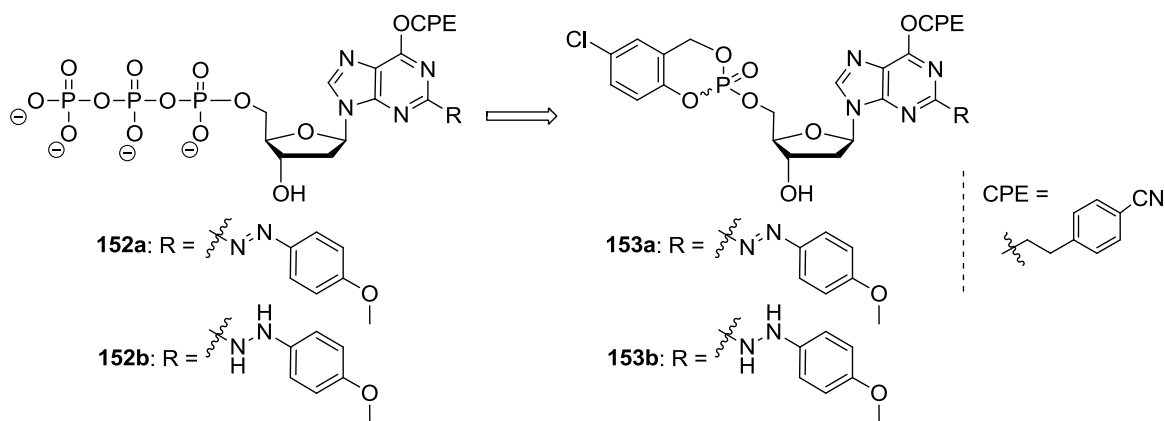


Abb. 134: Retrosynthese der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphate **152a** und **152b** ausgehend von den *cycloSal*-Verbindungen **153a** und **153b**

Zunächst wurden die *cycloSal*-Phosphattriester **153a** und **153b** dargestellt. Die Azoverbindung **153a** wurde als Modellverbindung für **153b** eingesetzt, da eventuell benötigte Optimierungsversuche nicht mit dem für biologische Systeme relevanteren Hydrazinoaddukt **153b** durchgeführt werden sollten.

6.3.1 Synthese der N^2 -Arylamin-modifizierten *cycloSal*-Phosphattriester **153a** und **153b**

In den etablierten Syntheserouten zur Darstellung von *cycloSal*-Phosphattriestern werden substituierte Saligenylchlorphosphite oder Saligenylphosphorchloridate mit der 5'-Hydroxygruppe der Zuckereinheit von Nucleosiden umgesetzt. Die Phosphor(III)-Verbindungen werden nach der Umsetzung mit einem geeigneten Oxidationsmittel zur entsprechenden Phosphor(V)-Verbindung oxidiert.^[174,178] Meist werden die Saligenylchlorphosphite eingesetzt, da diese eine höhere Reaktivität zeigen als die entsprechenden Saligenylphosphorchloridate. Jedoch konnte die reaktivere Phosphor(III)-Verbindung hier nicht eingesetzt werden, da es bei der sich sonst anschließenden Oxidation ebenfalls zu einer Oxidation der Hydrazinofunktion gekommen wäre.

Zudem wurde Chlor als Akzeptorsubstituent in 5-Position der *cycloSal*-Einheit gewählt, da die so substituierten *cycloSal*-Phosphattriester eine hohe Reaktivität

besitzen und dennoch stabil genug sind für eine chromatographische Reinigung (s. Abb. 135). Je elektronenziehender die Substituenten am Salicylalkohol sind, desto elektrophiler ist das Phosphoratom im *cyclo*Sal-Phosphattriester.

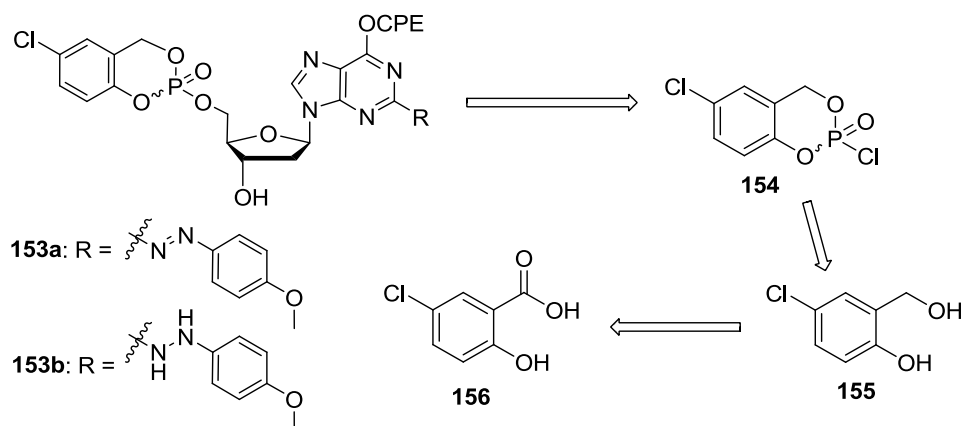


Abb. 135: Retrosynthese der *cyclo*Sal-Phosphattriester **153a** und **153b**

Zur Darstellung des Saligenylphosphorchloridats **154** wurde im ersten Reaktionsschritt 5-Chlorsalicylsäure **156** mit Hilfe von Lithiumaluminiumhydrid mit 64% Ausbeute zum Alkohol **155** reduziert (s. Abb. 136).^[179] Anschließend erfolgte die Umsetzung von **155** mit Phosphorylchlorid und Triethylamin zum Saligenylphosphorchloridat **154**.^[179] Die Umsetzung erfolgte für eine Stunde bei -50 °C. Nach Problemen bei der säulenchromatographischen Reinigung wurde das Produkt nur in einer relativ geringen Ausbeute von 24% erhalten.

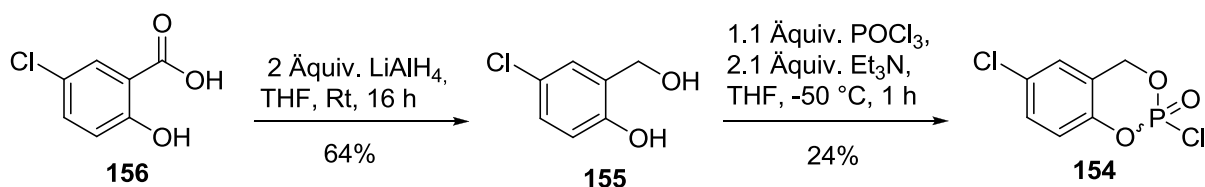


Abb. 136: Darstellung des Saligenylphosphorchloridats **154**

Als ersten Test der Umsetzung *N*²-Arylamin-modifizierter 2'-dG-Addukte mit dem Saligenylphosphorchloridat **154** wurden 100 mg der Azoverbindung **134b** eingesetzt (s. Abb. 137). Es wurden 0.8 Äquivalente des Saligenylphosphorchloridats **154** zugefügt, um die Umsetzung an der 3'-Hydroxygruppe möglichst vollständig zu vermeiden.

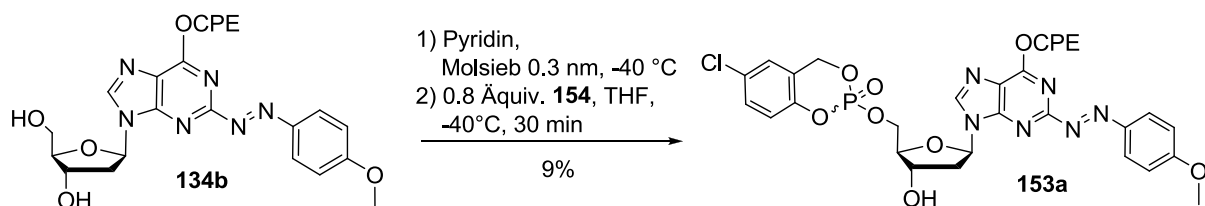


Abb. 137: Darstellung des *cyclo*Sal-Phosphattriesters **153a**

Um eine Bevorzugung der 5'-OH-Gruppe gegenüber der 3'-OH-Gruppe zu gewährleisten, erfolgte die Zugabe der 0.8 Äquivalente Saligenylphosphorchloridat **154** sehr langsam bei -40 °C. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 30 Minuten bei -40 °C gerührt.^[180] Für die Reinigung am Chromatotron wurden dem Laufmittel 2% Essigsäure zugesetzt. So konnte der *cycloSal*-Phosphatriester **153a** mit einer Ausbeute von 9% isoliert werden. Die geringe Ausbeute ist auf eine zu frühzeitige Beendigung der Reaktion zurückzuführen, da neben den 9% **153a** noch 27% sauberes Edukt **134b** und 69 mg einer Mischfraktion aus dem Produkt **153a** und dem Edukt **134b** erhalten wurden.

Nach der erfolgreichen Umsetzung und Isolierung des Produkts **153a** wurde **133b** mit dem Saligenylphosphorchloridat **154** zum 5-Chlor-*cycloSal*-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-monophosphat **153b** umzusetzen. Da die Reaktion zu **153a** zuvor zu keinem isolierbaren 3'-*cycloSal*-Nebenprodukt geführt hatte und die Umsetzung nicht vollständig gewesen war, wurden in diesem Fall 1.2 Äquivalente des Chloridats **154** eingesetzt (s. Abb. 138).

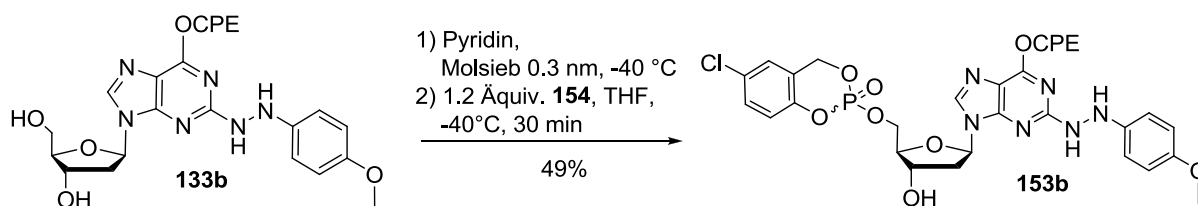


Abb. 138: Darstellung des *cycloSal*-Phosphatriesters **153b**

Auch hier erfolgte die Zugabe der 1.2 Äquivalente Saligenylphosphorchloridat **32** sehr langsam. Die Umsetzung war nach 1.5 Stunden bei -40 °C nach beendeter Zugabe vollständig, sodass nach Reinigung am Chromatotron eine Ausbeute von 49% des 5'-*cycloSal*-Phosphatriester **153b** erzielt wurde. Während der Reinigung kam es jedoch zu einer geringen Zersetzung des Produkts zum entsprechenden Monophosphat. In Abb. 139 ist das ³¹P-Spektrum des 5-Chlor-*cycloSal*-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-monophosphats **153b** zu sehen.

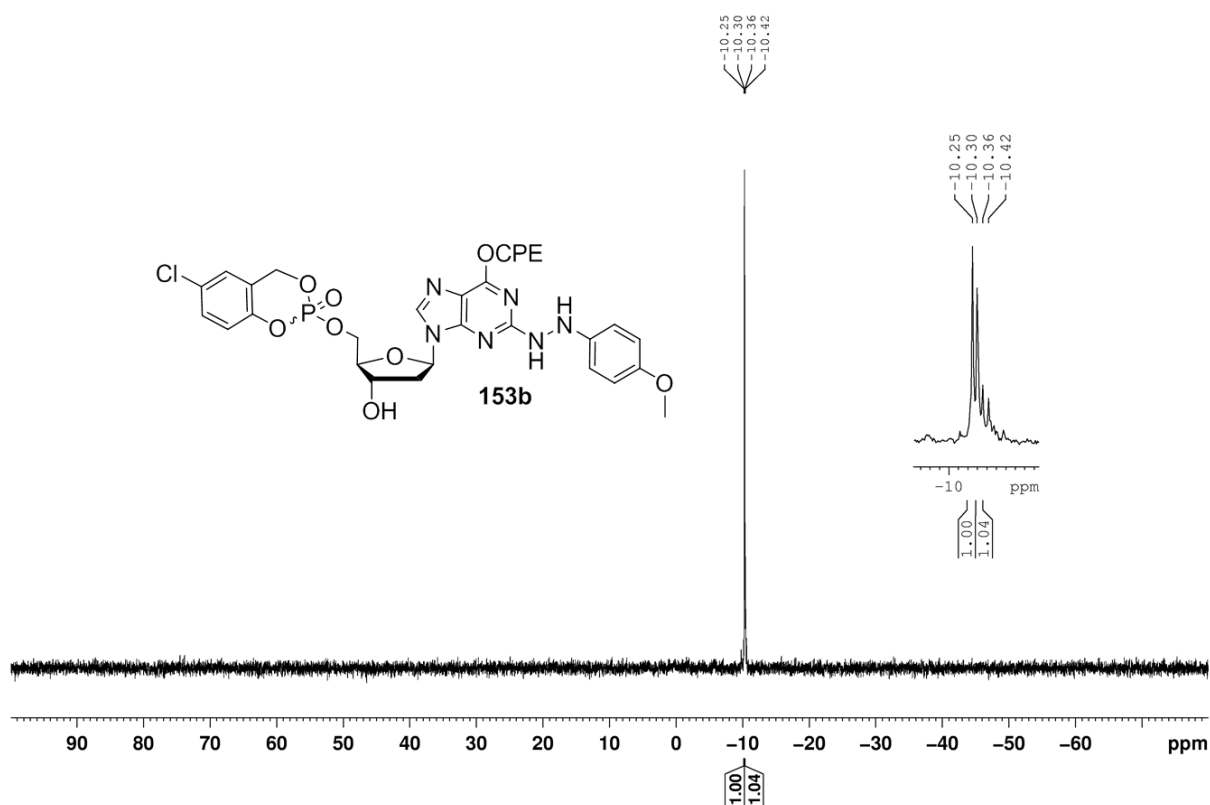


Abb. 139: ^{31}P -NMR-Spektrum des *cycloSal*-Phosphat triesters **153b** in $\text{DMSO}-d_6$

Bei der für *cycloSal*-Phosphat triester charakteristischen chemischen Verschiebung des Phosphoratoms sind die beiden Signale der Diastereomere bei -10.25 und -10.30 ppm erkennbar. Jedoch sind noch kleine andere Peaks vorhanden, die möglicherweise durch eine Oxidation der Hydrazinogruppe zur Azofunktion oder durch die geringfügige Verunreinigung mit doppelt maskiertem Nucleotid zustande gekommen sind. In der folgenden Abbildung ist das zugehörige ^1H -NMR-Spektrum von **153b** gezeigt. Auch hier sind die beiden Diastereomere des *cycloSal*-Phosphat triesters **153b** erkennbar. Jedoch ist zu erkennen, dass tatsächlich eine partielle Oxidation der Hydrazinoverbindung **153b** zur Azoverbindung **153a** stattgefunden hat (s. Abb. 140). Wahrscheinlich ist die auf die chromatographische Reinigung am Chromatotron zurückzuführen, da die Oxidation an normalem Kieselgel bereits zuvor beobachtet wurde. Zur Optimierung sollte die Reinigung zukünftig an neutralem Aluminiumoxid erprobt werden.

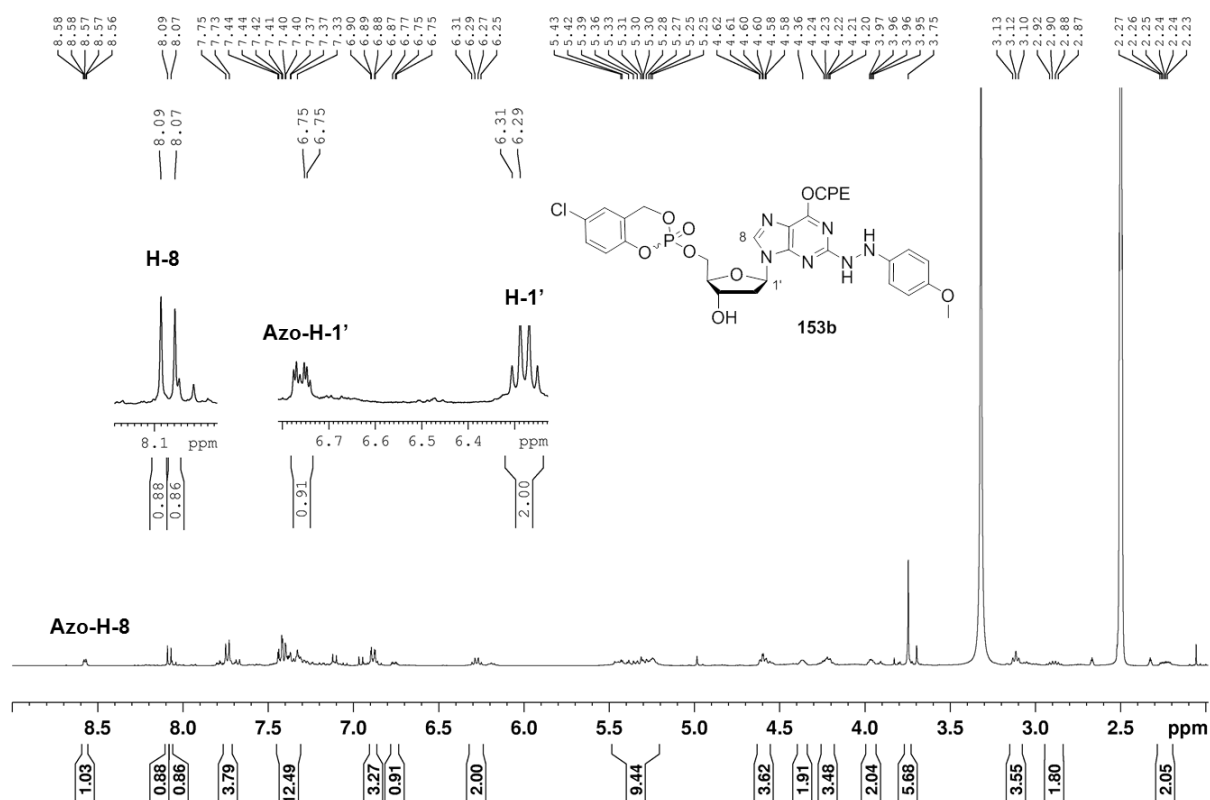


Abb. 140: ^1H -NMR-Spektrum des *cycloSal*-Phosphat triesters **153b** in $\text{DMSO}-d_6$

Es konnte gezeigt werden, dass die bereits etablierte Syntheseroute über Saligenylphosphorchloridate erfolgreich auf die N^2 -(4-Anisidin)-modifizierten Addukte angewendet werden konnte. Die synthetisierten *cycloSal*-Phosphat triester **153a** und **153b** standen somit für Umsetzungen mit den entsprechenden Nucleophilen zu Nucleosidtriphosphaten zur Verfügung.

6.3.2 Darstellung der N^2 -(4-Anisidin)-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphate **152a** und **152b**

Nachdem die entsprechenden *cycloSal*-Phosphat triester **153a** und **153b** dargestellt werden konnten, sollten diese nun mit Pyrophosphat umgesetzt werden. Das für die Reaktionen benötigte Tetrabutylammonium-Pyrophosphat wurde von *I. Sarac* und *T. Gollnest* zur Verfügung gestellt. Die hier verwendete Methode ist in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe optimiert und etabliert worden und sollte so im Folgenden auf die Phosphat triester **153a** und **153b** übertragen werden (s. Abb. 134, S. 141).^[181] Generell ist bei dieser Art von Reaktion absolute Wasserfreiheit oberstes Gebot. Aus diesem Grund wurden die vorgelegten Edukte mit aktiviertem Molsieb 4 Å über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet. Am nächsten Tag wurde absolutes DMF zugegeben und wiederum für 3 Stunden stehen gelassen. Daraufhin wurde der

gelöste Phosphatriester über 2 min zu der Pyrophosphat-Lösung getropft. Danach wurde mit 1 mL trockenem DMF das Molsieb im Triesterkolben nachgespült und dieses DMF ebenfalls zum Pyrophosphat getropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 21 h bei Rt gerührt.

Als erster Versuch wurde **153a** zur Synthese des Triphosphats **152a** eingesetzt (s. Abb. 141). Der Reaktionsumsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie an Silicagel verfolgt, als mobile Phase wurde Isopropanol/Ammoniumacetat 1M (2:1) verwendet. Dadurch konnte auch das sehr polare Triphosphat **152a** eluiert werden.

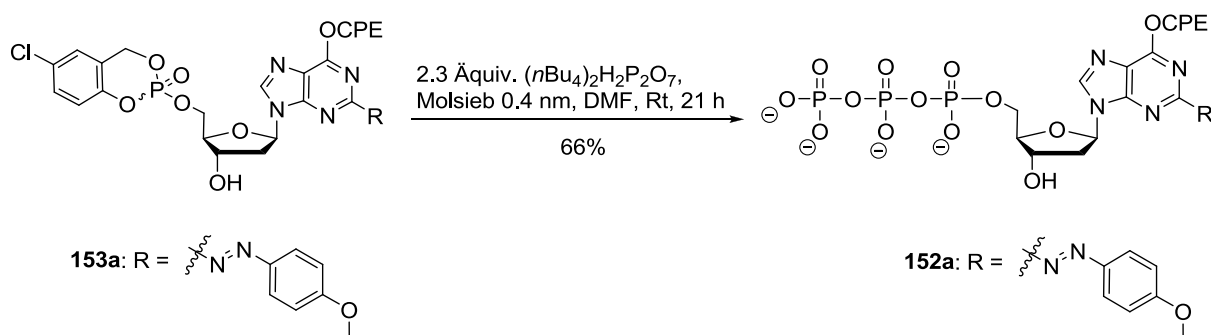


Abb. 141: Darstellung des Triphosphats **152a** aus dem cycloSal-Phosphatriester **153a**

Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt auf Ammonium-Gegenionen umgesalzen, da sich bei der Optimierung des Syntheseprotokolls für NTPs von S. Warnecke gezeigt hatte, dass diese Form am besten zu reinigen war.^[181] Die anschließend durchgeführte säulenchromatographische Reinigung an RP-18-Kieselgel mit einem Wasser/Acetonitril-Gradient als Eluent ergab das *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-triphosphat **152a** in einer Ausbeute von 68%. Die Ausbeute wurde mit drei Ammoniumgegenionen berechnet.

Diese Anzahl kann etwas variieren, da durch Gefriertrocknung der erhaltenen Fraktionen unter Protonierung der Phosphatgruppe wahrscheinlich Teile der Gegenionen als Ammoniak ausgasen konnten, was von S. Warnecke zuvor bereits beobachtet worden war.^[174] Im Folgenden sind das ³¹P- und das ¹H-NMR-Spektrum der gereinigten Zielverbindung **152a** abgebildet. Das ³¹P-NMR-Spektrum weist die charakteristischen Signale für Triphosphate auf, z. B. das bei -23.21 ppm liegende Pseudotriplett des β-Phosphoratoms (s. Abb. 142). Erfreulich war, dass das bei der Reaktion in geringem Anteil ebenfalls entstandene Nucleosidmonophosphat fast vollständig abgetrennt werden konnte.

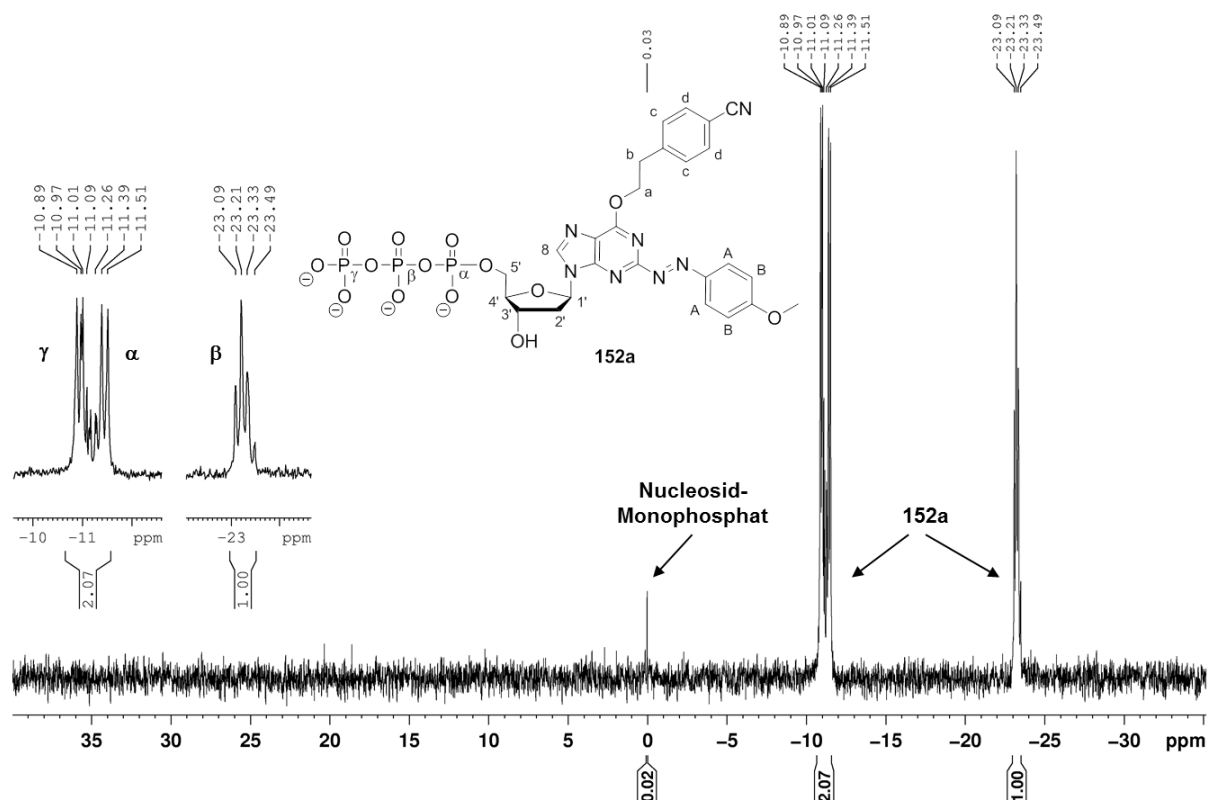


Abb. 142: ³¹P-NMR-Spektrum von O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-triphosphat **152a** in D₂O

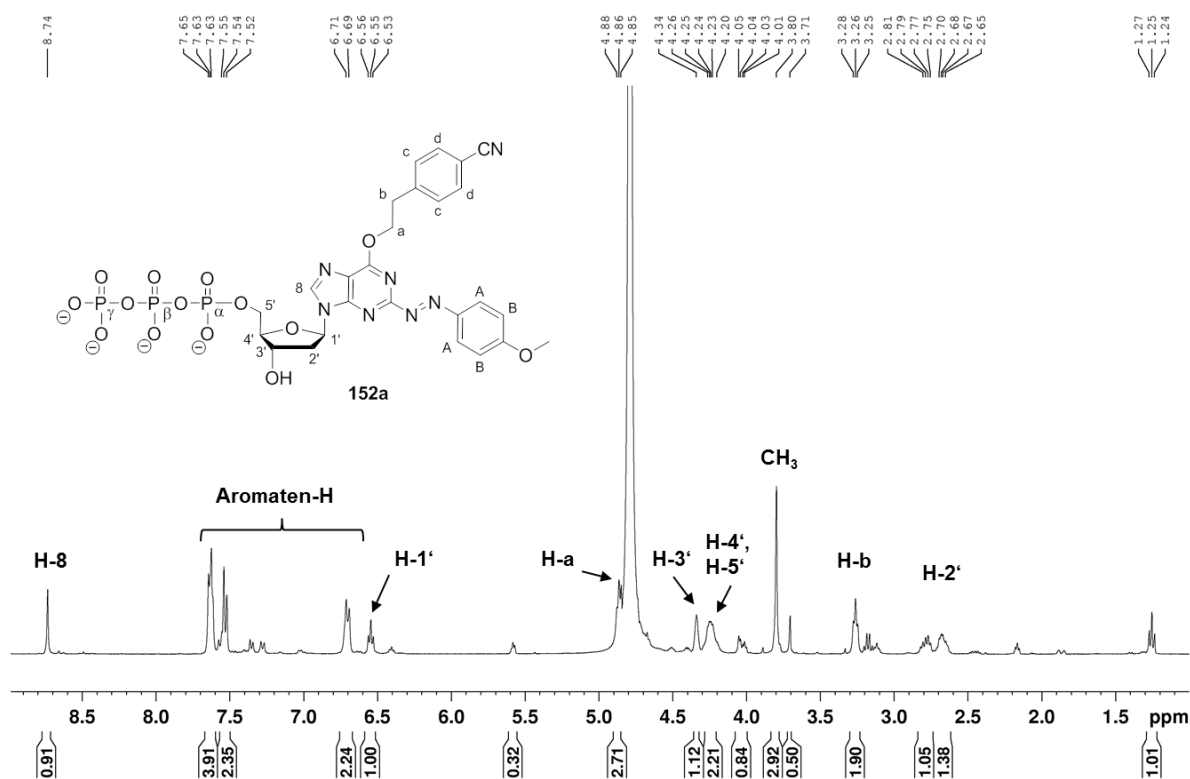


Abb. 143: ¹H-NMR-Spektrum von O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-triphosphat **152a** in D₂O

Nachdem diese Reaktion erfolgreich war, wurde als nächstes 5-Chlor-*cycloSal*-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-monophosphat **153b** mit dem Pyrophosphat-Salz umgesetzt (s. Abb. 144).

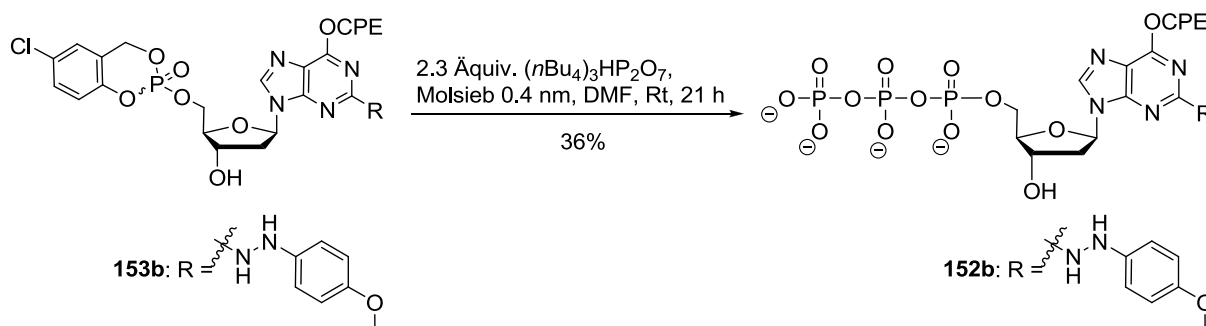


Abb. 144: Darstellung des Triphosphats **152b** aus dem *cycloSal*-Phosphattriester **153b**

Beim Extrahieren der organischen Phase (Ethylacetat) mit Wasser wurde diesmal eine sehr schwierige Phasentrennung beobachtet. Dies ist wahrscheinlich auf das DMF zurückzuführen. Nach der Aufarbeitung wurden die Gegenionen im Rohprodukt zur besseren Reinigung wie zuvor gegen Ammonium ausgetauscht. Die anschließend durchgeführte säulenchromatographische Reinigung an RP-18-Kieselgel mit einem Wasser/Acetonitril-Gradient als Eluent ergab das O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-triphosphat **152b** in einer relativ geringen Ausbeute von 36%. Im Folgenden sind das ³¹P- und das ¹H-NMR-Spektrum der gereinigten Zielverbindung **152b** abgebildet.

Das ³¹P-NMR-Spektrum zeigt die charakteristischen Signale für Triphosphate, z. B. das bei -23.09 ppm liegende Pseudotriplett des β-Phosphoratoms (s. Abb. 145). Interessant war, dass die chemischen Verschiebungen der α- und γ-Phosphoratoms bei den beiden Triphosphaten **152a** und **152b** relativ nahe beieinander bei ca. -10 ppm liegen. Für verschiedene NTPs wurde dies bereits von S. Warnecke beobachtet.^[181] In anderen Fällen war das γ-Phosphoratom etwas zu tieferem Feld verschoben (ca. -7 ppm).^[182] Neben den Signalen der Phosphoratom des Triphosphats **152b** zeigte das ³¹P-NMR-Spektrum weitere phosphorhaltige Verbindungen mit Signalen bei -5.59 und -6.31 ppm, sowie einen geringen Anteil Nucleosidmonophosphat. Anhand des ¹H-NMR-Spektrums wurde ebenfalls deutlich, dass das Triphosphat **152b** nach der säulenchromatographischen Reinigung nicht vollständig sauber erhalten werden konnte und hier zukünftig weitere Optimierung nötig ist.

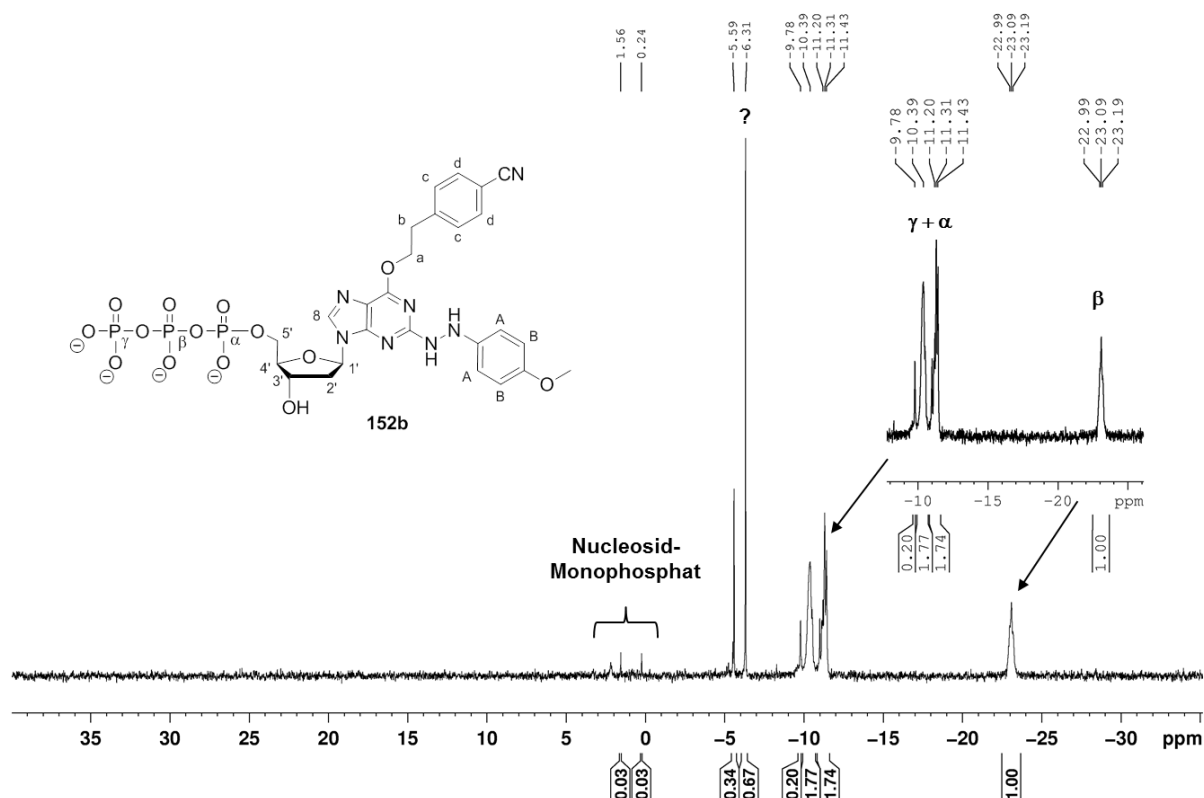


Abb. 145: ³¹P-NMR-Spektrum von O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-triphosphat **152b** in D₂O

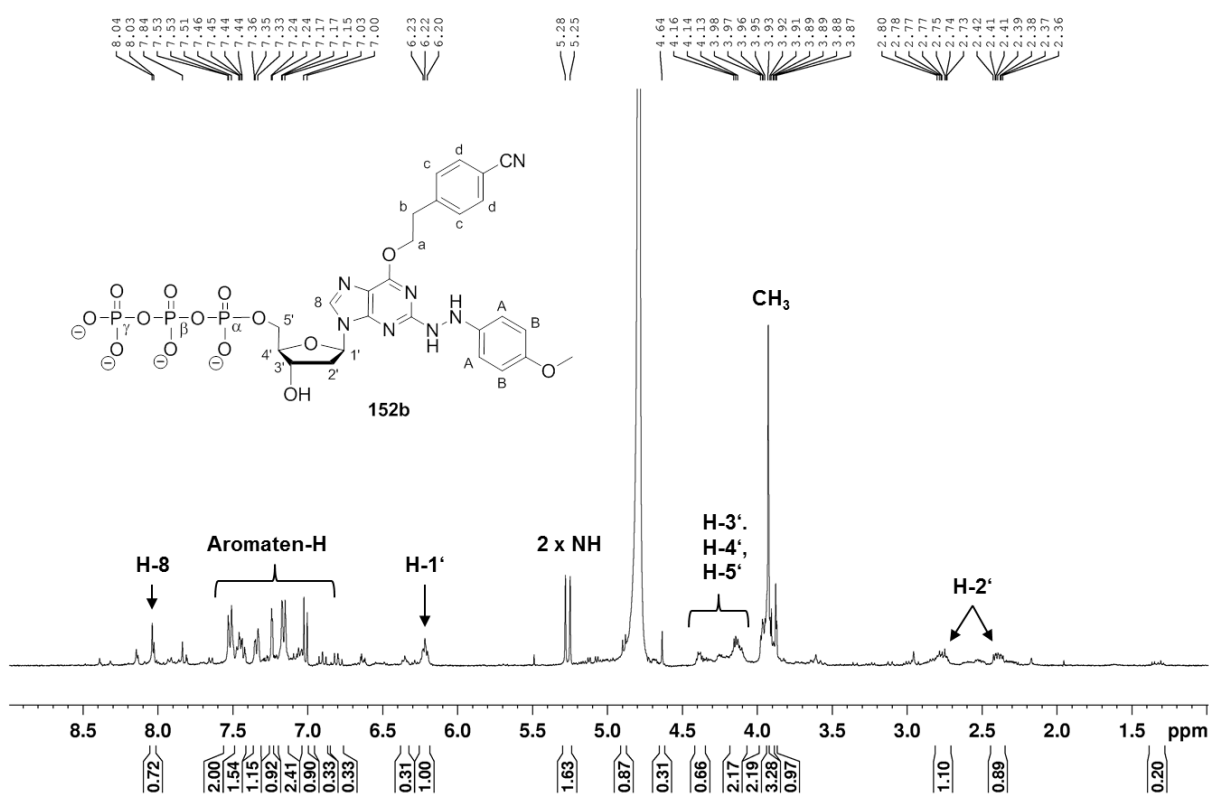


Abb. 146: ¹H-NMR-Spektrum von O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-triphosphat **152b** in D₂O

Trotz der Verunreinigungen konnten die Triphosphate **152a** und **152b** erfolgreich synthetisiert werden, was auch massenspektrometrisch bestätigt wurde. Mit diesem Ergebnis wurden erstmals Triphosphate von N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten chemisch zugänglich gemacht. Die geschaffenen Grundlagen können in zukünftigen Arbeiten weiter optimiert werden. So sollte z. B. die Verwendung einer anderen Schutzgruppe an der O^6 -Position erprobt werden, damit diese leichter abgespalten werden kann. Zusätzlich können weitere Arylamine eingesetzt werden und anschließend vor allem biochemische Untersuchungen der Interaktion mit DNA-Polymerasen durchgeführt werden. Mit diesem Kapitel sind die Resultate des dritten Abschnitts dieser Arbeit diskutiert und nun folgt eine kurze Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse.

6.4 Fazit: Synthesen zur Darstellung der Arylamin-Addukte

Das in diesem Kapitel vorgestellte Themengebiet kann in drei Projekte unterteilt werden:

Zur Erschließung der Verbindungsklasse C5-Arylamin-modifizierter 2'-dC-Addukte wurden zunächst erfolgreich C5-halogenierte-2'-dC- und C5-halogenierte-2'-dU-Verbindungen dargestellt (s. S. 119-123).

Das 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-5-brom-2'-desoxycytidin **103a** konnte mit einer Ausbeute von 47% über zwei Stufen über die Schützung von 2'-dC*HCl **106** mit TBDMS-Cl und anschließender Bromierung mit LiBr gewonnen werden (s. S. 121). Für die Synthese von 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-5-brom-2'-desoxyuridin **110a** stellte sich die Syntheseroute über das 5-Brom-2'-dU **112a** als effizienter heraus, da hierbei eine Ausbeute über zwei Stufen von 46% erzielt werden konnte (s. S. 123). Die Synthese von 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-5-iod-2'-dU **110b** gelang in guter Ausbeute (86%) aus 5-Iod-2'-dU **112b**.

Die C-N-Kreuzkupplungen der oben beschriebenen C5-halogenierten Nucleoside unter den für die Purinbasen etablierten Kupplungsbedingungen waren nicht erfolgreich. Daraufhin wurden sowohl die Base und der Ligand als auch die Reaktionszeit variiert (s. S. 123f). Das Kreuzkupplungsprodukt konnte jedoch in keinem Fall erhalten werden, so dass in zukünftigen Arbeiten weitere Optimierungen der Kupplungsbedingungen durchgeführt oder alternative Wege zur Darstellung von **102** gefunden werden sollten. Hierbei könnte die Verwendung eines anderen Palladium-Katalysators ein Ansatzpunkt sein.

Über die von *N. Böge* etablierte, siebenstufige Syntheseroute konnten vier *N*²-Arylamin-modifizierte Phosphoramidite von 2'-Desoxyguanosin, **10a-10d**, erfolgreich dargestellt werden (s. S. 126-129 und S. 132-134).

Da zusätzlich eine Alternative zur Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion gefunden werden sollte, wurden zur Erprobung zunächst zwei C-2-Tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphatsalze **127** und **128** dargestellt (s. S. 129-131). Zur anschließenden nucleophilen, aromatischen Substitution durch das entsprechende Hydrazin wurden verschiedenste Basen und Reaktionsbedingungen erprobt. Jedoch führten die Versuche nur in einem Fall zum Produkt (s. S. 131). Mit *n*-BuLi konnte das Produkt **11a** in einer Ausbeute von 2% isoliert werden.

Nach der erfolgreichen Synthese der vier Phosphoramidite **10a-10d** wurden diese mit Hilfe der chemischen DNA-Synthese an der siebten Position in die Oligonucleotide **138-141** der *NarI*-Sequenz eingebaut (s. S. 134f). Nach der Reinigung per HPLC konnten jedoch **139** und **141** massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Die erfolgreich dargestellten Oligonucleotide **138** und **140** wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften mit den *mismatch*-Oligonucleotiden **142-145** sowie den C8-Arylamin-Addukten vom 2'-dG **146-149** verglichen (s. S. 138-140). Durch Messung der *T_m*-Werte wurde ein geringerer Einfluss dieser beiden monozyklischen, *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte auf die Stabilität des entsprechenden Doppelstranges festgestellt, als es z. B. bei den anderen Addukten am 2'-dG oder den *mismatch*-Oligonucleotiden der Fall war.

Im dritten Projekt dieses Teils konnten erstmalig 5'-Triphosphate von *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukten dargestellt werden (s. S. 145-150). Dazu wurde die Anwendung der etablierten *cycloSal*-Methode nach *C. Meier* zur Darstellung der 5'-*cycloSal* Phosphatriester **153a** und **153b** erprobt. Durch Verwendung des Saligenylphosphorchloridats **154** konnte eine oxidative Aufarbeitung und damit die Oxidation der Hydrazingruppe weitgehend verhindert werden (s. S. 142-145). Mit der erfolgreichen Darstellung der modifizierten 5'-Triphosphate **152a** und **152b** konnte gezeigt werden, dass die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Syntheseroute auf *N*²-Arylamin-modifizierte 2'-dG-Addukte prinzipiell übertragbar ist.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden drei Themengebiete bearbeitet, wobei der deutliche Schwerpunkt auf den ersten beiden Teilen lag. Diese standen vor dem Hintergrund, neue Inhibitoren der Desoxyhypusinsynthase (DHS) zu identifizieren. Durch Inhibition der DHS sollte eine Hemmung der Replikation von HIV-1 erreicht werden. Der dritte Teil stand vor dem Hintergrund der Carcinogenese durch aromatische Amine. In diesem Abschnitt wurden Arylamin-modifizierte Nucleoside chemisch synthetisiert, nach Einbau in Oligonucleotide untersucht und in entsprechende Triphosphate überführt.

7.1 Neue *active-site* Inhibitoren der DHS

Die zelleigene DHS dient zur Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A, der eine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen und Infektionen, unter anderem bei HIV-1, zu spielen scheint (s. S. 11-12). Zur Identifizierung neuer, verbesserter Inhibitoren der DHS wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um *M. Rarey* ein rationaler Ansatz zum Wirkstoffdesign angewandt (s. S. 25-27 und 50-52).

Zunächst wurden, basierend auf der Kristallstruktur der DHS und dem bekannten Inhibitor der DHS, GC7 **1**, von *A. Kolodzik* über Struktur-basiertes Wirkstoffdesign 29 virtuelle Hits als potentielle, neue DHS-Inhibitoren der ersten Generation errechnet (s. S. 26). Von diesen waren drei Verbindungen kommerziell erhältlich und zu sieben der ausgewählten Verbindungen wurden effiziente Syntheserouten entwickelt (s. S. 27-45). Die insgesamt 10 neuen, potentiellen DHS-Inhibitoren der ersten Generation **5**, **16-20** und **26-29** (s. Abb. 46, S. 45) wurden von der Arbeitsgruppe um *J. Hauber* eingehenden *in vitro* Tests hinsichtlich der DHS-Inhibition und der Inhibition der HIV-1 Replikation in Zellkultur unterzogen (s. S. 45-49). Es wurde für **17** und **28** eine Inhibition der DHS festgestellt. In den Tests zur Inhibition der HIV-1 Replikation zeigte nur **17** eine signifikante Aktivität gegen HIV-1 (s. S. 47). Bei **17** (DAPI), das als DNA-Farbstoff in der Biochemie genutzt wird, spielen eventuell hinsichtlich der guten Werte für die HIV-1 Inhibition zusätzlich zur DHS-Inhibition auftretende Wirkmechanismen eine Rolle. Positiv ist, dass alle getesteten Verbindungen bis zu einer Konzentration von 4 µM keine toxischen Effekte auf die Zellen hatten (siehe auch 4.1.4, S. 49).

Im Folgenden wurde **17** als Hit verwendet, um durch die gewonnen Erkenntnisse das *molecular modelling* zu optimieren (s. S. 50-52). Zusätzlich zum Struktur-basierten Wirkstoffdesign wurde Fragment-basiertes Design verwendet, um *in silico* eine zweite Generation neuartiger, potentieller Inhibitoren der DHS zu generieren, deren virtuelle Bindungsaffinitäten zur DHS im Vergleich zu GC7 **1** und der ersten Generation potentieller DHS-Inhibitoren deutlich verbessert waren (s. Abb. 54, S. 52). Aus den neu berechneten Verbindungen wurde 2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46** nach synthetischen Gesichtspunkten für die Synthese ausgewählt. Die theoretischen Wechselwirkungen von **46** mit dem aktiven Zentrum der DHS sind in Abb. 94 (S. 93) veranschaulicht.

Das kommerziell erhältliche 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** wies ein geeignetes Substitutionsmuster auf und wurde als Ausgangsverbindung in der entwickelten Syntheseroute verwendet (s. Abb. 57, S. 55). Nach erfolgreichem Aufbau des Indolgerüsts **53b** (s. S. 58-63) führte dieser erste Syntheseweg nur bis eine Stufe vor der Zielverbindung, da die Reduktion der Nitrilfunktion des Indols **53b** zur Aminomethylgruppe nicht erfolgreich war (s. S. 68f). Daraufhin wurde die Syntheseroute umgestellt (s. Abb. 74, S. 71). Erneut wurde vom 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** ausgegangen, welches zuerst mit Boran*THF zu **61** reduziert wurde. Daraufhin wurde das Produkt mit Di-*tert*-butyldicarbonat zu **62a** umgesetzt. Die in diesem Schritt versuchte gleichzeitige Einführung der *N*-Boc-Gruppe an der aromatischen Aminogruppe war nicht erfolgreich, jedoch führte die Umsetzung von **62a** mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid zu **62b** zum Durchbruch (s. S. 73-74).

Ausgehend von den Verbindungen **62a** und **62b** konnte die Zielverbindung **46** nach Optimierung der Synthesen auf zwei verschiedenen Wegen erstmalig erfolgreich dargestellt werden (Syntheseroute 1, s. Abb. 95, S. 94, und Syntheseroute 2, s. Abb. 96, S. 95). Die entwickelten Synthesewege unterschieden sich in der Abfolge der durchgeführten Reaktionsschritte und vor allem in der Möglichkeit, das Indolgerüst einmal mit geschütztem Indolstickstoffatom (Route 1, 7 Stufen, 30-49% Gesamtausbeute) und andererseits mit freiem Indolstickstoffatom zu synthetisieren (Route 2, 7 Stufen, 14-17% Gesamtausbeute). Zusammengenommen bieten beide Synthesewege jeweils Vorteile und einen effizienten Zugang zu der Verbindungsklasse Aminomethyl- bzw. Guanidinoalkyl-substituierter Indole (siehe auch Kap. 4.3.9, S. 93-96). Die vor allem bei Route 1 hohen Ausbeuten und zuverlässige Reproduzierbarkeit erleichtern die Herstellung größerer Mengen an **46**.

bzw. entsprechender Derivate. Die in dieser Arbeit geschaffenen Grundlagen zur Synthese von **46** werden Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein, unter anderem um Route 2 hinsichtlich einer besseren Gesamtausbeute zu optimieren und vor allem, um weitere Verbindungen als neuartige Inhibitoren der DHS zu erhalten.

In den biochemischen Tests zeigte sich, dass **46** die DHS dosisabhängig hemmt. Jedoch war die Substanz nur etwa halb so aktiv wie GC7 **1** (s. S. 91). Vergleicht man die Ergebnisse des DHS-Assays mit denen des Tests gegen HIV-1, stellt man eine große Ähnlichkeit fest. Die HIV-1 Replikation wurde ebenfalls durch **46** gehemmt und ungefähr im gleichen Verhältnis geringer als GC7 **1** inhibierend wirkte (s. S. 92). Die für die erstmalig synthetisierte Verbindung **46** erhaltenen Testergebnisse sind trotzdem ein sehr erfreuliches Resultat, da eine dosisabhängige Inhibition gefunden wurde und somit durch rationales Wirkstoffdesign ein neuartiger *Hit* zur Inhibition der DHS und damit HIV-1 identifiziert werden konnte.

7.2 Untersuchung von CNI-1493 Derivaten als DHS-Inhibitoren

Neben den zuvor beschriebenen Arbeiten zur Entwicklung neuer *active-site* Inhibitoren der DHS wurde sich im zweiten Abschnitt mit CNI-1493 **2**, einem schon bekannten DHS-Inhibitor, beschäftigt (s. S. 11). Interessant ist, dass **2** zu groß ist, um einerseits durch den schmalen Tunnel zum aktiven Zentrum der DHS zu gelangen und andererseits für die Bindung im aktiven Zentrum selbst (vgl. Abb. 7, S. 10). Die zur Aktivität von **2** benötigten Strukturelemente wurden über die Derivatisierung von CNI-1493 identifiziert. Außerdem sollte die Stabilität von **2** untersucht werden.

Zur Synthese von CNI-1493 **2** wurde eine literaturbekannte Syntheseroute angewendet (s. S. 97-101). Das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte CNI-1493 **2** wurde daraufhin von der Arbeitsgruppe um R. Hilgenfeld erstmalig mit der DHS co-kristallisiert und zeigte eine mögliche Bindungsstelle auf der Außenfläche der DHS auf.^[54] Um eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufstellen zu können, wurde der Linker zwischen den beiden Kopfgruppen **87** variiert (s. Abb. 102, S. 101). Es konnten dreizehn CNI-Analoga **75-87** über den bekannten, fünfstufigen Syntheseweg erfolgreich dargestellt werden (s. S. 101-103). Nach den von Kooperationspartnern durchgeführten biochemischen Tests dieser CNI-1493 Derivate **75-88** wurde festgestellt (s. S. 103-108), dass mindestens zwei auf irgendeine Weise verknüpfte

Kopfgruppen für die Aktivität von CNI-1493 **2** notwendig waren. Als kürzest-möglicher Linker stellte sich der Oxalyl-Linker heraus (**75**, s. S. 104). Eine zu lange Alkylkette, wie bei **80** (C₁₄), führte möglicherweise durch entropische Effekte zu einer schlechteren Aktivität. Da die starren CNI-Analoga **75**, **85** und **86** eine gute Inhibition zeigten, obwohl sie nicht in der Lage sind, die in der Kristallstruktur gefundene Konformation einzunehmen, ist anzunehmen, dass es noch einen anderen Wirkmechanismus dieser Analoga gibt (s. S. 105). Die Inhibition von HIV-1 in Zellkultur durch die CNI-Analoga **76**, **79**, **85** und **86** zeigte bis auf eine Ausnahme eine hohe Übereinstimmung in den Aktivitäten der Verbindungen mit den Resultaten des DHS-Assays (s. S. 107f).

Die Tests gegen das Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* zeigten etwas andere Ergebnisse (s. S. 108-111). Eine Inhibition des Pilzwachstums über eine Hemmung der DHS von *F. graminearum* war bei den starren CNI-Analoga **75** und **85** und **86** nahezu nicht vorhanden (s. S. 110). Von den getesteten Verbindungen waren vier Verbindungen (**76**, **78**, **83** und **84**) so aktiv wie CNI-1493 **2** und mit **81** wurde eine Verbindung gefunden, die schon bei 5 µM eine nahezu vollständige Inhibition der DHS des Pflanzenpathogens und damit eine nahezu vollständige Hemmung des Pilzwachstums zeigte.

In einem weiteren Projekt des zweiten Abschnitts wurde eine Methode zur Analyse der Hydrolyse von CNI-1493 **2** mit Hilfe der HPLC entwickelt (s. S. 111f). Im Sauren war **2** über mindestens 5 Tage stabil, dagegen wurde im neutralen bis basischen Milieu eine schrittweise Hydrolyse der Iminbindungen zu den entsprechenden Ketonen beobachtet und diese mittels LC-MS verifiziert (s. S. 114f). Je höher die Basizität des Puffers, desto schneller verlief die Hydrolyse. Unterschiedliche Puffer führten bei gleichem pH-Wert zu verschiedenen Halbwertszeiten. Der pH-Wert hatte einen deutlich größeren Einfluss als die Temperatur. Eine Hydrolyse der Amidbindung konnte in keinem Fall beobachtet werden. Durch die Untersuchung der Hydrolyse von **2** im Kristallisationspuffer konnte das von *Hilgenfeld et al.* in der Kristallstruktur des DHS:CNI-1493 Co-Kristalls^[54] gefundene Aminoguanidinfragment mit der Hydrolyse der Iminbindungen von CNI-1493 **2** erklärt werden (s. S. 115). Unterstützend kam hinzu, dass für Aminoguanidin **88** keine DHS-Aktivität gemessen wurde, so dass das im aktiven Zentrum der kristallisierten DHS gefundene **88** ein Artefakt aus der Hydrolyse von CNI-1493 unter den Inkubationsbedingungen war (s. S. 104).

7.3 Aromatische Amine als DNA-Addukte

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene Projekte durchgeführt:

Zunächst wurden erste Versuche, einen synthetischen Zugang zu den C5-Arylamin-Addukten des 2'-dCs zu entwickeln, durchgeführt (s. Abb. 112, S. 119). Dazu wurden als Erstes C5-halogenierte-2'dC- **103a** und **103b** und -2'-dU-Verbindungen **110a** und **110b** erfolgreich dargestellt (s. S. 119-123). Die C-N-Kreuzkupplungen der oben beschriebenen C-5-halogenierten Nucleoside unter den etablierten Kupplungsbedingungen zu **102** waren nicht erfolgreich. Darüber hinaus wurden sowohl die Basen und der Ligand als auch die Reaktionszeit variiert (s. S. 123f). Das Kreuzkupplungsprodukt **102** bzw. **109** konnte jedoch in keinem Fall erhalten werden, so dass in zukünftigen Arbeiten weitere Optimierungen der Kupplungsbedingungen durchgeführt oder alternative Wege zur Darstellung von **102** gefunden werden sollten. Hierbei könnte die Verwendung eines anderen Palladium-Katalysators ein Ansatzpunkt sein.

Im zweiten Projekt des dritten Teils wurden aufbauend auf bereits durchgeführten Arbeiten vier N^2 -Arylamin-modifizierte Phosphoramidite von 2'-Desoxyguanosin, **10a-10d**, über eine siebenstufige Syntheseroute erfolgreich dargestellt (s. S. 126-129 und S. 132-134). Es wurde versucht, zur etablierten Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion eine Alternative zu finden. Dafür wurden zunächst zwei C-2-Tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphatsalze **127** und **128** zur Erprobung dargestellt (s. S. 129-131). Zur anschließenden nucleophilen, aromatischen Substitution durch das entsprechende Hydrazin wurden verschiedene Basen und Reaktionsbedingungen erprobt. Jedoch führten die Versuche nur in einem Fall zum Produkt (s. S. 131). Mit *n*-BuLi konnte das Produkt **11a** in einer Ausbeute von 2% isoliert werden. Nach der erfolgreichen Synthese der vier Phosphoramidite **10a-10d** wurden diese mit Hilfe der chemischen DNA-Synthese an der siebten Position in die Oligonucleotide **138-141** der *NarI*-Sequenz eingebaut (s. S. 134f). Die erfolgreich dargestellten Oligonucleotide **138** und **140** wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften mit den *mismatch*-Oligonucleotiden **142-145** sowie den Oligonucleotiden der C8-Arylamin-Addukten vom 2'-dG **146-149** verglichen (s. S. 138-140). Durch Messung der T_m -Werte wurde ein geringerer Einfluss dieser beiden monozyklischen, N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte **138** und **140** auf die Stabilität des entsprechenden Doppelstranges festgestellt, als es z. B. bei den

anderen Addukten am 2'-dG **146-149** oder den *mismatch*-Oligonucleotiden **142-145** der Fall war.

Als drittes Projekt dieses Abschnitts konnten erstmalig 5'-Triphosphate der N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte dargestellt werden (s. S. 145-150). Dazu wurde die Anwendung der etablierten *cycloSal*-Methode nach C. Meier zur Darstellung der 5'-*cycloSal* Phosphattriester **153a** und **153b** erprobt. Durch Verwendung des Saligenylphosphorchloridats **154** konnte eine oxidative Aufarbeitung und damit die Oxidation der Hydrazingruppe weitgehend verhindert werden (s. S. 142-145). Mit der erfolgreichen Darstellung der modifizierten 5'-Triphosphate **152a** und **152b** konnte gezeigt werden, dass die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Syntheseroute auf die N^2 -Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte prinzipiell übertragbar ist (s. S. 146-150).

8 Summary

This thesis deals with three topics. Identifying new inhibitors of the deoxyhypusine synthase (DHS) was the main subject of the first two parts. The inhibition of this cellular protein should lead to a subsequent inhibition of HIV-1 replication. The carcinogenesis induced by aromatic amines was the background in the third chapter. Therefore, arylamine modified nucleoside adducts should be synthesized and investigated.

8.1 New *active-site* DHS inhibitors

The cellular DHS is needed for activation of the eukaryotic initiation factor 5A. Among other diseases, eIF-5A is supposed to be also involved in the HIV-1 replication cycle (p. 11-12). In cooperation with the group of *M. Rarey* a rational drug design approach was used (p. 25-27 and 50-52).

Based on the DHS crystal structure and the known inhibitor GC7 **1**, *A. Kolodzik* identified via structure-based drug design 29 virtual hits as new, potential first generation DHS inhibitors (p. 26). Three compounds were commercially available and efficient synthetic routes were developed for the synthesis of another seven compounds (p. 27-45). The total of ten new, potential first generation DHS inhibitors **5**, **16-20** and **26-29** were tested in the group of *J. Hauber* regarding their inhibition of the DHS and additionally their inhibitory potency on HIV-1 replication in cell culture (p. 45-49). However, only **17** and **28** inhibited the DHS. These results were consistent with the measured activity against HIV-1, where **17** showed effective inhibition (p. 48). Due to the fact that **17** (DAPI) is also a known DNA-stain, maybe other mechanisms of action were additionally responsible for the good anti-HIV-1 activity. Noteworthy, all tested compounds exhibited no cellular toxicity up to 8 μ M (see also chapter 4.1.4, p. 49).

In the following work, **17** was used as a hit structure for optimisation of the molecular modelling (p. 50-52). In addition to the previously used structure-based design, fragment-based drug design was applied to develop a second generation of new, potential DHS inhibitors (p. 52). These new compounds had much higher virtual binding affinities to the DHS compared to GC7 **1** and the first generation of newly designed, potential DHS inhibitors. From the second set of compounds the 2-(2-

guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1H-indole **46** was selected for synthesis regarding the synthetic accessibility. The calculated interactions between **46** and the active site of the DHS are shown in figure 91 (p. 93).

Bearing a suitable substitution pattern, the commercially available 4-amino-3-iodobenzonitrile **50** was used as a starting material for the developed synthetic route (p. 55). After successful synthesis of the indole moiety **53b** (p. 58-63), the first synthetic approach failed when trying to reduce the nitrile function to the corresponding aminomethyl group (p. 68-69). Thus, the synthetic route was rearranged (p. 71) starting again from the 4-amino-3-iodobenzonitrile **50** which was in this case first reduced to **61** using borane*THF. After optimization the target compound **46** was successfully prepared via two synthetic routes (synthetic route 1, p. 94, and route 2, p. 95). Both developed synthetic approaches differ in the reaction sequence and, more important, in the possibility to synthesize the indole moiety on the one hand with a *N*-tosyl protected indole nitrogen (route 1, 7 steps, 30-49% overall yield) and on the other hand with a free indole nitrogen atom (route 2, 5 steps, 14-17% overall yield). Both synthetic pathways exhibit advantages and represent an efficient approach for this new class of aminomethyl- or guanidinoalkyl- substituted indoles (see also chapter 4.3.9, p. 93-96).

The new compound **46** showed dose-dependent inhibition of the DHS in vitro. However, the activity of **46** was about half of the GC7 **1** inhibitory potency (p. 92). Comparison of the DHS-assay results with the results of the test in cell culture against HIV-1 showed a similar activity profile, meaning that GC7 **1** was twice as active as **46** (p.93). The obtained antiviral data for **46** is still a very good result because a dose-dependent inhibition of the DHS and HIV-1 was found. Thereby, it was shown that the approach of applying rational drug design to discover new DHS inhibitors which was used in this work led to a new hit structure against HIV-1.

8.2 CNI-1493 derivatives as DHS inhibitors

Besides the previously described work regarding the development of new active site DHS inhibitors the second part of this thesis deals with CNI-1493 **2**, a known DHS inhibitor (p. 11). It is interesting that **2** does not fit into the active site and is also too big to pass through the small tunnel to the catalytic site (p. 10). The structural requirements for the activity of CNI-1493 **2** were identified by the synthesis and

biological evaluation of a set of CNI analogs. In addition, the stability of CNI-1493 should be investigated.

A literature known approach was used for the synthesis of CNI-1493 **2** (p. 98-102). The synthesized **2** was used by the group of *R. Hilgenfeld* to obtain a DHS:CNI-1493 co-crystal for the first time. The structure revealed an unexpected binding site on the outer surface of the DHS. For a structure-activity-relationship study, the linker between the two head groups (**87**) was varied (p. 102). Thirteen CNI analogs **75-87** were synthesized via the known, five steps containing synthetic route (p. 102-104). In the DHS inhibition assay it was shown that at least two linked head groups are needed for the activity of the class of CNI-1493 derivatives. The shortest possible linker was the oxalyl-linker (**75**, p. 105). A too long alkyl chain like in CNI analog **80** (C₁₄) led to a worse activity probably due to entropic reasons. Interestingly, the rigid CNI analogs **75**, **85** and **86** also showed significant activity in the DHS assay even though, they cannot adopt the “sandwich-like” conformation of CNI-1493 **2** found in the crystal structure.^[54] This could be a hint for another mechanism of action of these analogs (p. 106). The inhibition of HIV-1 by the CNI analogs **76**, **79**, **85** and **86** in cell culture showed with one exception a high accordance with the results obtained in the DHS inhibition assay (p. 108-110).

The CNI analogs were also tested against the plant pathogen *Fusarium graminearum* showing slightly different results: the rigid derivatives **75**, **85** and **86** were almost inactive. However the more flexible compounds **83** and **84** showed a good activity. Four compounds (**76**, **78**, **83** and **84**) were as good as CNI-1493 **2** and one (**81**) even slightly better.

Another part of the work regarding the CNI-1493 compounds was the development of an analytical method for the investigation of the hydrolysis behavior of CNI-1493 **2** (p. 112-113). CNI-1493 **2** was stable under acidic conditions for at least 5 days whereas a subsequent hydrolysis of the imine bonds was detected under neutral to basic conditions. This hydrolysis was confirmed by LC-MS (p. 115-116). The more basic the buffer the faster the hydrolysis proceeded, but the hydrolysis also seemed to be buffer-dependent. In general, the pH value had a higher influence than the incubation temperature. A cleavage of the amide bond was not detected in any case. Due to these results, the amino guanidine fragment **88** found in the active site of the DHS in

the DHS:CNI-1493 co-crystal could be explained as an artifact resulting from the hydrolysis of CNI-1493 **2** in the basic crystallization buffer (p. 116).

8.3 Synthesis of arylamine modified nucleosides

The third part of this thesis can be divided in three different projects. In the first project, it was tried to develop a synthetic route towards C5-arylamine-2'-dC adducts (p. 120). Therefore, C5-halogen-2'-dCs **103a** and **103b** and C5-halogen-2'-dUs **110a** and **110b** were synthesized (p. 120-124). The C-N cross coupling reaction of these compounds with arylamines to **102** and **109** was first tested under the established reaction conditions. However, a variation of the base or the ligand did not lead to the desired **102** (p. 124). As a future perspective it could be useful to try different catalysts or to think about a synthetic approach without the C-N cross coupling reaction.

On a previously established synthetic route, four N^2 -arylamine-modified 2'-dG phosphoramidites **10a-10d** were synthesized in the second project of the third part (p. 127-130 and p. 133-135). In addition, it was tried to synthesize these arylamine adducts via a nucleophilic, aromatic substitution. Therefore, two C-2-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate salts, **127** and **128** were synthesized (p. 130-132). For the subsequent substitution with an arylhydrazine different bases and reaction conditions were tested. In only one case the reaction led to the product **11a** in 2% yield. By chemical DNA synthesis the successfully synthesized phosphoramidites **10a-10d** were then incorporated in the oligonucleotides **138-141** (*NarI*-sequence, p. 135-136). Afterwards these oligonucleotides were analyzed regarding their T_m -values and these values were compared to other DNA lesions **142-149** (p. 139-141). It was shown that the two monocyclic N^2 -arylamine-modified 2'-dG adducts **138** and **140** did not affect the stability of the *NarI*-duplex in such a dramatic manner as the other lesions **142-149** did.

Two 5'-triphosphates of N^2 -arylamine-modified 2'-dG were successfully synthesized for the first time in the last project of the third part (p. 146-151). The previously established *cycloSal* method by C. Meier was used to synthesize the 5'-*cycloSal*-phosphate triesters **153a** and **153b**. By using the saligenylphosphorchloridate **154** an oxidative workup and oxidation of the hydrazino function could be circumvented (p.

143-146). With the successful synthesis of the two N^2 -arylamine-modified 2'-dG-5'-triphosphates **152a** and **152b** it was shown, that the established synthetic approach via the *cycloSal* method can be transferred to this type of arylamine modification (p. 147-151).

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeines

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien direkt nach Erhalt vom Händler ohne weitere Bearbeitung eingesetzt.

9.1.1 Reagenzien

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]

undec-7-en: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2$ [152.24 g/mol]; Sdp.: 261 °C; $\rho = 1.02 \text{ g/cm}^3$

- 1.) technische Qualität; im Vakuum destilliert und über Molsieb 0.4 nm gelagert.

Thionylchlorid: SOCl_2 [118.97 g/mol]; Sdp.: 75.3 °C; $\rho = 1.64 \text{ g/cm}^3$

- 2.) Unter Stickstoffatmosphäre destilliert

9.1.2 Lösungsmittel

Acetonitril: $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41.05 g/mol]; Sdp.: 81-82 °C; $\rho = 0.78 \text{ g/cm}^3$

- 1.) Chromasolv® gradient grade, for HPLC (Sigma-Aldrich 34851-2.5L).
- 2.) Unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molsieb 0.3 nm aufbewahrt.

1,2-Dichlorethan: $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ [98.97 g/mol]; Sdp.: 84 °C; $\rho = 1.25 \text{ g/cm}^3$

- 1.) Extra trocken, AcroSeal®; $\text{H}_2\text{O}: \leq 50 \text{ ppm}$; (Acros Nr. 326841000).

Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; $\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$

- 1.) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
- 2.) Unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molsieb 0.4 nm aufbewahrt.

N,N-Dimethylformamid: $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ [73.10 g/mol]; Sdp.: 153 °C; $\rho = 0.95 \text{ g/cm}^3$

- 1.) puriss. absolut, über Molsieb (0.4 nm), H₂O: ≤ 100 ppm (Sigma-Aldrich 40248).
- 1,2-Dimethoxyethan: C₄H₁₀O₂ [90.12 g/mol]; Sdp.: 84 °C; ρ = 0.87 g/cm³
- 1.) technische Qualität; unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Kalium zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molsieb 0.4 nm aufbewahrt.
- 1,4-Dioxan: C₄H₈O₂ [88.11 g/mol]; Sdp.: 101 °C; ρ = 1.03 g/cm³
- 1.) technische Qualität; unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Kalium zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molsieb 0.4 nm aufbewahrt.
- Essigsäureethylester: C₄H₈O₂ [88.11 g/mol]; Sdp.: 77 °C; ρ = 0.90 g/cm³
- 1.) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
- Methanol: CH₃OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; ρ = 0.79 g/cm³
- 1.) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert.
- 2.) puriss. Absolut, über Molsieb (0.4 nm), H₂O: ≤ 100 ppm; (Sigma-Aldrich 65542).
- N-Methyl-2-pyrrolidon: C₅H₉NO [99.13 g/mol]; Sdp.: 202 °C; ρ = 1.03 g/cm³
- 1.) technische Qualität; unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert.
- Petrolether (50-70):
- 1.) technische Qualität, bei Normaldruck destilliert.
- Pyridin: C₅H₅N [79.10 g/mol]; Sdp.: 115 °C; ρ = 0.98 g/cm³
- 1.) Extra trocken, AcroSeal[®], über Molsieb (0.4 nm), H₂O: ≤ 50 ppm; (Acros Nr. 364420025).
- Tetrahydrofuran: C₄H₈O [72.11 g/mol]; Sdp.: 65-66 °C; ρ = 0.89 g/cm³
- 1.) technische Qualität; unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Kalium zum Rückfluss erhitzt,

anschließend destilliert und über Molsieb 0.4 nm aufbewahrt.

Triethylamin: $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ [101.19 g/mol]; Sdp.: 89 °C; $\rho = 0.72 \text{ g/cm}^3$

- 1.) technische Qualität; unter Stickstoffatmosphäre für mehrere Tage über Natrium zum Rückfluss erhitzt, anschließend destilliert und über Molsieb 0.4 nm aufbewahrt.

p-Xylol: C_8H_{10} [106.17 g/mol]; Sdp.: 138 °C; $\rho = 0.86 \text{ g/cm}^3$

- 1.) zur Synthese; (Merck 808691).

9.1.3 Puffer für die HPLC

Ammoniumformiat-Puffer pH = 3.0 (CNI-1493 Hydrolyse): Es wurden 6.30 g (100 mmol) Ammoniumformiat in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst, mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3.0 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

TEAA-Puffer pH = 6.9 (Trennung der Oligonucleotide): Es wurden 5.88 mL Eisessig und 10.12 mL Triethylamin in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst, auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

9.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel (+ Fluoreszenzindikator) beschichtete Aluminiumfolien (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm und Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ Nr. 818333) verwendet. Die Laufstrecke betrug 5-10 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammerfüllung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei Wellenlängen von 254 nm und 366 nm. Als Färbereagenz wurde ein Gemisch aus *p*-Methoxybenzaldehyd (0.7 mL), Ethanol (99.8%, 27 mL), konz. Schwefelsäure (1.0 mL) und Essigsäure (0.3 mL) verwendet. Zur Detektion nicht-UV-aktiver Amine wurde ein Ninhydrin-Färbereagenz verwendet.

Zirkuläre, präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron)

Mit einem Chromatotron der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von bis zu 4 g getrennt. Als Trennmittel diente

gipshaltiges Kieselgel 60 PF254 (Merck Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm und 366 nm.

Präparative Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel 60 der Firma Macherey-Nagel (0.040-0.063, 230-400 mesh ASTM) verwendet. Es wurden stets destillierte Lösungsmittel verwendet.

Umkehrphasenchromatographie

Für die Säulenchromatographie an einer Umkehrphase wurde LiChroprep RP-18 (40-63 µm) der Firma Merck sowie RP-Kieselgel C18 der Firma Macherey-Nagel (100-50 Polygoprep) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die CNI-1493 Hydrolyse:

Software:	EZ Chrom Elite
System:	VWR-Hitachi LaChromElite
Pumpe:	VWR-Hitachi L-2130
Automatischer Probenwechsler:	VWR-Hitachi L-2200
Dioden Array Detektor:	VWR-Hitachi L-2455
Säule 1:	EcoCart 125-3 LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm) von Merck
Säule 2:	Nucleodur® C18 Gravity (EC 125/4.6, 5 µm) von Macherey-Nagel

Methode RP-18 mit Ammoniumformiat-Puffer:

Acetonitril-Gradient von 5-44% in Ammoniumformiat-Puffer bis 12 min, dann isokratisch 95% Wasser für 5 min, 10 min 95% Acetonitril isokratisch und abschließend 95% Puffer für 10 Minuten. Flussraten: Merck-Säule 0.5 mL/min und Gravity 1.3 mL/min. UV-Detektion bei 264 nm.

Für die CNI-1493 Hydrolyse per LC-MS:

Software:	Agilent MassHunter
Massenspektrometer:	Agilent 6224 ESI-TOF
HPLC:	Agilent HPLC 1200
Säule:	Extend-C18 (EC 50/2.1, 1.8 µm) von Agilent

Methode RP-18 mit Ammoniumformiat-Puffer:

Acetonitril-Gradient von 5-44% in Ammoniumformiat-Puffer bis 12 min, in einer min 44-95% Acetonitril, dann isokratisch 95% Acetonitril für 5 min und abschließend 95-5% Acetonitril für 2 Minuten. Flussraten: 0.5 mL/min. UV-Detektion bei 264 nm.

Für die Oligonucleotide:

Software: Chromatography Data Station Software HPLC
System Manager Version 3.1.1.

Interface: Merck-Hitachi Model L-7000

Pumpe: Merck-Hitachi Model L-7100

Automatischer Probenwechsler: Merck-Hitachi Model L-7200

Dioden Array Detektor: Merck-Hitachi Model L-7455

Säule 1: EcoCart 125-3 LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm) von Merck

Säule 2: Nucleodur® C18 Gravity (EC 125/3, 5 µm) von Macherey-Nagel

Methode RP-18 mit TEAA-Puffer:

Acetonitril-Gradient von 5-23% in TEAA-Puffer bis 55 min, dann isokratisch 95% Wasser für 5 min, 10 min 95% Acetonitril isokratisch und abschließend 95% Puffer für 10 Minuten. Flussraten: 0.5 mL/min (Säule 1) und 0.56 mL/min (Säule 2).

9.1.5 Geräte

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Hamburg auf Geräten der Firma Bruker aufgenommen.

¹H-NMR: Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker AV 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl₃ (δ = 7.26 ppm), Benzol-*d*₆ (7.16 ppm), DMSO-*d*₆ (δ = 2.50 ppm) oder D₂O (δ = 4.79 ppm). Die Aufnahmen erfolgten über einen Messbereich von 0 bis 14 ppm.

¹³C-NMR: Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz), Bruker DMX 500 (125 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl₃ (δ = 77.16 ppm), Benzol-*d*₆ (128.0 ppm) oder DMSO-*d*₆ (δ = 39.52 ppm). Die in D₂O gemessenen ¹³C-NMR-Spektren wurden nicht kalibriert. Die Aufnahmen erfolgten über einen Messbereich von 0 bis 200 ppm.

^{31}P -NMR: Bruker AMX 400 (162 MHz), Bruker AV 400 (162 MHz), Bruker DMX 500 (202 MHz). Die Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Signale werden gegen einen externen Standard von 85%-iger Phosphorsäure angegeben.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an einem Bruker Alpha-P IR-Spektrometer bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 - 4000 cm^{-1} aufgenommen. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Messung der Proben in Substanz. Als Messmethode wurde die *attenuated total reflexion* (ATR) verwendet.

UV-Spektrometer

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Departments Chemie der Universität Hamburg aufgenommen.

Die EI-Massenspektren wurden mit einem doppelt-fokussierenden VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer aufgenommen.

Die (HR-)FAB-Massenspektren wurden mit einem doppelt-fokussierenden Spektrometer VG/70-250F der Firma VG Analytical gemessen. Als Matrix wurde *m*-Nitrobenzylalkohol und als Stoßgas Xenon verwendet.

Die (HR-)ESI-Massenspektren wurden entweder mit einem Finnigan ThermoQuest MAT 95 XL Spektrometer oder einem Agilent Technologies ESI-TOF 6224 Spektrometer gemessen.

Die MALDI-Massenspektren wurden auf einem Bruker UltrafleXtreme Smartbeam II Laser gemessen. Als Matrix wurden DHB oder THAP verwendet.

Gefriertrocknung

Zum Gefriertrocknen wässriger Lösungen wurde eine Christ-Alpha 2-4 Gefrier-trocknungsanlage verwendet.

Thermomixer

Die Abspaltung vom Träger wurde in einem Eppendorf Thermomixer, Modell 5436, bei 45 °C durchgeführt.

Mikrowelle

Für chemische Reaktionen unter Mikrowelleneinstrahlung wurde eine Mikrowelle CEM Discover® LabMate der Firma CEM Corp. verwendet.

Circular Dichroismus

Die Messungen des Circular Dichroismus der Oligonucleotide wurden an einem CD Instrument Model 215 der Firma AVIV durchgeführt.

DNA Synthesizer

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte entweder auf einem Applied Biosystems RNA/DNA-Synthesizer 394 oder mit einem H-8-DNA-Synthesizer der Firma K&A Laborgeräte. Die Synthesen wurden dabei nach der Phosphoramidit-Methode durchgeführt.

Nanodrop

Die Konzentrationsbestimmung der Oligonucleotide wurde mit Hilfe eines Thermo Scientific Nanodrop durchgeführt.

Speed-Vac-Probenkonzentrator

Die Trocknung der Oligonucleotide wurde mit Hilfe eines Speed-Vac-Probenkonzentrators, einer Zentrifuge mit integrierter Membranpumpe, der Firma Eppendorf durchgeführt.

9.2 Biochemische Assays

9.2.1 Inhibition der Desoxyhypusinsynthese

Die DHS-Inhibition durch die synthetisierten Verbindungen wurde von Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts (Hamburg) bestimmt, dazu wurde die DHS-Reaktion grundsätzlich wie von Bevec *et al.* beschrieben durchgeführt.^[183] Die Reaktionsmischung enthielt 5 µg eIF5A-Vorläuferprotein, 3 µg DHS und 2 µCi [³H]-Spermidin (32,4 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 200 µl Reaktionspuffer (300 mM Glycin-NaOH, pH 9.0, 1 mM NAD⁺, 1 mM DTT, 50 µg/ml BSA). Die enzymatische Reaktion wurde in Gegenwart der neuen, potentiellen DHS-Inhibitoren bzw. in Gegenwart von DMSO als Lösungsmittel-Kontrolle durchgeführt. Nach 1 h bei

37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µL 20 mM Spermidin in PBS gestoppt und auf eine Millipore GSWPO2500-Nitrocellulose-Membran transferiert, die zuvor 1 h lang mit 20 mM Spermidin/PBS geblockt worden war. Die Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck filtriert und anschließend die Membran mit 5 mL PBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran an der Luft getrocknet und das Tritium-Signal in einem Flüssig-Szintillationszähler gemessen.^[149]

9.2.2 Inhibition der HIV-1 Replikation in Zellkultur

Die Tests wurden von Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts (Hamburg) und des Universitätsklinikums Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. PM1-Zellen und das HIV-1-Isolat BaL wurden vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Program erhalten. Die Zellen wurden in RPMI (Invitrogen) mit 10% FCS (Biochrom AG), 100 units/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Invitrogen) gehalten. Die Zellen wurden in Gegenwart der zu testenden DHS-Inhibitoren bzw. in Gegenwart von DMSO als Lösungsmittel-Kontrolle 8 bis 10 Tage lang präinkubiert und entsprechend der Kulturdichte gesplittet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Makrophagen-tropen (R5) HIV-1-Stamm BaL infiziert.^[184] Für die Infektion wurden etwa $3 \cdot 10^6$ Zellen ohne die zu testenden Verbindungen in 500 µl Kulturmedium resuspendiert und 3 h bei 37 °C mit 3 ng HIV-1-Virusstamm inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Gegenwart der potentiellen DHS-Inhibitoren bzw. in Gegenwart von DMSO als Lösungsmittel-Kontrolle weiter inkubiert. An Tag 3 nach der Infektion wurde das Kulturmedium ersetzt und die Zellen gesplittet. An Tag 7 nach der Infektion wurden die p24-Level im Überstand durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, Innogenetics NV) bestimmt. Parallel wurde die Zellviabilität mittels AlamarBlue (AbD Serotec) getestet. Für jede getestete Konzentration wurden bis zu sechs unabhängige Infektionen durchgeführt.^[149]

9.2.3 Inhibition des Pathogenwachstums bei Mais

Die Tests wurden von Mitarbeitern des Biozentrums Klein Flottbek (Hamburg) in 96-well Mikrotiter-Platten durchgeführt. Um das Wachstum von *Fusarium graminearum* quantifizieren zu können, wurde ein GFP-exprimierender Wildtyp-Stamm verwendet. Das Myzelien-Wachstum wurde durch Messung der Fluoreszenz mittels ELISA unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissions-

wellenlänge von 528 nm bestimmt. Der inhibierende Effekt der CNI-Analoga **75-87** auf das Myzelien-Wachstum wurde dadurch bestimmt, dass 20 µL einer Keimlösung bestehend aus $2 \cdot 10^4$ Keime/mL und 2 µL der zu testenden CNI-Analoga in finalen Konzentrationen von 1 µM, 5 µM oder 10 µM in 180 µL SNA-Medium eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle wurden 180 µL SNA-Medium mit 2 µL DMSO eingesetzt. Die Mikrotiter-Platte wurde bei 28 °C und 150 U/min inkubiert und die Fluoreszenz alle 24 Stunden für 4 Tage gemessen. Der inhibierende Effekt ist prozentual zum Pilzwachstum dargestellt. Dabei wurde das Wachstum von *F. graminearum* in der Negativkontrolle als 100% gesetzt.^[150]

9.3 Hydrolyseuntersuchungen

Verwendete Puffer und Lösungen

50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen:

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat in 100 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde mittels verdünnter Phosphorsäure oder 1 M Natronlauge auf den benötigten Wert eingestellt.

Glycin-Puffer:

Es wurden 300 mM Glycin, 1 mM NAD⁺, 1 mM DTT und 50 µg/mL BSA in 50 mL Reinstwasser gelöst und mit 1 M Natronlauge auf pH 9.0 eingestellt.

Tris-Kristallisationspuffer:

Es wurden 100 mM Tris, 63% 2-Methyl-2,4-pentandiol und 3 mM NAD⁺ bei pH 8.5 eingesetzt.

RPMI-1640 Kulturmedium:

Es wurde vom Herinrich-Pette-Institut erhaltenes RPMI-1640 Kulturmedium mit 10 % hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) verwendet.

Interner Standard (AZT-Lösung):

Es wurden 5 mg AZT in 500 µL Reinstwasser gelöst (38 mM).

Hydrolyseexperimente zur Untersuchung von CNI-1493 2

Die Hydrolyse von CNI-1493 **2** wurde durch Inkubation in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten und bei Rt bzw. 37 °C durchgeführt. Zunächst wurde von CNI-1493 eine 5 mM Stammlösung in DMSO angesetzt. Von dieser Lösung wurden 16 µL mit 12 µL der AZT-Lösung und 372 µL bzw. 72 µL DMSO versetzt und auf 800 µL mit dem entsprechenden Puffer aufgefüllt. Durch kurzes „Vortexen“ (Durchmischen) wurde die Hydrolyse gestartet und die Proben bei Rt bzw. 37 °C im Thermomixer inubiert. Zu den jeweiligen Zeiten wurden Aliquote von je 40 µL entnommen und direkt in die analytische HPLC injiziert. Die Halbwertszeiten wurden aus den erhaltenen Chromatogrammen anhand des Quotienten aus den Peakflächen von CNI-1493, der Hydrolyseprodukte und dem internen Standard berechnet und gegen die Hydrolysedauer in Stunden aufgetragen. Durch Anlegen einer Ausgleichsgrade durch die experimentell bestimmten Messpunkte konnte aus der erhaltenen Gradengleichung über die Formel

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

die Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet werden, da aufgrund des großen Wasserüberschusses eine Reaktion *pseudo*-erster Ordnung angenommen wird. Es wurde keine Doppelbestimmung durchgeführt wurde und abhängig vom Puffer nicht immer Basislinien-getrennte Peaks erhalten wurden.

9.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1 Reduktion der aromatischen Nitrogruppen mit Zinn(II)chlorid

Zunächst wurde Zinn(II)chlorid in konz. HCl (2.5 mL pro 1 mmol Nitroverbindung) gelöst und auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde die Nitroverbindung portionsweise zugegeben und für 15 Minuten bis 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Im Anschluss wurde diese Lösung unter sehr starker Gas- und Schaumentwicklung vorsichtig zu einem Gemisch aus Kaliumcarbonat (1.8 g pro mL HCl) mit Eis und Wasser (ca. 5 mL pro 1 mL HCl) gegeben. Das Produkt wurde dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante a:

Nach der Aufarbeitung wurde keine weitere Reinigung durchgeführt, wenn diese nach analytischer Untersuchung des Produktes aufgrund hoher Reinheit des Produktes nicht mehr nötig war.

Variante b:

Das Rohprodukt wurde in Methanol gelöst und mit Macherey-Nagel Chromabond® versetzt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde der Feststoff auf das Kieselgel in einer Glassäule aufgetragen und säulenchromatographisch gereinigt. Die Zusammensetzung des Eluenten ist den jeweiligen Synthesevorschriften zu entnehmen.

AAV 2 *Synthese der Harnstoff- und Thioharnstoffderivate*

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äquivalent des entsprechenden Diamins in abs. THF (3.5 mL pro 1 mmol Diamin) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung aus 0.35 Äquiv. Trimethylsilylisocyanat bzw. Trimethylsilylthiocyanat in abs. THF (30 mL pro 1 mmol Cyanat) über einen Zeitraum von 3 Stunden tropfenweise zugefügt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit dest. Wasser (1.4 mL pro 1 mmol Diamin) versetzt und weitere 2 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in heißem Ethylacetat suspendiert und filtriert. Der zurückbleibende Feststoff wurde anschließend mit dest. Wasser (2 mL pro 1 mmol Diamin) gewaschen. Nach Gefriertrocknung dieser wässrigen Phase wurde das Produkt erhalten.

AAV 3 *Darstellung der Ammoniumchloride mittels Boran-THF-Reduktion*

Es wurde unter Stickstoffatmosphäre 1 Äquivalent der Nitrilverbindung in abs. THF (5 mL pro 1 mmol Edukt) gelöst. Anschließend wurden 3 Äquivalente 1 M Boran-THF-Lösung ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$) zugetropft und für vier Stunden in der Siedehitze gerührt. Nach dem Abkühlen wurde der Reaktionsansatz mit 3 Äquivalenten 1 M Salzsäure versetzt und für eine weitere Stunde auf 100 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das entsprechende Ammoniumchlorid ohne weitere Reinigung direkt weiter umgesetzt.

AAV 4 *Einführung der Boc-Schutzgruppe*

Es wurde unter Stickstoff als Schutzgas 1 Äquivalent Ammoniumchlorid mit 4 Äquivalenten abs. Triethylamin und abs. Dichlormethan (5 mL pro 1 mmol Edukt) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.2 Äquivalente DMAP und portionsweise 3 Äquivalente Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben. Die Suspension wurde für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die nun klare Lösung wurde mit

Dichlormethan verdünnt, dreimal mit dest. Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden daraufhin mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 → 1:1 v/v).

Bei versuchter gleichzeitiger Einführung der Boc-Schutzgruppe an der aromatischen Aminogruppe wurden 2-7 Äquiv. Di-*tert*-butyldicarbonat eingesetzt. Außerdem wurden das Lösungsmittel, die Temperatur sowie die Reaktionszeit variiert.

AAV 5 *C-C-Kreuzkupplung mit Polymer-gebundenem Palladium-Katalysator*

Es wurden unter Stickstoff als Schutzgas 1 Äquivalent des Aryliodids und 3.5 mol% Pd EnCat TPP30[®] in abs. Acetonitril (5 mL pro mmol Edukt) gelöst und anschließend mit 1.5 Äquivalenten dest. DBU versetzt. Nach der tropfenweisen Zugabe von 1.5 Äquivalenten des Alkins wurde der Reaktionsansatz für 21 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Suspension wurde diese mit Dichlormethan und Methanol verdünnt, und abschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 98:2 → 9:1 v/v).

AAV 6 *Ringschlussreaktion zum Indol in Anlehnung an Castro et al.*

Es wurde unter Stickstoffatmosphäre 1 Äquivalent des Kreuzkupplungsproduktes mit 0.5 Äquivalenten Kupfer(I)-iodid und 1-1.5 Äquivalenten Base (Kalium-*tert*-butanolat oder dest. DBU) und in abs. DMF (10 mL pro 1 mmol Edukt) suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 80-100 °C bis zum Beenden der Reaktion (1-5 d) gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension mit dest. Wasser versetzt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel.

AAV 7 *Ringschlussreaktion zum Indol in Anlehnung an Hiroya et al.*

Unter Schutzgasatmosphäre wurde 1 Äquivalent des Kreuzkupplungsproduktes mit 1.1 Äquivalenten Kupfer(II)-acetat versetzt und in abs. 1,2-Dichlorethan (10 mL pro 0.3 mmol Edukt) suspendiert. Nach Zugabe von 1.2 Äquivalenten Kaliumhydrid (33%ige Suspension in Paraffinöl) wurde das Reaktionsgemisch bei variierter

Reaktionsdauer und Reaktionstemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 99:1 $\rightarrow$ 9:1 v/v).

AAV 8 *Direkte Ringschlussreaktion zum Indol in Anlehnung an Larock et al.*

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äquivalent des *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamates **62a** bzw. *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamates **62b** mit 1 Äquivalent Lithiumchlorid, 5 Äquivalenten Natriumcarbonat und 5 mol% $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ versetzt und in abs. DMF (10 mL pro 1 mmol Edukt) suspendiert. Anschließend wurden tropfenweise 1.5 Äquiv. des Alkins zugegeben und bei 100 °C bis zum Beenden der Reaktion (6 h - 5 d) gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension mit dest. Wasser (1.5 mL pro 1 mL DMF) versetzt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel. Die Zusammensetzung des Eluenten ist den jeweiligen Synthesevorschriften zu entnehmen.

AAV 9 *In situ Ringschlussreaktion zum Indol nach C-C-Kreuzkupplung in Anlehnung an Adachi et al.*

Unter Stickstoff wurde 1 Äquivalent des *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamates **62a** bzw. *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamates **62b** mit 0.2 Äquivalenten Kupfer(I)-iodid sowie 0.1 Äquivalenten Dichloridobis(triphenylphosphin)palladium(II) versetzt. Nach der Zugabe von 3 oder 6 Äquivalenten des Alkins wurde das Gemisch in DMF (10 mL pro 1 mmol Edukt) suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde für 17 Stunden bei 85 °C gerührt. Anschließend wurde die Suspension zur Überführung mit Ethylacetat verdünnt und dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel. Die Zusammensetzung des Eluenten ist den jeweiligen Synthesevorschriften zu entnehmen.

AAV 10 Mitsunobu-Reaktion zur Einführung der Guanidinogruppe

Es wurde unter Stickstoffatmosphäre 1 Äquivalent des Alkohols mit 1.5 Äquivalenten Triphenylphosphin und 1.5 Äquivalenten *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidin **59** versetzt und in abs. Tetrahydrofuran (3 mL pro 0.2 mmol Edukt) gelöst. Bei 0 °C wurden 1.5 Äquivalente Diisopropylazodicarboxylat zugetropft, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und dann für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt an Kieselgel gereinigt. Die Zusammensetzung des Eluenten ist den jeweiligen Synthesevorschriften zu entnehmen.

AAV 11 Abspaltung der *N*-Tosyl-Gruppe

Unter Schutzgasatmosphäre wurde 1 Äquivalent der *N*-tosylierten Verbindung in Methanol gelöst (30 mL pro 1 mmol) und anschließend mit festem Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid versetzt. Die Reaktionstemperatur und Reaktionsdauer wurde variiert. Zur Überführung des Reaktionsansatzes wurde mit Ethylacetat verdünnt, dreimal mit dest. Wasser gewaschen und die wässrige Phase einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 99:1 → 9:1 v/v).

AAV 12 Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in wässriger HCl

Es wurde 1 Äquivalent 5-(*O-tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-Indol **66a** eingesetzt. Als Reagenz und Lösungsmittel wurde 2 M HCl/CH₃CN (1:1 v/v, 50 mL pro 1 mmol von **66a**) zugegeben und die Reaktionsmischung bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 4:1 v/v). Aufgrund der hohen Polarität des entschützten Produktes wurde der Verbrauch des Eduktes als Maß für den Umsatz genommen. Nach Gefriertrocknung der Reaktionsmischung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an RP-Kieselgel mit dest. Wasser als Eluent gereinigt. Eine erneute Gefriertrocknung lieferte das Produkt als Hydrochlorid.

AAV 13 *Synthese der Dicarbonsäurechloride*

Wenn das entsprechende Säurechlorid nicht kommerziell erhältlich war, wurde die Dicarbonsäure in dest. Thionylchlorid (0.5 mL pro mmol Edukt) suspendiert. Nach Zugabe von 5 Tropfen abs. DMF wurde die Reaktionsmischung bis zum Ausbleiben der Gasentwicklung zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das entsprechende Dicarbonsäurechlorid ohne weitere Reinigung umgesetzt.

AAV 14 *Bildung der Amidbindung zu den Tetraketonen*

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 3,5-Diacetylanilin **68** in abs. Dichlormethan (7 mL pro mmol Edukt) gelöst und mit 2.7 Äquivalenten abs. Pyridin versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf -10 °C gekühlt und über 30 Minuten tropfenweise mit 0.5 Äquivalenten des Dicarbonsäurechlorides versetzt. Das Säurechlorid wurde entweder in Substanz oder gelöst in abs. Dichlormethan (10 mL pro mmol) zugetropft. Nach Aufwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung für 2-15 Stunden gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde durch Filtration erhalten und nacheinander mit 10 mL Dichlormethan und 5 mL dest. Wasser gewaschen und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

AAV 15 *Synthese der Guanylylhydrazone zur Darstellung der CNI-1493 Analoga*

Das entsprechende Tetraketon **89-100** wurde in 3-5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) gelöst und mit 5 Äquivalenten Aminoguanidin-Hydrochlorid versetzt. Nach Zugabe von 2 Tropfen konz. HCl wurde die Reaktionsmischung für 3 Stunden zum Sieden erhitzt. Bei -26 °C fiel das Produkt als Tetrahydrochlorid aus der Reaktionslösung aus und wurde durch Filtration erhalten. Zur Reinigung wurde der Niederschlag mit 10 mL -26 °C kaltem Ethanol und 2 mL kaltem dest. Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

AAV 16 *Synthese der C5-Arylamin-2'-dC-Addukte mittels Buchwald-Hartwig Reaktion*

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äquivalent Nucleosid mit 30 mol% Ligand, 10 mol% Pd₂(dba)₃, 2 Äquivalenten Base, 0.2 Äquivalenten Triethylammoniumchlorid und 2 Äquivalenten 4-Anisidin versetzt. Die Reaktanden wurden in absolutem 1,2-Dimethoxyethan gelöst/suspendiert und 3-7 Tage bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wurde eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend eine gesättigte Natriumchloridlösung hinzugegeben. Nach

der Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach der Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE: 10% → 35% EE).

AAV 17 *Synthese der N^2 -Arylamin-2'-dG-Addukte mittels Buchwald-Hartwig-Reaktion*

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äquivalent O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-brom-2'-dG **12** mit 30mol% *rac*-BINAP, 10mol% $Pd_2(dba)_3$, 2 Äquivalenten Kaliumphosphat, 0.2 Äquivalenten Triethylammoniumchlorid und 2 Äquivalenten des Arylhydrazins versetzt. Die Reaktanden wurden in abs. 1,2-Dimethoxyethan (20 mL pro mmol Edukt) gelöst/suspendiert und 63 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wurde eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend eine gesättigte Natriumchlorid-Lösung dazugeben. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach der Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (PE/EE: 10% → 35% EE).

AAV 18 *Desilylierung der N^2 -Addukte*

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde das jeweilige O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-arylamino-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dG-Derivat in abs. Tetrahydrofuran und abs. Dichlormethan (1:1 v/v, 20 mL pro mmol Edukt) gelöst, mit 10 Äquivalenten Triethylamin und 12.5 Äquivalenten Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Ende der Reaktion wurde eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Nach anschließendem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (Neutral, Aktivitätsstufe 3) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradient (10% → 40%). Die Trennung der Azo- und Hydrazinoform erfolgte mit Hilfe von RP-18-Kieselgel. Laufmittel: 1000 mL Acetonitril/Wasser 1:4 v/v; 500 mL Acetonitril/Wasser 2.5:7.5 v/v; 500 mL Acetonitril/Wasser 3:7 v/v; 500 mL

Acetonitril/Wasser 3.5:6.5 v/v; Acetonitril/Wasser 4:6 v/v. Nach dem Entfernen des Acetonitrils wurden die jeweils vereinigten Phasen lyophilisiert.

AAV 19 DMTr-Schützung der N^2 -Addukte

Das O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-hydrazinoaryl-2'-desoxyguanosin-Derivat wurde zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert, in abs. Pyridin (25 mL pro mmol Edukt) gelöst, in einer Stickstoffatmosphäre mit 2 Äquivalenten Dimethoxytritylchlorid versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Dichlormethan wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (Neutral, Aktivitätsstufe 3) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan.

AAV 20 Phosphitylierung der O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-hydrazinoaryl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin-Derivate

Das O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-hydrazinoaryl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin-Derivat wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril coevaporiert, unter einer Stickstoffatmosphäre in abs. Dichlormethan/abs. Acetonitril (1:1 v/v, 30 mL pro mmol Edukt) gelöst und mit einem Äquivalent 4,5-Dicyanoimidazol versetzt. Unter Rühren wurden 1.5 Äquivalente Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit (DIPP) zugetropft und die Reaktionsmischung bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (Neutral, Aktivitätsstufe 3) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan/Ethylacetat 1:2 v/v. Eine anschließende Gefriertrocknung mit Benzol lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff.

AAV 21 Synthese der 5'-cycloSal-Phosphattriester über die *P(V)*-Route

Unter Stickstoffatmosphäre wurde das O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-hydrazinoaryl-2'-desoxyguanosin-Derivat in 1.5 mL abs. Pyridin (7.5 mL pro mmol Edukt) gelöst

und mit fünf Kugeln aktiviertem Molekularsieb (3 Å) versetzt. Anschließend wurde bei -40 °C eine Lösung von 1.2 Äquivalenten des Saligenylphosphorchloridats in 0.5 mL abs. Tetrahydrofuran langsam zugetropft (ca. 100 µL/h). Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 0.5-1.5 h weiter bei -40 °C gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 + 1% Eisessig v/v). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-20% mit 2% Essigsäure).

AAV 22 *Synthese der N²Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphate*

In einer Stickstoffatmosphäre wurden zwei Kolben mit jeweils 7 Körnchen aktiviertem Molsieb (0.4 nm) versetzt. Dann wurde ein Äquivalent des entsprechenden *cyclo*Sal-Phosphatriesters in den einen Kolben und 2-2.3 Äquivalente des Tetrabutylammonium-Pyrophosphats in den zweiten Kolben eingewogen und jeweils über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Pyrophosphat in 2 mL (pro 120 µmol Pyrophosphat) und der Triester in 3 mL (pro 50 µmol Triester) abs. DMF gelöst und jeweils 3 h gerührt bzw. stehen gelassen. Daraufhin wurde der Triester unter Rühren über 3 min zu der Pyrophosphat-Lösung getropft. Mit 1 mL abs. DMF wurde das Molsieb im Triesterkolben nachgespült und ebenfalls zum Pyrophosphat getropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (Isopropanol/1 M NH₄OAc: 2:1 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der Rückstand mit Ethylacetat/dest. Wasser aufgenommen und die organische Phase dreimal mit dest. Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Tetrabutylammonium-Gegenionen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an Dowex (W50x8, NH₄⁺) gegen Ammonium ausgetauscht. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde die säulenchromatographische Reinigung an RP-Kieselgel durchgeführt. Als Eluent diente dest. Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (0-30% v/v). Eine anschließende Gefriertrocknung lieferte das entsprechende Triphosphat. Die Ausbeute wurde mit drei Ammoniumgegenionen berechnet. Diese Anzahl kann etwas variieren, da durch Gefriertrocknung der erhaltenen Fraktionen unter Protonierung der Phosphatgruppe wahrscheinlich Teile der Gegenionen als Ammoniak ausgasen konnten, was von S. Warnecke zuvor bereits beobachtet worden war.^[181]

Siedehitze gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v). Nachdem die Reaktionsmischung auf Eiswasser gegossen worden war, wurde der ausgefallene Niederschlag filtriert, mit dest. Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

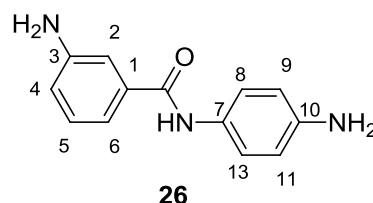
Ausbeute: 1.90 g (6.61 mmol, 91%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)benzamid **26**

Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 30 mg (0.10 mmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** in 10 mL 98%igem Ethanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Nach kurzem Halten ins Ultraschall-Bad wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur unter einer Wasserstoffatmosphäre für 24 h gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v). Anschließend wurde der Katalysator durch mehrmalige Zentrifugation entfernt. Nach dem Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt am Chromatotron mit Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-15%) gereinigt.

Ausbeute: 5.5 mg (23 μmol , 23%) eines farblosen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.52. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 9.64 (s, 1H, Amid-NH), 7.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 2H, H-9), 7.12-7.00 (m, 3H, H-2/-5/-6), 6.70 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 1H, H-4), 6.52 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$,



26
 $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$
 $M = 227.2618 \text{ g/mol}$

2.1 Hz, 2H, H-10), 5.23 (s, 2H, NH_2), 4.87 (s, 2H, NH_2). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 165.3 (Amid-C), 148.4 (C-3), 144.6 (C-11), 136.1 (C-1), 128.4 (C-5), 128.2 (C-8), 122.0 (C-9), 116.1 (C-4), 114.3 (C-6), 113.4 (C-10), 112.7 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3325, 3218, 1597, 1583, 1511, 1320, 1246, 817, 505. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 228.1136 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 228.1132 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden ca. 100 mg Raney-Nickel eingewogen, im Vakuum getrocknet und in 2 mL abs. DMF suspendiert. Dann wurden 50.0 mg (174 μmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31**, gelöst in 6 mL abs. DMF zugegeben

und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden in der Kälte 55 µL (700 µmol, 4 Äquiv.) Hydrazinhydrat (80%ige-Lösung) dazugegeben, die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel mit Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-15%) gereinigt.

Ausbeute: 6 mg (26 µmol, 15%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Synthese 3:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 50.0 mg (0.174 mmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** in 10 mL 98%igem Ethanol gelöst, mit 32 mg (0.288 mmol) Calciumchlorid (gelöst in 0.7 mL dest. Wasser) und 800 mg Zink-Staub versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 1.5 h gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v). Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan mit einem Methanolgradient (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 8 mg (35 µmol, 21%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Synthese 4:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.348 mmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** und 11 Äquiv. SnCl₂ eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 15 Minuten und die Reinigung erfolgte nach *Variante a*.

Ausbeute: 75 mg (0.33 mmol, 95%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Synthese 5:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 50.0 mg (0.174 mmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** und 20 Äquiv. SnCl₂ eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden und die Reinigung erfolgte nach *Variante b* mit CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 als Eluent.

Ausbeute: 29 mg (0.13 mmol, 74%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

2,5-Di-(3-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol **34**

Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 200 mg (1.10 mmol) 3-Nitrobenzoylchlorid **32** in 8 mL abs. Dioxan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 18 µL (18 mg, 0.55 mmol, 0.5 Äquiv.) Hydrazinhydrat **37** zugesetzt und für 30 Min bei Rt gerührt. Nun wurden 0.350 mL (390 mg, 2.75 mmol, 2.5 Äquiv.) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (verdünnt in 2 mL abs. Dioxan) zugegeben. Nach 4 Stunden in der Siedehitze wurde die Reaktion abgebrochen. Dazu wurde durch Zugabe von ges. Ammoniumchlorid-Lösung ein pH-Wert von 6.0 eingestellt, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit Dichlormethan mit einem Methanolgradient (0-10%) gereinigt.

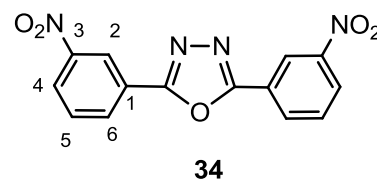
Ausbeute: 24 mg (77 µmol, 7%) eines farblosen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.82. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 9.00 (dd,

$^4J_{\text{H,H}} = 1.7$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 2H, H-2), 8.64 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$,

$^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 2H, H-6), 8.51 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$, $^4J_{\text{H,H}} =$

1.0, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, 2H, H-4), 7.96 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 2H, H-5). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 163.6 (Oxadiazol-C), 148.9 (C-3), 132.8 (C-6),

130.8 C-5), 126.8 (C-4), 125.2 (C-1), 122.2 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3093, 1517, 1350, 1062, 912, 713, 667. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 313.0572 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 313.0576 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



34

$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$
M = 312.2371 g/mol

Synthese 2:

Zunächst wurden zur Darstellung der polyphosphorigen Säure 15 g Phosphorpentoxid mit 10 mL konzentrierter Phosphorsäure vermischt. Zu dieser Lösung wurden 1.00 g (5.99 mmol) 3-Nitrobenzoesäure **35** und 0.67 g (5.99 mmol) Aminoharnstoff-Hydrochlorid **36** gegeben. Nach Rühren der Reaktionsmischung für 2 Stunden bei 170 °C wurde die Reaktionsmischung vorsichtig in Eis/Wasser

gegossen. Das ausgefallene Produkt wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 482 mg (1.55 mmol, 26%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

2,5-Di-(3-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazol **27**

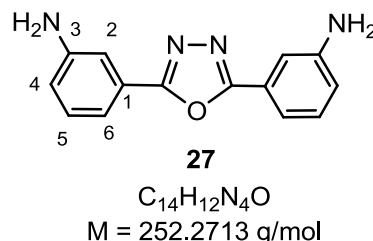
Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden ca. 100 mg Raney-Nickel eingewogen, im Vakuum getrocknet und in 3 mL abs. DMF suspendiert. Dann wurden 20 mg (64 μ mol) 2,5-Di-(3-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol **34**, gelöst in 4 mL abs. DMF zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden in der Kälte 10.0 μ L (270 μ mol, 4 Äquiv.) Hydrazinhydrat (80%ige-Lösung) dazugegeben, die Reaktionsmischung bei Rt für 5 Stunden gerührt. und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan mit einem Methanolgradient (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 5.3 mg (21 μ mol, 33%) eines leicht gelblichen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v):

0.61. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.29 (dd, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 2H, H-2), 7.26-7.21 (m, 2H, H-5), 7.21-7.18 (m, 2H, H-6), 6.79 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$, $^4J_{\text{H,H}} =$

2.3, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 2H, H-4), 5.52 (s, 4H, NH_2). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 164.2 (Oxadiazol-C), 149.4 (C-1), 129.8 (C-5), 123.5 (C-3), 117.2 (C-4), 113.7 (C-6), 111.0 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3207, 1592, 1468, 1317, 781, 678. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 253.1083 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, gef.: 253.1089 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.



Synthese 2:

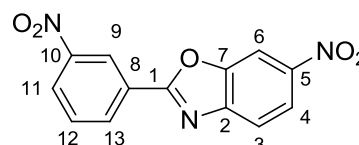
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.320 mmol) 2,5-Di-(3-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol **34** und 10 Äquiv. SnCl_2 eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 1.5 Stunden und die Reinigung erfolgte nach *Variante a*.

Ausbeute: 68 mg (0.27 mmol, 84%) eines leicht gelblichen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazol 40Synthese 1:

Es wurden 104 mg (362 μ mol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** mit 1.5 mL 2-Dichlorbenzol versetzt und 30 mg (83 μ mol, 0.2 Äquiv.) Kupfertriflat hinzugegeben. Die Suspension wurde für 22 h bei 160 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Rt wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE:EE (6:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 28 mg (99 μ mol, 27%) eines leicht rosafarbenen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 4:1 v/v): 0.41. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 9.15 (dd,

**40**

$\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5$
 $M = 285.2118 \text{ g/mol}$

$^4J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H-9), 8.63 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, H-13), 8.57 (dd, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3 \text{ Hz}$, $^5J_{\text{H,H}} = 0.4 \text{ Hz}$, H-6), 8.48 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, H-11), 8.39 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^5J_{\text{H,H}} = 0.3 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 7.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H-12). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3) = 149.7 (C-7), 148.5 (C-2), 146.4 (C-1), 145.5 (C-10), 133.5 (C-13), 130.5 (C-12), 127.0 (C-11), 123.2 (C-8), 122.7 (C-3), 122.2 (C-9), 121.5 (C-5), 121.2 (C-4), 107.6 (C-6). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3104, 2922, 2852, 1521, 1345, 1061, 815, 733, 707. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 285.0386 [M], gef.: 286.0463 [M+H] $^+$.

Synthese 2:

Es wurden 771 mg (5.00 mmol) 2-Amino-5-nitrophenol **42** und 836 (5.00 mmol) 3-Nitrobenzoesäure **35** in 15 mL Xylol suspendiert. Nach Zugabe von 340 mg (5.50 mmol) Borsäure wurde die Reaktionsmischung für 8 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 99:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 229 mg (0.803 mmol, 16%) eines leicht rosafarbenen Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

6-Amino-2-(3-aminophenyl)benzoxazol 29Versuch 1:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 28 mg (0.098 mmol) 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazol **40** und 17 Äquiv. SnCl_2 eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden und die Reinigung erfolgte nach *Variante b* mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 19:1 v/v als Eluent.

Das reduzierte Produkt **29** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen kam es neben der Reduktion der beiden Nitrogruppen zu einer reduktiven Öffnung des Oxazol-Fünfringes zum 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)benzamid **26**.

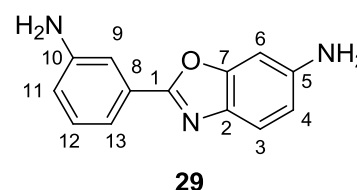
Versuch 2:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 10 mg (44 μmol) 3-Amino-*N*-(4-aminophenyl)benzamid **26**, 6.4 mg (18 μmol) Kupfertriflat und 1.15 mL 2-Dichlorbenzol vermischt und nach Entfernen der Stickstoffatmosphäre über 48 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, die Lösung über Kieselgel filtriert. Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden.

Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 75 mg (33 μmol) 6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzoxazol **40** in 8 mL 98%igem Ethanol gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Nach kurzem Halten ins Ultraschall-Bad wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur unter einer Wasserstoffatmosphäre für 68 h gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v). Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration und Waschen mit Methanol entfernt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 97:3 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 18 mg (80 μmol , 25%) eines farblosen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.47. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.37 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, H-3), 7.31 (s, 1H, H-9), 7.24-7.14 (m, 2H, H-12/-13), 6.79 (s, 1H, H-6), 6.70 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 1H, H-11), 6.62 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 5.38 (2 * s, 4H, 2 * NH_2). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 159.8 (C-1), 151.7 (C-2), 149.2 (C-

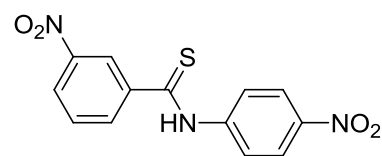
**29**

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$
 $M = 225.2459$ g/mol

8), 147.8 (C-7), 131.9 (C-5), 129.5 (C-12), 127.6 (C-10), 119.5 (C-3), 116.2 (C-11), 113.9 (C-13), 112.3 (C-4), 111.3 (C-9), 94.2 (C-6). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3413, 3314, 3205, 1628, 1489, 1354, 1146, 811, 717, 622. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 226.0902 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 226.0974 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzothioamid **39**

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 203 mg (0.707 mmol) 3-Nitro-*N*-(4-nitrophenyl)benzamid **31** und 515 mg (1.27 mmol, 1.8 Äquiv.) Lawesson's Reagenz in 5 mL abs. THF gelöst und 39 h zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde abgekühlt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE:EE: 3:1 $\rightarrow$ 1:2 v/v) gereinigt. Es wurden 96.2 mg eines gelblichen Feststoffes erhalten. Jedoch war der isolierte Feststoff stark verunreinigt, so dass keine weitere Analytik durchgeführt werden konnte.

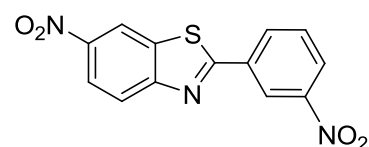
**39**

$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$
 $M = 303.2933 \text{ g/mol}$

6-Nitro-2-(3-nitrophenyl)benzothiazol **41**

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 200 mg (1.11 mmol) 6-Nitrobenzothiazol **43** und 829 mg (3.33 mmol, 3 Äquiv.) 1-Iod-3-nitrobenzol **44** in 1.5 mL abs. DMF gelöst und mit 21 mg (0.11 mmol, 0.1 Äquiv.) Kupfer(I)iodid sowie 25 mg (2.22, 2 Äquiv.) KOtBu versetzt. Nach 60 Minuten bei 140 °C in der Mikrowelle

**41**

$\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$
 $M = 301.2774 \text{ g/mol}$

wurde der Reaktionsansatz mit EE verdünnt, dreimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE:EE: 10% $\rightarrow$ 30%) gereinigt. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnte in einer der erhaltenen Fraktionen das Produkt **41** nachgewiesen werden (11 mg, 33 μmol , 3%), jedoch konnte aufgrund der enthaltenen Verunreinigungen und der geringen Menge keine vollständige Charakterisierung durchgeführt werden.

Versuch 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 112 mg (0.62 mmol) 6-Nitrobenzothiazol **43**, 185 mg (0.74 mmol, 1.2 Äquiv.) 1-Iod-3-nitrobenzol **44**, 342 mg (1.24 mmol, 2 Äquiv.) Silbercarbonat, 16 mg (62 µmol, 0.1 Äquiv.) Triphenylphosphin und 25 mg (31 µmol, 0.05 Äquiv.) [Pd(dppf)Cl₂]*CH₂Cl₂ in 5 mL abs. CH₃CN suspendiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für 48 Stunden gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 2:1 v/v). Da sich nach 48 Stunden kein Umsatz zeigte, wurden zusätzlich 25 mg (31 µmol, 0.05 Äquiv.) [Pd(dppf)Cl₂]*CH₂Cl₂ zugesetzt und die Reaktionsmischung für weitere 38 Stunden erhitzt. Da nach 86 Stunden dünnschichtchromatographisch kein Umsatz der Edukte festzustellen war, wurde die Reaktion abgebrochen.

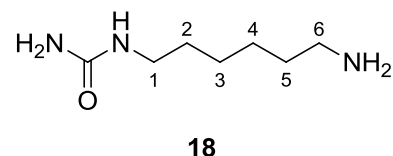
Versuch 3:

Es wurden 112 mg (0.62 mmol) 6-Nitrobenzothiazol **43**, 185 mg (0.74 mmol, 1.2 Äquiv.) 1-Iod-3-nitrobenzol **44**, 342 mg (1.24 mmol, 2 Äquiv.) Silbercarbonat, 16 mg (62 µmol, 0.1 Äquiv.) Triphenylphosphin und 25 mg (31 µmol, 0.05 Äquiv.) [Pd(dppf)Cl₂]*CH₂Cl₂ in 5 mL dest. Wasser suspendiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für 40 Stunden gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 2:1 v/v). Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert, mit Aceton und Dichlormethan nachgespült und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE:EE (9:1 v/v) als Laufmittel gereinigt. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnte in einer der erhaltenen Fraktionen das Produkt **41** nachgewiesen werden (7.0 mg, 22 µmol, 4%), aufgrund der enthaltenen Verunreinigungen und der geringen Menge konnte keine vollständige Charakterisierung durchgeführt werden.

(6-Aminohexyl)harnstoff 18

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 500 mg (4.30 mmol) 1,6-Diaminohexan **24a** eingesetzt.

Ausbeute: 68 mg (0.43 mmol, 28%) eines farblosen Schaumes. - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆):



C₇H₁₇N₃O
M = 159.2294 g/mol

5.92 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1H, Harnstoff-NH), 5.34 (s, 2H, Harnstoff-NH₂), 3.44 (brs, 2H, NH₂), 2.93 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, H-1), 2.53 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 2H, H-6), 1.39-1.20 (m, 8H, Alkyl-H). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 158.6 (Harnstoff-C), 41.1 (C-6), 38.9 (C-1), 30.0, 26.2, 26.1, 26.0 (Alkyl-C). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3301, 2932, 2854, 1643, 1556, 1356, 1228, 587. - **HRMS** (FAB, *m/z*): ber.: 160.1449 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, gef.: 160.1451 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

(7-Aminoheptyl)harnstoff **19**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 500 mg (3.85 mmol) 1,7-Diaminoheptan **24b** eingesetzt.

Ausbeute: 24 mg (0.14 mmol, 11%) eines farblosen

Schaumes. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆):

5.92 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 1H, Harnstoff-NH), 5.34 (s, 2H,

Harnstoff-NH₂), 3.78 (brs, 2H, NH₂), 2.93 (q, $^3J_{\text{H,H}} =$

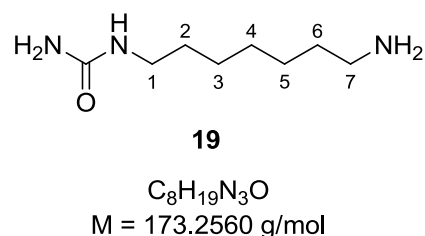
6.6 Hz, 2H, H-1), 2.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, H-7),

1.42-1.21 (m, 10H, Alkyl-H). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 158.6

(Harnstoff-C), 40.2 (C-7), 38.7 (C-1), 31.0, 29.9, 28.5, 26.3, 26.2 (Alkyl-C). - **IR**:

Wellenzahl [cm^{-1}]: 3349, 2931, 2852, 1651, 1596, 1553, 1262, 1225. - **HRMS** (FAB,

m/z): ber.: 174.1606 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, gef.: 174.1614 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.



(8-Aminooctyl)harnstoff

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 500 mg (3.5 mmol) 1,8-Diaminooctan **24c** eingesetzt.

Ausbeute: 90 mg (0.48 mmol, 39%) eines farblosen

Schaumes. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, DMSO-

*d*₆): 5.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, Harnstoff-NH), 5.35

(s, 2H, Harnstoff-NH₂), 3.60 (brs, 2H, NH₂), 2.92 (q,

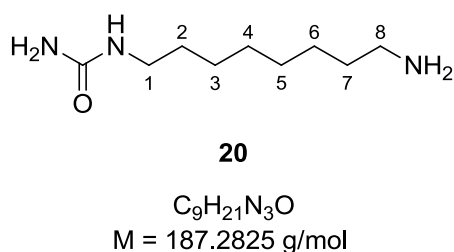
$^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, H-1), 2.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H,

H-8), 1.40-1.30 (m, 4H, H-2/-7), 1.27-1.22 (m, 8H, Alkyl-H). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101

MHz, DMSO-*d*₆): 158.7 (Harnstoff-C), 40.8 (C-8), 38.9 (C-1), 31.6, 30.0, 28.9, 28.7,

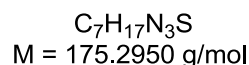
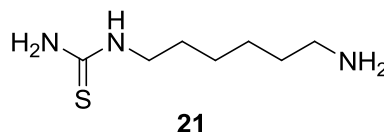
26.4, 26.2 (Alkyl-C). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3393, 1928, 2851, 1655, 1594, 1558,

1404, 655, 572. - **HRMS** (FAB, *m/z*): ber.: 188.1762 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, gef.: 188.1763 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.



(6-Aminohexyl)thioharnstoff 21

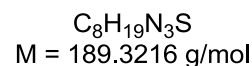
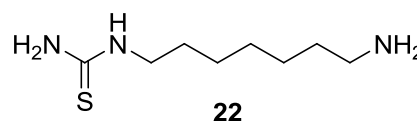
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 500 mg (4.30 mmol) 1,6-Diaminohexan **24a** eingesetzt.



Das Produkt **21** konnte nicht erhalten werden.

(7-Aminoheptyl)thioharnstoff 22

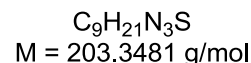
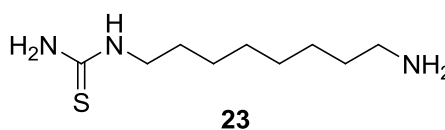
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 2 durchgeführt. Es wurden 500 mg (3.85 mmol) 1,7-Diaminoheptan **24b** eingesetzt.



Das Produkt **21** konnte nicht erhalten werden.

(8-Aminooctyl)thioharnstoff 23

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 500 mg (3.5 mmol) 1,8-Diaminooctan **24c** in 15 mL Brombenzol suspendiert und mit 133 mg (1.75 mmol) Ammoniumisothiocyanat versetzt. Anschließend



wurde die Reaktionsmischung für 18 Stunden in der Siedehitze gerührt. Nach Kühlen auf 0 °C wurde die Reaktionsmischung mit dest. Wasser gewaschen. In keiner der beiden Phasen konnte das Produkt **23** oder andere charakterisierbare Verbindungen identifiziert werden.

N-(6-Aminohexyl)prop-2-enamid 28Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 1.16 g (10 mmol) 1,6-Diaminohexan **22a** in 15 mL abs. Pyridin gelöst. Im Tropftrichter wurden 10 mL abs. Pyridin vorgelegt und mit 0.40 mL (0.45 g, 5.0 mmol, 0.5 Äquiv.) Acryloylchlorid **38** versetzt. Dabei reagierte das Acryloylchlorid anscheinend mit dem Pyridin. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz verworfen.

Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 1.16 g (10 mmol) 1,6-Diaminohexan **22a** in 15 mL abs. Dichlormethan suspendiert und mit 1.41 mL (1.01 g, 10 mmol) abs. Triethylamin gelöst. Nach Kühlen auf -10 °C wurde in der Kälte eine Lösung aus 0.37 mL (0.41 g, 4.5 mmol) Acryloylchlorid **38** in 10 mL abs. Dichlormethan über 2 Stunden zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$: 80:18:2 v/v/v). Zur Aufarbeitung wurde mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$: 80:18:2 v/v/v) gereinigt. Es wurde ein sehr geringer Anteil **28** erhalten. Jedoch wurden 478 mg (2.13 mmol, 95%) des doppelt acylierten Produktes als Hauptprodukt erhalten.

Synthese 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 500 mg (4.3 mmol) 1,6-Diaminohexan **22a** in 10 mL abs. THF suspendiert und mit 0.27 mL (0.20 g, 1.9 mmol) abs. Triethylamin gelöst. Nach Kühlen auf -10 °C wurde in der Kälte eine Lösung aus 0.14 mL (0.16 g, 1.72 mmol) Acryloylchlorid **38** in 30 mL abs. THF über 2 Stunden zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$: 80:18:2 v/v/v). Zur Aufarbeitung wurde mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$: 80:18:2 v/v/v) gereinigt. Es wurde ein sehr geringer Anteil **28** erhalten. Jedoch wurden 168 mg (0.75 mmol, 87%) des doppelt acylierten Produktes als Hauptprodukt erhalten.

Synthese 3:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 500 mg (4.30 mmol) 1,6-Diaminohexan **22a** in 20 mL abs. Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.35 mL (4.3 mmol) Acryloylchlorid **38** langsam über eine Stunde zugetropft. Nach der Zugabe wurde die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 30 Minuten gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$: 80:18:2 v/v/v) gereinigt.

Ausbeute: 253 mg (1.49 mmol, 35%) eines farblosen

Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Et}_3\text{N}$:

80:18:2 v/v/v): 0.31. **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz,

$\text{DMSO}-d_6$): 8.05 (s, 1H, Amid-NH), 6.20 (dd, $^2J_{\text{H,H}} =$

17.1, $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$ Hz, 1H, H-2), 6.05 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 17.1$,

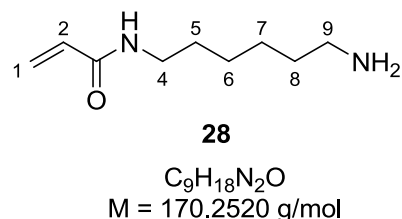
$^3J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-1a), 5.55 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 10.0$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-1b), 3.25 (brs,

2H, NH_2), 3.10 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-4), 2.53-2.51 (m, 2H, H-9), 1.44-1.22 (m, 8H,

Alkyl-H). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 164.4 (Amid-C), 131.9 (C-2),

124.6 (C-3), 41.4 (C-9), 38.5 (C-4), 33.0, 29.1, 26.4, 26.0 (Alkyl-C). - **IR**: Wellenzahl

$[\text{cm}^{-1}]$: 3296, 3057, 2930, 2856, 1653, 1542, 1239, 951. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 171.1497 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef: 171.1499 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



9.5.2 Synthese des neuartigen DHS-Inhibitors (46) der zweiten Generation

4-Amino-3-(4-brombut-1-ynyl)-benzonitril 54a

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 488 mg (2.00 mmol)

4-Amino-3-iodbenzonitril **50**, 0.68 mL (7.2 mmol, 3.6 Äquiv.)

4-Brom-1-butin **55a** und 231 mg (0.200 mmol, 0.1 Äquiv.)

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 6 mL abs. DMF gelöst. Nach 20 Minuten

wurden 76 mg (0.40 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)iodid und

0.65 mL (3.8 mmol, 3.6 Äquiv.) abs. DIPEA in die schwarze

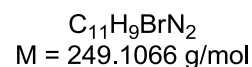
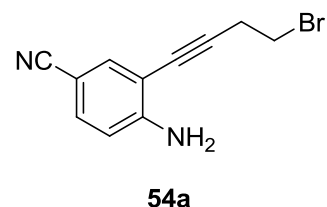
Lösung zugegeben. Nach 5 Tagen unter Rühren bei Raumtemperatur wurde für

24 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und

das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE: 3:1 v/v). Es

konnte mittels NMR-Spektroskopie keine Umsetzung zum gewünschten Produkt

festgestellt werden.



Versuch 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 150 mg (615 μmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril

50, 6 mg (0.03 mmol, 0.05 Äquiv.) Kupfer(I)iodid sowie 21 mg (0.03 mmol,

0.05 Äquiv.) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ in 3 mL abs. Et_3N gelöst und bei Raumtemperatur gerührt.

Sobald die Lösung homogen war, wurden 0.07 mL (0.7 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Brom-1-butin **55a** zugegeben. Es wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde für 24 h in der Siedehitze gerührt. Die Reaktion wurde abgekühlt und in 50 mL Wasser aufgenommen, dreimal mit jeweils 10 mL Ethylacetat sowie dreimal mit jeweils 30 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (PE/EE: 3:1 v/v). Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

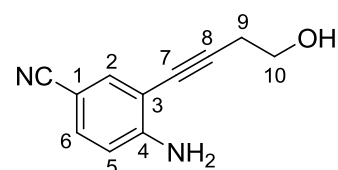
Versuch 3:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 199 mg (0.816 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 98 µL (0.98 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Brom-1-butin **55a** eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 36 Stunden. Das Produkt konnte nicht erhalten werden.

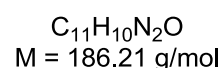
4-Amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzonitril 54b

Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (440 µmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50**, 4 mg (0.02 mmol, 0.05 Äquiv.) Kupfer(I)iodid sowie 15 mg (0.02 mmol, 0.05 Äquiv.) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ in 3 mL abs. Et_3N gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reaktionslösung wurde eine Lösung aus 37 µL (0.49 mmol, 1.1 Äquiv.) 3-Butin-1-ol **55b** in 4 mL abs. Et_3N zugetropft. Nach 24 h wurde die



54b



Reaktionsmischung über eine Aluminiumoxidsäule (Al_2O_3 , neutral, Aktivitätsstufe 3) filtriert und mit 50 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (19:1 v/v) nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit jeweils 50 mL dest. Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit jeweils 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 19:1 v/v).

Ausbeute: 77 mg (0.42 mmol, 94%) eines bräunlichen Feststoffes. - **DC:** R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 19:1 v/v): 0.49. - **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.47 (d,

$^4J_{\text{H,H}} = 2.9 \text{ Hz}$, 1H, H-10), 7.37 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.57$, $^4J_{\text{H,H}} = 2.04 \text{ Hz}$, 1H, H-8), 6.74 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.57 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 6.29 (bs, 2H, -NH₂), 4.94 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.65 \text{ Hz}$, 1H, -OH), 3.60 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 6.63$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.71 \text{ Hz}$, 2H, H-1), 2.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.67 \text{ Hz}$, 2H, H-2). **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 153.1 (C-6), 135.4 (C-10), 132.6 (C-8), 119.7 (CN), 113.5 (C-7), 106.8 (C-9), 95.0 (C-5), 76.2 (C-4), 67.1 (C-3), 59.6 (C-1), 23.6 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3456, 3347, 2935, 2214, 1615, 1560, 1499, 1039, 819, 602, 593. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 187.0793 [M+H]⁺, gef.: 187.0865 [M+H]⁺.

Synthese 2:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 100 mg (418 μmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 42.7 μL (571 μmol , 1.4 Äquiv.) 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt.

Ausbeute: 66 mg (0.36 mmol, 85%) eines gelblichen Öls. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Synthese 3:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 1.00 g (4.10 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 0.460 mL (6.15 mmol, 1.5 Äquiv.) 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt.

Ausbeute: 29 mg (0.13 mmol, 74%) eines gelblichen Öls. Die analytischen Daten entsprechen den oben genannten.

4-Amino-3-(4-O-*tert*-butyldimethylsilyloxy-but-1-ynyl)benzonitril 54c

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 309 mg (1.66 mmol) 4-Amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzonitril **54b** mit 198 mg (2.91 mmol, 1.75 Äquiv.) Imidazol versetzt und in 10 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurden 314 mg (2.08 mmol, 1.25 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zugegeben und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL Methanol gestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zweimal mit je 5 mL Toluol und einmal mit 5 mL Dichlormethan coevaporiert. Der Rückstand wurde anschließend in Dichlormethan aufgenommen und mit dest. Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden

über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 448 mg (1.49 mmol, 90%) eines

grünbraunen Öls. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$:

19:1 v/v): 0.85. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.45 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 1H, H-2), 7.38 (dd, $^3J_{\text{H,H}} =$

8.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.74 (d, $^3J_{\text{H,H}} =$

8.6 Hz, 1H, H-5), 6.28 (s, 2H, NH_2), 3.79 (t, $^3J_{\text{H,H}} =$

6.6 Hz, 2H, H-10), 2.64 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, H-9),

0.88 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.07 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz,

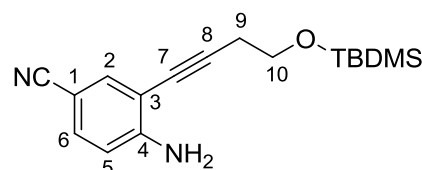
$\text{DMSO-}d_6$): 153.1 (C-4), 135.3 (C-2), 132.6 (C-6), 120.0 (CN), 113.5 (C-5), 106.8 (C-

1), 94.4 (C-3), 76.2 (C-7), 61.8 (C-10), 25.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.4 (C-9), 18.5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$),

-5.4 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3476, 3355, 3316, 2951, 2928, 2855, 2218,

1618, 1500, 1322, 1253, 1098, 834, 808. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 300.1685 [M],

gef.: 301.1731 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.



54c

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OSi}$
M = 300.47 g/mol

5-Cyano-2-(2-hydroxyethyl)-1H-indol 53b

Synthese 1:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 270 mg (1.45 mmol) 4-Amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzonitril **54b** eingesetzt. Als Base wurde zuerst 1 Äquiv. dest. DBU und anschließend 1 Äquiv. Kalium-*tert*-butanolat verwendet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 98:2 $\rightarrow$ 9:1 v/v).

Ausbeute: 163 mg (0.876 mmol, 60%) eines gelb-braunen

Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.37. -

Smp.: 99 °C. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):

11.49 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, H-4), 7.45 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz,

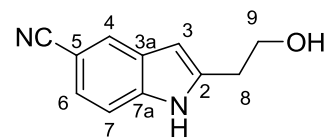
1H, H-7), 7.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 1H, H-6),

6.33 (s, 1H, H-3), 4.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, 1H, OH), 3.74 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} =$

5.3 Hz, 2H, H-9), 2.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-8). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$): 141.0 (C-3), 138.1 (C-7a), 128.1 (C-3a), 126.3 (C-4), 125.1 (C-6), 121.0

(CN), 113.8 (C-7), 100.2 (C-2), 60.5 (C-9), 31.4 (C-8). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3420,



53b

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$
M = 186.21

3300, 2929, 2873, 2221, 1661, 1613, 1417, 1318, 1061, 1024, 814, 790, 695, 619, 499. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 186.1 [M], gef.: 187.1 [M+H]⁺.

Synthese 2:

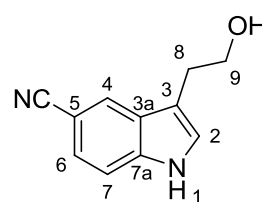
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.00 g (4.11 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 1.5 Äquiv. 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt.

Ausbeute: 342 mg (1.84 mmol, 45%) eines orangefarbenen Feststoffes von **53b**. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Zusätzlich wurden 232 mg (1.26 mmol, 31%) 5-Cyano-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **57** als orangefarbener Feststoff erhalten.

- **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v): 0.36. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.34 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H-2), 7.49 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, H-4), 7.38 (dd, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.33 (d, ⁴J_{H,H} = 1.5 Hz, 1H, H-7), 4.73 (t, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, 1H, OH), 3.64 (m, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, 2H, H-9), 2.85 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, H-8).

- **¹³C-NMR**: δ [ppm] (DMSO-*d*₆, 101 MHz): 137.8 (C-7a), 127.4 (C-3a), 125.5 (C-7), 124.4 (C-3), 123.4 (C-6), 120.9 (CN), 113.3 (C-2), 112.5 (C-4), 100.1 (C-5), 61.5 (C-9), 28.3 (C-8). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3461, 3229, 3131, 2912, 2215, 1616, 1471, 1260, 1033, 879, 826, 722, 570, 416. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 186.0 [M], gef.: 187.0 [M+H]⁺.



57

C₁₁H₁₀N₂O
M = 186,21 g/mol

Synthese 3:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt, außer dass als Katalysator PdCl₂(PPh₃)₄ verwendet wurde. Es wurden 259 mg (1.06 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 1.5 Äquiv. 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt.

Ausbeute: 27 mg (0.15 mmol, 15%) einer nicht trennbaren Mischung aus **53b**, **54b** und **57**.

Als weitere Fraktion wurden 43 mg (0.23 mmol, 22%) des C-C-Kreuzkupplungsproduktes **54b** erhalten.

Synthese 4:

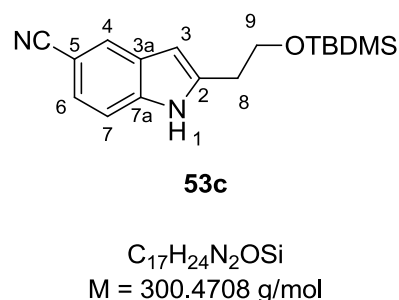
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt, außer das als Katalysator $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ verwendet wurde. Es wurden 500 mg (2.05 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 1.5 Äquiv. 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt.

Ausbeute: 60 mg (0.32 mmol, 16%) eines braunen Öls von **53b**. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

Als weitere Fraktion wurden 132 mg (0.71 mmol, 32%) 5-Cyano-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **57** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten überein.

5-Cyano-2-(2-O-*tert*-butyldimethylsilyloxyethyl)-1*H*-indol 53cVersuch 1:

Die Synthese wurde nach der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 100 mg (333 μmol) 4-Amino-3-(4-O-*tert*-butyldimethylsilyloxy-but-1-ynyl)-benzonitril **54c** eingesetzt. Als Base wurden 1.5 Äquiv. dest. DBU verwendet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 $\rightarrow$ 1:2 v/v).



Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten 54.5 mg (0.181 mmol, 54%) des Eduktes **54c** zurückgewonnen werden, sowie eine Mischfraktion der Verbindungen **53b** und **54b** im Verhältnis von 1 zu 0.5 isoliert werden. Das gewünschte Produkt **53c** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (0.333 mmol) 4-Amino-3-(4-O-*tert*-butyldimethylsilyloxy-but-1-ynyl)-benzonitril **54c** mit 0.018 mL (13 mg, 0.13 mmol, 0.4 Äquiv.) abs. Triethylamin und 15 mg (0.066 mmol, 0.2 Äquiv.) Cyclopentadienyltitan-Trichlorid versetzt und in 2.5 mL abs. THF gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 3.5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 6 mL 1%-iger methanolischer Natriumhydroxid-Lösung wurde der Ansatz unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingeeengt und anschließend mit 10 mL *n*-

Hexan resuspendiert und über Kaliumcarbonat filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Es konnten 69 mg (0.23 mmol, 69%) des Eduktes **54c** zurückgewonnen werden. Das gewünschte Produkt **53c** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 3:

Die Synthese wurde nach der AAV 6 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.333 mmol) 4-Amino-3-(4-O-*tert*-butyldimethylsilyloxy-but-1-ynyl)-benzonitril **54c** eingesetzt. Als Base wurden 1.2 Äquiv. Kalium-*tert*-butanolat verwendet. Der Reaktionsansatz wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE: 4:1 v/v → EE).

Das gewünschte Produkt **53c** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen wurde 5-Cyano-2-vinyl-1*H*-indol **56** isoliert.

Ausbeute: 58 mg eines gelben Sirups (verunreinigt durch

Ethylacetat). - **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 4:1 v/v): 0.63. - **¹H-NMR**:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.86 (s, 1H, NH), 8.02 (s,

1H, H-4), 7.49-7.42 (m, 2H, H-6, H-7), 6.78 (dd, $^3J_{H,H}(E) =$

17.9 Hz, $^3J_{H,H}(Z) = 11.4$ Hz, 1H, H-8), 6.61 (s, 1H, H-3), 5.90

(d, $^3J_{H,H}(E) = 17.9$ Hz, 1H, H-9a), 5.37 (d, $^3J_{H,H}(Z) = 11.4$ Hz,

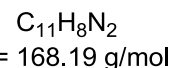
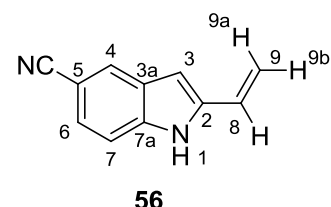
1H, H-9b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 141.0 (C-3), 138.1 (C-7a),

128.1 (C-3a), 126.3 (C-4), 125.1 (C-6), 120.5 (C-CN), 113.8 (C-7), 100.2 (C-2), 60.5

(C-9), 31.4 (C-8). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3420, 3300, 2929, 2873, 2221, 1661, 1613,

1417, 1318, 1061, 1024, 814, 790, 695, 619, 499. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.:

168.0687 [M], gef.: 168.0681 [M+H]⁺.



Versuch 4:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (0.333 mmol) 4-Amino-3-(4-O-*tert*-butyldimethylsilyloxy-but-1-ynyl)-benzonitril **54c** in 4 mL abs. *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst und mit 41 μ L (28 mg, 0.70 mmol, 2.1 Äquiv.) Kaliumhydrid in Paraffin-Öl versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 22 Stunden gerührt, anschließend mit 1 mL dest. Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v → EE).

Es konnten 23 mg (0.076 mmol, 23%) des Eduktes **54c** zurückgewonnen sowie 1 mg (7 µmol, 2%) der ringgeschlossenen Verbindung **53b** ohne TBDMS-Gruppe isoliert werden. Die spektroskopischen Daten entsprechen oben angegebenen. Das gewünschte Produkt **53c** konnte nicht erhalten werden.

5-Cyano-2-(2-bromomethyl)-1H-indol 53a

Versuch 1:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 1.00 g (4.11 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 1.5 Äquiv. 4-Brombut-1-in **55a** eingesetzt.

Das gewünschte Produkt **53a** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen wurden 92 mg (0.55 mmol, 13%) des Eliminierungsproduktes 5-Cyano-2-vinyl-1H-indol **56** erhalten. Die analytischen Daten entsprechen den zuvor genannten.

Versuch 2:

Die Reaktion erfolgte gemäß der AAV 8. Es wurden 202 mg (827 µmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 1.5 Äquiv. 4-Brombut-1-in **55a** eingesetzt.

Das gewünschte Produkt **53a** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen wurden 19.6 mg (117 µmol, 14%) des Eliminierungsproduktes 5-Cyano-2-vinyl-1H-indol **56** erhalten. Die analytischen Daten entsprechen den zuvor genannten.

N,N'-Bis-tert-butoxycarbonylguanidinobut-3-in 58

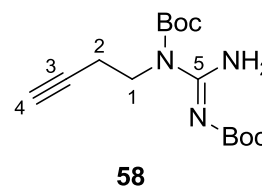
Synthese 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 48 mg (2.0 mmol, 1 Äquiv.) gewaschenes Natriumhydrid in 8 mL abs. DMF suspendiert, mit 519 mg (2.00 mmol, 1 Äquiv.) N,N'-Bis-tert-butoxycarbonylguanidin **59** versetzt und gerührt, bis sich alles gelöst hatte. Anschließend wurde zu dieser Lösung eine Lösung aus 0.190 mL (266 mg, 2.00 mmol, 1 Äquiv.) 4-Brombut-1-in **55a** in 4 mL abs. DMF gegeben und die Reaktionsmischung für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 mL dest. Wasser und 50 mL EE versetzt und die wässrige Phase nach der Phasentrennung noch zweimal mit je 50 mL EE extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und

Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 → 1:1 v/v).

Ausbeute: 58 mg (0.19 mmol, 10%) eines farblosen Feststoffes.

- **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.42. - **Smp.**: 76 °C. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 9.06 (s, 2H, NH_2), 3.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 2H, H-1), 2.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1H, H-4), 2.44 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 2H, H-2), 1.50 (s, 9H, 3 * BocCH_3), 1.41 (s, 9H, 3 * BocCH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 160.9 (C-5), 154.8 (2 * BocC=O), 83.0 (C-3), 80.0 (2 * $\text{BocC}(\text{CH}_3)_3$), 73.3 (C-4), 43.4 (C-1), 28.4 (2 * $\text{BocC}(\text{CH}_3)_3$), 18.3 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3376, 3260, 3197, 2984, 2965, 2931, 1637, 1512, 1450, 1308, 1216, 1120, 1087, 1003, 597. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 311.2 [M], gef.: 312.3 [M+H] $^+$.



$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$
M = 311.3767 g/mol

Synthese 2:

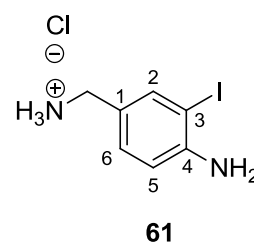
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 0.1 mL (0.09 g, 1 mmol) 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 → 1:1 v/v).

Ausbeute: 387 mg (1.24 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffes. Die analytischen Daten entsprechen den oben genannten.

4-Amino-3-iod-N-benzylammoniumchlorid 61

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (410 μmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** in 5 mL abs. Dioxan gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Nach kurzem Halten ins Ultraschall-Bad wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur unter einer Wasserstoffatmosphäre für 12 Tage gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 1:1 v/v). Da auch nach 12 Tagen keine Umsetzung des Eduktes detektiert werden konnte, wurde der Reaktionsansatz verworfen.



$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{ClIN}_2$
M = 284.5252 g/mol

Versuch 2:

Die Reaktion erfolgte gemäß der AAV 1. Es wurden 100 mg (410 μmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50** und 10 Äquiv. SnCl_2 eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug eine Stunde und die Reinigung erfolgte nach *Variante a*. Es konnte keine Umsetzung beobachtet werden, sondern es wurden 83% des Eduktes **50** reisoliert.

Synthese 1:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 3 durchgeführt. Es wurden 8.00 g (28.1 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril **50**. Es wurde ein leicht gelblicher Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter für den nächsten Schritt der Einführung der Boc-Schutzgruppe eingesetzt wurde.

O-tert-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamate 62a und O-tert-Butyl-[4-N-(4-O-tert-butoxycarbonyl)-amino-3-iodbenzyl]carbamate 62c

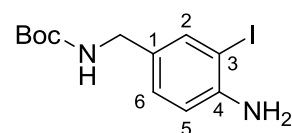
Synthese 1:

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 874 mg (3.07 mmol) 4-Amino-3-iod-N-benzylamin-Hydrochlorid **61** eingesetzt. Die Menge an Di-tert-butylidicarbonat betrug 3 Äquivalente. Als Lösungsmittel wurde CH_2Cl_2 verwendet. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ausbeute: 815 mg (2.34 mmol, 76% über zwei Stufen) eines orangefarbenen Öls. - **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.55. -

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.41 (s, 1H, H-2), 7.24-7.21 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz 1H, NH), 6.95 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 1H, H-6), 6.68 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, H-5), 5.09 (s, 2H, NH_2), 3.91 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, BnCH_2), 1.37 (s, 9H, 3 * BocCH_3).

- **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 155.6 (BocC=O), 147.2 (C-1), 137.1 (C-2), 129.8 (C-3), 128.2 (C-6), 114.1 (C-5), 82.8 (C-4), 77.6 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)_3$), 42.2 (BnCH_2), 28.2 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)_3$). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3342, 2975, 2929, 1686, 1614, 1496, 1365, 1247, 1154, 1027, 783, 664. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 349.0413 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, gef.: 349.0406 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

**62a**

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{IN}_2\text{O}_2$
 $M = 348.1801$ g/mol

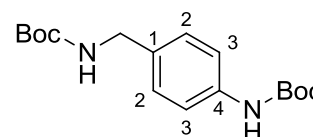
Synthese 2:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 4. Es wurden 1.45 g (5.11 mmol) 4-Amino-3-iod-*N*-benzylammoniumchlorid **61** eingesetzt. Es wurden 7.2 Äquivalente Di-*tert*-butyldicarbonat verwendet, von denen 1.8 Äquivalente nach 4 h Reaktionszeit nachgegeben wurden. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h bei 80 °C gerührt.

Ausbeute: 1.08 g (3.11 mmol, 61% über zwei Stufen) von **62a** als orangefarbenes Öl. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Das gewünschte Produkt **62c** konnte nicht erhalten werden.

Stattdessen wurden noch 36 mg (80 µmol, 2% über zwei Stufen) der dehalogenierten Verbindung **62d** als farbloser Feststoff erhalten. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.68. -

**62d**

C₁₇H₂₆N₂O₄
M = 322.3993 g/mol

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9.26 (s, 1H, N⁴-H), 7.36 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-3), 7.28 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.10 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 2H, H-2), 4.02 (d, ⁴J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, BnCH₂), 1.46 (s, 9H, 3 * BocCH₃), 1.38 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 155.7 (BocC=O), 152.8 (BocC=O), 138.1 (C-4), 133.7 (C-1), 127.3 (C-2), 118.0 (C-3), 78.9 (BocC(CH₃)₃), 77.7 (BocC(CH₃)₃), 43.0 (BnCH₂), 28.2 (BocC(CH₃)₃), 28.1 (BocC(CH₃)₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3407, 3295, 2976, 2934, 1680, 1515, 1242, 1053, 916, 637.

Synthese 3:

Die Synthese wurde nach der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 625 mg (2.20 mmol) 4-Amino-3-iod-*N*-benzylammoniumchlorid **61** eingesetzt. Es wurden 7.3 Äquivalente Di-*tert*-butyldicarbonat verwendet, von denen 1.9 Äquivalente nach 4 h Reaktionszeit nachgegeben wurden. Als Lösungsmittel wurde abs. DMF verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei 120 °C gerührt.

Ausbeute: 610 mg (1.75 mmol, 80% über zwei Stufen) von **62a** als orangefarbenes Öl. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Das gewünschte Produkt **62c** konnte nicht erhalten werden.

Stattdessen wurden noch 20 mg (45 μ mol, 2% über zwei Stufen) der dehalogenierten Verbindung **62d** als farbloser Feststoff erhalten. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Synthese 4:

Die Synthese wurde nach der AAV 4 durchgeführt. Es wurde 1.42 g (5.00 mmol) 4-Amino-3-iod-*N*-benzylamin-Hydrochlorid **61** eingesetzt. Die Menge an Di-*tert*-butyldicarbonat betrug 5.4 Äquivalente. Als Lösungsmittel wurde CH₂Cl₂ verwendet. Die Reaktionstemperatur betrug 40 °C.

Ausbeute: 1.30 g (3.73 mmol, 75% über zwei Stufen) von **62a** als orangefarbenes Öl. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

Das gewünschte Produkt **62c** konnte nicht erhalten werden.

Stattdessen wurden noch 1 mg (2 μ mol, 0% über zwei Stufen) der dehalogenierten Verbindung **62d** als farbloser Feststoff erhalten.

Synthese 5:

Die Synthese wurde nach der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 5.68 g (20.0 mmol) 4-Amino-3-iod-*N*-benzylamin-Hydrochlorid **61** eingesetzt. Die Menge an Di-*tert*-butyldicarbonat betrug 2.1 Äquivalente. Als Lösungsmittel wurde CH₂Cl₂ verwendet. Die Reaktion wurde bei 40 °C durchgeführt.

Ausbeute: 5.00 g (14.4 mmol, 72% über zwei Stufen) von **62a** als orangefarbenes Öl. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

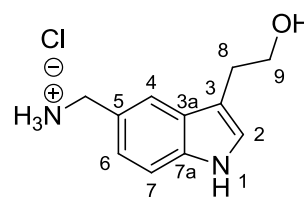
Das gewünschte Produkt **62c** konnte nicht erhalten werden.

Stattdessen wurden noch 88 mg (0.20 mmol, 1% über zwei Stufen) der dehalogenierten Verbindung **62d** als farbloser Feststoff erhalten. Die analytischen Daten entsprachen den oben angegebenen.

5-Methylammoniumchlorid-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol 61a

Die Synthese wurde nach der AAV 3 durchgeführt. Es wurden 170 mg (0.911 mmol) 5-Cyano-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **57** eingesetzt. Vor der Zugabe von 1 M Salzsäure wurde der Reaktionsansatz mit 5 mL Aceton versetzt.

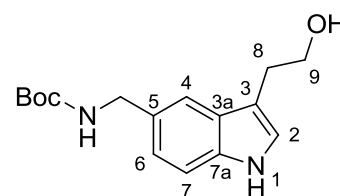
Es wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten, der nicht charakterisiert und ohne weitere Reinigung in der Folgestufe eingesetzt wurde.

**61a**

$C_{11}H_{15}ClN_2O$
 $M = 226.7026 \text{ g/mol}$

5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol 64

Die Synthese wurde nach der AAV 4 durchgeführt. Es wurden 207 mg (0.911 mmol) 5-Methylammoniumchlorid-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **61a** eingesetzt. Die Menge an Di-*tert*-butyldicarbonat betrug 3 Äquivalente. Als Lösungsmittel wurde CH_2Cl_2 verwendet. Die Reaktion wurde bei Rt durchgeführt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH_2Cl_2/CH_3OH : 98:2 $\rightarrow$ 9:1 v/v).

**64**

$C_{16}H_{22}N_2O_3$
 $M = 290.3575 \text{ g/mol}$

Das gewünschte Produkt **64** konnte nicht erhalten werden.

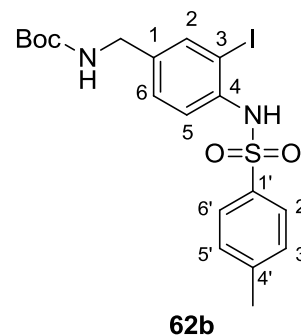
***O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamat 62b**

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 3.00 g (8.61 mmol) *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamat **62a** in 35 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 2.08 mL (25.8 mmol, 3 Äquiv.) abs. Pyridin versetzt. Anschließend wurden der Lösung portionsweise 1.97 g (10.3 mmol, 1.2 Äquiv.) *para*-Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 42 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Überführung wurde mit Dichlormethan verdünnt und dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit Dichlormethan wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v).

Ausbeute: 3.99 g (7.93 mmol, 92%) eines beigefarbenen Feststoffes. – **DC:** R_f -Wert (PE/EE: 2:1 v/v):

0.41. – **Smp.:** 60-63 °C. – **$^1\text{H-NMR}$:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.61 (s, 1H, TosNH), 7.66 (s, 1H, H-2), 7.58 (d, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.02$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 3H, H-3', H-5', BocNH), 7.12 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 6.91 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 4.03 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.91$ Hz, 2H, BnCH $_2$ ', BnCH $_2$ ', BnCH $_2$), 2.38 (s, 3H, TosCH $_3$), 1.38 (s, 9H, 3 * BocCH $_3$). – **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 156.8

(BocC=O), 143.5 (C-4'), 141.4 (C-1), 138.2 (C-3), 138.0 (C-2), 129.8 (C-3', C-5'), 128.5 (C-1'), 127.7 (C-5), 127.3 (C-6), 127.1 (C-2', C-6'), 99.8 (C-4), 78.6 (BocC(CH $_3$) $_3$), 42.6 (BnCH $_2$), 28.4 (BocC(CH $_3$) $_3$), 21.4 (TosCH $_3$). – **IR:** Wellenzahl [cm $^{-1}$]: 3325, 2976, 2930, 2217, 1688, 1487, 1332, 1246, 1157, 664, 548. – **HRMS** (ESI $^+$, m/z): ber.: 525.0321 [M+Na] $^+$, gef.: 525.0322 [M+Na] $^+$.



$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{IN}_2\text{O}_4\text{S}$
M = 502.3664 g/mol

5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **63a**

Versuch 1:

Die Synthese wurde nach AAV 9 durchgeführt. Es wurden 110 mg (0.316 mmol) *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbammat **62a** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH $_2$ Cl $_2$ /CH $_3$ OH: 99:1 → 9:1 v/v).

Es wurde nicht das Indol **63a**, sondern nur das Kreuzkupplungsprodukt **65a** erhalten (74%). Die analytischen Daten stimmen für diese Verbindung mit den zuvor angegebenen überein.

Synthese 1:

Die Synthese wurde nach AAV 8 durchgeführt. Es wurden 504 mg (1.44 mmol) *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbammat **62a** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH $_2$ Cl $_2$ /CH $_3$ OH: 98:2 → 9:1 v/v).

Ausbeute: 170 mg (0.585 mmol, 41%) eines gelben Öls. Es wurde eine Mischung aus 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxy-ethyl)-1*H*-indol **63a** und 5-

(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-3-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **64** erhalten, die säulenchromatographisch nicht getrennt werden konnten.

Synthese 2:

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 94 mg (0.32 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzyl]carbammat **65a** eingesetzt. Als Base wurden 1.2 Äq. Kalium-*tert*-butanolat verwendet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 98:2 → 9:1 v/v).

Es wurden das Eliminierungsprodukt, das Edukt, sowie das gewünschte Produkt erhalten, die trotz Säulenchromatographie nicht sauber isoliert werden konnten.

Synthese 3:

Die Synthese wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.344 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzyl]carbammat **65a** eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 92 h bei 70 °C.

Ausbeute: 79 mg (0.27 mmol 79%) eines braunen

Öls. - **DC**: R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v): 0.53. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.76 (s, 1H,

NH-1), 7.28-7.22 (m, 2H, H-4, BocNH), 7.20 (d, ³J_{H,H} =

7.8 Hz, 1H, H-7), 6.89 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, H-6),

6.10 (s, 1H, H-3), 4.72 (t, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 1H, OH), 4.14

(d, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, BnCH₂), 3.70 (dt, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 9.4 Hz, 2H, H-9), 2.84

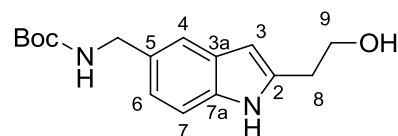
(t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-8), 1.39 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz,

DMSO-*d*₆): 155.4 (BocC=O), 137.4 (C-2), 129.4 (C-5), 119.6 (C-6), 117.5 (C-4),

110.3 (C-7), 99.0 (C-3), 76.6 (BocC(CH₃)₃), 60.6 (C-9), 44.2 (BnCH₂), 31.7 (C-8),

28.4 (BocC(CH₃)₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3385, 3332, 3048, 2977, 2931, 1684,

1537, 1438, 1363, 1303, 1273, 1166, 806, 669, 641. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 291.1709 [M+H]⁺, gef.: 291.1697 [M+H]⁺.



63a

C₁₆H₂₂N₂O₃
M = 290.3575 g/mol

5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1-*N*-(4-toluolsulfonyl)-indol **63b**

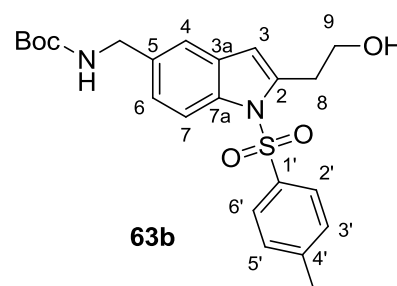
Synthese 1:

Die Synthese wurde nach der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 185 mg (0.368 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbammat **62b** und 6 Äquivalente 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 99:1 → 9:1 v/v).

Ausbeute: 158 mg (0.580 mmol, 97%) eines gelblichen

Sirups. - **DC**: R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 19:1 v/v): 0.38. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.94 (d, ⁴J_{H,H} = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.66 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.34 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 3H, H-3', H-5', NH), 7.30 (s, 1H, H-4), 7.14 (d, ⁴J_{H,H} = 8.7 Hz, 1H, H-6), 6.59 (s, 1H, H-3), 4.78 (t, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, OH), 4.15 (d, ³J_{H,H} =



C₂₃H₂₈N₂O₅S
M = 444.5438 g/mol

5.6 Hz, 2H, BnCH₂), 3.77 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 2H, H-9), 3.14 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 2H, H-8), 2.30 (s, 3H, TosCH₃), 1.38 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 156.1 (BocC=O), 144.9 (C-4'), 138.9 (C-2), 134.4 (C-7a), 130.4 (C-3', C-5'), 129.4 (C-3a), 126.0 (C-2', C-6'), 122.8 (C-5), 119.2 (C-4), 110.1 (C-3), 75.2 (BocC(CH₃)₃), 59.5 (C-9), 43.0 (BnCH₂), 32.2 (C-8), 28.4 (BocC(CH₃)₃), 21.3 (TosCH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3400, 3054, 2977, 2930, 1688, 1510, 1469, 1364, 1090, 961, 670, 493. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 467.1617 [M+Na]⁺, gef.: 467.1615 [M+Na]⁺.

Synthese 2:

Die Synthese wurde nach der AAV 9 durchgeführt. Es wurden 500 mg (995 μmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbammat **62b** und 3 Äquivalente 3-Butin-1-ol **55b** eingesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 99:1 → 95:1 v/v).

Ausbeute: 399 mg (898 μmol, 90%) eines gelblichen Öls. Die analytischen Daten entsprechen den zuvor angegebenen.

Synthese 3:

Die Synthese wurde nach der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 195 mg (0.388 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamat **62b** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 98:2 → 9:1 v/v).

Ausbeute: 134 mg (0.301 mmol, 77%) eines gelblichen Sirups. Die spektroskopischen Daten entsprechen den oben angegebenen.

5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-*N*-(4-toluolsulfonyl)-indol **66b**

Synthese 1:

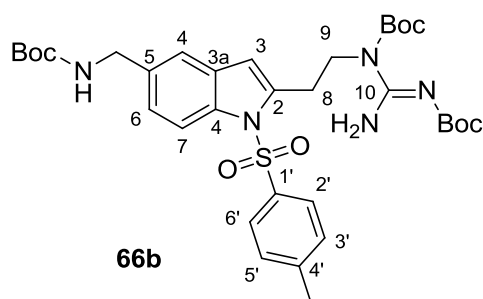
Die Synthese wurde nach AAV 9 durchgeführt. Es wurden 254 mg (0.506 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-*N*-(toluolsulfonyl-amino)-3-iodbenzyl]carbamat **62b** und 442 mg (1.52 mmol, 3 Äquiv.) *N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino-but-3-in **58** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE: 4:1 → 1:1 v/v).

Ausbeute: 212 mg (0.309 mmol, 62%) eines gelbbraunlichen Feststoffes. - **DC:** R_F-Wert

(PE/EE: 2:1 v/v): 0.42. - **Smp.:** 106 °C. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9.13 (s, 2H, NH₂), 8.01 (d, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.70 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.39-7.31 (m, 3H, H-3', H-5', BocNH), 7.29 (s, 1H, H-4), 7.18 (dd, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.4 Hz, 1H, H-6), 6.49

(s, 1H, H-3), 4.20 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, H-9), 4.14 (d, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, BnCH₂), 3.22 (t, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2H, H-8), 2.30 (s, 3H, TosCH₃), 1.41 (s, 9H, 3 * BocCH₃), 1.37 (s, 9H, 3 * BocCH₃), 1.19 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 160.0 (BocC=O), 156.1 (BocC=O), 154.5 (C-10), 145.6 (C-4'), 138.8 (C-2), 135.5 (C-3a), 135.5 (C-1'), 130.5 (C-3', C-5'), 130.0 (C-7a), 129.9 (C-5), 126.3 (C-2', C-6'), 123.9 (C-6), 119.0 (C-4), 114.3 (C-7), 110.8 (C-3), 84.7 (BocC(CH₃)₃), 83.9 (BocC(CH₃)₃), 78.3 (BocC(CH₃)₃), 43.6 (BnCH₂), 44.2 (C-9), 28.5 (BocC(CH₃)₃), 28.1 (C-8), 27.5 (BocC(CH₃)₃), 21.4 (TosCH₃). - **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3378, 2931, 1709,



C₃₄H₄₇N₅O₈S
M = 685.8307 g/mol

1607, 1504, 1471, 1443, 1365, 1282, 1162, 811, 545. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 685.3 [M], gef.: 686.5 [M+H]⁺.

Synthese 2:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 10. Es wurde 399 mg (0.897 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)-indol **63b** eingesetzt. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel (PE/EE 4:1 → 1:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 585 mg (0.853 mmol, 95%) eines leicht gelblichen Öls erhalten. Die analytischen Daten entsprechen den oben angegebenen.

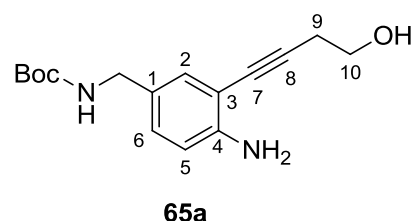
O-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-hydroxybut-1-ynyl)-benzyl]carbamate **65a**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 5 durchgeführt. Es wurden 610 mg (1.75 mmol) *O*-*tert*-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbamate **62a** eingesetzt und 3-Butin-1-ol **55b** als Alkin verwendet. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel. (CH₂Cl₂/CH₃OH: 98:2 → 9:1 v/v).

Ausbeute: 457 mg (1.57 mmol, 90%) eines orangefarbenen Öls. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH:

9:1 v/v): 0.55. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.17 (t, ⁴J_{H,H} = 5.9 Hz, 1H, H-2), 6.96 (s, 1H, NH), 6.89 (dd, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.60 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, H-5), 5.16 (s, 2H, NH₂), 4.88 (t, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, OH), 3.90 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2H,

BnCH₂), 3.58 (dt, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 9.8 Hz, 2H, H-10), 2.58 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-9), 1.37 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 155.7 (BocC=O), 148.2 (C-4), 130.2 (C-2), 128.1 (C-6), 127.2 (C-1), 113.4 (C-5), 106.4 (C-3), 92.8 (C-8), 78.3 (C-7), 77.6 (BocC(CH₃)), 59.5 (C-10), 42.8 (BnCH₂), 28.3 (BocC(CH₃)), 23.6 (C-9). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3350, 2930, 1687, 1621, 1500, 1365, 1248, 1162, 1043, 735. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 291.1709 [M+H]⁺, gef.: 291.1711 [M+H]⁺.



65a

C₁₆H₂₂N₂O₃
M = 290.3575 g/mol

***O*-tert-Butyl-[4-amino-3-(4-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-1-in-1-yl)-benzyl]carbammat 65b**

Die Synthese wurde nach der AAV 5 durchgeführt. Es wurde 306 mg (878 μ mol) *O*-tert-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbammat **62a** und *N,N'*-Bis-*tert*-butoxy-carbonyl-guanidinobut-3-in **58** eingesetzt. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 99:1 $\rightarrow$ 95:5 v/v).

Ausbeute: 237 mg (0.446 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffes. **DC:** R_f -Wert

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.55. - **$^1\text{H-NMR}$:** δ

[ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 9.08 (s, 2H,

guanidin- NH_2), 7.17 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH),

6.96 (s, 1H, H-2), 6.89 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, H-

6), 6.60 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1H, H-5), 5.13 (s, 2H,

NH_2), 4.01 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, 2H, H-10), 3.90 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 2H, BnCH_2), 2.74 (t,

$^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2H, H-9), 1.49 (s, 9H, 3 * BocCH_3), 1.41 (s, 9H, 3 * BocCH_3), 1.37 (s,

9H, 3 * BocCH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$:** δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 162.8 (C-11), 159.4

(BocC=O), 155.6 (BocC=O), 153.9 (BocC=O), 148.1 (C-4), 130.4 (C-2), 128.3 (C-6),

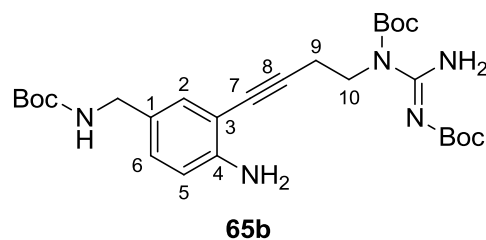
127.3 (C-1), 113.6 (C-5), 106.0 (C-3), 91.4 (C-8), 83.7 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 79.0 (C-7), 77.8

($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 77.6 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 43.2 (C-10), 42.7 (BnCH_2), 28.3 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 28.0

($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 27.5 ($\text{BocC}(\text{CH}_3)$), 19.2 (C-9). **IR:** Wellenzahl [cm^{-1}]: 3373, 2976, 1709,

1608, 1502, 1365, 1245, 1141, 1004, 744. **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 532.3135 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$,

gef.: 532.3136 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.



$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6$
M = 531.6443 g/mol

5-(*O*-tert-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-Indol 66a

Versuch 1:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 8 durchgeführt. Es wurden 195 mg (0.388 mmol) *O*-tert-Butyl-(4-amino-3-iodbenzyl)carbammat **62a** eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 98:2 $\rightarrow$ 4:1 v/v).

Das Produkt konnte nicht erhalten werden.

Synthese 1:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 10 durchgeführt. Es wurden 54 mg (0.19 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-hydroxyethyl)-1*H*-indol **63a** eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE: 2:1 → 1:2 v/v).

Das Produkt **66a** wurde erhalten, konnte jedoch auch nach säulenchromatographischer Reinigung nicht sauber isoliert werden.

Synthese 2:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 7 durchgeführt. Es wurden 214 mg (0.402 mmol) *O*-*tert*-Butyl-[4-amino-3-(4-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinobut-1-in-1-yl)-benzyl]carbammat **65b** eingesetzt.

Ausbeute: 123 mg (0.230 mmol, 57%) eines

gelben Feststoffes. - **DC:** R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v): 0.28. - **Smp.:** 124 °C.

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.94 (s,

1H, NH-1), 7.27 (brs, 2H, H-4, BocNH), 7.22 (d,

³J_{H,H} = 8.2 Hz, 1H, H-7), 6.92 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz,

1H, H-6), 6.17 (s, 1H, H-3), 4.15 (d, ³J_{H,H} = 6.3

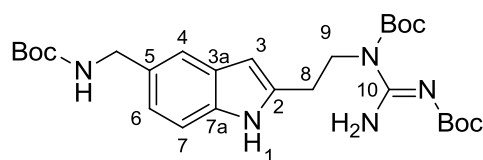
Hz, 1H, BnCH₂), 3.52 (t, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, 2H, H-9), 2.90 (brs, 2H, H-8), 1.42 (s, 9H, 3 * BocCH₃), 1.38 (s, 9H, 3 * BocCH₃), 1.29 (s, 9H, 3 * BocCH₃). - **¹³C-NMR:** δ [ppm]

(101 MHz, DMSO-*d*₆): 160.9 (C-10), 155.7 (2 * BocC=O), 136.9 (C-2), 135.1 (C-7a),

130.4 (C-5), 128.1 (C-3a), 120.2 (C-6), 117.7 (C-4), 110.4 (C-7), 99.0 (C-3), 77.5 (C-

9), 44.0 (BnCH₂), 28.3 (2 * C-BocC(CH₃)), 28.1 (C-8). - **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3281,

2930, 1683, 1632, 1486, 1390, 1301, 1146, 966, 776. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 532.3135 [M+H]⁺, gef.: 532.3122 [M+H]⁺.



66a

C₂₇H₄₁N₅O₆
M = 531.6443 g/mol

Versuch 2:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 186 mg (0.271 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino ethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)-indol **66b** eingesetzt. Es wurde 2 M KOH in Methanol als Reagenz verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 4 h bei Raumtemperatur.

Es wurde das Edukt **66b** reisoliert (75%).

Versuch 3:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 27 mg (39 µmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)-indol **66b** eingesetzt. Es wurde 5 M KOH in Methanol als Reagenz verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 2 h in der Siedehitze.

Ausbeute: 2 mg (4 µmol, 1%) eines gelben Feststoffes. Die Signale des ¹H-NMR-Spektrums entsprechen den oben angegebenen Werten. Für eine vollständige Charakterisierung war die in dieser Reaktion erhaltene Menge nicht ausreichen.

Synthese 3:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 408 mg (595 µmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)-indol **66b** eingesetzt. Es wurde 2 M KOH in Methanol als Reagenz verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 2 h bei 35 °C.

Ausbeute: 66 mg (0.12 mmol, 21%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten entsprechen den oben angegebenen. Außerdem wurden noch 118 mg (202 µmol, 34%) des Eduktes **66b**, bei dem eine Boc-Gruppe fehlte, erhalten.

Synthese 4:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 186 mg (0.271 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluol-sulfonyl)-indol **66b** eingesetzt. Es wurde 5 M KOH in Methanol als Reagenz verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 24 h bei Raumtemperatur. Während der ersten halben Stunde wurde die Temperatur des Reaktionskolbens mit einem Wasserbad konstant gehalten.

Ausbeute: 101 mg (0.19 mmol, 68%) eines gelblichen Feststoffes. Die analytischen Daten entsprechen den oben angegebenen.

Synthese 5:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 585 mg (0.853 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxy

carbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b** eingesetzt. Als Reagenz wurde 5 M KOH in Methanol eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 24 h bei Raumtemperatur. Während der ersten halben Stunde wurde die Temperatur des Reaktionskolbens mit einem Wasserbad konstant gehalten.

Ausbeute: 272 mg (0.512 mmol, 60%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor angegebenen überein.

Synthese 6:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 187 mg (0.273 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxy carbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b** eingesetzt. Als Reagenz wurde 5 M KOH in Methanol eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 43 h bei Raumtemperatur. Während der ersten halben Stunde wurde die Temperatur des Reaktionskolbens mit einem Wasserbad konstant gehalten.

Ausbeute: 78 mg (0.147 mmol, 54%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor angegebenen überein.

Synthese 7:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.729 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxy carbonylguanidinoethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)indol **66b** eingesetzt. Als Reagenz wurde 5 M NaOH in Methanol eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 29 h bei Raumtemperatur. Während der ersten halben Stunde wurde die Temperatur des Reaktionskolbens mit einem Wasserbad konstant gehalten.

Ausbeute: 302 mg (0.569 mmol, 78%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor angegebenen überein.

Synthese 8:

Die Synthese wurde gemäß der AAV 11 durchgeführt. Es wurden 59 mg (86 µmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino ethyl)-1-(4-toluolsulfonyl)-indol **66b** eingesetzt. Es wurde 5 M NaOH in Methanol als Reagenz verwendet. Es wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Während der ersten halben Stunde wurde die Temperatur des Reaktionskolbens mit einem Wasserbad konstant gehalten.

Ausbeute: 45 mg (85 μ mol, 99%) eines gelben Feststoffes. Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor angegebenen überein.

2-(2-Guanidinoethyl)-5-aminomethyl-1*H*-indol **46**

Versuch 1:

Es wurden 5 mL konz. Schwefelsäure zu 5 g Ammoniumchlorid getropft und der entstehende gasförmige Chlorwasserstoff über zwei Stunden in eine Lösung von 40 mg (75 μ mol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-Bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** in 10 mL Ethylacetat geleitet. Dabei fiel ein roter Feststoff aus, der filtriert und unter vermindertem Druck getrocknet wurde.

Das gewünschte Produkt **46** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 2:

Es wurden 29 mg (0.054 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** in 2.5 mL Acetonitril/dest. Wasser im Verhältnis 7:3 v/v gelöst und mit einem Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für fünf Minuten mit einem Heißluftfön erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abschließend durch Gefriertrocknung entfernt.

Ausbeute: 24 mg eines roten Schaums.

Synthese 1:

Es wurden 18 mg (35 μ mol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidinoethyl)-1*H*-indol **66a** eingesetzt. Als Lösungsmittel wurden 3 mL (69 mL pro 1 mmol) CH₃CN/dest. Wasser 1:1 bei Raumtemperatur verwendet. Dann wurden 1.5 mL 3 M Salzsäure zur Reaktionslösung gegeben. Nach 120 h wurde dünnschichtchromatographisch voller Umsatz des Eduktes detektiert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 4:1 v/v). Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin mit Ethylacetat extrahiert. Da aus der organischen Phase kein Produkt isoliert werden konnte, wurde die wässrige Phase unter vermindertem Druck getrocknet. Die Reinigung des Rückstandes aus der wässrigen Phase erfolgte an RP-Kieselgel mit Wasser als Eluent.

Ausbeute: 6 mg (0.02 μ mol, 57%) des Hydrochlorids von **46** als einen leicht rosanen Feststoff. Die Signale des ¹H-NMR-Spektrums entsprechen den unten angegebenen

Werten. Für eine vollständige Charakterisierung war die in dieser Reaktion erhaltene Menge nicht ausreichend.

Synthese 2:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 55 mg (0.10 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino ethyl)-1*H*-Indol **66a** eingesetzt. Es wurde für 28 h bei Raumtemperatur gerührt

Ausbeute: 22 mg (73 μ mol, 73%) des Hydrochlorids

von **46** als einen leicht rosanen Feststoff. - ¹H-NMR:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.37 (s, 1H, NH-1),

8.33 (s, 3H, BnNH₂, Guanidin-NH), 7.86 (t, ³J_{H,H} =

5.8 Hz, 1H, Guanidin-NH), 7.75-6.90 (brs, 2H,

Guanidin-NH₂), 7.54 (s, 1H, H-4), 7.32 (d, ³J_{H,H} =

8.7 Hz, 1H, H-7), 7.13 (dd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} =

1.7 Hz, 1H, H-6), 6.27 (s, 1H, H-3), 4.01 (dt, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H,

BnCH₂), 3.52 (dt, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 2H, H-9), 2.94 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H,

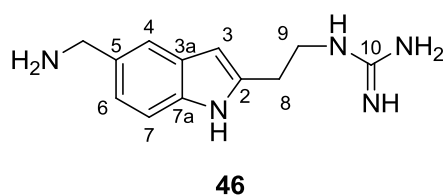
H-8). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 156.9 (C-10), 136.9 (C-2), 135.4 (C-

7a), 127.9 (C-3a), 123.8 (C-5), 120.8 (C-6), 120.4 (C-4), 110.7 (C-7), 99.1 (C-3), 58.7

(C-9), 42.6 (BnCH₂), 28.8 (C-8). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3326, 3232, 3148, 3052,

2923, 2816, 1683, 1604, 1486, 1450, 1309, 1164, 967, 804, 641. - HRMS (ESI⁺,

m/z): ber.: 232.1557 [M+H]⁺, gef.: 232.1552 [M+H]⁺.



46

C₁₂H₁₇N₅
M = 231.2969 g/mol

Synthese 3:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 12 durchgeführt. Es wurden 54 mg (0.10 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino ethyl)-1*H*-Indol **66a** eingesetzt. Als Lösungsmittel und Reagenz wurde 5 mL CH₃CN/4 M Salzsäure 1:1 verwendet. Es wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 16 mg (53 μ mol, 53%) des Hydrochlorids von **46** als einen leicht rosanen Feststoff. Die analytischen Daten entsprechen den oben angegebenen.

Synthese 4:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 12 durchgeführt. Es wurde 222 mg (0.417 mmol) 5-(*O*-*tert*-Butoxycarbonyl)-aminomethyl-2-(2-*N,N'*-bis-*tert*-butoxycarbonylguanidino ethyl)-1*H*-Indol **66a** eingesetzt. Als Lösungsmittel und

Reagenz wurde 20 mL CH₃CN/4 M Salzsäure 1:1 verwendet. Es wurde für 72 h bei Raumtemperatur gerührt.

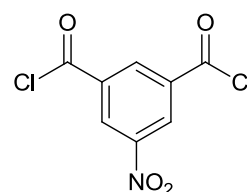
Ausbeute: 84 mg (0.28 mmol, 67%) des Hydrochlorids von **46** als einen leicht rosanen Feststoff. Die analytischen Daten entsprechen den oben angegebenen.

9.6 Synthesen zu den CNI-Analoga 75-87

9.6.1 Synthese von 3,5-Diacetylanilin **68**

5-Nitroisophthalsäuredichlorid **70**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 13 durchgeführt. Es wurden 10.1 g (47.8 mmol) 5-Nitroisophthalsäure **71** eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 2 Stunden. Das Rohprodukt wurde direkt weiter eingesetzt.



70

C₈H₃Cl₂NO₄
M = 248.0197 g/mol

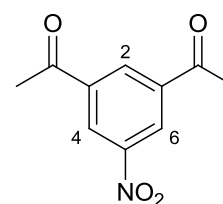
1,3-Diacetyl-5-nitrobenzol **69**

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 17.4 mL (18.4 g, 115 mmol) Malonsäurediethylester in 240 mL abs. THF gelöst und unter starker Gasentwicklung mit 2.95 g (123 mmol, 1.07 Äquiv.) gewaschenem Natriumhydrid versetzt. Unter weiterer Gasentwicklung wurde die Suspension 3 Stunden bis zum Sieden erhitzt. Zu der entstandenen Lösung wurde langsam der in absolutem THF aufgenommene Rückstand von **70** getropft. An der Eintropfstelle bildete sich hierbei kurzzeitig eine Rotfärbung, die durch das Rühren wieder verschwand. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Lösung über 15 Stunden bis zum Sieden erhitzt. Von der nun orangenen Lösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der braune Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde in einem Gemisch aus 5 mL konzentrierter Schwefelsäure, 100 mL konzentrierter Essigsäure und 20 mL Wasser aufgenommen und über 3.5 Stunden in der Siedehitze gerührt. Im Anschluss wurden 250 mL Wasser hinzugegeben und das Produkt dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat

getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 2.87 g (13.8 mmol, 29%) eines farblosen Feststoffes. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 8.94 (d, ⁴J_{H,H} = 1.6 Hz, 2H, H-4/-6), 8.81 (t, ⁴J_{H,H} = 1.6 Hz, 1H, H-2), 2.74 (s, 6H, CH₃). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 195.1 (Carbonyl-C), 149.0 (C-5), 139.0 (C-1/-3), 132.9 (C-2), 126.7 (C-4/-6), 26.9 (CH₃).



69

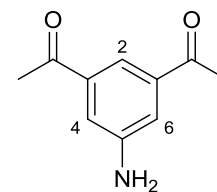
C₁₀H₉NO₄
M = 207.1828 g/mol

1,3-Diacetylanilin **68**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 1 durchgeführt. Es wurden 2.80 g (13.5 mmol) 1,3-Diacetyl-5-nitrobenzol **69** und 4 Äquiv. SnCl₂ eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 15 Minuten und die Reinigung erfolgte nach *Variante a*.

Ausbeute: 2.35 g (13.2 mmol, 98%) eines hell-gelben Feststoffes. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.89 (d, ⁴J_{H,H} = 1.5 Hz, 2H, H-4/-6), 7.43 (t, ⁴J_{H,H} = 1.5 Hz, 1H, H-2), 2.61 (s, 6H, CH₃). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 197.8 (Carbonyl-C), 147.2 (C-1), 138.6 (C-3/-5), 118.8 (C-4), 118.4 (C-2/-6), 26.9 (CH₃). - **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 3431, 3347, 3233, 1670, 1601, 1333, 1229, 861, 676, 587. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 178.0868 [M+H]⁺, gef.: 178.0860 [M+H]⁺.



68

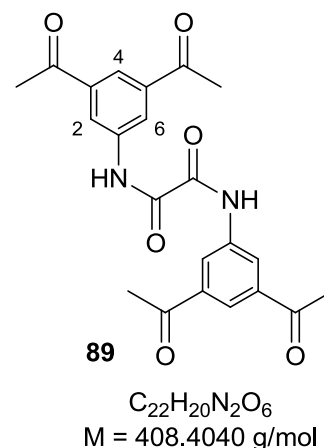
C₁₀H₁₁NO₂
M = 177.1998 g/mol

9.6.2 Synthese der *N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-Diamide 89-100

N,N'-Bis[3,5-diacetylphenyl]ethandiamid 89

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.850 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68**, 5.7 Äquiv. abs. Pyridin (anstatt 2.7 Äquiv.) und 2 Äquiv. Oxalylchlorid (anstatt 0.5 Äquiv.) eingesetzt.

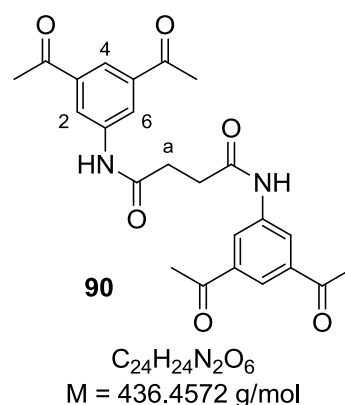
Ausbeute: 110 mg (0.270 mmol, 63%) eines schwach grauen Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.43 (s, 2H, Amid-NH), 8.92 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.06 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 2H, H-4), 2.68 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (125 MHz, DMSO-*d*₆): 197.4 (Carbonyl-C), 145.2 (C-1), 142.8 (C-3/-5), 124.1 (C-4), 123.8 (C-2/-6), 26.8 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3275, 3077, 1674, 1446, 1229. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 431.1214 [M+Na]⁺, gef.: 431.1202 [M+Na]⁺.



N,N'-Bis[3,5-diacetylphenyl]butandiamid 90

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 200 mg (1.13 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,4-Butandisäurechlorid eingesetzt.

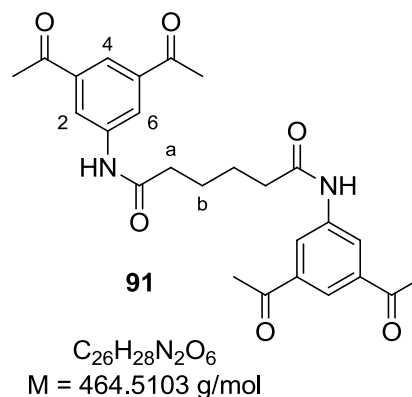
Ausbeute: 185 mg (0.425 mmol, 75%) eines schwach grauen Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.45 (s, 2H, Amid-NH), 8.42 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.14 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, H-4), 2.73 (s, 4H, H-a), 2.62 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.3 (Carbonyl-C), 171.0 (Amid-C), 140.1 (C-1), 137.5 (C-3/-5), 122.3 (C-4), 122.0 (C-2/-6), 30.8 (C-a), 26.7 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3351, 3105, 1674, 1556, 1445, 1261. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 437.1713 [M+H]⁺, gef.: 431.1710 [M+H]⁺.



***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]hexandiamid 91**

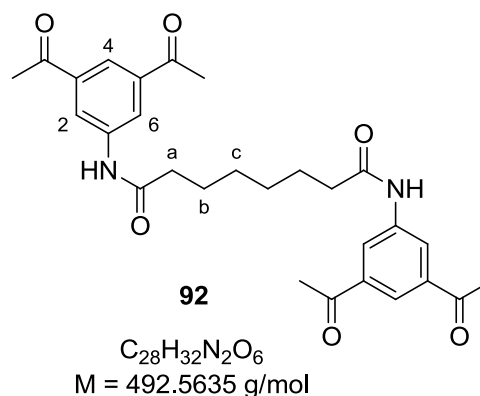
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 300 mg (1.70 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,6-Hexandisäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 201 mg (0.433 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffes. - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.31 (s, 2H, Amid-NH), 8.41 (s, 4H, H-2/-6), 8.13 (s, 2H, H-4), 2.62 (s, 12H, CH₃), 2.41-2.38 (m, 4H, H-a), 1.68-1.66 (m, 4H, H-b). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.2 (Carbonyl-C), 171.7 (Amid-C), 140.1 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 122.4 (C-4), 122.2 (C-2/-6), 36.2 (C-a), 26.8 (CH₃), 24.6 (C-b). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3350, 3107, 1676, 1554, 1448, 1223. - HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 465.2020 [M+H]⁺, gef.: 465.2015 [M+H]⁺.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]octandiamid 92**

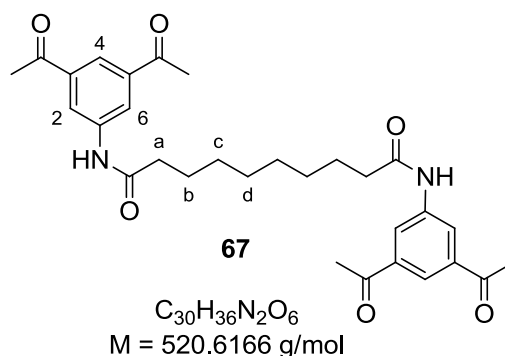
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 250 mg (1.41 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,8-Octandisäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 205 mg (0.441 mmol, 63%) eines farblosen Feststoffes. - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.26 (s, 2H, Amid-NH), 8.40 (d, ⁴J_{H,H} = 1.5 Hz, 4H, H-2/-6), 8.12 (t, ⁴J_{H,H} = 1.5 Hz, 2H, H-4), 2.62 (s, 12H, CH₃), 2.35 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 4H, H-a), 1.68-1.58 (m, 4H, H-b), 1.37-1.36 (m, 4H H-c). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.1 (Carbonyl-C), 171.7 (Amid-C), 140.0 (C-1), 137.4 (C-3/-5), 122.2 (C-4), 122.1 (C-2/-6), 36.2 (C-a), 28.3 (C-c), 26.7 (CH₃), 24.7 (C-b). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3360, 3108, 1678, 1552, 1452, 1223. - HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 493.2339 [M+H]⁺, gef.: 493.2332 [M+H]⁺.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]decandiamid 67**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 951 mg (5.37 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,10-Decandisäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 537 mg (1.03 mmol, 38%) eines farblosen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10.43 (s, 2H, Amid-NH), 8.54 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.25 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 2H, H-4), 2.74 (s, 12H, CH_3), 2.46 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, H-a), 1.75-1.71 (m, 4H, H-b), 1.45-1.40 (m, 8H H-c/-d). - $^{13}\text{C-NMR}$:

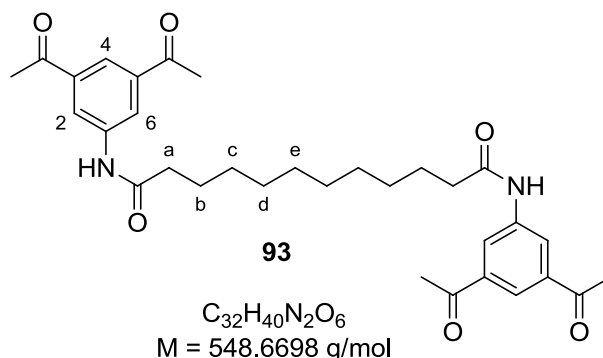


δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 197.3 (Carbonyl-C), 171.9 (Amid-C), 140.1 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 122.3 (C-4), 122.2 (C-2/-6), 36.4 (C-a), 28.7, 28.6 (C-c/-d), 26.9 (CH_3), 24.9 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3338, 2987, 2915, 1671, 1549, 1448, 1234, 896. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 521.2652 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, gef.: 521.2673 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]dodecandiamid 93**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 250 mg (1.41 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,12-Dodecandisäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 177 mg (0.323 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10.28 (s, 2H, Amid-NH), 8.40 (s, 4H, H-2/-6), 8.14 (s, 2H, H-4), 2.63 (s, 12H, CH_3), 2.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, H-a), 1.67-1.57 (m, 4H, H-b), 1.24 (s, 12H H-c/-d/-e). - $^{13}\text{C-}$



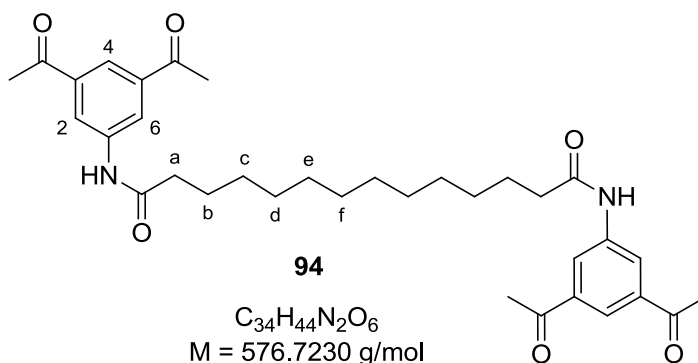
NMR: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 197.1 (Carbonyl-C), 171.7 (Amid-C), 140.0 (C-1), 137.5 (C-3/-5), 122.3 (C-4), 122.1 (C-2/-6), 36.3 (C-a), 28.7, 28.6, 28.5 (C-c/-d/-e), 26.7 (CH_3), 24.9 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3363, 3109, 1670, 1547, 1453, 1226. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 549.2965 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, gef.: 549.2990 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]tetradecandiamid 94**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 198 mg (1.12 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,14-Tetradecandisäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 157 mg (0.272 mmol, 49%) eines farblosen Feststoffes.

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10.27 (s, 2H, Amid-NH), 8.41 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.13 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, H-4), 2.62 (s, 12H, CH_3),

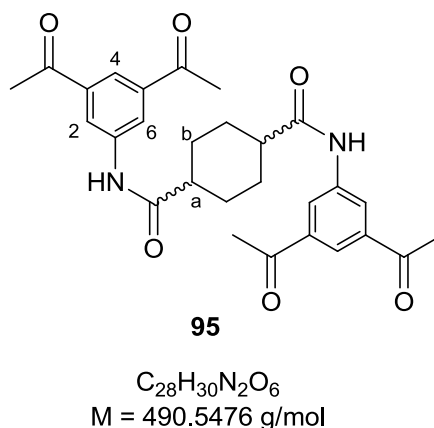


2.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 4H, H-a), 1.59 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 4H, H-b), 1.29-1.23 (m, 16H, H-c/-d/-e/-f). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 197.2 (Carbonyl-C), 171.9 (Amid-C), 140.1 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 122.4 (C-4), 122.2 (C-2/-6), 36.4 (C-a), 29.0, 28.9, 28.8, 28.6 (C-c/-d/-e/-f), 26.9 (CH_3), 25.0 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3360, 2987, 2916, 1677, 1598, 1368, 1226, 886. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 577.3277 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 577.3284 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-(*cis/trans*)-1,4-cyclohexandiamid 95**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 200 mg (1.13 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. (*cis/trans*)-1,4-Cyclohexandicarbonsäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 205 mg (0.418 mmol, 73%) eines braunlichen Öls. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10.35 (s, 2H, Amid-NH), 8.48 (s, 4H, H-2/-6), 8.13 (s, 2H, H-4), 2.70-2.66 (m, 2H, H-a), 2.63 (s, 12H, CH_3), 1.74-1.60 (m, 8H, H-b). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 197.2 (Carbonyl-C), 174.5 (Amid-C), 140.3 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 122.4 (C-4), 122.2 (C-2/-6), 41.7 (C-a), 27.7 (C-b), 26.8 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3336, 3068, 2952, 1666, 1599, 1542, 889, 751. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 491.2177 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 491.2173 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-2-butendiamid 96**

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 20 mg (0.11 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.03 mL (0.02 g, 0.2 mmol, 1.3 Äquiv.) DIPEA in 4 mL abs. DMF gelöst. Die gelbliche

Lösung wurde anschließend mit 13 mg (0.11 mmol, 1 Äquiv.) Fumarsäure und 55 mg (0.17 mmol, 1.5 Äquiv.) TBTU versetzt. Die Reaktionslösung färbte sich daraufhin von gelb zu schwarz und wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der schwarze Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das rötliche Rohprodukt wurde am Chromatotron mit CH_2Cl_2 als Laufmittel gereinigt. Das Produkt **96** wurde jedoch nicht erhalten.

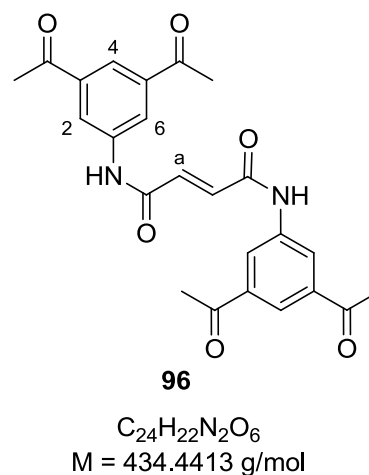
Versuch 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 24 mg (0.14 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.02 mL (0.02 g, 0.1 mmol, 1 Äquiv.) DIPEA in 4 mL abs. DMF gelöst. Anschließend wurde die gelbe Lösung mit 13 mg (0.11 mmol, 1.2 Äquiv.) Fumarsäure, 17 mg (0.13 mmol, 1.1 Äquiv.) HOBt und 0.02 mL (0.02 g, 0.1 mmol, 1 Äquiv.) DIC versetzt, wobei sie sich bräunlich färbte. Die Reaktionslösung wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der schwarze Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit CH_2Cl_2 als Laufmittel gereinigt. Jedoch konnte das Produkt **96** nicht isoliert werden.

Synthese 1:

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 200 mg (1.13 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. Fumarsäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 213 mg (0.530 mmol, 94%) eines schwach grauen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 10.36 (s, 2H, Amid-NH), 8.27 (d, $J = 1.3$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.07 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, H-4), 7.23 (s, 2H, H-a), 2.66 (s, 12H, CH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 197.3 (Carbonyl-C), 162.8 (Amid-C), 139.7 (C-1), 137.9 (C-3/-5), 133.9 (C-a), 122.5 (C-4), 122.3 (C-2/-6), 26.8 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3352, 2987,

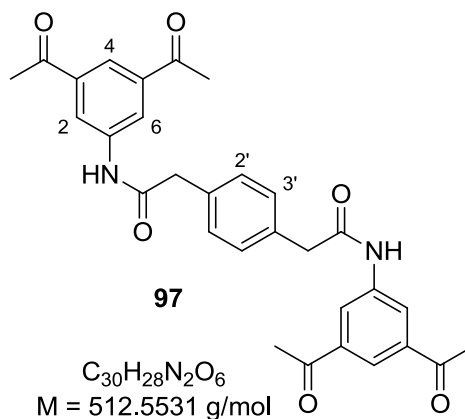


2901, 1675, 1557, 1447, 1231, 1066, 886, 596. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 435.1556 [M+H]⁺, gef.: 435.1554 [M+H]⁺.

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-1,4-phenylacetdiamid 97**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 198 mg (1.12 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,4-Phenyldiacetylchlorid eingesetzt.

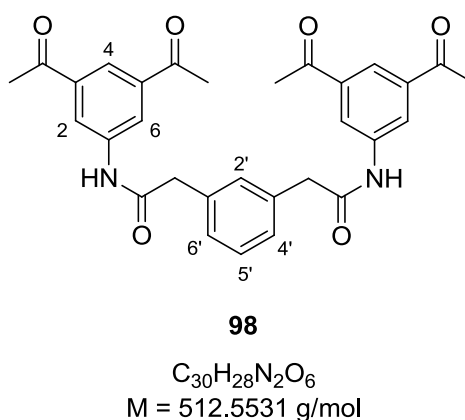
Ausbeute: 140 mg (0.270 mmol, 48%) eines leicht violetten Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.57 (s, 2H, Amid-NH), 8.41 (s, 4H, H-2/-6), 8.14 (s, 2H, H-4), 7.31 (s, 4H, H-2'/-3'), 3.66 (s, 4H, CH₂), 2.70 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.2 (Carbonyl-C), 169.8 (Amid-C), 140.0 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 134.0 (C-1'/-4'), 129.2 (C-2'/-3'), 122.6 (C-4), 122.3 (C-2/-6), 43.0 (CH₂), 26.9 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3268, 2987, 2901, 1683, 1555, 1222, 1066, 602. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 513.202 [M+H]⁺, gef.: 513.201 [M+H]⁺.



***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-1,3-phenylacetdiamid 98**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 198 mg (1.12 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,3-Phenyldiacetylchlorid eingesetzt.

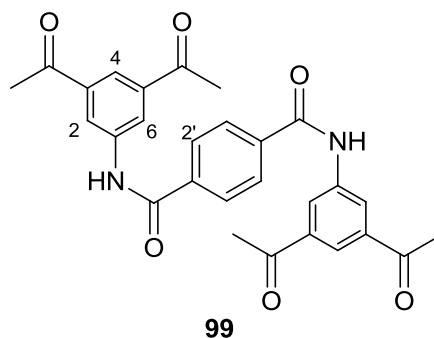
Ausbeute: 210 mg (0.410 mmol, 72%) eines leicht violetten Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.60 (s, 2H, Amid-NH), 8.40 (s, 4H, H-2/-6), 8.14 (s, 2H, H-4), 7.34-7.22 (m, 4H, H-2'/-4'/-5'/-6'), 3.68 (s, 4H, CH₂), 2.61 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.2 (Carbonyl-C), 169.7 (Amid-C), 140.0 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 135.6 (C-1'/-3'), 129.8, 128.4, 127.6 (C-2'/-4'/-5'/-6'), 122.7 (C-4), 122.3 (C-2/-6), 43.3 (CH₂), 26.9 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3341, 1699, 1551, 1353, 1201, 886, 683, 587. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 513.2025 [M+H]⁺, gef.: 513.2019 [M+H]⁺.



***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-1,4-benzoldiamid 99**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 200 mg (1.13 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,4-Benzoldicarbonsäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 258 mg (0.533 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.81 (s, 2H, Amid-NH), 8.68 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.25 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 2H, H-4), 8.19 (s, 4H, H-2'), 2.68 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.3 (Carbonyl-C), 165.1 (Amid-C), 139.9 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 127.9 (C-2'), 123.8 (C-4), 123.3 (C-2/-6), 27.0 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3340, 1671, 1545, 1233. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 485.1707 [M+H]⁺, gef.: 485.1712 [M+H]⁺.

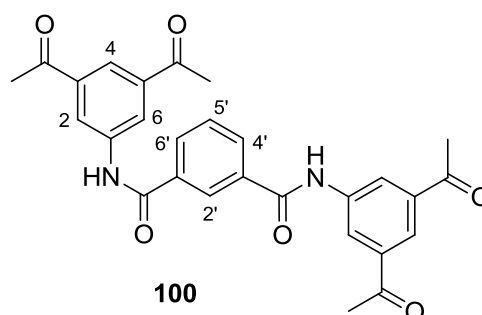


C₂₈H₂₄N₂O₆
M = 484.5000 g/mol

***N,N'*-Bis[3,5-diacetylphenyl]-1,3-benzoldiamid 100**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 14 durchgeführt. Es wurden 200 mg (1.13 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** und 0.5 Äquiv. 1,3-Benzoldicarbonsäurechlorid eingesetzt.

Ausbeute: 264 mg (0.545 mmol, 96%) eines farblosen Feststoffes. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.00 (s, 2H, Amid-NH), 8.83 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, H-2'), 8.75 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.24 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8, 1.7$ Hz, 2H, H-4'/-6'), 8.22 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 2H, H-4), 7.75 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 2.70 (s, 12H, CH₃). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 197.2



C₂₈H₂₄N₂O₆
M = 484.5000 g/mol

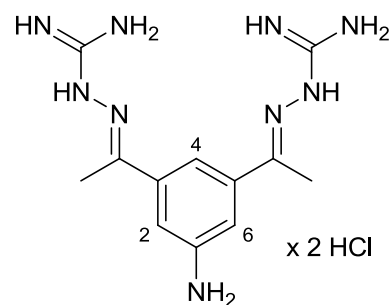
(Carbonyl-C), 165.2 (Amid-C), 140.0 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 134.3 (C-1'/-3'), 131.2 (C-4'/-6'), 128.9 (C-5'), 126.9 (C-2'), 123.8 (C-4), 123.3 (C-2/-6), 26.9 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2987, 2901, 1663, 1550, 1251, 1133, 680, 587. - **HRMS** (FAB, *m/z*): ber.: 485.1712 [M+H]⁺, gef.: 485.1690 [M+H]⁺.

9.6.3 Synthese der Guanylhydrazone zur Darstellung der CNI-1493 Analoga

3,5-Bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]anilin-bishydrochlorid **87**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.570 mmol) 3,5-Diacetylanilin **68** in 3 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 132 mg (0.364 mmol, 64%) eines farblosen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, D_2O): 8.13-8.11 (m, 1H, H-4), 7.86-7.84 (m, 2H, H-2/-6), 2.38 (s, 6H, CH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, D_2O): 155.7 (Guanidin-C), 153.1 (Imin-C), 139.4 (C-3/-5), 132.0 (C-1), 124.5 (C-4), 121.6 (C-2/-6), 14.2 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3151, 2989, 1626, 1607, 885, 574. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 290.1836 [$\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}$] $^+$, gef.: 290.1833 [$\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}$] $^+$.

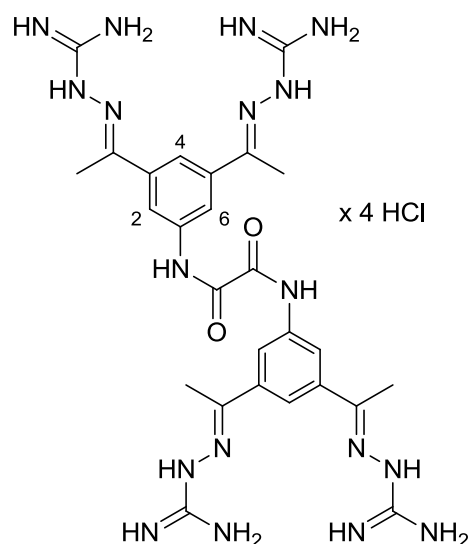
**87**

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_9$
 $M = 362.2614 \text{ g/mol}$

N,N'-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]ethandiamid-tetrahydrochlorid **75**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 91 mg (0.22 mmol) **89** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 94 mg (0.12 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 11.31 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.81 (s, 2H, Amid-NH), 8.43 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 4H, H-2/-6), 8.17 (s, 2H, H-4), 7.82 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 2.41 (s, 12H, CH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 158.3 (Amid-C), 156.1 (Guanidin-C), 151.3 (Imin-C), 137.8 (C-3/-5), 137.7 (C-1), 120.9 (C-4), 119.8 (C-2/-6), 14.7 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3305, 3151, 1669, 1588, 1348. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 633.3341 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^+$, gef.: 633.3347 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^+$.

**75**

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{Cl}_4\text{N}_{18}\text{O}_2$
 $M = 778.5272 \text{ g/mol}$

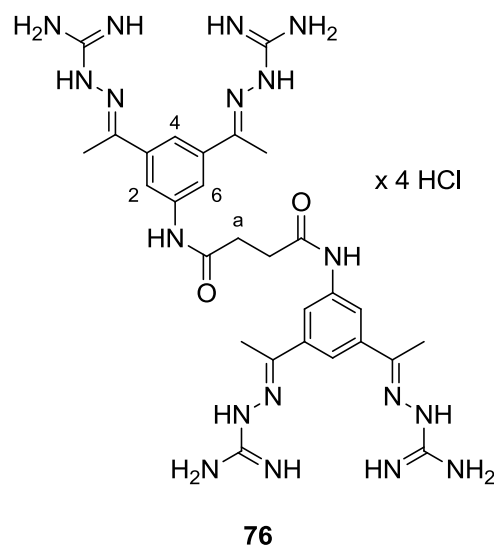
***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]butandiamid-tetrahydrochlorid 76**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 148 mg (0.339 mmol) **90** in 3 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 259 mg (0.322 mmol, 95%) eines leicht grauen Feststoffes. -¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.28 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.31 (s, 2H, Amid-NH), 8.13 (s, 4H, H-2/-6), 8.04 (s, 2H, H-4), 7.82 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃), 2.72 (s, 4H, H-a), 2.38 (s, 12H, CH₃). -

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 170.1 (Amid-C), 156.1 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.5 (C-1), 137.7 (C-3/-5), 118.8 (C-4), 118.7 (C-2/-6), 56.0 (C-a), 15.2 (CH₃). - IR:

Wellenzahl [cm⁻¹]: 3236, 3075, 1667, 1590, 1355, 1348. - HRMS (FAB, m/z): ber.: 661.3659 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 661.3660 [M-4HCl+H]⁺.



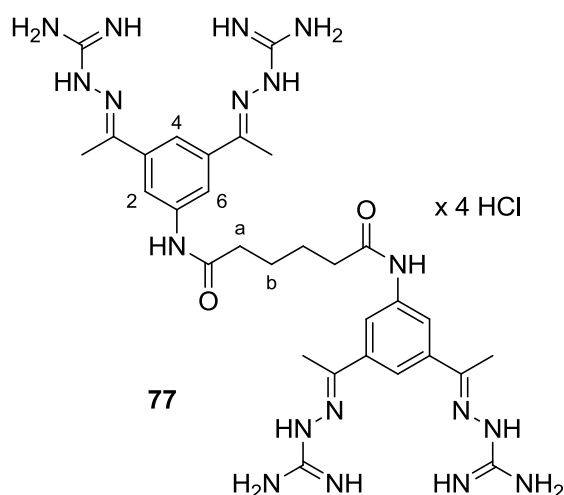
C₂₈H₄₄Cl₄N₁₈O₂
M = 806.5804 g/mol

***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]hexandiamid-tetrahydrochlorid 77**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 137 mg (0.294 mmol) **91** in 3 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 121 mg (0.145 mmol, 49%) eines farblosen Feststoffes. -¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.33 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.30 (s, 2H, Amid-NH), 8.17 (s, 4H, H-2/-6), 8.05 (s, 2H, H-4), 7.85 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃), 2.41 (s, 4H, H-a), 2.39 (s, 12H, CH₃), 1.67 (s, 4H, H-b). - ¹³C-NMR:

δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 171.3 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.6 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.5 (C-3/-5), 119.4 (C-4), 118.8 (C-2/-6), 36.3 (C-a), 24.6 (C-b), 15.1



C₃₀H₄₈Cl₄N₁₈O₂
M = 834.6335 g/mol

(CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3107, 1666, 1593, 1353. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 689.3973 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 689.3985 [M-4HCl+H]⁺.

***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]octandiamid-tetrahydrochlorid 78**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 201 mg (0.408 mmol) **92** in 3 mL Ethanol/dest.

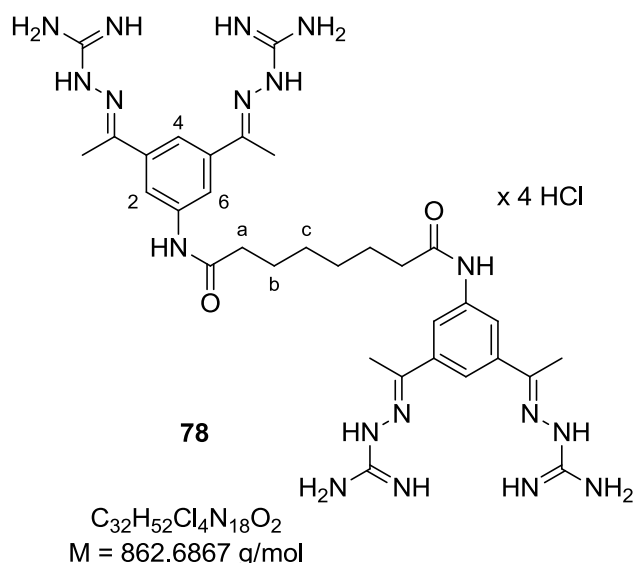
Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 203 mg (0.238 mmol, 58%)

eines farblosen Feststoffes. -¹H-NMR:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.32 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.22 (s, 2H, Amid-NH), 8.15 (d, ⁴J_{H,H} = 1.4 Hz, 4H, H-2/-6), 8.04 (s, 2H, H-4), 7.85 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃), 2.38 (s, 12H, CH₃), 2.36-2.28 (m, 4H, H-a), 1.70-1.58 (m, 4H, H-b), 1.35 (s, 4H, H-c). -

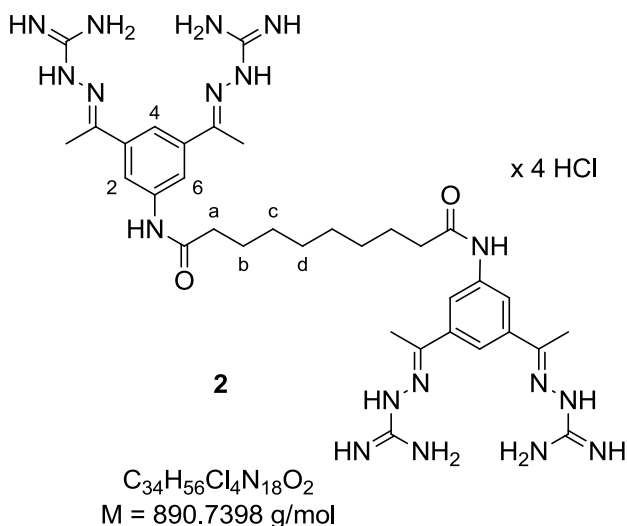
¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 171.4 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.6 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.4 (C-3/-5), 119.4 (C-4), 118.7 (C-2/-6), 36.2 (C-a), 28.3 (C-c), 24.7 (C-b), 15.1 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3338, 3167, 1678, 1587, 1355. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 717.4286 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 717.4304 [M-4HCl+H]⁺.



***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]decandiamid-tetrahydrochlorid 2**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 533 mg (1.02 mmol) **67** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 696 mg (0.781 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffes. -¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.23 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.17 (s, 2H, Amid-NH), 8.12 (d, ⁴J_{H,H} = 1.6 Hz, 4H, H-2/-6),



8.04 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 2H, H-4), 7.81 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 2.37 (s, 12H, CH_3), 2.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, H-a), 1.62-1.59 (m, 4H, H-b), 1.33-1.30 (m, 8H, H-c/-d). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 171.6 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.4 (C-3/-5), 118.9 (C-2/-4/-6), 36.4 (C-a), 28.7 (C-c/-d), 25.0 (C-b), 15.2 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2987, 2901, 1451, 1075, 892. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 745.4598 [M-4HCl+H] $^+$, gef.: 745.4614 [M-4HCl+H] $^+$.

***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]dodecandiamid-tetrahydrochlorid 79**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 158 mg (0.289 mmol) **93** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 181 mg (0.197

mmol, 68%) eines farblosen

Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm]

(400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11.24

(brs, 4H, Guanidin-NH), 10.16

(s, 2H, Amid-NH), 8.12 (d,

$^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 4H, H-2/-6),

8.04 (t, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 2H, H-

4), 7.81 (brs, 12H, Guanidin-

N_2H_3), 2.37 (s, 12H, CH_3),

2.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 4H, H-

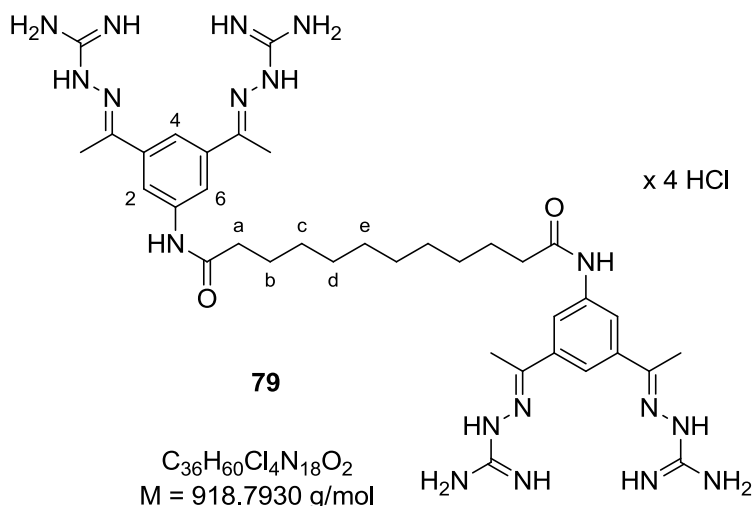
a), 1.62-1.57 (m, 4H, H-b), 1.28 (s, 12H, H-c/-d/-e). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$): 171.5 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.6 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.5

(C-3/-5), 118.8 (C-4), 118.7 (C-2/-6), 36.2 (C-a), 28.8, 28.7, 28.6 (C-c/-d/-e), 24.9 (C-

b), 15.1 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3130, 1659, 1587, 1355. - **HRMS** (FAB, m/z):

ber.: 773.4834 [M-4HCl+H] $^+$, gef.: 773.4938 [M-4HCl+H] $^+$.



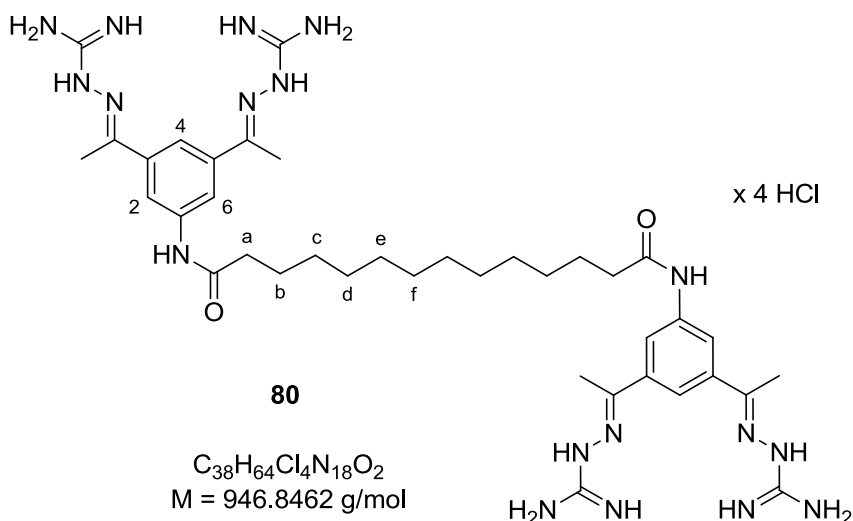
***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]tetradecandiamid-tetrahydrochlorid 80**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 136 mg (0.236 mmol) **94** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 80 mg (84 μmol , 36%) eines farblosen Feststoffes. -

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11.24 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.15 (s, 2H, Amid-NH), 8.12 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, 4H, H-2/-6), 8.04 (t, $^4J_{\text{H,H}} =$

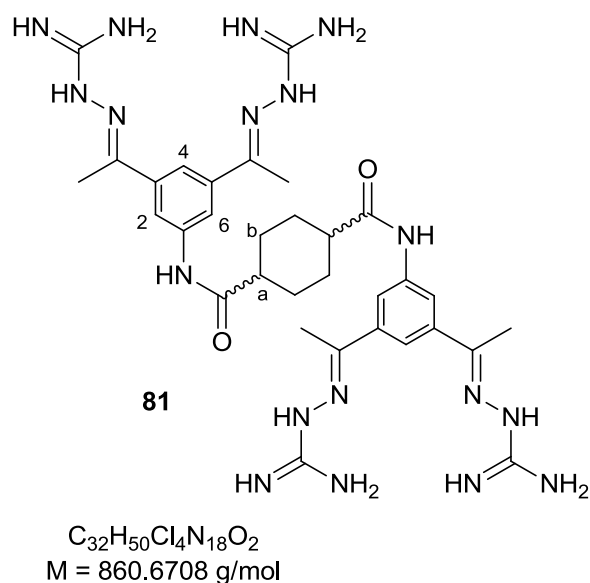
1.4 Hz, 2H, H-4), 7.81 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 2.37 (s, 12H, CH_3), 2.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 4H, H-a), 1.59 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 4H, H-b), 1.32-1.23 (m, 16H, H-c/-d/-e/-f). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 171.6 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.5 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 118.9 (C-4), 118.4 (C-2/-6), 36.4 (C-a), 29.0, 28.9, 28.7 (C-c/-d/-e/-f), 25.0 (C-b), 15.2 (CH_3). - IR: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3139, 1921, 1670, 1586, 1443, 1273, 1123. - MS (FAB, m/z): ber.: 801.5 $[\text{M-4HCl}+\text{H}]^+$, gef.: 801.5 $[\text{M-4HCl}+\text{H}]^+$.



N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]-(*cis/trans*)-1,4-cyclohexandiamid-tetrahydrochlorid **81*

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.410 mmol) **95** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 70 mg (90 μmol , 24%) eines farblosen Feststoffes. - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11.24 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.06 (s, 2H, Amid-NH), 8.16-8.14 (m, 4H, H-2/-6), 8.05 (brs, 2H, H-4), 7.78 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 2.62-2.55 (m, 2H, H-a), 2.37 (s, 12H, CH_3), 2.01-1.95 (m, 4H, H-b), 1.68-1.50 (m, 4H, H-b). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 174.2 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.7 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 118.9 (C-4), 118.7 (C-2/-6), 41.4 (C-a), 26.5 (C-b), 15.2 (CH_3). - IR:

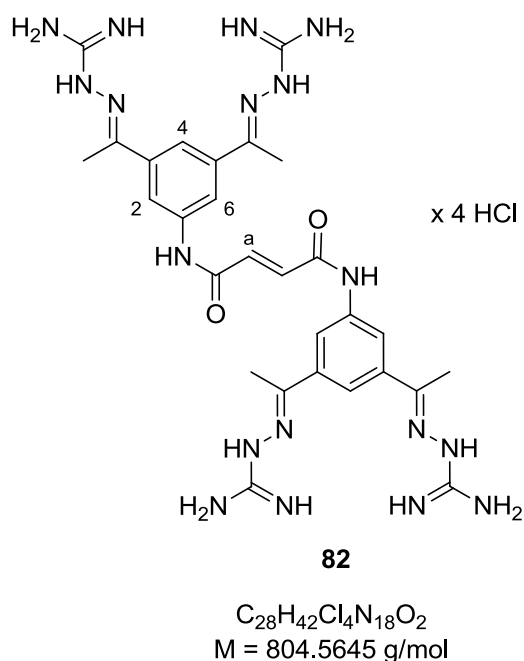


Wellenzahl [cm^{-1}]: 3138, 1667, 1589, 1443, 1138, 862. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 715.4129 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^{+}$, gef.: 715.4143 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^{+}$.

***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]2-butendiamid-tetrahydrochlorid 82**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.410 mmol) **96** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 156 mg (0.194 mmol, 55%) eines schwach grauen Feststoffes. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 11.26 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.93 (s, 2H, Amid-NH) 8.23 (s, 4H, H-2/-6), 8.11 (s, 2H, H-4), 7.82 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 7.26 (s, 2H, H-a), 2.41 (s, 12H, CH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 162.6 (Amid-C), 156.1 (Guanidin-C), 151.7 (Imin-C), 139.0 (C-1), 137.8 (C-3/-5), 134.1 (C-a), 120.2 (C-4), 119.2 (C-2/-6), 15.1 (CH_3). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 2987, 2971, 2900, 1394, 1250, 1065. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 659.3503 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^{+}$, gef.: 659.3505 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^{+}$.

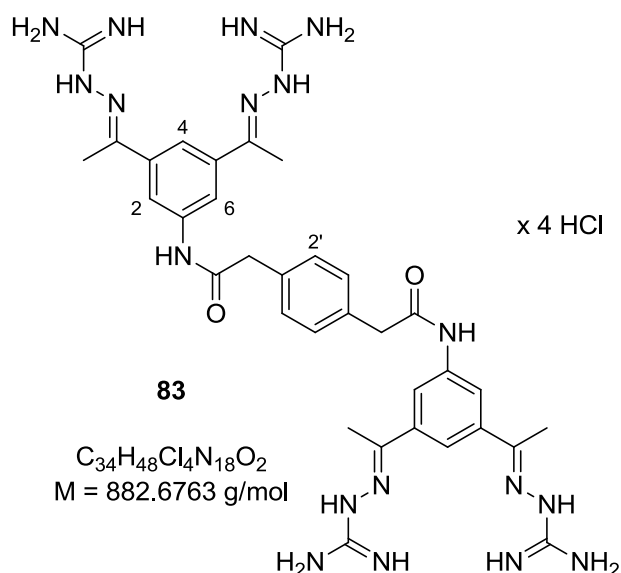


***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]-1,4-phenylacetdiamid-tetrahydrochlorid 83**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.230 mmol) **97** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 171 mg (0.194 mmol, 84%)

eines farblosen Feststoffes. - ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.20 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.53 (s, 2H, Amid-NH), 8.13 (s, 2H, H-4), 8.04 (s, 2H, H-2/-6), 7.79 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃), 7.32 (s, 4H, H-2'), 3.66 (s, 4H, CH₂), 2.36 (s, 12H, CH₃). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 169.6 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 134.0 (C-1'), 129.1 (C-2'), 118.9 (C-2/-6), 118.6 (C-4), 42.6 (CH₂), 15.1 (CH₃). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2987, 2901, 1588, 1406, 1229, 1066, 899. - HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 737.3967 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 737.3956 [M-4HCl+H]⁺.



N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]-1,3-phenylacetdiamid-tetrahydrochlorid **84*

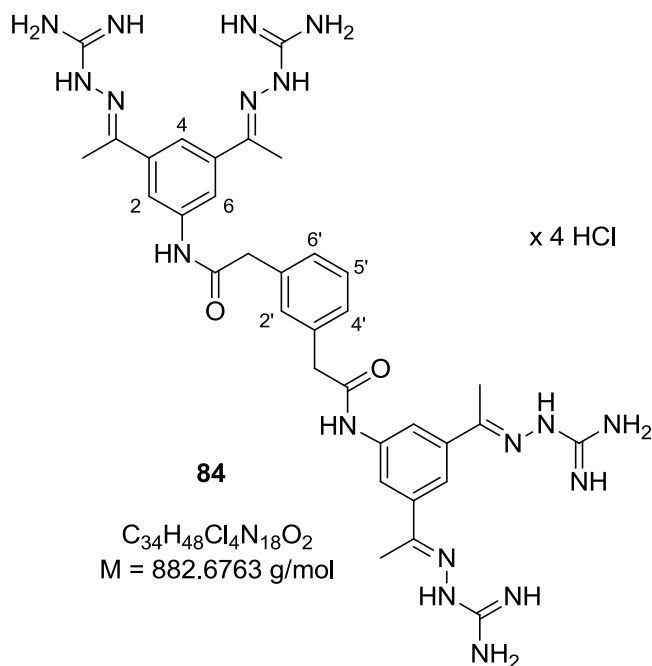
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.230 mmol) **98** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 81 mg (92 μ mol, 40%)

eines farblosen Feststoffes. -

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 11.21 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.55 (s, 2H, Amid-NH), 8.15 (s, 2H, H-4), 8.05 (s, 2H, H-2/-6), 7.80 (brs, 12H, Guanidin- N_2H_3), 7.33 (s, 1H, H-2'), 7.31-7.25 (m, 3H, H-4'/-5'/-6'), 3.69 (s, 4H, CH_2), 2.36 (s, 12H, CH_3). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 169.4 (Amid-C), 156.0 (Guanidin-C), 151.8 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.7 (C-3/-5), 135.7 (C-1'/-3'), 130.1 (C-2'), 128.3, 127.6 (C-4'/-5'/-6'), 119.3 (C-2/-6), 118.6 (C-4), 43.2 (CH_2), 15.2 (CH_3).

- **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3120, 1667, 1584, 1440, 1354, 1127, 874. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 737.3973 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^+$, gef.: 737.4009 [$\text{M}-4\text{HCl}+\text{H}$] $^+$.



***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]-1,4-benzoldiamid-tetrahydrochlorid 85**

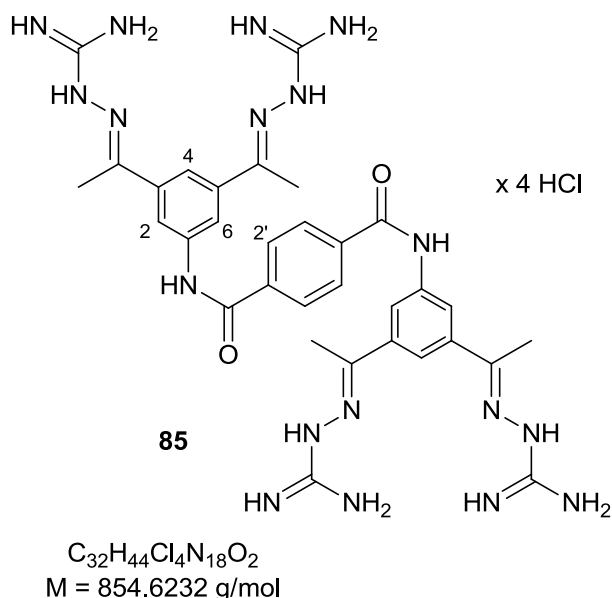
Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 226 mg (0.447 mmol) **99** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 198 mg (0.279 μ mol, 60%)

eines farblosen Feststoffes. - ¹H-NMR:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.35 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.71 (s, 2H, Amid-NH), 8.42 (s, 4H, H-2/-6), 8.24 (s, 4H, H-2'), 8.13 (s, 2H, H-4), 7.87 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃), 2.43 (s, 12H, CH₃). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 164.7 (Amid-C), 156.1 (Guanidin-C), 151.6 (Imin-C), 139.1 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 137.1 (C-1'), 127.9 (C-2'), 120.7 (C-2/-6), 120.5 (C-4), 15.2

(CH₃). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3340, 3150, 1668, 1357. - HRMS (FAB, m/z): ber.: 709.3659 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 709.3671 [M-4HCl+H]⁺.

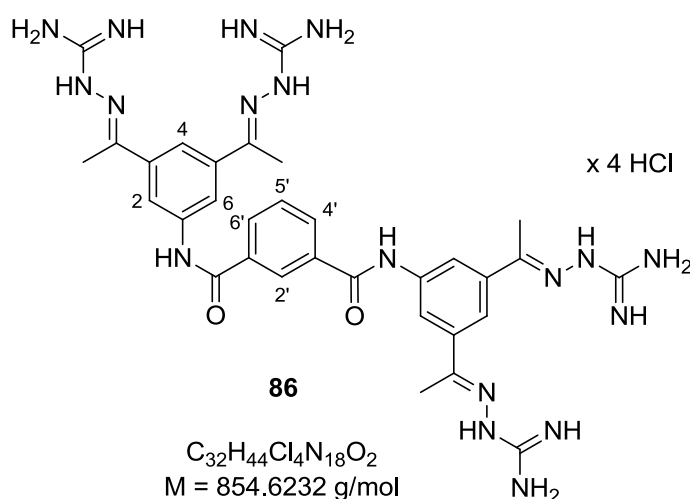
***N,N'*-Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)-hydrazoethyl]phenyl]-1,3-benzoldiamid-tetrahydrochlorid 86**

Die Reaktion wurde gemäß der AAV 15 durchgeführt. Es wurden 210 mg (0.412 mmol) **100** in 5 mL Ethanol/dest. Wasser (9:1 v/v) eingesetzt.

Ausbeute: 231 mg (0.270 μ mol,

66%) eines farblosen Feststoffes. -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.31 (brs, 4H, Guanidin-NH), 10.91 (s, 2H, Amid-NH), 9.05 (s, 1H, H-2'), 8.59 (s, 4H, H-2/-6), 8.25 (d, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 2H, H-4'/-6'), 8.13 (s, 2H, H-4), 7.86 (brs, 12H, Guanidin-N₂H₃),



7.74 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, 1H, H-5'), 2.44 (s, 12H, CH₃). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 164.7 (Amid-C), 156.1 (Guanidin-C), 151.7 (Imin-C), 139.4 (C-1), 137.6 (C-3/-5), 134.3 (C-1'/-3'), 130.9 (C-4'/-6'), 128.8 (C-5'), 126.0 (C-2'), 120.3 (C-4), 119.7 (C-2/-6), 15.1 (CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2987, 2900, 1406, 1250, 1066, 892. - **HRMS** (FAB, *m/z*): ber.: 709.3660 [M-4HCl+H]⁺, gef.: 709.3680 [M-4HCl+H]⁺.

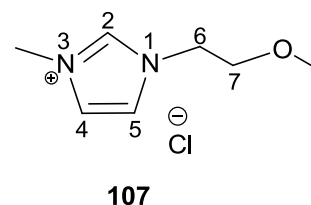
9.7 Synthesen der Arylamin-Addukte

9.7.1 Synthesen zur Darstellung der C5-Arylamin 2'-dC-Addukte

1-(2-Methoxyethyl)-3-methyl-1*H*-imidazolium-chlorid **107**

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 10.4 mL (131 mmol) 1-Methylimidazol vorgelegt und 12.0 mL (131 mmol) Chlormethylethylether unter Rühren hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei 80°C gerührt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde viermal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Beim Entfernen des Lösungsmittels bildete sich aus dem zunächst bräunlichen Öl ein kristalliner, leicht brauner Feststoff.

Ausbeute: 22.6 g (128 mmol, 98%) eines bräunlichen, kristallinen Feststoffs. - **Smp.**: 83 °C. - **$^1\text{H-NMR}$** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9.34 (s, 1H, H-2), 7.80 (m, 1H, H-4), 7.76 (m, 1H, H-5), 4.39-4.36 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 2H, H-6), 3.88 (s, 3H, N-CH₃), 3.69-3.67 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 2H, H-7), 3.26 (s, 3H, O-CH₃). - **$^{13}\text{C-NMR}$** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-



$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$
M = 176.6439 g/mol

*d*₆): 123.2 (C-2), 122.7 (C-5), 122.4 (C-4), 70.1 (C-7), 69.5 (O-CH₃), 69.0 (C-6), 48.5 (N-CH₃). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3135, 3072, 2963, 2826, 2737, 1562, 1452, 1223, 1190, 1167, 1112, 1029, 1010, 967, 909, 829, 801, 699, 630, 528. **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 141.1022 [M-Cl]⁺, gef.: 141.1026 [M-Cl]⁺.

1-(2-Methoxyethyl)-3-methyl-1*H*-imidazolium-trifluoracetat **108**

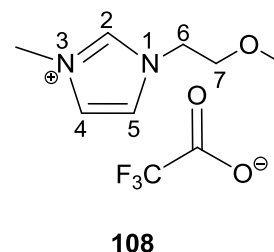
In 175 mL Aceton wurden 22.1 g (125 mmol) 1-(2-Methoxyethyl)-3-methyl-1*H*-imidazolium-chlorid **107** suspendiert. Anschließend wurden 28.3 g (208 mmol) Natrium-trifluoracetat hinzugegeben und 18 h bei Rt gerührt. Die entstandene Suspension wurde filtriert, der Rückstand zweimal mit je 25 mL Aceton gespült und

das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 0% → 10%) gereinigt.

Ausbeute: 23.6 g (97.5 mmol, 78%) eines gelb/braunen Öls. -

¹H-NMR δ [ppm] (400 MHz, Aceton-*d*₆): 9.39 (s, 1H, H-1), 7.74-7.70 (m, 2H, H-4, H-5), 4.55-4.52 (t, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 2H, H-6), 4.05 (s, 3H, N-CH₃), 3.81-3.78 (t, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 2H, H-7), 3.33 (s, 3H, O-CH₃). - **¹³C-NMR** δ [ppm] (101 MHz, Aceton-*d*₆): 162.6 (-CO₂), 139.5 (C-2), 125.4 (C-5), 124.9 (C-4), 120.7 (-CF₃), 71.9 (C-7), 59.8 (O-CH₃), 51.2 (C-6), 37.5 (N-CH₃). - **IR**:

Wellenzahl [cm⁻¹]: 3152, 3102, 2942, 1673, 1568, 1429, 1360, 1201, 1168, 1116, 1035, 1013, 831, 80, 752, 719, 654, 623, 598, 518, 409. - **HRMS** (ESI⁺, *m/z*): ber.: 141.1022 [C₇H₁₃N₂O]⁺, gef.: 141.1074; (ESI⁻, *m/z*): ber.: 112.9856 [C₂F₃O₂]⁻, gef.: 112.9858 [C₂F₃O₂]⁻.



C₉H₁₃F₃N₂O₃
M = 254.2063 g/mol

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin **104**

Es wurden 6.35 g (27.8 mmol) 2'-dC*HCl **106** in einer Stickstoffatmosphäre zweimal mit 3 mL abs. Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde der Feststoff in 30 mL Pyridin gelöst und mit 6.11 g (89.7 mmol) Imidazol versetzt. Nachdem die trübe Lösung klar geworden war, wurden 9.16 g (60.8 mmol) TBDMS-Cl hinzugegeben. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt. Durch die Zugabe von 6 mL Methanol wurde die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel anschließend entfernt. Zur vollständigen Abtrennung wurde dreimal mit je 15 mL Toluol coevaporiert. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Dichlormethan in Wasser (1:1, v/v).

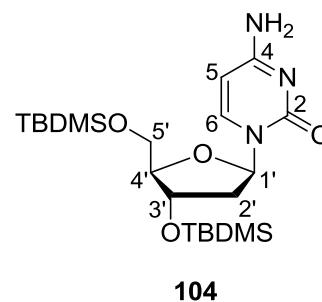
Ausbeute: 11.46 g (25.14 mmol, 91%) eines farblosen

Feststoffs. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v): 0.30. -

[α]²⁰₅₉₈: +77° (c = 1.0, CHCl₃). - **Smp.**: 95-96 °C. - **¹H-NMR**

δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.97 (d, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-6), 6.23 (dd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, H-1'), 5.82 (d, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-5), 4.37-4.36 (m, 1H, H-4'), 3.90-3.89 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.77-3.74 (m, 1H, H-3'), 2.42-2.35 (m, 1H, H-2'a), 2.08-2.02 (m, 1H, H-2'b), 0.91 (s, 9H,

SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂). -



C₂₁H₄₁N₃O₄Si₂
M = 455.7389 g/mol

^{13}C -NMR δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 164.8 (C-4), 155.2 (C-2), 141.4 (C-6), 94.2 (C-5), 87.5 (C-3'), 86.0 (C-1'), 70.5 (C-4'), 62.0 (C-5'), 42.2 (C-2'), 25.9, 25.7 ($2^*\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -4.6, 4.9, -5.5, -5.6 ($2^*\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3130, 3314, 2952, 2928, 2885, 2856, 1721, 1640, 1520, 1486, 1471, 1405, 1252, 1065, 1028, 1005, 832, 740, 669. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 478.2528 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 478.2533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-desoxycytidin 103a

Synthese 1:

In 6 mL Acetonitril wurden 920 mg (2.02 mmol) TBDMS-2'-dC **104** suspendiert und 220 mg (2.48 mmol) LiBr hinzugegeben. Nachdem sich der Feststoff gelöst hatte, wurden 2.10 g (3.83 mmol) Ammoniumcer(IV)nitrat hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Feststoff wurde in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 20 mL dest. Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Schließlich erfolgte die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 95:5 v/v).

Ausbeute: 560 mg (1.09 mmol, 55%) eines gelblichen

Feststoffs. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.65. -

$[\alpha]^{20}_{598}$: +32.7° ($c = 0.7$, CHCl_3). - **Smp.**: Zersetzung bei

190 °C. - **^1H -NMR**: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.89 (s, 1H, H-6), 6.09 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 1H, H-1'),

4.34-4.33 (m, 1H, H-3'), 4.85-3.84 (m, 1H, H-4), 3.93 (dd, ,

$^3J_{\text{H,H}} = 3.4$ Hz, $^2J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, 1H, H-5'a), 3.77 (dd, ,

$^3J_{\text{H,H}} = 3.4$ Hz, 1H, H-5'b), 2.46 (ddd, , $^2J_{\text{H,H}} = 12.9$

Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, H-2'a), 2.05-1.98 (m,

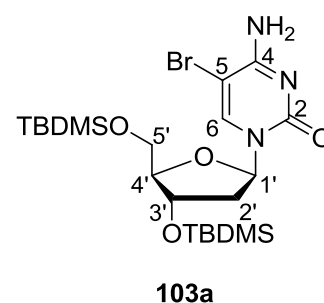
1H, H-2'b), 0.93 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.13, 0.12, 0.08, 0.07

(s, 3H, $\text{Si}-\text{CH}_3$). - **^{13}C -NMR** δ [ppm] (101 MHz, DMSO): 161.8 (C-4), 153.4 (C-2),

140.9 (C-6), 87.0 (C-4'), 86.3 (C-5), 85.3 (C-1'), 72.0 (C-3'), 62.5 (C-5'), 40.7 (C-2'),

25.7, 25.6 ($2^*\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 17.9, 17.6 ($2^*\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -4.9, 5.0, -5.5, -5.6 ($2^*\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). -

IR: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3483, 3385, 2928, 2856, 1655, 1495, 1287, 1255, 1087, 1060,



$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{BrN}_3\text{O}_4\text{Si}_2$
M = 534.6350 g/mol

1032, 995, 932, 829, 812, 775, 660. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 534.1813 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 534.1813 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese 2:

Es wurden 460 mg (1.01 mmol) TBDMS-2'-dC **104** unter einer Stickstoffatmosphäre in abs. DMF gelöst und 210 mg (1.18 mmol) NBS hinzugegeben. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 98:2 $\rightarrow$ 1:1 v/v).

Ausbeute: 57.7 mg (106 μmol , 10%). Die spektroskopischen und spektrometrischen Daten entsprachen den oben angegebenen Werten.

3',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin 103b

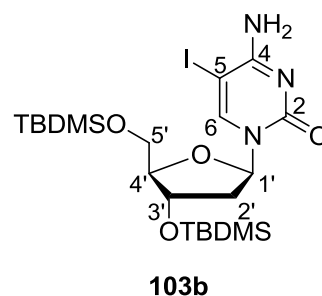
In 35 mL Methanol wurden 1.01 g (2.21 mmol) TBDMS-2'-dC **104** und anschließend 500 mg (3.07 mmol) Iodmonochlorid zusammengegeben. Nach 48 h wurde der Reaktionsansatz mit 1.5 mL 10%iger wässriger Ammoniaklösung neutralisiert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und bis zur Entfärbung mit Natriumthiosulfat versetzt. Die organische Phase wurde zweimal mit dest. Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 99:1 $\rightarrow$ 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 41.4 mg (71.0 μmol , 3%) eines farblosen

Feststoffs. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.24. -

$^1\text{H-NMR}$ δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 13.34, 11.71 (s, 1H, -NH₂), 7.96 (s, 1H, H-6), 6.08 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.35-4.34 (m, 1H, H-3'), 3.84-3.78 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.71 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, H-5'b), 2.24-2.17 (m, 1H, H-2'a), 2.14-2.08 (m, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.87 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.11 (s,

6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.08 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **$^{13}\text{C-NMR}$** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 160.3 (C-4), 149.9 (C-2), 144.0 (C-6), 89.5 (C-5), 87.0 (C-4'), 84.5 (C-1'), 71.8 (C-3'), 62.5 (C-5'), 39.8 (C-2'), 25.8, 25.5 (2* $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -4.9, 5.1, -5.4, -5.5 (2* $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 556.1633 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 556.4396 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{IN}_3\text{O}_4\text{Si}_2$
M = 581.6355 g/mol

5-Brom-2'-desoxycytidin 105aVersuch 1:

In 8 mL dest. Wasser wurden 220 mg (830 μ mol) 2'-dC*HCl **106** und 220 mg (1.25 mmol) NBS gelöst und für 45 sec. mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 50 min. bei Raumtemperatur gerührt und erneut eine Minute mit Ultraschall behandelt. Nach sieben Stunden wurde die Reaktion beendet und dreimal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert.

Es konnte kein Produkt isoliert werden.

Versuch 2:

In abs. DMF wurden unter einer Stickstoffatmosphäre 270 mg (1.03 mmol) 2'-dC*HCl **106** und 220 mg (1.23 mmol) NBS gelöst und das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und versucht den Rückstand aus Aceton umzukristallisieren.

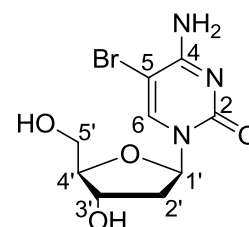
Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Versuch 3:

In 4 mL dest. Wasser wurden 100 mg (390 μ mol) 2'-dC*HCl **106** sowie 110 mg (600 μ mol) NBS gelöst, 5 min bei Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsgefäß in eine Mikrowelle gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min mit 100 W auf 50 °C gehalten und anschließend filtriert. Eine Umkristallisation aus Aceton schlug fehl, so dass das Produkt **105a** nicht isoliert werden konnte.

Synthese 1:

Es wurden 500 mg (2.21 mmol) 2'-dC **106** in 2 mL ionischer Flüssigkeit **108** gelöst und anschließend 560 mg (3.14 mmol) NBS hinzugegeben. Nachdem 5 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, erfolgte die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 95:5 v/v).

**105a**

Ausbeute: 589 mg (1.92 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffs. -

DC: R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 4:1 v/v): 0.42. - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.27 (s, 1H, H-6), 6.08 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz,

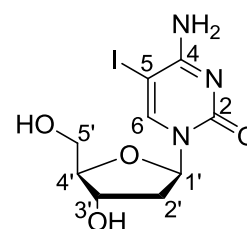
C₉H₁₂BrN₃O₄
M = 306.1133 g/mol

³J_{H,H} = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 4.23-4.20 (m, 1H, H-3'), 3.80-3.77 (m, 1H, H-4'), 3.64-3.60

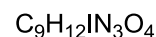
(m, 1H, H-5'a), 3.57-3.53 (m, 1H, H-5'a), 2.17-2.11 (m, 1H, H-2'a), 2.04-1.97 (m, 1H, H-2'b). - $^{13}\text{C-NMR}$ δ [ppm] (101 MHz, DMSO): 161.7 (C-6), 153.6 (C-2), 141.9 (C-6), 87.4 (C-4'), 86.1 (C-1'), 85.4 (C-1'), 69.5 (C-3'), 60.8 (C-5'), 40.7 (C-2'). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3325, 2945, 1671, 1634, 1590, 1508, 1447, 1339, 1298, 1185, 1129, 952, 841, 799, 746, 722, 518. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 305.0011 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 305.1571 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-Iod-2'-desoxycytidin **105b**

In 2.5 mL Ionischer Flüssigkeit **108** wurden 650 mg (2.46 mmol) 2'dC*HCl **106** und 1.39 g (6.16 mmol) *N*-Iodsuccinimid gelöst. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 4 h auf 60 °C erwärmt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 19:1 $\rightarrow$ 9:1 v/v) gereinigt.



105b



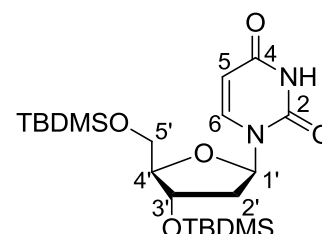
$M = 353.1137 \text{ g/mol}$

Es konnte keine Auswertung vorgenommen werden, da die Reagenzien nicht vollständig abgetrennt werden konnten.

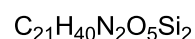
3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin **111**

Es wurden 500 mg (2.19 mmol) 2'-dU **113** in einer Stickstoffatmosphäre mit 2 mL abs. Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde der Feststoff in 7 mL Pyridin gelöst und mit 550 mg (8.05 mmol) Imidazol sowie 840 mg (5.56 mmol) TBDMS-Cl versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 20 h gerührt. Durch die Zugabe von 10 mL Methanol wurde die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Zur vollständigen Abtrennung wurde dreimal mit je 15 mL Toluol coevaporiert. Die Reinigung erfolgte durch das Umkristallisieren aus Dichlormethan in Wasser (1:1, v/v).

Ausbeute: 860 mg (1.88 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffs. - **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.54. - $[\alpha]^{20}_{598}$: +33.9° ($c = 0.5$, CHCl_3). - $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 11.33 (s, 1H, N-H), 7.70 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 6.13 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 5.59 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H-H-6), 4.38-4.35 (m, 1H, H-3'), 3.81-3.74 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.69 (dd, $^2J_{\text{H,H}} =$



111



$M = 456.7237 \text{ g/mol}$

10.9 Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, H-5'b), 2.24-2.17 (m, 1H, H-2'a), 2.12 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, 1H, H-2'b), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.07 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 163.0 (C-4), 150.3 (C-2), 140.0 (C-6), 101.6 (C-5), 86.5 (C-4'), 84.1 (C-1'), 71.9 (C-3'), 71.4 (C-2'), 62.3 (C-5'), 25.7, 25.6 (2*SiC(CH₃)₃), -1.8, 1.9, -5.6, -6.1 (2*Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3058, 2953, 2928, 2885, 2856, 1692, 1461, 1388, 1252, 1113, 1081, 1065, 1028, 884, 831, 774, 671, 556, 423. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 479.2361 [M+Na]⁺, gef.: 479.2361 [M+Na]⁺.

3',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-desoxyuridin **110a**

Synthese 1:

In einer Schutzgasatmosphäre wurden 830 mg (2.70 mmol) 5-Brom-2'-dU **112a** mit 4 mL Pyridin coevaporiert und in 7 mL Pyridin erneut gelöst. Anschließend wurden 670 mg (9.90 mmol) Imidazol und 1.01 g (6.76 mmol) TBDMS-Cl hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei Rt 24 h gerührt. Durch die Zugabe von 10 mL Methanol wurde die Reaktion abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand zweimal mit jeweils 10 mL Toluol codestilliert und schließlich aus Dichlormethan/Wasser (1:1, v/v) umkristallisiert.

Ausbeute: 910 mg (1.71 mmol, 63%) eines farblosen

Feststoffs. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.48. - **[α]²⁰₅₉₈**:

+6° (c = 0.1, CHCl₃). - **Smp.**: 78-81 °C. - **¹H-NMR**: δ [ppm]

(400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.85 (s, 1H, N-H), 7.98 (s, 1H, H-6),

6.08 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.36-4.34

(m, 1H, H-3'), 3.84-3.79 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.72 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$

= 10.4 Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.43$ Hz, 1H, H-5'b), 2.30-2.21 (m, 1H, H-

2'a), 2.13 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.4$ Hz,

1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂),

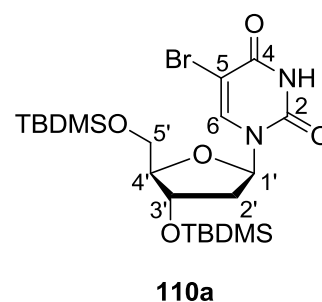
0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 158.9 (C-4), 149.5 (C-

2), 139.3 (C-6), 87.0 (C-4'), 84.7 (H-1'), 71.6 (C-3'), 62.4 (C-2'), 39.8 (C-5'), 25.8,

25.5 (2*SiC(CH₃)₃), -4.9, 5.0, -5.1, -5.5 (2*Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3183,

3066, 2953, 2928, 2884, 2856, 1692, 1461, 1388, 1252, 1066, 1027, 1005, 968, 829,

774, 673, 548. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 557.1473 [M+Na]⁺, gef.: 557.1479 [M+Na]⁺.



C₂₁H₃₉BrN₂O₅Si₂
M = 535.6198 g/mol

Synthese 2:

Es wurden 830 mg (1.82 mmol) TBDMS-2'-dU **111** in 6 mL Acetonitril gelöst und 0.21 g (2.3 mmol) LiBr hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde so lange gerührt bis sich der Feststoff gelöst hatte. Anschließend wurden 2.00 g (3.63 mmol) Ammoniumcer(IV)nitrat hinzugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 40 mL Ethylacetat aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit 20 mL dest. Wasser wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE: 6:1 → 1:1 v/v) gereinigt.

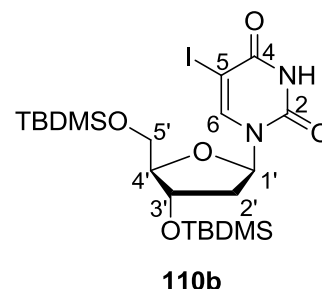
Ausbeute: 150 mg (280 µmol, 15%) eines farblosen Feststoffs. Die spektroskopischen Daten entsprachen den oben angegebenen Werten.

3',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxyuridin 110b

In einer Schutzgasatmosphäre wurden 510 mg (1.45 mmol) 5-Iod-2'-dU **112b** mit 2 mL abs. Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde der Feststoff in 7 mL abs. Pyridin gelöst und 530 mg (7.84 mmol) Imidazol sowie 550 mg (3.64 mmol) TBDMS-Cl hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 21 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion schließlich durch die Zugabe von Methanol abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand dreimal mit je 10 mL Toluol coevaporiert. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Dichlormethan und Wasser (1:1, v/v).

Ausbeute: 680 mg (1.17 mmol, 81%) eines farblosen

Feststoffs. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1 v/v): 0.48. - **[α]²⁰₅₉₈**: -19° (c = 0.36, CHCl₃). - **Smp.**: 135-136 °C. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.72 (s, 1H, N-H), 7.96 (s, 1H, H-6), 6.08 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 4.36-4.34 (m, 1H, H-3'), 3.84-3.78 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.71 (dd, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-5'b), 2.25-2.18 (m, 1H, H-2'a), 2.11 (ddd, ²J_{H,H} = 13.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 3.0



C₂₁H₃₉IN₂O₅Si₂
M = 582.6202 g/mol

Hz, 1H, H-2'b), 0.91 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR** δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 160.3 (C-4), 149.9 (C-2), 144.0 (C-6), 86.5 (C-4'), 84.5 (C-1'), 71.8 (C-3'), 69.8 (C-5), 62.5 (C-2'), 39.7 (C-5') 25.9, 25.6 (2*SiC(CH₃)₃), -4.9, -5.1, -5.4, -5.5 (2*Si(CH₃)₂). - **IR**:

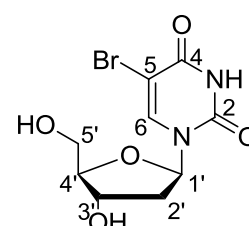
Wellenzahl [cm^{-1}]: 3144, 3030, 2951, 2928, 2856, 1699, 1665, 1610, 1360, 1255, 1102, 1089, 1059, 1027, 828, 811, 773, 752, 716, 672, 595, 550, 444. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 582.1442 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 581.1741 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-Brom-2'-desoxyuridin **112a**

In 2.5 mL der Ionischen Flüssigkeit **108** wurden 500 mg (2.20 mmol) 2'-dU **113** gelöst und zu der viskosen Masse 590 mg (3.33 mmol) NBS hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h gerührt und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 95:5 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 489 mg (1.60 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs. -

DC: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 3:1 v/v): 0.49. - $[\alpha]_{598}^{20}$: $+20.6^\circ$ ($c = 0.5$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1)). - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11.78 (s, 1H, N-H), 8.38 (s, 1H, H-6), 6.11 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.25-4.22 (m, 1H, H-3'), 3.79 (dd, 1H, H-4'), 3.59 (dd, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1H, H-5'a, H-5'b), 2.23-2.11 (m, 2H, H-2'a, H-2'b). - **$^{13}\text{C-NMR}$** δ [ppm] (101 MHz, CDCl_3): 159.1 (C-4), 149.7 (C-2), 140.2 (C-6), 95.6 (C-5), 84.5 (C-4'), 84.8 (C-1'), 69.9 (C-3'), 60.8 (C-5'), 40.1 (C-2'). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]:



112a

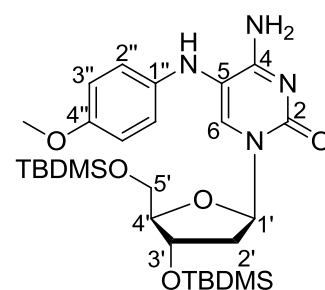
$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_5$
 $M = 307.0980$ g/mol

3403, 2916, 2836, 1670, 1619, 1457, 1348, 1194, 1140, 1091, 1074, 1051, 1036, 639, 599, 551, 426. - **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 330.0873 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 330.9721 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-*N*-(4-methoxyanilin)-2'-desoxycytidin **114**

Versuch 1:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 208 mg (390 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Kaliumphosphat und als Ligand *rac*-BINAP verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden. Die Analyse der nach der säulenchromatographischen Reinigung erhaltenen Fraktionen zeigte sowohl das Edukt als auch das debromierte Edukt **104** (16 mg, 35 μmol , 9%) an.



114

$\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_5\text{Si}_2$
 $M = 576.8755$ g/mol

Versuch 2:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 200 mg (344 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-dC **103b** eingesetzt. Als Base wurde Kaliumphosphat und als Ligand *rac*-BINAP verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 3:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 202 mg (378 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Kalium-*tert*-butanolat und als Ligand *rac*-BINAP verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden. Die NMR-Auswertung der Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigung zeigte das Vorhandensein des debromierten Eduktes **104**.

Versuch 4:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 201 mg (376 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Cäsiumcarbonat und als Ligand *rac*-BINAP verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden. Die NMR-Auswertung der Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigung zeigte das Vorhandensein von debromiertem Edukt **104** (49.1 mg, 108 μmol , 29%).

Versuch 5:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 200 mg (374 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Kaliumphosphat und als Ligand Xantphos verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden. Die NMR-Auswertung der Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigung zeigte das Vorhandensein von debromiertem Edukt **104** (19.0 mg, 42 μmol , 11%).

Versuch 6:

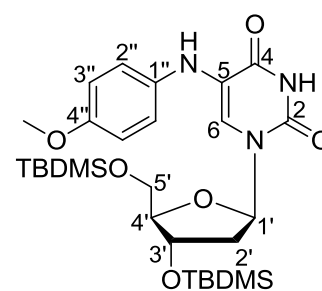
Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 202 mg (378 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Kalium-*tert*-butanolat und als Ligand Xantphos verwendet. Triethylammoniumchlorid wurde nicht verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 7:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 202 mg (378 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dC **103a** eingesetzt. Als Base wurde Li-HMDS und als Ligand Xantphos verwendet. Triethylammoniumchlorid wurde nicht verwendet. Das Produkt **114** konnte nicht erhalten werden

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-*N*-(4-methoxyanilin)-2'-desoxyuridin **115**Versuch 1:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 201 mg (345 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-dU **110b** eingesetzt. Als Base wurde Kaliumphosphat und als Ligand Xantphos verwendet. Triethylammoniumchlorid wurde nicht verwendet. Nach drei Tagen Reaktionszeit wurden noch einmal 10mol% Pd-Katalysator hinzu gegeben. Das Produkt **115** konnte nicht erhalten werden. Aus den Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigung konnte das dehalogenierte Edukt **111** (64.6 mg, 143 μmol , 41%) identifiziert werden.

**115**

$\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}_2$
 $M = 577.8603 \text{ g/mol}$

Versuch 2:

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 16. Es wurden 201 mg (375 μmol) 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-brom-2'-dU **110a** eingesetzt. Als Base wurde Kaliumphosphat und als Ligand *rac*-BINAP verwendet. Triethylammoniumchlorid wurde nicht verwendet. Das Produkt **115** konnte nicht erhalten werden.

9.7.2 Synthese der geschützten und C2-funktionalisierten 2'-dG-Derivate**3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dG **118****

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 9.45 g (33.8 mmol) 2'-dG $\cdot$ H₂O **13** zweimal mit jeweils 10 mL abs. Pyridin coevaporiert. Anschließend wurden 200 mL abs. Pyridin, 12.8 (85.0 mmol) TBDMS-Cl und 8.61 g (125 mmol) Imidazol hinzugegeben und über Nacht bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v). Nach Zugabe von CH₃OH und Toluol und Entfernen des

Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH: 99:1 → 9:1 v/v).

Ausbeute: 15.6 g (31.0 mmol, 92%) eines farblosen

Feststoffs. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1 v/v).

- **Smp.**: 261 °C. -[α]₅₉₈²⁰: -17.6 ° (c = 1.0, CHCl₃). -

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.51 (s,

1H, NH), 7.77 (s, 1H, H-8), 6.38 (s, 2H, NH₂), 6.02

(dd, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 4.40

(ddd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz,

1H, H-3'), 3.72-3.69 (m, 1H, H-4'), 3.71 (dd, ²J_{H,H} =

11.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, H-5'a), 3.65 (dd, ²J_{H,H} =

11.0 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-5'b), 2.57-2.50 (m, 1H, H-2'a), 2.16 (ddd, ²J_{H,H} = 13.2

Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, H-2'b), 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C-3'), 0.77 (s,

9H, SiC(CH₃)₃ an C-5'), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.06, -0.07 (2 * s, 2 * 3H, Si(CH₃)₂). -

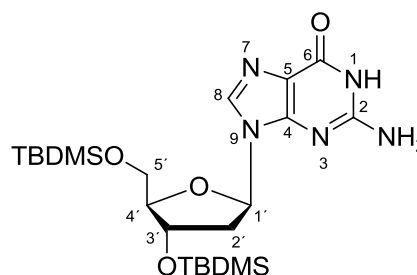
¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 156.7 (C-6), 153.7 (C-2), 135.1 (C-8), 133.5

(C-4), 130.6 (C-5), 87.0 (C-4'), 82.1 (C-3'), 72.1 (C-1'), 62.8 (C-5'), 36.6 (C-2'), 25.7

(SiC(CH₃)₃), 22.3 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.8, -5.0

(SiC(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 1830, 1280, 1208, 1005, 987, 968, 713,

694, 620, 572, 498. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 495.2697 [M], gef.: 496.2789 [M+H]⁺.



118

C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂
M = 495.7630 g/mol

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-dG **129**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 10.0 g (20.2 mmol) 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-2'-

dG **118** und 12.9 g (46.4 mmol) PPh₃ in 120 mL abs. 1,4-Dioxan gelöst und

7.00 mL (7.35 g, 68.0 mmol) Benzylalkohol zugegeben. Die Reaktionsmischung

wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit

7.00 mL (6.84 g, 33.7 mmol) DIAD versetzt. Die

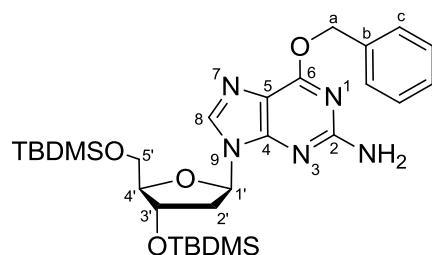
hellgelbe Lösung wurde für 25 Stunden bei Rt

gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im

Vakuum wurde das Rohprodukt

säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE: 3:1 →

2:1 v/v).



129

C₂₉H₄₇N₅O₄Si₂
M = 585.8856 g/mol

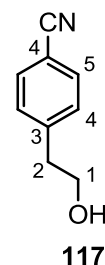
Ausbeute: 8.30 g (14.2 mmol, 70%) eines leicht

gelblichen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 1:1):

0.74. - **Smp.**: 69.2 °C; $[\alpha]_{598}^{20} = -1.5^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3). - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.06 (s, 1H, H-8), 7.50 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 2H, H-c), 7.42-7.37 (m, 2H, H-d), 7.37-7.33 (m, 1H, H-e), 6.52 (s, 2H, NH_2), 6.21 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.50 (s, 2H, H-a), 4.51 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 3.82 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, 1H, H-4'), 3.72 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1H, H-5'a), 3.64 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, H-5'b), 2.73 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, 1H, H-2'a), 2.25 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, 1H, H-2'b), 0.89 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ an C3'), 0.86 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ an C5'), 0.11 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.03, 0.03 (2 x s, 2 x 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 160.0 (C6), 159.7 (C2), 137.4 (C8), 136.5 (Cb), 128.3 (Cc), 128.2 (Cd), 128.0 (Ce), 122.9 (C4), 113.0 (C5), 86.8 (C4'), 82.2 (C3'), 71.5 (C1'), 66.7 (Ca), 62.9 (C5'), 59.5 (C2'), 25.5 (2 x $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 20.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 13.9 (2 x $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 3396, 2770, 2711, 1876, 1755, 1705, 1674, 1614, 1574, 1557, 1548, 1486, 1463, 1416, 1005, 985, 919, 619, 508. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 585.3167 [M], gef.: 586.3253 [M+H]⁺.

2-(4-Cyanophenyl)ethanol **117**

In einem Kolben wurden 10.0 g (160 mmol) Natriumnitrit in 8 mL Wasser gelöst und zu einer Lösung aus 19.2 g (140 mmol) 2-(4-Aminophenyl)ethanol **116** und 100 mL eines Salzsäure/Eis-Gemisches (2:3 v/v) bei 3 °C getropft. Nach anschließender Neutralisation mit Natriumcarbonat-Lösung wurde die Lösung bei 0 °C zu 240 mL eines mit Kupfercyanid-Lösung (14.8 g Kupferchlorid und 19.6 g Natriumcyanid in 100 mL Wasser) überschichteten Toluol/Benzol-Gemisches (1:1 v/v) getropft.



117

$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}$
M = 147.1739 g/mol

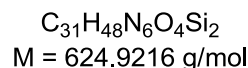
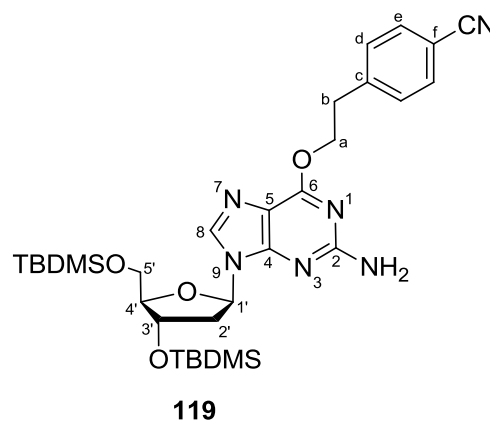
Nach weiterem Rühren für eine Stunde bei 0 °C wurde die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend für 1.5 Stunden bei 50 °C stengelassen. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde die wässrige Phase dreimal mit je 80 mL Dichlormethan extrahiert, bevor die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit wurden. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 0% → 5% v/v).

Ausbeute: 16.8 g (114 mmol, 71%) eines orangefarbenen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.54 - **Smp.**: 49 °C. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.73 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 2H, H-4), 7.43 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 2H, H-5), 4.70 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, 1H, OH), 3.63 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, 2H, H-1), 2.79 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 2H, H-2). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 146.2 (C-6), 132.1 (C-5), 130.0 (C-4), 119.2 (C-3), 108.8 (CN), 61.5 (C-1), 39.0 (C-2). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 2356, 2078, 1826, 1705, 1676, 1207, 741. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 147.06 [M], gef.: 148.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-dG 119

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 5.05 g (10.2 mmol, 1 Äquiv.) 3',5'-Bis-O-(TBDMS)-dG **118** 6.44 g (24.5 mmol, 2.5 Äquiv.) Triphenylphosphin und 5.0 g (34 mmol, 3 Äquiv.) 2-(4-Cyanophenyl)-ethanol **117** in 42 mL abs. 1,4-Dioxan gelöst. Unter Eisbadkühlung wurden tropfenweise 3.40 mL (16.8 mmol, 1.5 Äquiv.) DIAD zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (PE/EE: 1:1 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 4:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v).

Ausbeute: 5.41 g (8.67 mmol, 85%) eines gelben Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 1:1): 0.74. - **Smp.**: 69 °C. - $[\alpha]_{598}^{20}$: -0.5° ($c = 1.67$, CHCl_3). - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.02 (s, 1H, H-8), 7.78-7.71 (m, 2H, H-d), 7.55 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 2H, H-e), 6.44 (s, 2H, NH_2), 6.20 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.51 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 3.82 (m, 1H, H-4'), 3.74-3.69 (m, 1H, H-5'a), 3.63 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 6.9$



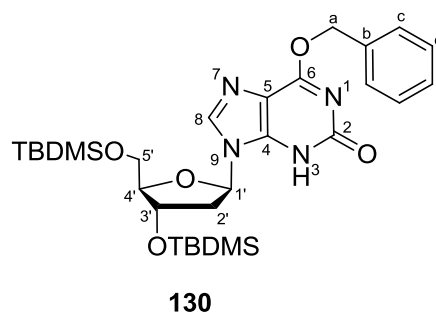
Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1H, H-5'b), 4.64 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-a), 3.19 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-b), 2.73 (m, 1H, H-2'a), 2.24 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, H-2'b), 0.89 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ an C-3'), 0.86 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ an C-5'), 0.10 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.03, 0.02 (2 * s, 2 * 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 160.1 (C-6), 159.8 (C-2), 154.1 (C-4), 144.3 (C-c), 137.5 (C-8), 132.1 (C-e), 130.1 (C-d), 119.0 (C-f), 113.8 (C-5), 109.4 (CN), 87.0 (C-4'), 82.3 (C-3'), 72.2 (C-

1'), 65.5 (C-a), 62.7 (C-5'), 61.3 (C-2'), 34.6 (C-b), 25.7 (2 * SiC(CH₃)₃), 17.8 (2 * SiC(CH₃)₃), -4.8, -5.0, -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3373, 2929, 2884, 2857, 2228, 1733, 1611, 1585, 1506, 1462, 1410, 1372, 1332, 1252, 1178, 1111, 1070, 968, 939, 838, 780, 671, 640, 562. - **HRMS** (FAB, m/z) ber.: 624.3354 [M], gef.: 625.3348 [M+H]⁺.

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyxanthosin 130

Zu einer Lösung von 4.00 g (6.83 mmol) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dG **129** in 38 mL Aceton wurden unter Eiskühlung 25 mL Wasser, 23 mL Essigsäure und 9.44 g (13.7 mmol) Natriumnitrit gegeben. Die Reaktionslösung wurde 40 Minuten mit Eis gekühlt und anschließend für 5 h bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 2:1). Anschließend wurde die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen bzw. neutralisiert. Es wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE: 4:1 → 1:1 v/v).

Ausbeute: 1.80 g (3.06 mmol, 45%) eines farblosen, schaumigen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1): 0.31. - **Smp.**: 107 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: -0.6 ° (c = 0.64, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.73 (s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H8), 7.50 (dd, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.4 Hz, 2H, Hc), 7.43-7.39 (m, 2H, Hd), 7.38-7.34 (m, 1H, He), 6.23 (dd, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.54 (s, 2H, H-a), 4.56-4.53



C₂₉H₄₆N₄O₅Si₂
M = 586.8703 g/mol

(m, 1H, H-3'), 3.84 (ddd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-4'), 3.75 (dd, ²J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, H-5'a), 3.64 (dd, ²J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 4.4 Hz, 1H, H-5'b), 2.81-2.75 (m, 1H, H-2'a), 2.30 (ddd, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, H-2'b), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C3'), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C5'), 0.11 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.02, 0.01 (s, 2 * 3H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 158.7 (C6), 154.3 (C2), 134.6 (C8), 129.7 (Cb), 128.4 (Cc), 128.1 (Cd), 128.0 (Ce), 125.5 (C4), 117.5 (C5), 88.0 (C4'), 87.4 (C3'), 48.6 (C1'), 47.7 (Ca), 45.0 (C5'), 38.2 (C2'), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 22.3 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.8, -5.0 (Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3302, 2983, 2930,

2857, 1740, 1648, 1593, 1444, 1403, 1374, 1359, 1242, 1103, 1047, 836, 779, 740, 482. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 586.3007 [M], gef.: 587.3085 [M+H]⁺.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyxanthosin 131

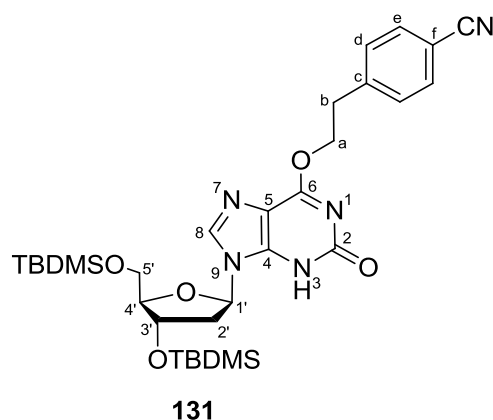
Zu einer Lösung von 4.0 g (6.40 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-dG **119** in 75 mL Aceton wurden unter Eiskühlung 33 mL Wasser, 42 mL Essigsäure und 17.7 g (25.6 mmol) Natriumnitrit gegeben. Die Reaktionslösung wurde dreißig Minuten mit Eis gekühlt und anschließend für 22.5 h bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 1:1). Anschließend wurde die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Es wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE: 4:1 → 1:1 → 1:3 v/v).

Ausbeute: 2.90 g (4.63 mmol, 72%) eines gelblichen Öls. - **DC**: R_F-Wert (PE/EE: 1:1 v/v):

0.32. - **[α]²⁰₅₉₈**: -2.6 ° (c = 1.0, CHCl₃). - **¹H-NMR**:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 11.72 (s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H-8), 7.67 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-d), 7.57 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-e), 6.24 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.57-4.52 (m, 1H, H-3'), 3.86-3.82 (m, 1H, H-4'), 3.75-3.70 (m, 1H, H-5'a), 3.65-3.61 (m, 3H, H-5'b/H-a), 2.69 (t, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 2H, H-b), 2.66-

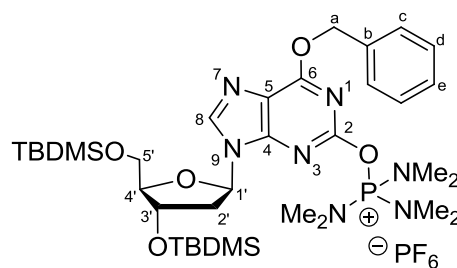
2.64 (m, 1H, H-2'a), 2.21-2.16 (m, 1H, H-2'b), 0.78 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C3'), 0.74 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C5'), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.10, -0.09 (2 * s, 2 * 3H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 145.9 (C2), 144.2 (C6), 138.6 (C8), 137.6 (Cf), 132.2 (Cb), 131.9 (Cc), 131.2 (Cd), 130.0 (C4), 119.0 (Ce), 114.3 (C5), 109.2 (CN), 87.0 (C4'), 82.9 (C1'), 71.9 (C3'), 66.1 (Ca), 62.5 (C5'), 59.6 (C2'), 26.1 (2 * SiC(CH₃)₃), 17.67 (2 * SiC(CH₃)₃), -5.0, -4.8 (Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2951, 2929, 2889, 2857, 2227, 1641, 1608, 1592, 1405, 1360, 1251, 1110, 1024, 830, 777, 550. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 625.3116 [M], gef.: 626.3187 [M+H]⁺.



C₃₁H₄₇N₅O₅Si₂
M = 625.9064 g/mol

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O²-tris(dimethylamino)-phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.78 g (3.04 mmol) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-desoxyxanthosin **130** und 2.71 g (6.11 mmol) BOP in 30 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.1 mL (0.81 g, 6.3 mmol) DIPEA versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 5 h bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 19:1).



127

C₃₅H₆₃F₆N₇O₅P₂Si₂

M = 894.0276 g/mol

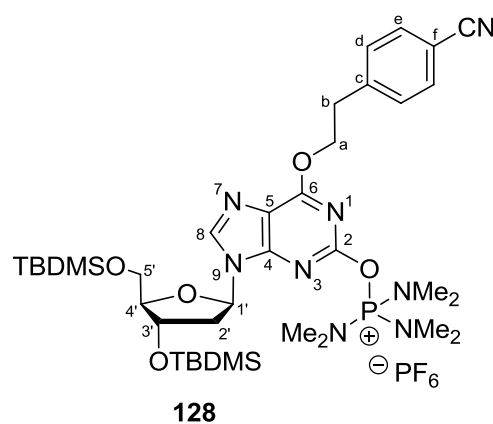
Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der beige-braune Feststoff säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE: 1:1 v/v → CH₂Cl₂/Aceton: 7:3 v/v).

Ausbeute: 2.18 g (2.44 mmol, 80%) eines schaumigen, beigen Feststoffs. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 19:1): 0.60. - **Smp.**: 55.6 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: -1.07 ° (c = 0.68, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃): 8.36 (s, 1H, H-8), 7.44 (d, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, H-c), 7.37-7.31 (m, 3H, H-d,-e), 6.38 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 5.66 (s, 2H, H-a), 4.58 (dd, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, H-3'), 4.02 (dd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, H-4'), 3.84 (dd, ²J_{H,H} = 11.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-5'a), 3.78 (dd, ²J_{H,H} = 11.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, 1H, H-5'b), 2.83 (d, ³J_{H,P} = 10.7 Hz, 18H, 3 * N(CH₃)₂), 2.45 (dd, ³J_{H,H} = 5.99 Hz, ³J_{H,H} = 5.23 Hz, 2H, H-2'), 0.91 (s, 18H, 2 * SiC(CH₃)₃), 0.10, 0.09 (s, 12H, 2 * Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (125 MHz, CDCl₃): 161.9 (C6), 152.6 (C2), 140.9 (C8), 135.3 (Cb), 128.6 (Cd,e), 127.7 (Cc), 120.2 (C4), 117.7 (C5), 88.01 (C4'), 83.9 (C1'), 71.5 (C3'), 69.7 (Ca), 62.6 (C5'), 41.9 (C2'), 37.5 (d, ²J_{C-P} = 4.1 Hz, 3 * N(CH₃)₂), 26.1 (2 * SiC(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), -5.2 (Si(CH₃)₂), -5.5 (Si(CH₃)₂). - **³¹P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): 33.0 (s, P[N(CH₃)₂]₃), -144.4 (sep, J_{P-F} = 715.0 Hz). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2952, 2929, 2857, 1604, 1470, 1347, 1315, 1250, 1233, 1171, 1066, 1000, 832, 774, 698, 556, 467, 407. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 748.4161 [M+H]⁺ (ohne PF₆⁻), gef.: 748.4167 [M+H]⁺ (ohne PF₆⁻).

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-O²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat 128

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.39 g (3.82 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2'-desoxyxanthosin **131** und 3.39 g BOP (7.65 mmol) in 40 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.3 mL (1.0 g, 7.5 mmol) DIPEA versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 3.5 h bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE: 1:1 v/v → CH₂Cl₂/CH₃OH: 7:3 v/v).

Ausbeute: 2.39 g (2.56 mmol, 67%) eines orange-braunen Öls erhalten. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 19:1): 0.38. - **[α]²⁰₅₉₈**: -1.38 ° (c = 0.67, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.47 (s, 1H, H-8), 7.68 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-d), 7.45 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-e), 6.22 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 4.59 (ddd, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H-3'), 3.86 (ddd, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1H, H-4'), 3.74 (m, 1H, H-5'a), 3.63-3.59 (m, 3H, H-5'b/H-a), 2.84-2.76 (m, 21H, 3 * N(CH₃)₂, H-b, H-2'a), 2.26 (m, 1H, H-2'b), 0.78 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C3'), 0.71 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C5'), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.11, -0.13 (2 * s, 2 * 3H Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 168.0 (C2), 159.8 (C6), 152.6 (C5), 144.0 (C8), Cb (143.8), 142.3 (Cf), 132.6 (Cc), 132.2 (Cd), 130.0 (Ce), 119.0 (C4), 109.3 (CN), 87.1 (C4'), 83.3 (C1'), 71.2 (C3'), 62.2 (C5'), 61.2 (Ca), 59.6 (C2'), 36.5 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, 3 * N(CH₃)₂), 25.5 (2 * SiC(CH₃)₃), 17.7 (2 * SiC(CH₃)₃), -5.1, -4.9 (Si(CH₃)₂). - **³¹P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, DMSO-*d*₆): 33.36 (s, P[N(CH₃)₂]₃), -144.2 (sep, J_{P-F} = 711.3 Hz). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2952, 2930, 2858, 2227, 1605, 1448, 1348, 1315, 1235, 1176, 1048, 1002, 831, 776, 671, 642, 557, 489, 467. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 787.4270 [M+H]⁺ (ohne PF₆⁻), gef.: 787.4277 [M+H]⁺ (ohne PF₆⁻).



C₃₇H₆₄F₆N₈O₅P₂Si₂
M = 933.0636 g/mol

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-brom-2'-dG 12

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden
4.67 g (7.48 mmol, 1 Äquiv.)

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-
O-(TBDMS)-2'-dG **119** und 2.03 g

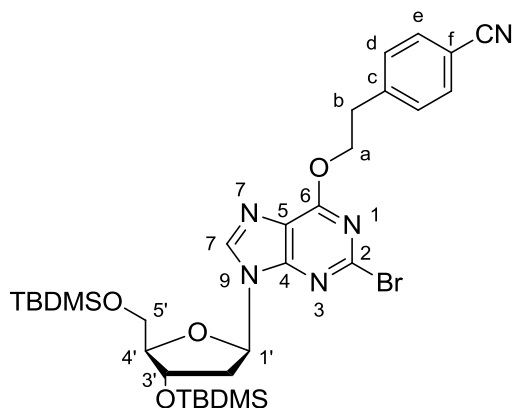
(5.61 mmol, 0.75 Äquiv.) Antimontribromid
zusammengegeben und mittels

Viehsalz/Eisbad auf -10 °C gekühlt.
Abschließend wurden 25 mL Dibrommethan

zugefügt. Zur Reaktionslösung wurden
1.79 mL (15.0 mmol, 2 Äquiv.) *t*-Butylnitrit

getropft. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei -
10 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte

mittels DC (PE/EE: 2:1 v/v). Nach Zugabe von 7.5 g Natriumhydrogencarbonat,
gelöst in 125 mL kaltem Wasser, wurde die Lösung in einen Scheidetrichter
dekantiert und die wässrige Phase nach der Phasentrennung dreimal mit
Dichlormethan extrahiert. Der hochviskose Niederschlag wurde im Becherglas
solange mit Dichlormethan gerührt und dekantiert, bis der Niederschlag farblos war.
Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das
Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte
säulenchromatographisch (PE/EE: 4:1 → 2:1 v/v).

**12**

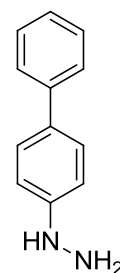
C₃₁H₄₆BrN₅O₄Si₂
M = 688.8030 g/mol

Ausbeute: 3.07 g (4.46 mmol, 60%) eines gelben Sirups. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1): 0.47. - **[α]²⁰₅₉₈**: +8.7 ° (c = 0.19, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.50 (s, 1H, H-8), 7.77 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-d), 7.55 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2H, H-e), 6.32 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 12.7 Hz, 1H, H-1'), 4.68 (ddd, ³J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, H-3'), 3.86-3.77 (m, 2H, H-4', H-5'a), 4.78 (t, 2H, H-a), 3.64 (dd, ²J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, H-5'b), 3.23 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-b), 2.94-2.88 (m, 1H, H-2'a), 2.35 (ddd, ²J_{H,H} = 18.3 Hz, ³J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C-3'), 0.8 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C-5'), 0.12 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.01, -0.05 (2 * s, 2 * 3H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.8 (C-6), 152.6 (C-4), 144.0 (C-c), 132.2 (C-d), 130.1 (C-e), 120.8 (C-5), 118.8 (C-f), 109.4 (CN), 87.0 (C-4'), 83.9 (C-1'), 71.5 (C-3'), 67.4 (C-a), 62.2 (C-5'), 38.1 (C-2'), 34.3 (C-b), 25.7 (2 * SiC(CH₃)₃), 17.7 (2 * SiC(CH₃)₃), -4.8, -5.0

(Si(CH₃)₂), -5.6 (Si(CH₃)₂). – **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 3854, 3446, 2954, 2930, 2857, 2228, 1734, 1653, 1596, 1569, 1507, 1472, 1430, 1362, 1314, 1256, 1227, 1164, 1110, 1070, 1030, 837, 778. – **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 729.3854 [M], gef.: 730.3899 [M+H]⁺.

4-Hydrazinobiphenyl 120

In einem Gemisch aus 30 mL Wasser und 11.4 mL konzentrierter Salzsäure wurden 3.00 g (17.7 mmol) 4-Aminobiphenyl **3** suspendiert und auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1.35 g (18.0 mmol, 1 Äquiv.) Natriumnitrit in 8 mL Wasser langsam zugetropft. Nach vier Stunden bei -10 °C wurde die hellgelbe Lösung in der Kälte zu einer Lösung von 15.2 g (80.0 mmol, 4.4 Äquiv.) Zinn(II)-chlorid in 13 mL konzentrierter Salzsäure gegeben. Nach einer Stunde wurde der Niederschlag abfiltriert und das Produkt durch Versetzen des Niederschlags mit 25%iger Ammoniaklösung erhalten. Das Hydrazin wurde mit Ether extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



120

C₁₂H₁₂N₂

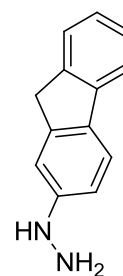
M = 184.2371 g/mol

Ausbeute: 2.06 mg (11.2 mmol, 63%) eines orangefarbenen Feststoffes. – **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.48 (d, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.34 (d, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.31 (m, 1H, H-4'), 6.82 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 2H, H-3, H-5), 5.17 (s, 1H, NH), 3.54 (2H, NH₂). – **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 150.7 (C-8), 132.5 (C-4), 128.8 (C-2, C-2'), 128.0 (C-8, C-8'), 126.6 (C-1, C-3, C-3'), 126.5 (C-5), 112.5 (C-7, C-7'). – **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2929, 2856, 1598, 1576, 1242, 1139, 1106, 1067, 831, 776. – **MS** (EI, m/z): ber.: 184.1 [M], gef.: 184 [M].

2-Hydrazinofluoren 121

Synthese 1:

Es wurden 4.0 g (22 mmol) 2-Aminofluoren **4** in 10 mL konzentrierter Salzsäure suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Es erfolgte eine tropfenweise Zugabe von 1.51 g (22.0 mmol, 1 Äquiv.) Natriumnitrit, gelöst in 4 mL kaltem Wasser und weiteres Rühren bei 0 °C für 30 min. Anschließend erfolgte die



121

C₁₃H₁₂N₂

M = 196.2478 g/mol

tropfenweise Zugabe von 12.5 g (66.0 mmol, 3 Äquiv.) Zinn(II)-chlorid, gelöst in 24 mL kalter konzentrierter Salzsäure, bei 0 °C. Nach Lagerung über Nacht wurde der Niederschlag filtriert und mit gesättigter Natriumchloridlösung und PE/Diethylether (2:1 v/v) gewaschen. Nach Aufnahme des Niederschlags in frisch angesetzte Natronlauge wurde mit Diethylether extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das freie Hydrazin wurde durch Extraktion mit Diethylether gegen Natronlauge und abschließendem Einengen der organischen Phase erhalten.

Ausbeute: 1.12 g (5.71 mmol, 26%) eines gelben Feststoffes. – **MS** (EI, m/z): 181 [100%] 2-Aminofluoren, 165 [33%] Fluoren, 196 [8%] 2-Hydrazinofluoren; (FAB, m/z): 196.1 [73%] 2-Hydrazinofluoren, 181.1 [100%] 2-Aminofluoren.

Synthese 2:

Es wurden die Bedingungen wie bei Synthese 1 verwendet. Eingesetzt wurden 4.0 g (22 mmol) 2-Aminofluoren **4**.

Ausbeute: 1.96 g (1.00 mmol, 45%) eines gelben Feststoffes. – **MS** (EI, m/z): 166 [100%] Fluoren, 181 [30%] 2-Aminofluoren.

Synthese 3:

In einem Gemisch aus 30 mL Wasser und 11.4 mL konzentrierter Salzsäure wurden 3.21 g (17.7 mmol) 2-Aminofluoren **4** suspendiert und auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1.35 g (18.0 mmol, 1 Äquiv.) Natriumnitrit in 8 mL Wasser langsam zugetropft. Nach vier Stunden bei -10 °C wurde die hellgelbe Lösung in der Kälte zu einer Lösung von 15.2 g (80.0 mmol, 4.4 Äquiv.) Zinn(II)-chlorid in 13 mL konzentrierter Salzsäure gegeben. Nach einer Stunde wurde der Niederschlag abfiltriert und das Produkt durch Versetzen des Niederschlags mit 25%iger Ammoniaklösung erhalten. Das Hydrazin wurde mit Ether extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1.98 g (10.1 mmol, 58%) eines gelben Feststoffes. – **MS** (FAB, m/z): 180.1 [100%] 2-Aminofluoren, 196.1 [60%] 2-Hydrazinofluoren; (EI, m/z): 180 [100%] 2-Aminofluoren, 196 [85%] 2-Hydrazinofluoren.

Synthese 4:

Es wurden die Bedingungen wie bei Synthese 3 verwendet. Eingesetzt wurden 3.24 g (17.9 mmol) 2-Aminofluoren **4**.

Ausbeute: 550 mg (2.80 mmol, 16%) eines gelben Feststoffes. – **MS** (EI, m/z): 165 [100%] Fluoren, 181 [50%] 2-Aminofluoren, 196 [20%] 2-Hydrazinofluoren.

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 510 mg (20.0 μ mol) Magnesiumspäne mit einigen Krümeln Iod über Nacht gerührt. Anschließend wurden 4.96 g (20.0 μ mol) 2-Bromfluoren **122** in 30 mL abs. THF gelöst und zu dem Magnesium hinzugegeben. Die entstandene braune Suspension wurde nach beendeter Zugabe für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Kühlen auf -78 °C wurden 4.61 g (20.0 μ mol) Di-*tert*-butylazodicarboxylat **124** zugegeben und nach 10 min weiterem Rühren mit 1.14 mL (20.0 μ mol) Essigsäure versetzt. Die Suspension wurde daraufhin bei Raumtemperatur mit 15 mL Wasser und 50 mL Diethylether versetzt, die Phasen getrennt und die organische Phase dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Trocknung erfolgte über Magnesiumsulfat und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **121** konnte mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie nicht gefunden werden.

9.7.3 Synthese der *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte über die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion

*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-*N*-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **11a**

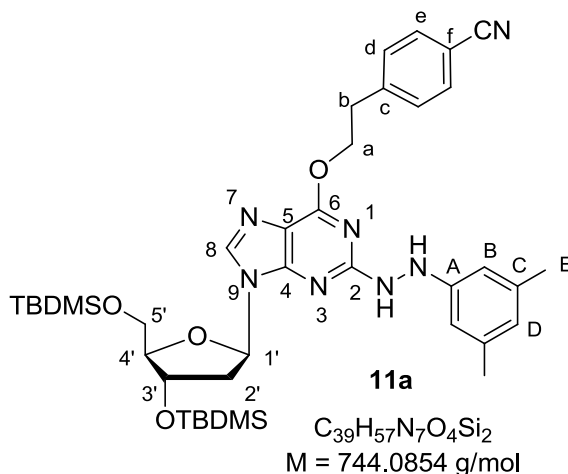
Die Synthese wurde gemäß der AAV 17 durchgeführt. Es wurden 2.0 g (2.9 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-2-brom-2'-dG **12** eingesetzt.

Ausbeute: 1.39 g (1.86 mmol, 64%) eines orangefarbenen Feststoffes. - **DC**: *R*_F-Wert (PE/EE: 1:1): 0.50. - **Smp.**: 83-85 °C. - **[α]**²⁰₅₉₈: +7.8 ° (c = 1.2, CH₂Cl₂). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.16 (s, 1H, H-8), 7.75-7.73 (m, 2H, H-d), 7.44-7.40 (m, 2H, H-e), 7.26 (s, 2H, H-B), 6.70 (s, 1H, H-D), 6.30-6.26 (m, 1H, H-1'), 5.24 (s, 2H, NH), 4.80-4.73 (m, 2H, H-a), 4.64-4.58 (m, 1H, H-3'), 3.83-3.81 (m, 1H, H-4'), 3.64-3.55 (m, 2H, H-5'), 3.17-3.12 (m, 2H, H-b), 3.00-2.95 (m, 1H, H-2'a), 2.27-2.24

(m, 1H, H-2'b), 2.21 (s, 6H, H-E), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C-3'), 0.83 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ an C-5'), 0.10 (s, 3H, Si(CH₃)₂ an C-3'), 0.00 (s, 3H, Si(CH₃)₂ an C-3'), -0.02 (s, 6H, Si(CH₃)₂ an C-5'). - ¹³C-

NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 156.1 (C-6), 153.2 (C-2), 144.8 (C-C), 140.2 (C-8), 144.1 (C-f), 136.3 (C-c), 132.1 (C-d), 130.0 (C-e), 124.8 (C-B), 128.0 (C-4), 121.3 (C-D), 118.9 (CN),

118.8 (C-A), 109.3 (C-5), 87.9 (C-4'), 83.4 (C-1'), 73.5 (C-3'), 65.9 (C-a), 62.8 (C-5'), 59.7 (C-2'), 34.5 (C-b), 25.2 (SiC(CH₃)₃), 21.9 (C-E), 9.6 (SiC(CH₃)₃), -4.1, -5.4 (Si(CH₃)₂). - **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 2930, 2835, 2227, 1618, 1463, 1384, 1301, 1256, 1175, 1032, 827, 703, 583. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 743.4011 [M], gef.: 744.4125 [M+H]⁺.



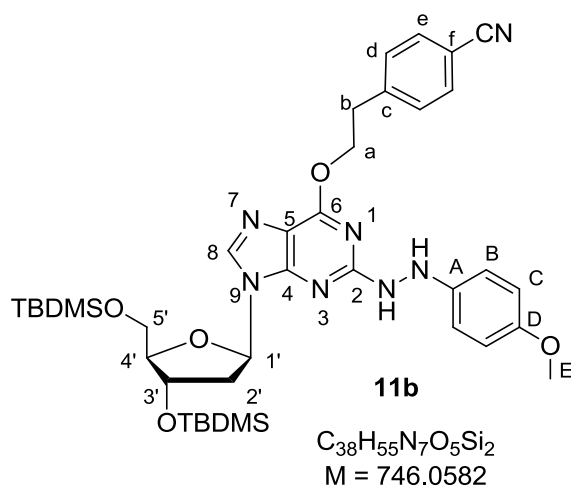
O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(4-methoxyphenyl)-2'-dG **11b**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 17 durchgeführt. Es wurden 3.00 g (4.35 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-brom-2'-dG **12** eingesetzt.

Ausbeute: 2.48 g (3.32 mmol, 76%) eines orangefarbenen Feststoffes. - **DC:** R_F-Wert (PE/EE: 1:1): 0.44. - **Smp.:** 89-91 °C. - ¹H-

NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.13 (s, 1H, H-8), 7.76-7.74 (m, 2H, H-d), 7.49-7.46 (m, 2H, H-B), 7.43-7.39 (m, 2H, H-e), 6.89-6.86 (m, 2H, H-C), 6.27 (dd, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 5.26 (s, 2H, NH), 4.61 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, H-a), 4.52-4.48 (m, 1H, H-3'), 3.85-3.86 (m, 1H,

H-4'), 3.75 (s, 3H, H-E), 3.70-3.61 (m, 2H, H-5'), 3.11 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-b), 2.95-2.85 (m, 1H, H-2'a), 2.24 (ddd, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, H-2'b), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.01 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.05, -0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - ¹³C-

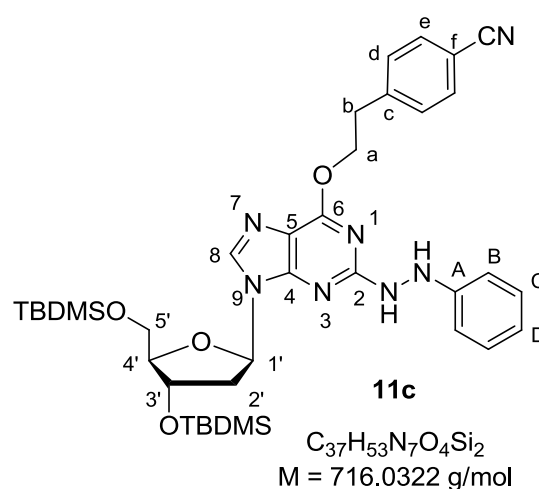


d_6): 159.2 (C-6), 158.2 (C-2), 155.6 (C-A), 153.6 (C-4), 144.0 (C-c), 140.1 (C-5), 138.3 (C-8), 132.2 (C-e), 129.9 (C-d), 125.6 (C-B), 118.8 (-CN), 115.1 (C-D), 113.6 (C-C), 109.2 (C-f), 87.3 (C-4'), 83.3 (C-1'), 72.5 (C-3'), 65.7 (C-a), 62.9 (C-5'), 55.1 (C-E), 38.3 (C-2'), 34.4 (C-b), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 20.7 (C-E), 17.6 (SiC(CH₃)₃), -4.9, -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2929, 2856, 1608, 1509, 1455, 1243, 835, 780. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 745.3803 [M], gef.: 746.3896 [M+H]⁺.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-phenylhydrazino-2'-dG 11c

Die Synthese wurde gemäß der AAV 17 durchgeführt. Es wurden 0.98 g (1.4 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-brom-2'-dG **12** eingesetzt.

Ausbeute: 723 mg (1.01 mmol, 71%) eines braunen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE: 2:1): 0.18. - **Smp.**: 84-87 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: -3 ° (c = 1.0, CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.17 (s, 1H, H-8), 7.73 (d,



³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2H, H-e), 7.46-7.30 (m, 5H, H-Ar), 7.21-7.13 (m, 2H, H-C), 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 5.34 (s, 2H, NH), 4.52 (t, 2H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, H-a), 4.47-4.43 (m, 1H, H-3'), 3.85-3.80 (m, 1H, H-4'), 3.64-3.57 (m, 2H, H-5'), 3.07 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-b), 2.90-2.82 (m, 1H, H-2'a), 2.22 (ddd, ²J_{H,H} = 13.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, H-2'b), 0.75 (s, 9H, Si(CH₃)₃ an C-3'), 0.80 (s, 9H, Si(CH₃)₃ an C-5'), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.15 (2 * s, 2 * 3H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.1 (C-6), 156.7 (C-2), 152.4 (C-D), 145.7 (C-A), 144.4 (C-f), 139.6 (C-8), 130.0 (C-C), 129.5 (C-c), 127.6 (C-d), 127.5 (C-e), 123.6 (C-4), 119.0 (C-B), 118.6 (-CN), 114.8 (C-5), 87.1 (C-4'), 84.0 (C-1'), 71.6 (C-3'), 67.8 (C-a), 62.8 (C-5'), 39.7 (C-2'), 34.3 (C-b), 25.7, 25.6 (SiC(CH₃)₃), 17.8, 17.6 (SiC(CH₃)₃), -4.8, -5.0, -5.5 (Si(CH₃)₂). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3744, 3037, 1737, 1695, 1612, 1507, 1110, 838. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 715.3698 [M], gef.: 716.3736 [M+H]⁺.

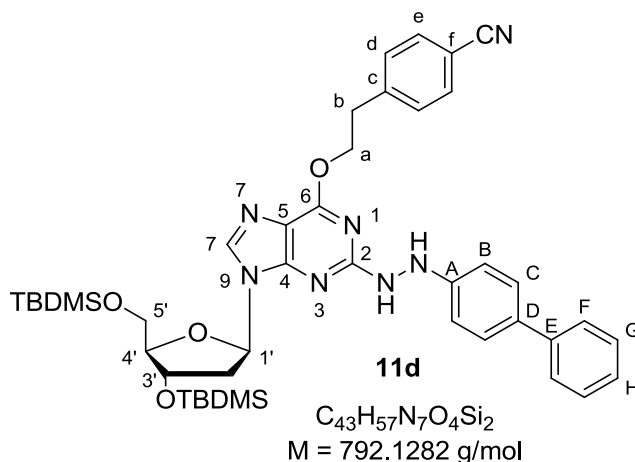
O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG **11d**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 17 durchgeführt. Es wurden 1.53 g (2.23 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-brom-2'-dG **12** eingesetzt.

Ausbeute: 1.06 g (1.34 mmol, 60%) eines orangefarbenen Feststoffes. -

DC: R_f-Wert (PE/EE: 1:1):

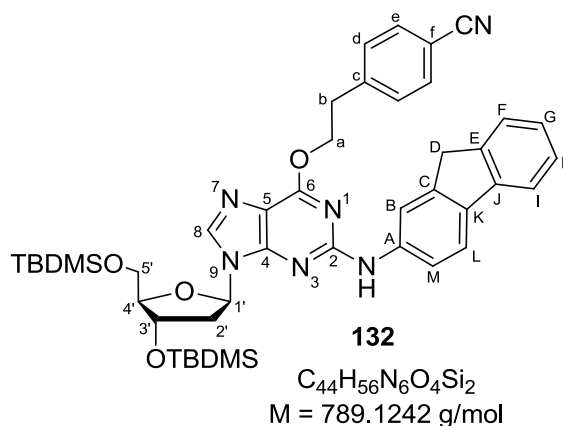
0.66. - **Smp.:** 75-78 °C. - **[α]²⁰₅₉₈:** +25 ° (c = 0.4, CHCl₃). - **¹H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.19 (s, 1H, H-8), 7.77-7.33 (m, 13H, H-Ar), 6.31 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 5.37, 5.20 (2 * s, 2 * 1H, NH), 4.70 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-a), 4.54-4.51 (m, 2H, H-3'), 3.85-3.82 (m, 1H, H-4'), 3.72-3.62 (m, 2H, H-5'), 3.17 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-b), 2.97-2.90 (m, 1H, H-2'a), 2.30-2.24 (m, 1H, H-2'b), 0.88, 0.84 (2 * s, 2 * 9H, Si(CH₃)₃), 0.10, 0.00 (2 * s, 2 * 6H, Si(CH₃)₂). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.2 (C-6), 157.5 (C-Ar), 153.1 (C-4), 148.2 (C-2), 144.1 (C-Ar), 139.7 (C-8), 132.0, 128.7, 126.1 (C-Ar), 118.7 (C-N), 115.1 (C-5), 87.1 (C-4'), 83.2 (C-1'), 72.3 (C-3'), 65.8 (C-a), 62.8 (C-5'), 38.3 (C-2'), 34.1 (C-b), 25.6, 25.5 (SiC(CH₃)₃), -5.6, -5.1 (Si(CH₃)₂). - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 791.4011 [M], gef.: 791.4035 [M]⁺.



O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(2-aminofluoren)-2'-dG **132**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 17 durchgeführt. Es wurden 1.92 g (2.78 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-brom-2'-dG **12** eingesetzt.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte nur die Verbindung **132** erhalten



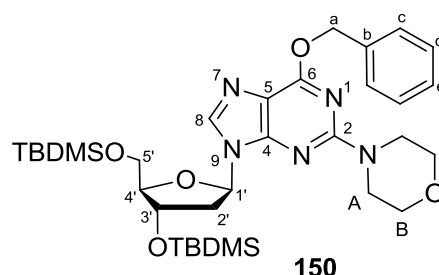
werden, nicht das gewünschte Produkt **11e**.

Ausbeute: 1.124 mg (1.424 mmol, 51%) eines orangefarbenen Feststoffes. – **DC**: R_f -Wert (PE/EE: 2:1): 0.48. – **Smp.**: 112 °C. – **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.60 (s, 1H, N-H), 8.20 (s, 1H, H-8), 8.10 (s, 1H, H-B), 7.79-7.73 (m, 4H, H-e, H-Fluoren), 7.70-7.67 (m, 1H, H-M), 7.58-7.56 (m, 2H, H-d), 7.51-7.22 (m, 3H, H-Fluoren), 6.35 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 1H, H-1'), 4.79 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, H-a), 4.57-4.55 (m, 1H, H-3'), 3.89-3.86 (m, 1H, H-4'), 3.84 (s, 2H, H-D), 3.75-3.62 (m, 2H, H-5'), 3.26 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-b), 2.97-2.91 (m, 1H, H-2'a), 2.38-2.33 (m, 1H, H-2'b), 0.92/0.81 (2s, 2*9H, SiC(CH₃)₃), 0.13/-0.03 (2d, 2*6H, SiC(CH₃)₂). – **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 159.8 (C-6), 155.4 (C-A), 153.3 (C-4), 144.2 (C-c), 143.5/142.4/141.4 (C-K/J), 139.8 (C-2), 134.6 (C-C/E), 132.3 (C-M), 130.1 (C-d), 126.7/125.6/124.8/119.8/119.0 (C-Arom-Fluoren), 118.9 (C-N), 117.7 (C-Arom-Fluoren), 115.4 (C-B), 115.2 (C-5), 109.3 (C-f), 87.2 (C-4'), 83.1 (C-1'), 72.5 (C-3'), 66.2 (C-a), 62.8 (C-5'), 38.5 (C-2') 36.5 (C-D), 34.5 (C-b), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 17.9/17.7 (SiC(CH₃)₃), -4.8/-4.9/-5.6 (SiC(CH₃)₂). – **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2928, 2856, 2227, 1737, 1588, 1537, 1453, 1391, 1310, 1230, 1072, 1025, 938, 831, 776, 730, 670, 637, 558, 421. – **HRMS** (FAB m/z): ber.: 789.3980 [M+H]⁺, gef.: 789.3955 [M+H]⁺.

9.7.4 Synthese der *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte über die nucleophile aromatische Substitution

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(morpholin)-2'-dG 150

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (0.110 mmol) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 4 mL absolutem DME gelöst und anschließend 39 μL (38 mg, 0.44 mmol) Morpholin zugefügt. Die Reaktionslösung wurde 30 Stunden bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde



$\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2$
M = 655.9754 g/mol

dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EE: 1:1). Da kein Fortschreiten der Reaktion festgestellt werden konnte, wurden zusätzlich 2 Äquiv. Morpholin zugefügt und weitere 18 Stunden bei Rt gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im

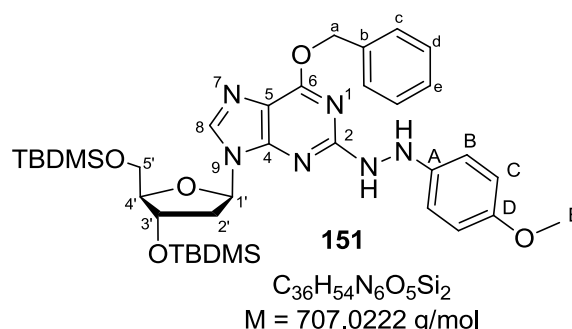
Vakuum, erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 3:1 → 1:1 → EE).

Ausbeute: 51 mg (78 µmol, 71%) eines farblosen Sirups. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[167]

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **151**

Versuch 1:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 202 mg (0.226 mmol) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 3 mL absolutem DME gelöst und anschließend 126 mg (0.912 mmol)



4-Methoxyphenylhydrazin hinzu gegeben. Die Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei 85 °C gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 4:1 → 1:1 → CH₂Cl₂/Aceton: 7:3).

O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **151** wurde nicht erhalten.

Versuch 2:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 203 mg (0.227 mmol) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 3 mL absolutem DME gelöst. Nach Zugabe von 127 mg (0.919 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazin und 296 mg (0.908 mmol, 4 Äquiv.) Cs₂CO₃ wurde die Reaktionslösung für weitere 24 h bei Rt gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 4:1 → 1:1 → CH₂Cl₂/Aceton: 7:3 → 4:6).

O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)-2- N -(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **151** wurde nicht erhalten. Es wurden jedoch 35% des O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)-2'-desoxyxanthosins **130** isoliert.

Versuch 3:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 101 mg (0.113 mmol) O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)- O^2 -tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 1.5 mL abs. DME gelöst und mit 44.0 μ L (0.444 mmol) Phenylhydrazin versetzt. Anschließend wurden 51.0 μ L (0.339 mmol) DBU hinzugegeben. Nach erfolgter Zugabe setzte eine Farbveränderung von gelb nach rosa ein. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:1) verfolgt. Anschließend wurde das erhaltene Rohprodukt in 50 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Als nächstes wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 $\rightarrow$ PE/EE 3:1 $\rightarrow$ PE/EE 1:1 $\rightarrow$ CH₂Cl₂/Aceton 7:3).

O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)-2- N -phenylhydrazino-2'-dG **151a** wurde nicht erhalten. Es wurden jedoch 8% des O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)-2'-desoxyxanthosins **130** isoliert.

Versuch 4:

Zunächst erfolgte eine Deprotonierung des Phenylhydrazins. In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1.00 mL (10.2 mmol) Phenylhydrazin bei Raumtemperatur portionsweise unter auftretender Wasserstoffentwicklung mit 242 mg (10.1 mmol) gewaschenem Natriumhydrid versetzt. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend in 10 mL abs. DME gelöst und für die weiteren Reaktionen als Reagenz verwendet. Dazu wurden 101 mg (0.113 mmol) O^6 -Benzyl-3',5'-bis- O -(TBDMS)- O^2 -tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 1 mL abs. DME gelöst und mit 500 μ L (0.508 mmol) der hergestellten Phenylhydrazinlösung versetzt. Das resultierende rote Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:1) verfolgt.

Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und das Rohproduktgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 $\rightarrow$ PE/EE 3:1 $\rightarrow$ PE/EE

1:1 → CH₂Cl₂/Aceton 7:3). O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-*N*-phenylhydrazino-2'-dG **151a** konnte nicht erhalten werden.

Versuch 5:

300 mg (1.74 mmol) des 3,5-Dimethylphenylhydrazin-Hydrochlorids wurden mit ca. 15 mL Ammoniak versetzt und dreimal mit ca. 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

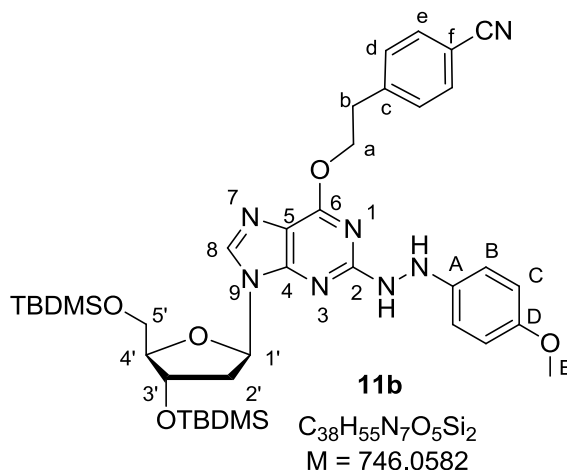
Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 68 mg (50 µmol, 1 Äquiv.) 3,5-Dimethylphenylhydrazin in 10 mL abs. 1,2-DME gelöst. In einem zweiten Kolben unter Stickstoffatmosphäre wurden 105 mg (0.112 mmol, 1 Äquiv.) O⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **127** in 5 mL abs. 1,2-DME gelöst. Die Lösung des ersten Kolbens wurde mit Hilfe eines Acetonkältebades auf -75 °C gekühlt und 0.31 mL (50 µmol, 1 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 10 min. bei -75 °C gerührt. 2.24 mL (0.112 mmol, 2 Äquiv.) dieser Lösung wurden in den zweiten Kolben überführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (PE/EE: 1:2). Nach dem die Reaktionslösung 30 min bei Rt gerührt hatte, wurden weitere 2.24 mL (0.112 mmol, 2 Äquiv.) der Hydrazin-Lösung in den zweiten Kolben überführt. Die Lösung wurde 30 min bei Rt gerührt und anschließend für 96 h auf 80 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 1:2 → 1:4 v/v → EE/CH₃OH: 1:9 v/v). Neben einem nicht trennbaren Stoffgemisch wurden auch 7 mg (7.5 µmol, 7%) des Eduktes **127** reisoliert.

O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **11b*

Versuch 1:

500 mg (2.86 mmol) des 4-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorids wurden mit ca. 15 mL Ammoniak versetzt und dreimal mit ca. 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 208 mg (0.223 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-*O*²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** in 3 mL abs. DME gelöst und anschließend 119 mg (0.861 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazin hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 26.5 h bei Rt gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). Da kein Fortschreiten der Reaktion festgestellt werden konnte, wurde die Reaktion für weitere 89 h bei 85 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 4:1 → 1:1 → CH₂Cl₂/Aceton: 7:3, v/v).



*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **11b** wurde nicht erhalten.

Versuch 2:

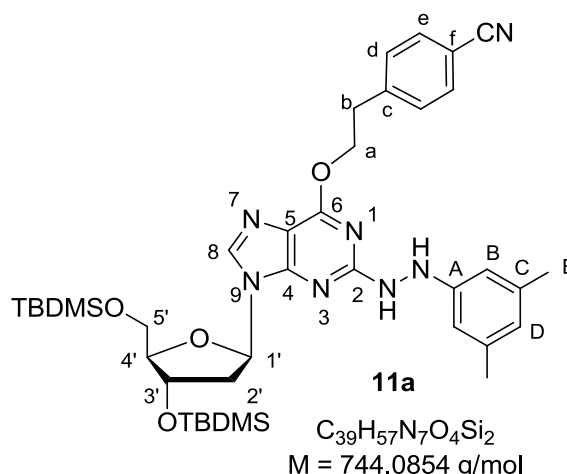
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 100 mg (0.107 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-*O*²-tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** in 1.5 mL abs. DME gelöst. Anschließend wurden zu der erhaltenen Reaktionslösung 59.0 mg (0.428 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazin sowie 64.0 µL (0.428 mmol) DBU hinzugegeben und die resultierende Reaktionslösung vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:1) verfolgt.

Infolgedessen, dass jedoch keine Produktbildung beobachtet werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen und keine weitere Analytik durchgeführt.

O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-*N*-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **11a**

Versuch 1:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 222 mg (1.29 mmol, 1 Äquiv.) 3,5-Dimethylphenylhydrazin-Hydrochlorid in 10 mL abs. Dichlormethan gelöst. In einem zweiten Kolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 152 mg (163 μ mol, 1 Äquiv.) O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)- O^2 -tris(dimethylamino)phosphor-2'-



desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** in 5 mL abs. Dichlormethan gelöst. Zur Lösung des ersten Kolbens wurden 66.6 mg (2.78 mmol, 2.1 Äquiv.) Natriumhydrid portionsweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 min bei Rt gerührt und anschließend 5 mL (0.6 mmol, 4 Äquiv.) dieser Lösung in den zweiten Kolben überführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (PE/EE: 1:1). Nach dem die Reaktionslösung 2.5 h bei Rt gerührt hatte, wurden weitere 2 mL (0.3 mmol, 1.5 Äquiv.) der Lösung aus dem ersten Kolben in den zweiten überführt. Die Reaktion wurde nach weiteren 19 h rühren bei Rt auf 35 °C zum Rückfluss erhitzt und 22 h gerührt. Anschließend wurden 0.80 mL (1.3 mmol, 7.5 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan zugetropft und 5 Tage bei 35 °C gerührt. Reaktionskontrolle mittels DC zeigte die Zersetzung des Eduktes sowie eine Vielzahl weiterer Nebenprodukte an.

Versuch 2:

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 222 mg (1.29 mmol, 1 Äquiv.) 3,5-Dimethylphenylhydrazin Hydrochlorid in 10 mL absolutem Dichlormethan gelöst. In einem zweiten Kolben unter Stickstoffatmosphäre wurden 150 mg (0.161 mmol, 1 Äquiv.) O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)- O^2 -tris(dimethylamino)phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** in 5 mL abs. Dichlormethan

gelöst. Zur Lösung des ersten Kolbens wurden 1.5 mL (2.4 mmol, 2 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan getropft und die Lösung anschließend für 15 min bei Rt gerührt. Es wurden 3 mL (0.4 mmol, 2.5 Äquiv.) der Lösung vom ersten Kolben in den zweiten Kolben überführt und 18 h bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (PE/EE: 1:2). Die Reaktionslösung wurde anschließend für 3.5 h auf 50 °C zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erfolgte die Reinigung säulenchromatographisch (PE/EE: 1:2 → 1:4; EE/CH₃OH: 1:9 v/v). Erhalten wurde ein nicht trennbares Stoffgemisch.

Versuch 3:

498 mg (1.26 mmol) des 3,5-Dimethylphenylhydrazin Hydrochlorids wurden mit ca. 15 mL Ammoniak versetzt und dreimal mit ca. 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

174.4 mg (1.26 mmol, 1 Äquiv.) des freien 3,5-Dimethylphenylhydrazins wurden unter einer Stickstoffatmosphäre in 12 mL abs. DME gelöst und 0.8 mL (1.3 mmol, 1 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan bei -10 °C zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 15 min bei -10 °C gerührt. Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 101 mg (110 µmol, 1 Äquiv.) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino) phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** wurden in 5 mL abs. DME gelöst und 4 mL (0.4 mmol, 4 Äquiv.) des deprotonierten Hydrazins langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 92 h bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EE: 1:2 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 2:1 → 1:4 v/v), welche das Produkt in einem nicht trennbaren Gemisch lieferte.

Synthese 1:

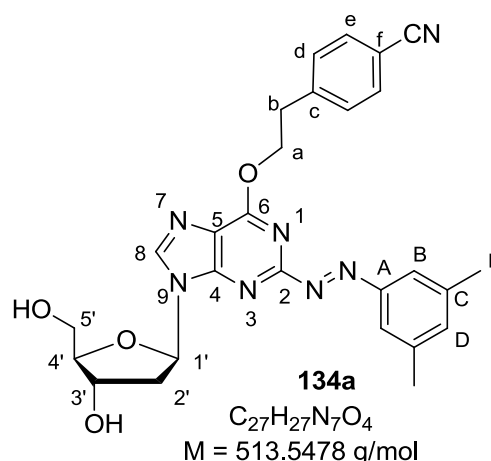
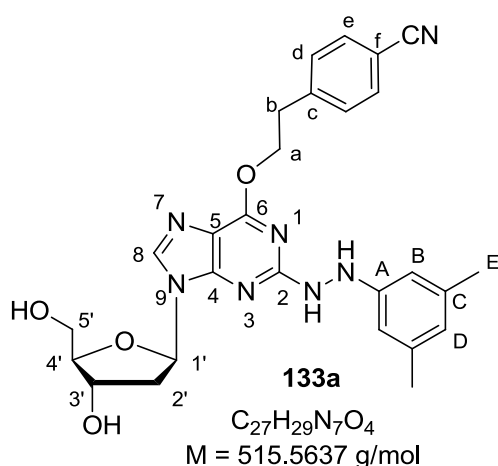
Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 225 mg (1.30 mmol, 1 Äquiv.) 3,5-Dimethylphenylhydrazin-Hydrochlorid in 10 mL abs. 1,2-DME gelöst. In einem zweiten Kolben unter Stickstoffatmosphäre wurden 105 mg (0.112 mmol, 1 Äquiv.) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-O²-tris(dimethylamino) phosphor-2'-desoxyxanthosin-Hexafluorophosphat **128** in 5 mL abs. 1,2-DME gelöst. Die Lösung des ersten Kolbens wurde mit Hilfe eines Acetonkältebades auf -75 °C gekühlt und

1.6 mL (2.6 mmol, 2 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 10 min. bei -75 °C gerührt. 1.25 mL (0.161 mmol, 1.5 Äquiv.) dieser Lösung wurden in den zweiten Kolben überführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der DC (PE/EE: 1:2). Nach dem die Reaktionslösung 30 min bei Rt gerührt hatte, wurden weitere 0.83 mL (0.107 mmol, 1 Äquiv.) der Lösung aus dem ersten Kolben in den zweiten Kolben überführt. Die Lösung wurde 30 min bei Rt gerührt und anschließend für 1.5 h auf 90 °C zum Rückfluss erhitzt. Es wurden weitere 0.8 mL (0.103 mmol, 1 Äquiv.) des ersten Kolben in den zweiten überführt (-30 °C) und die Lösung erneut 15 min bei Rt gerührt, bevor die Lösung für 15 h bei 100 °C zum Rückfluss erhitzt wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die säulenchromatographische Reinigung (PE/EE: 1:2 → 1:4 v/v; EE/CH₃OH: 1:9 v/v).

Ausbeute: 1.8 mg (2.4 µmol, 2%) eines orangefarbenen Feststoffes. - **DC**: R_F-Wert (PE/EE: 1:1): 0.50. Die weiteren analytischen Daten entsprechen den in Kap. 9.7.3 für Verbindung **11a** angegebenen Daten.

9.7.5 Überführung der *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-Addukte in die Phosphoramidite

*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **133a** und *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(3,5-dimethylphenylazo)-2'-dG **134a**



Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 18. Es wurden 1.34 g (1.80 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-2-*N*-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **11a** eingesetzt.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **133a**

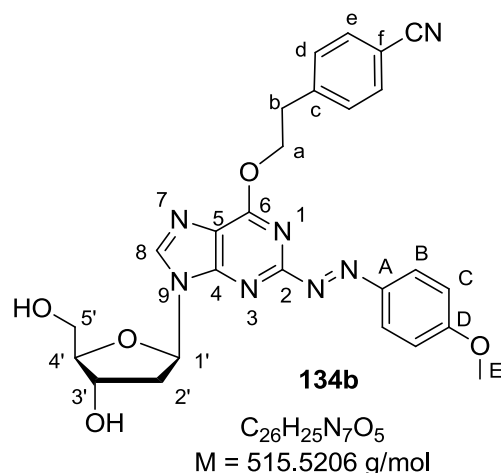
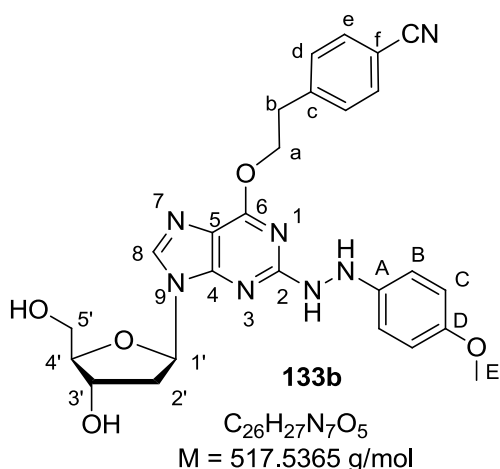
Ausbeute: 418 mg (0.81 mmol, 45%) eines beigen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.18. - **Smp.**: 101-103 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +36 ° (c = 0.15, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.22 (s, 1H, H-8), 7.75 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2H, H-e), 7.39 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 2H, H-d), 7.25 (s, 2H, H-B), 6.72 (s, 1H, H-D), 6.32 (dd, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 5.29 (d, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 5.25 (s, 2H, NH), 4.88 (t, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, 5'-OH), 4.58 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, H-a), 4.40-4.34 (m, 1H, H-3'), 3.85-3.81 (m, 1H, H-4'), 3.60-3.44 (m, 2H, H-5'), 3.13 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, H-b), 2.79-2.70 (m, 1H, H-2'a), 2.28-2.23 (m, 1H, H-2'b), 2.21 (s, 3H, H-E). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 159.0 (C-6), 157.7 (C-2), 153.2 (C-4), 144.8 (C-A), 143.9 (C-c), 140.1 (C-5), 136.4 (C-8), 132.1 (C-e), 130.0 (C-d), 124.8 (C-D), 121.4 (C-B), 118.8 (-CN), 114.7 (C-C), 109.2 (C-f), 87.6 (C-4'), 83.2 (C-1'), 70.7 (C-3'), 65.9 (C-a), 61.6 (C-5'), 38.5 (C-2'), 34.3 (C-b), 20.9 (C-E). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3253, 2916, 2185, 1577, 1388, 1240, 1054, 931, 840, 638, 558. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 515.2281 [M], gef.: 516.2325 [M+H]⁺.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(3,5-dimethylphenylazo)-2'-dG **134a**

Ausbeute: 278 mg (0.540 mmol, 30%) eines orange-roten Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.19. - **Smp.**: 98-99 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +35 ° (c = 0.18, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆): 8.71 (s, 1H, H-8), 7.77 (d, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 2H, H-e), 7.64-7.56 (m, 3H, H-B und H-d), 7.30 (s, 1H, H-D), 6.48 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.45-5.29 (m, 1H, 3'-OH), 5.09-4.92 (m, 1H, 5'-OH), 4.88 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-a), 4.48-4.42 (m, 1H, H-3'), 3.93-3.88 (m, 1H, H-4'), 3.66-3.52 (m, 2H, H-5'), 3.28 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-b), 2.79-2.70 (m, 1H, H-2'a), 2.41 (s, 6H, H-E), 2.38-2.32 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 160.8 (C-6), 160.1 (C-2), 152.4 (C-A), 152.0 (C-4), 144.1 (C-5), 138.9 (C-f), 134.1 (C-D), 132.1 (C-e), 130.0 (C-d), 120.6 (C-B), 118.8 (-CN), 109.2 (C-c), 88.0 (C-4'), 83.8 (C-1'), 70.5 (C-3'), 66.8 (C-a), 61.4 (C-5'), 39.1 (C-2'), 34.3 (C-b), 20.6 (C-E). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3331, 2917, 2227, 1593, 1410, 1342, 1229, 1055, 939, 825, 636. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 513.2125 [M], gef.: 514.2192 [M+H]⁺.

Des Weiteren wurden 102 mg (0.198 mmol, 11%) als Mischfraktion erhalten.

***O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **133b** und
*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG **134b****



Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 18. Es wurden 2.67 g (3.58 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **11b** eingesetzt.

*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **133b**

Ausbeute: 755 mg (1.46 mmol, 51%) eines beigen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert: (CH_2Cl_2/CH_3OH : 9:1): 0.14. - **Smp.**: 128-130 °C. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$): 8.19 (s, 1H, H-8), 7.73 (d, $^3J_{H,H} = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H-d), 7.47 (d, $^3J_{H,H} = 9.1 \text{ Hz}$, 2H, H-B), 7.39 (d, $^3J_{H,H} = 8.0 \text{ Hz}$, 2H, H-e), 6.89 (d, $^3J_{H,H} = 9.1 \text{ Hz}$, 2H, H-C), 6.27 (dd, $^3J_{H,H} = 6.9 \text{ Hz}$, $^3J_{H,H} = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 5.29 (d, $^3J_{H,H} = 7.0 \text{ Hz}$, 1H, 3'-OH), 5.26 (s, 2H, NH), 4.88 (t, d, $^3J_{H,H} = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, 5'-OH), 4.58 (t, $^3J_{H,H} = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H-a), 4.40-4.35 (m, 1H, H-3'), 3.85-3.81 (m, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, H-E), 3.58-3.46 (m, 2H, H-5'), 3.10 (t, $^3J_{H,H} = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H-b), 2.77-2.69 (m, 1H, H-2'a), 2.23 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.1 \text{ Hz}$, $^3J_{H,H} = 6.1 \text{ Hz}$, $^3J_{H,H} = 3.0 \text{ Hz}$, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, $DMSO-d_6$): 159.2 (C-6), 158.2 (C-2), 155.7 (C-A), 153.4 (C-4), 144.1 (C-c), 140.1 (C-5), 138.4 (C-8), 132.1 (C-e), 130.0 (C-d), 125.7 (C-B), 118.8 (-CN), 114.6 (C-D), 113.0 (C-C), 109.2 (C-f), 87.7 (C-4'), 83.2 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.6 (C-a), 61.8 (C-5'), 55.1 (C-E), 38.0 (C-2'), 34.4 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3112, 2836, 2226, 1613, 1580, - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 517.2074 [M], gef.: 518.2146 [M+H]⁺.

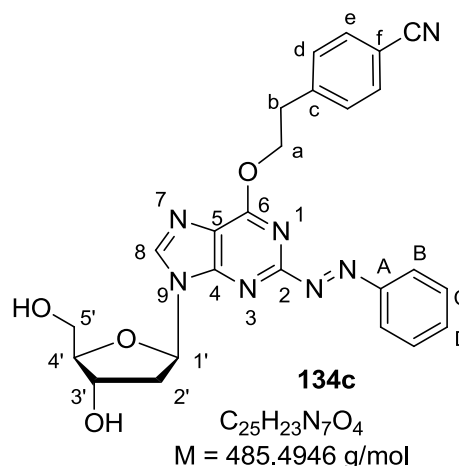
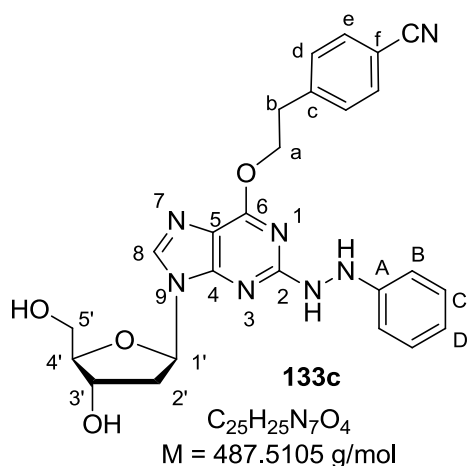
*O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG **134b**

Ausbeute: 345 mg (0.67 mmol, 23%) eines orange-roten Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert: (CH_2Cl_2/CH_3OH : 9:1): 0.15. - **Smp.**: 116-118 °C. - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz,

DMSO-*d*₆): 8.69 (s, 1H, H-8), 8.00 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 2H, H-d), 7.78 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, 2H, H-B), 7.59 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 2H, H-e), 7.18 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, 2H, H-C), 6.48 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.38-5.34 (m, 1H, 3'-OH), 4.99-4.95 (m, 1H, 5'-OH), 4.89 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2H, H-a), 4.48-4.42 (m, 1H, H-3'), 3.90 (s, 3H, H-E), 3.66-3.52 (m, 3H, H-4', H-5'), 3.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-b), 2.77-2.69 (m, 1H, H-2'a), 2.35 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 163.3 (C-6), 161.1 (C-2), 160.2 (C-A), 152.3 (C-4), 146.3 (C-c), 144.2 (C-5), 143.1 (C-8), 132.2 (C-e), 130.0 (C-d), 125.5 (C-B), 118.9 (-CN), 114.8 (C-D), 113.7 (C-C), 109.3 (C-f), 88.1 (C-4'), 83.9 (C-1'), 70.6 (C-3'), 66.8 (C-a), 61.6 (C-5'), 55.7 (C-E), 34.4 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹]: 2928, 2226, 1597, 1503, 1342, 1239, 1139, 1057, 839. - **HRMS** (FAB, *m/z*): ber.: 515.1917 [M], gef.: 516.2005 [M+H]⁺.

Des Weiteren wurden 206 mg (0.40 mmol, 14%) als Mischfraktion erhalten.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-phenylhydrazino-2'-dG 133c **133c** **und**
O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-phenylazo-2'-dG 134c



Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 18. Es wurden 1.00 g (1.40 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-O-(TBDMS)-2-*N*-phenylhydrazino-2'-dG **11c** eingesetzt.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-phenylhydrazino-2'-dG 133c

Ausbeute: 382 mg (0.784 mmol, 56%) eines beigen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.25. - **Smp.**: 95-99 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +34 ° (c = 1.0, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.22 (s, 1H, H-8), 7.75 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 2H, H-e), 7.64 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, 2H, H-B), 7.41 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 2H, H-d), 7.35-7.29 (m, 2H, H-C), 7.07 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz,

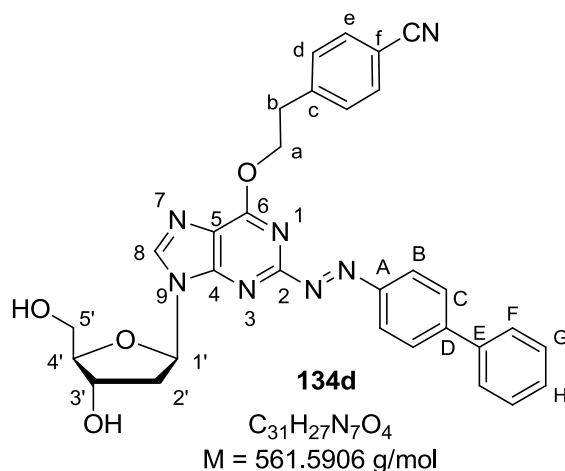
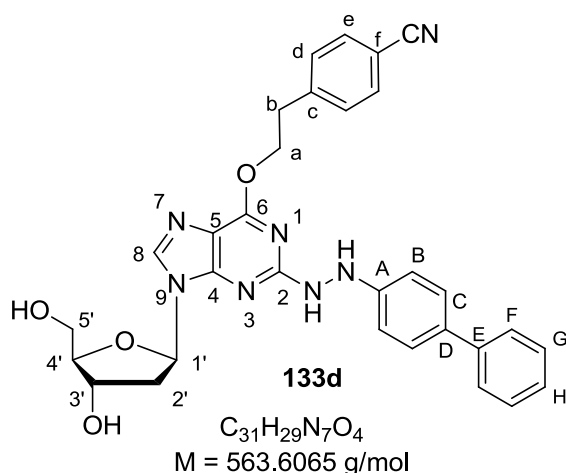
$^4J_{H,H} = 1.1$ Hz, 1H, H-D), 6.31 (dd, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.34-5.26 (m, 3H, NH, 3'-OH), 4.94-4.84 (m, 1H, 5'-OH), 4.62 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, H-a), 4.40-4.35 (m, 1H, H-3'), 3.86-3.81 (m, 1H, H-4'), 3.60-3.44 (m, 2H, H-5'), 3.12 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, H-b), 2.78-2.73 (m, 1H, H-2'a), 2.24 (ddd, $^2J_{H,H} = 13.2$, $^3J_{H,H} = 6.2$, $^3J_{H,H} = 3.0$ Hz, 1H, H-2'b). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 159.1 (C-6), 157.7 (C-2), 145.1 (C-A), 144.0 (C-f), 139.6 (C-8), 132.2 (C-e), 130.0 (C-d), 127.7 (C-C), 123.7 (C-B), 123.3 (C-D), 119.5 (C-4), 118.8 (CN), 114.9 (C-5), 109.2 (C-c), 87.7 (C-4'), 83.2 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.7 (C-a), 61.7 (C-5'), 38.7 (C-2'), 34.4 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 3403, 2361, 2227, 1653, 1611, 1577, 1507, 1395, 1241, 1056. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 487.1968, gef.: 488.2046 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-phenylazo-2'-dG **134c**

Ausbeute: 68 mg (0.14 mmol, 10%) eines orangefarbenen Feststoffes. - **DC**: R_f -Wert: ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1 v/v): 0.26. - **Smp.**: 95-99 °C. - **$[\alpha]^{20}_{598}$** : +71 ° ($c = 1.0$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 1:1). - **$^1\text{H-NMR}$** : δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 8.72 (s, 1H, H-8), 8.01-7.98 (m, 2H, H-B), 7.79 (d, $^3J_{H,H} = 8.3$ Hz, 2H, H-e), 7.70-7.65 (m, 2H, H-C), 7.64-7.62 (m, 1H, H-D), 7.60 (d, $^3J_{H,H} = 8.3$ Hz, 2H, H-d), 6.48 (dd, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 5.39-5.30 (m, 1H, 3'-OH), 5.01-4.92 (m, 1H, 5'-OH), 4.89 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 2H, H-a), 4.46-4.42 (m, 1H, H-3'), 3.92-3.88 (m, 1H, H-4'), 3.58-3.49 (m, 2H, H-5'), 3.29-3.27 (m, 2H, H-b), 2.78-2.70 (m, 1H, H-2'a), 2.40-2.31 (m, 1H, H-2'b). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 160.4 (C-6), 152.2 (C-Ar), 144.8 (C-f), 132.1 (C-e), 130.1 (C-d), 129.6 (C-C), 123.1 (C-B), 119.3 (-CN), 109.3 (C-c), 86.1 (C-1'), 83.8 (C-4'), 70.5 (C-3'), 66.9 (C-a), 61.5 (C-5'), 39.1 (C-2'), 34.3 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 3886, 3854, 3744, 3752, 3675, 3447, 1701, 1654, 1597, 1437. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 485.4946, gef.: 486.1890 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Des Weiteren wurden 74 mg (0.15 mmol, 11%) als Mischfraktion erhalten.

O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG **133d** und *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-biphenylazo)-2'-dG **134d*



Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 18. Es wurden 1.06 g (1.34 mmol) *O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis-*O*-(TBDMS)-2-*N*-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG **11d** eingesetzt.

O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-*N*²-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG **133d*

Ausbeute: 300 mg (0.533 mmol, 40%) eines beigen Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.16. - **Smp.**: 90 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +54 ° (c = 0.8, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.25 (s, 1H, H-8), 7.77-7.32 (m, 13H, H-Ar), 6.34 (dd, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.76, 5.37 (2 * s, 2 * 1H, NH), 5.30 (d, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 4.90 (t, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, 5'-OH), 4.66 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-a), 4.41-4.38 (m, 1H, H-3'), 3.86-3.83 (m, 1H, H-4'), 3.58-3.49 (m, 2H, H-5'), 3.15 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-b), 2.97-2.79 (m, 1H, H-2'a), 2.29-2.23 (m, 1H, H-2'b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 159.1 (C-6), 155.6 (C-2), 153.2 (C-4), 144.1 (C-A), 139.7 (C-8), 134.6 (C-Ar), 130.0 (C-B, C-F), 118.8 (C-5), 116.2 (CN), 109.1 (C-D), 87.6 (C-4'), 83.1 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.8 (C-a), 61.7 (C-5'), 39.7 (C-2'), 34.4 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3448, 2922, 2857, 2227, 1718, 1609, 1384, 1238, 1105, 832, 763, 701. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 563.2281 [M], gef.: 563.2402 [M].

O*⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-biphenylazo)-2'-dG **134d*

Ausbeute: 145 mg (0.258 mmol, 19%) eines orange-roten Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.17. - **Smp.**: 92 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +4 ° (c = 1.2, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.15 (s, 1H, H-8), 7.86-7.62 (m, 13H,

H-Ar), 6.38 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 5.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.90 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.79 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-a), 4.50-4.43 (m, 1H, H-3'), 3.97-3.93 (m, 1H, H-4'), 3.67-3.63 (m, 2H, H-5'), 3.26 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 2H, H-b), 3.02-2.94 (m, 1H, H-2'a), 2.41-2.35 (m, 1H, H-2'b). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, DMSO- d_6): 159.2 (C-6), 157.5 (C-Ar), 153.1 (C-4), 148.2 (C-2), 144.1 (C-Ar), 139.7 (C-8), 132.0, 128.7, 126.1 (C-Ar), 118.7 (CN), 115.1 (C-5), 87.1 (C-4'), 83.2 (C-1'), 72.3 (C-3'), 65.8 (C-a), 62.8 (C-5'), 38.3 (C-2'), 34.1 (C-b). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 3473, 1718, 1637, 1384, 1237, 1150, 767, 701, 636. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 561.2125 [M], gef.: 561.3241 [M].

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG 135a

Die Synthese wurde gemäß der AAV 19 durchgeführt. Es wurden 450 mg (0.873 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **133a** eingesetzt.

Ausbeute: 479 mg (0.585 mmol, 67%)

eines gelben Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.79. - **Smp.**: 132-

134 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: +17 ° (c = 0.19, CHCl₃).

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6):

8.01 (s, 1H, H8), 7.78-6.62 (m, 20H, H-

Ar), 6.09 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$

Hz, 1H, H-1'), 5.27 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, 1H,

3'-OH), 4.38-4.30 (m, 2H, H-a), 4.18-4.12

(m, 1H, H-3'), 4.38-4.33 (m, 1H, H-4'),

3.65-3.57 (m, 8H, H-5' und OCH₃), 2.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, H-b), 2.70-2.62 (m, 1H,

H-2'a), 2.34-2.26 (m, 1H, H-2'b), 2.14 (s, 6H, H-E). - $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz,

DMSO- d_6): 158.5 (C-6), 158.0 (C-5), 157.5 (C-4), 146.1 (C-2), 144.9, 144.7 (C-Ar),

138.5 (C-8), 136.3 (C-A), 136.2, 135.6 (C-Ar), 132.2 (C-e), 130.5, 129.9, 129.7,

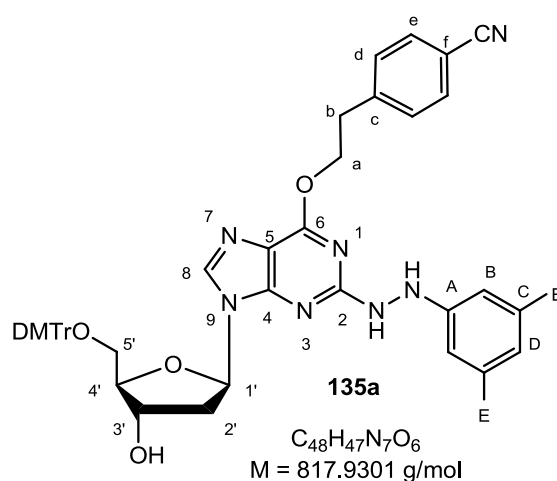
129.5, 129.2, 127.7, 126.8, 125.0 (C-Ar), 118.9 (C-f), 113.0, 112.2 (C-Ar), 109.3

(-CN), 86.0 (C-4'), 82.1 (C-1'), 70.9 (C-3'), 65.7 (C-a), 54.9 (OCH₃), 39.9 (C-2'), 34.2

(C-b), 20.8 (C-E). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr): 2930, 2227, 1606, 1577, 1506, 1441,

1244, 1174, 1031, 825, 700, 581. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 817.35 [M], gef.: 818.7

[M+H]⁺.



O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135b**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 19 durchgeführt. Es wurden 350 mg (0.676 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **133b** eingesetzt.

Ausbeute: 504 mg (0.615 mmol, 91%)

eines gelben Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert

(CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.74. - **¹H-NMR**:

δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.99 (s,

1H, H8), 7.73-6.60 (m, 21H, H-Ar),

6.09 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz,

1H, H-1'), 5.23 (d, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, 1H,

3'-OH), 4.33 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 2H, H-a),

4.12-4.07 (m, 1H, H-3'), 3.97-3.92 (m,

1H, H-4'), 3.72-3.58 (m, 11H, H-5', H-E

und OCH₃), 2.94 (t, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, H-b), 2.66-2.60 (m, 1H, H-2'a), 2.22-2.16 (m,

1H, H-2'b). - **¹³C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*₆): 158.54 (C-6), 158.0 (C-2),

157.4 (C-A), 156.6 (C-4), 144.9, 144.7, 143.9 (C-Ar), 140.1 (C-5), 136.4 (C-8), 132.1

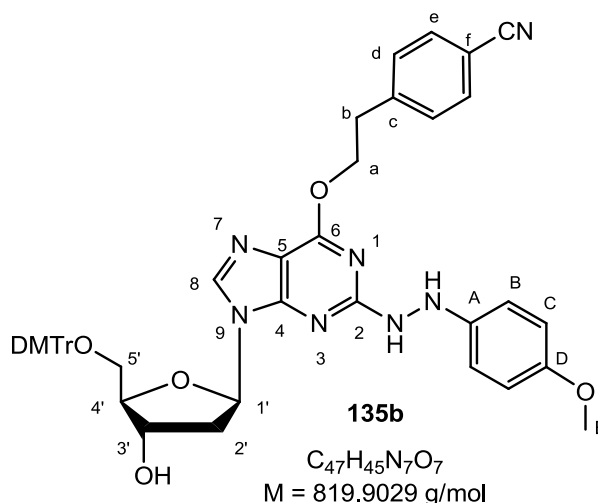
(C-e), 130.0 (C-d), 129.9, 129.5, 129.1, 128.7, 127.6 (C-Ar), 125.7 (C-B), 118.9 (-

CN), 113.1, 113.0, 112.8, 112.3 (C-Ar), 109.2 (C-f), 85.4 (C-4'), 83.3 (C-1'), 65.4 (C-

a), 61.8 (C-5'), 55.1 (C-E), 54.9, 54.8 (OCH₃), 39.0 (C-2'), 34.3 (C-b). - **IR**:

Wellenzahl [cm⁻¹]: 2948, 2219, 1602, 1582, 1505, 1437, 1230, 1162, 1029, 831, 565.

- **MS** (FAB, m/z): ber.: 819.3380 [M], gef.: 820.3469 [M+H]⁺.



O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-phenylhydrazino-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135c**

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 19. Es wurden 300 mg (0.615 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-phenylhydrazino-2'-dG **133c** eingesetzt.

Ausbeute: 384 mg (0.486 mmol, 79%) eines gelben Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert:

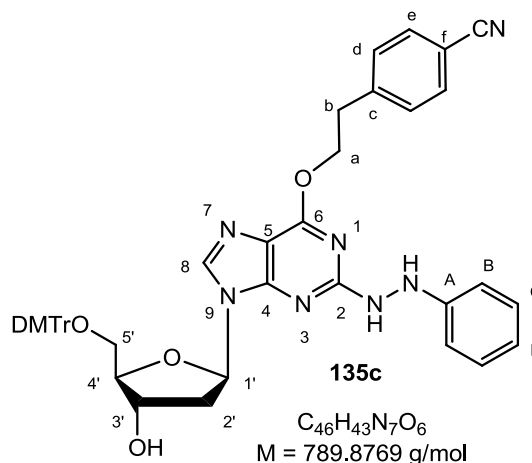
(CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.84. - **Smp.**: 124-125 °C. - **[α]²⁰₅₉₈**: -19 ° (c = 1.2,

CHCl₃). - **¹H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.01 (s, 1H, H-8), 7.35 - 7.16 (m,

22H, H-Ar), 6.09 (dd, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 5.75 (s, 2H, NH), 5.26

(d, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, 3'-OH), 4.35 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-a), 4.15-4.06 (m, 1H, H-

3'), 3.98-3.91 (m, 1H, H-4'), 3.60-3.55 (m, 8H, OCH₃ und H-5'), 2.95 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, H-b), 2.69-2.59 (m, 1H, H-2'a), 2.25-2.14 (m, 1H, H-2'b). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d₆): 158.5 (C-6), 157.9 (C-Ar), 157.3 (C-8), 152.9 (C-4), 144.8, 143.8 (C-Ar), 141.5 (C-8), 136.2, 135.5 (C-Ar), 132.1 (C-e), 130.3, 129.6, 129.0, 127.6, 124.9, 113.0, 112.2 (C-Ar), 109.2 (C-d), 86.5 (C-4'), 79.2 (C-1'), 71.1 (C-3'), 65.4 (C-a), 60.9 (C-5'), 54.9, 39.1 (C-2'), 34.2 (C-b). - IR: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3447, 2930, 2834, 2361, 2227, 1609, 1579, 1507, 1442, 1382, 1300, 1249, 1176, 1070, 1033, 827, 789. - HRMS (FAB, m/z): ber.: 789.3275 [M], gef.: 790.3353 [M+H]⁺.



O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-biphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxy-trityl-2'-dG **135d**

Die Synthese erfolgte gemäß der AAV 19. Es wurden 300 mg (0.532 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG **133d** eingesetzt.

Ausbeute: 317 mg (0.367 mmol, 69%)

eines orangefarbenen Feststoffes. -

DC: R_f-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1):

0.87. - Smp.: 112 °C. - [α]₅₉₈²⁰: -69 °

(c = 1.6, CH₂Cl₂/CH₃OH: 1:1). - ¹H-

NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆):

8.15 (s, 1H, H-8), 7.86-6.62 (m, 26H,

H-Ar), 6.38 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} =

6.4 Hz, 1H, H-1'), 5.36 (d, ³J_{H,H} = 4.5

Hz, 1H, 3'-OH), 4.79 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-a), 4.50-4.43 (m, 1H, H-3'), 3.97-3.93

(m, 1H, H-4'), 3.67-3.63 (m, 8H, H-5', OCH₃), 3.26 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-b), 3.02-

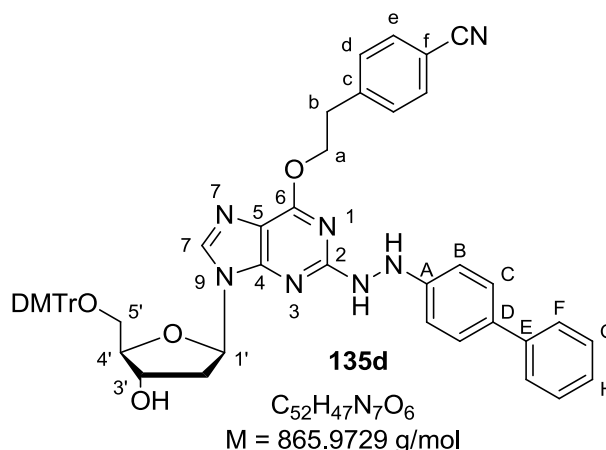
2.94 (m, 1H, H-2'a), 2.41-2.35 (m, 1H, H-2'b). - ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-

d₆): 159.1 (C-6), 155.6 (C-2), 153.2 (C-4), 144.1 (C-A), 139.7 (C-8), 135.6 (C-Ar),

134.6, 130.0 (C-B, C-F), 127.8, 122.3 (C-Ar), 118.8 (C-5), 116.2 (CN), 109.1 (C-d),

87.6 (C-4'), 83.1 (C-1'), 70.8 (C-3'), 65.8 (C-a), 61.7 (C-5'), 39.7 (C-2'), 34.4 (C-b). -

IR: Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3416, 1637, 1617, 1560, 1508, 1458, 1384, 1314, 1247,



1175, 1075, 619, 477. - **HRMS** (FAB, m/z): ber.: 865.3588 [M], gef.: 866.3625 [M+H]⁺.

3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(N,N'-diisopropylamino)-phosphinyl]-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2-N-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-2'-dG **10a**

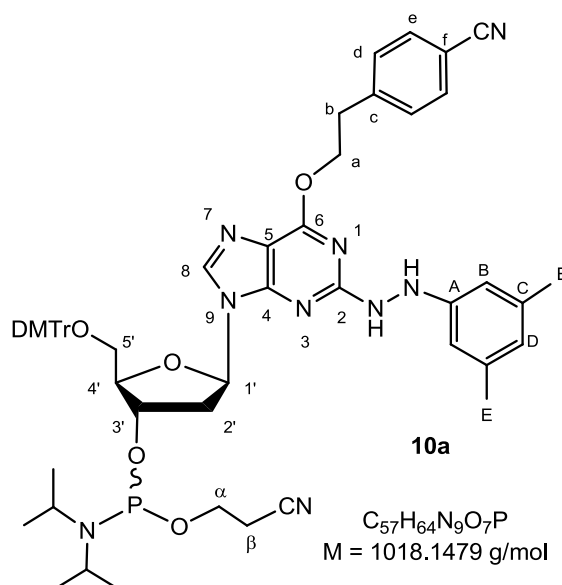
Die Synthese wurde gemäß der AAV 20 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.367 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(3,5-dimethylphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135a** eingesetzt.

Ausbeute: 316 mg (0.311 mmol, 85%)
eines beigen Feststoffes, welcher als
Diastereomerengemisch (I+II) vorliegt. –

DC: R_F-Wert (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.82 .

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, Benzol-*d*₆):

7.88 (s, 1H, H-8 (I)), 7.85 (s, 1H, H-8 (II)),
7.75-6.50 (m, 48 H, DMTr-H (I+II), H-Ar
(I+II)), 6.34-6.29 (m, 2H, H-1' (I+II)), 4.57
-4.49 (m, 2H, H-3' (I+II)), 4.34-4.31 (m,
2H, H-4' (I+II)), 4.30-4.16 (m, 4H, H-a
(I+II)), 3.69-3.09 (m, 28H, OCH₃(I+II), H-b
(I+II), H-5' (I+II), *i*Pr-H (I+II) und H-α (I+II)),



2.57-2.54 (m, 2H, H-2'a+b (I+II)), 2.23 (s,
12H, H-E (I+II)), 1.83-1.64 (m, 4H, H-β (I+II)), 1.15-1.064 (m, 26H, CH₃/Pr (I+II)). –

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 160.1, 159.3, 159.0, 158.7, 158.6, 154.3,
153.3, 148.2, 148.1, 146.2, 145.9, 145.3, 143.5, 143.3, 139.7, 137.5, 137.2, 137.0,
136.1, 131.5, 131.4, 130.6, 130.2, 129.7, 128.7, 128.6, 127.4, 127.2, 126.9, 126.5,
119.0, 113.7, 113.5, 112.9, 110.8, 86.0, 83.6, 74.4, 66.1, 64.3, 63.0, 58.6, 54.8, 43.5,
39.9, 35.1, 24.7, 24.6, 21.3, 21.2, 20.0. – **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆):
149.08, 148.94 (I+II). – **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2930, 2227, 1607, 1578, 1506, 1376,
1244, 1174, 1031, 826, 753, 701, 581. - **MS** (ESI⁺, m/z): ber.: 1017.4 [M], gef.:
1040.2 [M+Na]⁺.

3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(N,N'-diisopropylamino)-phosphinyl]-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG **10b**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 20 durchgeführt. Es wurden 296 mg (0.361 mmol) O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135b** eingesetzt.

Ausbeute: 299 mg (0.292 mmol, 81%)

eines beigen Feststoffes, welcher als Diastereomerengemisch (I+II) vorliegt. –

DC: R_f -Wert (CH_2Cl_2/CH_3OH : 9:1):0.85. –

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, Benzol- d_6):

7.85 (s, 1H, H-8 (I)), 7.82 (s, 1H, H-8 (II)),

7.73-6.54 (m, 48 H,DMTr-H (I+II), H-Ar

(I+II)), 6.30-6.25 (m, 2H, H-1' (I+II)), 4.67-

4.64 (m, 2H, H-3' (I+II)), 4.44-4.41 (m, 2H,

H-4' (I+II)), 4.17-4.07 (m, 4H, H-a (I+II)),

3.34-3.29 (m, 28H, OCH₃(I+II), H-b (I+II),

H-5' (I+II), iPr-H (I+II) und H- α (I+II)), 2.45-2.40 (m, 2H, H-2'a+b (I+II)), 1.82-1.64 (m,

4H, H- β (I+II)), 1.15-1.07 (m, 26H, CH₃iPr (I+II)). – **^{13}C -NMR:** δ [ppm] (101 MHz,

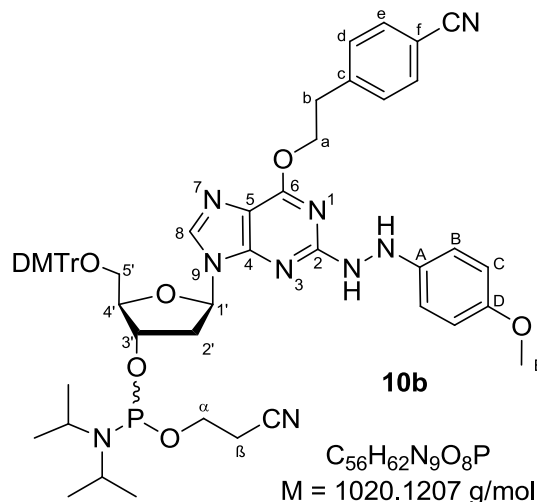
Benzol- d_6): 159.3, 158.7, 132.0, 131.4, 130.7, 130.6, 130.2, 129.8, 128.7, 127.5, 127.3, 126.6, 113.7, 113.4, 113.0, 66.0, 55.0, 54.9, 54.8, 54.8, 43.7, 43.6, 35.2, 24.6.

– **^{31}P -NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol- d_6): 149.08, 148.91 (I+II). – **IR:** Wellenzahl

[cm^{-1}]: 2963, 2834, 2227, 1606, 1578, 1506, 1442, 1380, 1296, 1242, 1175, 1116,

1030, 976, 935, 827, 788, 754, 726, 702, 680, 639, 581, 524, 419. – **MS** (ESI⁺, m/z):

ber.: 1041.43 [M], gef.: 1042.56 [M+Na]⁺.



3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(N,N'-diisopropylamino)-phosphinyl]-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2-N-phenylhydrazino-2'-dG 10c

Die Synthese wurde gemäß der AAV 20 durchgeführt. Es wurden 330 mg (0.420 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-phenylhydrazino-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135c** eingesetzt.

Ausbeute: 312 mg (0.315 mmol, 75%)

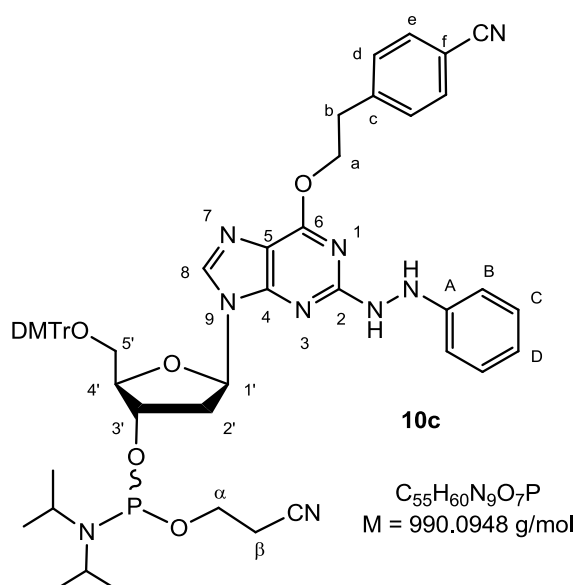
eines beigen Feststoffes, welcher als Diastereomerengemisch (I+II) vorliegt. -

DC: R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH: 9:1): 0.93.

- **Smp.:** 68-71 °C. - **¹H-NMR:** δ [ppm]

(400 MHz, Benzol-*d*₆): 7.84 (s, 1H, H-8 (I)), 7.81 (s, 1H, H-8 (II)), 7.71-7.41 (m, 44H, H-Ar (I+II), DMTr-H (I+II)), 6.25 (dd, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 2H, H-1' (I+II)), 4.74-4.58 (m, 2H, NH (I)), 4.47-4.37 (m, 2H, NH (II)), 4.16-4.05 (m, 4H, H-a (I+II)), 3.58-3.35 (m, 12H, -OCH₃, H-5' (I-II), H-b (I)), 3.15-3.02 (m, 2H, H-b (II)), 2.54-2.29 (m, 12H, *i*Pr-H (I+II), H-α (I+II), H-2' (I+II)), 1.81 (t, 2H, H-β (I)), 1.73 (m, 2H, H-β (II)), 1.15-1.01 (m, 24H, CH₃*i*Pr (I+II)). - **¹³C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-*d*₆): 160.1, 159.3, 158.7, 148.2, 145.8, 143.3, 138.0, 137.4, 136.1, 132.0, 131.4, 130.6, 130.1, 129.8, 119.0, 113.7, 113.0, 111.0, 87.1, 74.4, 74.2, 66.0, 54.8, 45.3, 43.6, 35.1, 24.7, 24.6, 22.8. - **³¹P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, Benzol-*d*₆): 149.35, 149.19 (I+II). - **IR:** Wellenzahl [cm⁻¹] (KBr): 3870, 3816, 3752, 3744, 3676, 3447, 2966, 1654, 1609, 1581, 1508, 1465, 1383, 1250, 1179, 1034, 829. - **MS** (FAB, m/z):

ber.: 989.4 [M], gef.: 990.5 [M+H]⁺.



3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(N,N'-diisopropylamino)-phosphinyl]-O⁶-2-(4-cyanophenyl)ethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2-N-(4-biphenylhydrazino)-2'-dG 10d

Die Synthese wurde gemäß der AAV 20 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.354 mmol) O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-biphenylhydrazino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-dG **135d** eingesetzt.

Ausbeute: 238 mg (0.223 mmol, 63%)

eines beigen Feststoffes, welcher als Diastereomerengemisch (I+II) vorliegt.

- **DC**: R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1):

0.84. - **Smp.**: 75-78 °C. - **$^1\text{H-NMR}$** : δ

[ppm] (400 MHz, Benzol- d_6): 7.84 (s, 1H, H-8 (I)), 7.82 (s, 1H, H-8 (II)),

7.62-6.58 (m, 52H, DMTr-H (I+II), H-Ar

(I+II)), 6.29-6.19 (m, 2H, H-1' (I+II)),

5.76, 5.37 (2 * s, 2 * 2H, NH (I+II)),

5.04-5.01 (m, 2H, H-3' (I+II)), 4.60-

4.50 (m, 4H, H-a (I+II)), 4.13-4.08 (m, 2H, H-4' (I+II)), 3.52-3.17 (m, 20H, OCH₃ (I+II),

H-b (I+II), H-5' (I+II)), 2.98-2.93 (m, 1H, H-2'a (I)), 2.89-2.84 (m, 1H, H-2'a (II)), 2.71-

2.68 (m, 8H, *i*Pr-H (I+II), H- α (I+II)), 2.56-2.48 (m, 1H, H-2'b (I)), 2.41-2.34 (m, 1H, H-

2'b (II)), 1.73-1.67 (m, 4H, H- β (I+II)), 1.13-1.05 (m, 24H, CH₃/*i*Pr (I+II)). - **$^{13}\text{C-NMR}$** : δ

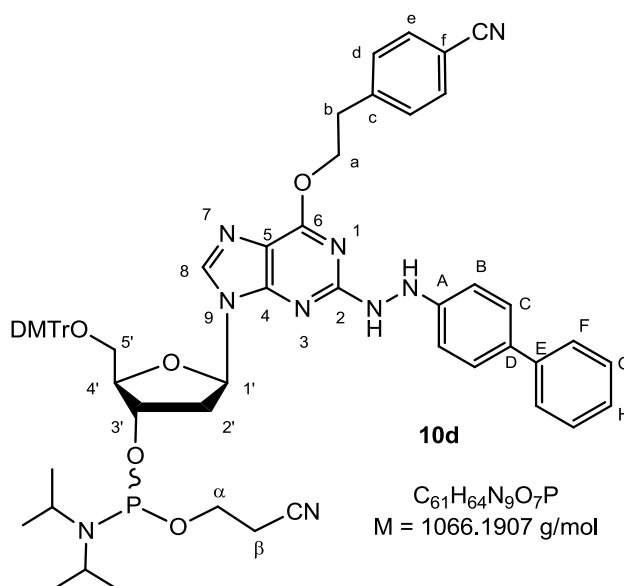
[ppm] (101 MHz, Benzol- d_6): 159.1, 155.6, 153.2, 144.1, 139.7, 135.6, 134.6, 130.0,

127.8, 122.3, 118.8, 116.2, 109.1, 87.6, 83.1, 70.8, 65.8, 61.7, 39.7, 34.4. - **$^{31}\text{P-NMR}$** :

δ [ppm] (162 MHz, Benzol- d_6): 149.87, 149.09 (I+II). - **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}] (KBr):

3744, 3675, 2966, 1607, 1457, 1200, 1077, 978. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 1065.5 [M],

gef.: 1066.6 [M+H]⁺.



9.7.6 Synthesen zu den *N*²-Arylamin-modifizierten 2'-dG-5'-Triphosphaten

5-Chlorsalicylalkohol 155

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde zu einer Suspension von

2.20 g (58.0 mmol, 2 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 66 mL

abs. THF eine Lösung aus 4.99 g (28.9 mmol, 1 Äquiv.)

5-Chlorsalicylsäure **156** in 33 mL abs. THF zugetropft. Nach

vollständiger Zugabe wurde 16 h bei Rt gerührt. Anschließend

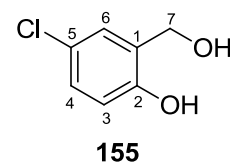
wurde zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Daraufhin wurde mit Eis hydrolysiert und

mit ca. 80 mL Schwefelsäure (10%ig) ein pH-Wert von 1 eingestellt. Die wässrige

Phase wurde dreimal mit je ca. 25 mL Ethylacetat extrahiert und die organische

Phase anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Im Anschluss wurde das

Lösungsmittel unter vermindert Druck entfernt. Zur Reinigung des Rohproduktes



$\text{C}_7\text{H}_7\text{ClO}_2$

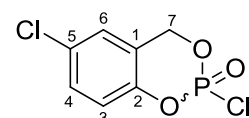
M = 158.5823 g/mol

wurde dieses in ca. 100 mL Dichlormethan gelöst und durch zutropfen in ca. 600 mL eisgekühlten Petrolether ausgefällt.

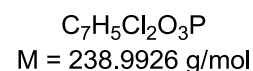
Ausbeute: 2.93 g (18.5 mmol, 64%) eines weißgelben Feststoffes. – $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6): 9.63 (bs, 1H, OH), 7.27 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, 1H, H-6), 7.06 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 6.76 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 1H, H-3), 4.45 (s, 2H, CH₂).

5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **154**

In einem mit Molekularsieb (4 Å) versehenen Tropftrichter wurden 1.50 g (9.47 mmol, 1 Äquiv.) des 5-Chlorsalicylalkohols **155** in 30 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 3.02 mL (21.8 mmol, 2.1 Äquiv.) Triethylamin versehen. Nach 30 min. wurde diese Lösung bei -70 °C innerhalb 1 h zu 1.04 mL (11.4 mmol, 1.1 Äquiv.) dest. Phosphorylchlorid in abs.



154

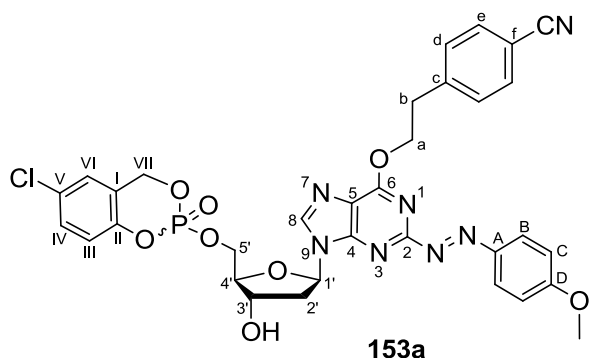


Tetrahydrofuran gelöst, getropft. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei -50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Rt wurde der Feststoff filtriert und das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Produkt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE: 1:1 v/v).

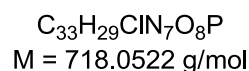
Ausbeute: 533 mg (2.23 mmol, 24%) eines weißgelben Feststoffes. – $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.35 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8$ Hz, 1H, H-4), 7.13 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 7.07 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8$ Hz, 1H, H-3), 5.45 (dd, 2H, CH₂). – $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃): -6.66.

5-Chlor-cycloSal-O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-monophosphat **153a**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 21 durchgeführt. Es wurden 99.8 mg (194 µmol) des O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG **134b** eingesetzt.



153a



Ausbeute: 12 mg (17 µmol, 9%)

eines gelben Feststoffes, welcher als Diastereomerenmischung (I+II) vorliegt. – DC:

R_f -Wert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1): 0.45. – $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.58 (m, 2H, H-8 (I+II)), 8.00 (d, 4H, H-B/C (I+II)), 7.79 (d, 4H, H-e (I+II)), 7.61 (d, 4H, H-d (I+II)), 7.37-7.24 (m, 6H, H-III/IV/VI (I+II)), 7.18 (d, 4H, H-B/C (I+II)), 6.46 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 12.8 \text{ Hz}$ $^3J_{\text{H,H}} = 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H-1' (I+II)), 5.44-5.24 (m, 4H, H-VII (I+II)), 4.91-4.87 (m, 4H, H-a (I+II)), 4.56-4.52 (m, 2H, H-3' (I+II)), 4.47-4.37 (m, 4H, H-5' (I+II)), 4.06-4.03 (m, 2H, H-4' (I+II)), 3.91 (s, 6H, H-E (I+II)), 3.27-3.21 (m, 4H, H-b (I+II)), 2.83-2.76 (m, 2H, H-2'a (I+II)), 2.43-2.37 (m, 2H, H-2'b (I+II)). – $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 163.3 (C-2), 160.3 (C-6), 152.4 (C-4), 148.1 (C-II), 146.3 (C-A/D), 144.3 (C-c), 132.3 (C-e), 130.1 (C-d), 129.4 (C-III/IV/VI), 128.1 (C-V), 125.8 (C-B/C), 125.6 (C-III/IV/VI), 122.7 (C-I), 118.9 (C-N), 114.8 (C-B/C), 109.3 (C-f), 85.0 (C-4'), 83.9 (C-1'), 70.0 (C-3'), 67.9 (C-5'), 67.3 (C-VII), 66.9 (C-a), 55.8 (C-E), 38.6 (C-2'), 34.5 (C-b). – $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): -10.37, -10.48 (I+II). – **IR**: Wellenzahl [cm^{-1}]: 3268, 2947, 2227, 1736, 1596, 1579, 1503, 1482, 1418, 1342, 1300, 1248, 1188, 1140, 1050, 1022, 1003, 936, 865, 842, 821, 758, 676, 640, 615, 559, 525, 473, 440. – **HRMS** (ESI^+ , m/z): ber.: 718.1577 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 718.1577 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-Chlor-cycloSal- O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-monophosphat **153b**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 21 durchgeführt. Es wurden 80.2 mg (155 μmol) des O^6 -2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxy-phenylhydrazino)-2'-dG **133b** eingesetzt.

Ausbeute: 55 mg (76 μmol , 49%)

eines schwach gelben Feststoffes,

welcher als Diastereomerengemisch

(I+II) vorliegt. – **DC**: R_f -Wert

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$: 9:1): 0.38. – **Smp.**:

145 °C. – $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm]

(400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.08 (d, 2H,

H-8 (I+II)), 7.74 (d, 4H, H-e (I+II)),

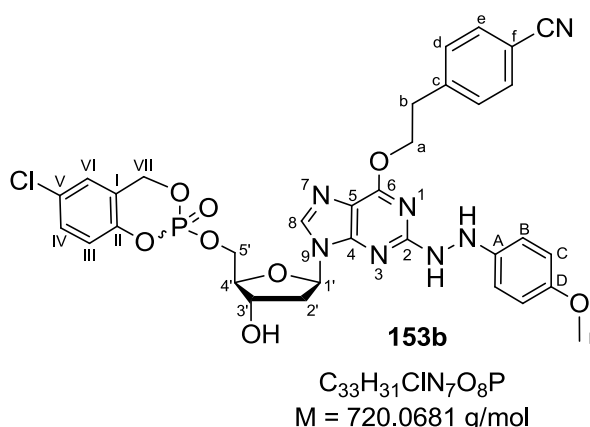
7.49-7.10 (m, 12H, H-III/IV/VI/B/C/d

(I+II)), 6.37-6.17 (m, 2H, H-1' (I+II)), 5.47-5.25 (m, 10H, H-4'/5'/NH (I+II)), 4.62-4.54

(m, 4H, H-a (I+II)), 4.37 (s, 2H, H-3' (I+II)), 4.26-4.19 (m, 4H, H-VII (I+II)), 3.75 (s, 6H,

H-E (I+II)), 3.13-3.10 (m, 4H, H-b (I+II)), 2.92-2.87 (m, 2H, H-2'a (I+II)), 2.27-2.21 (m,

1H, H-2'b (I+II)). – $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 159.2 (C-6), 155.9 (C-D),

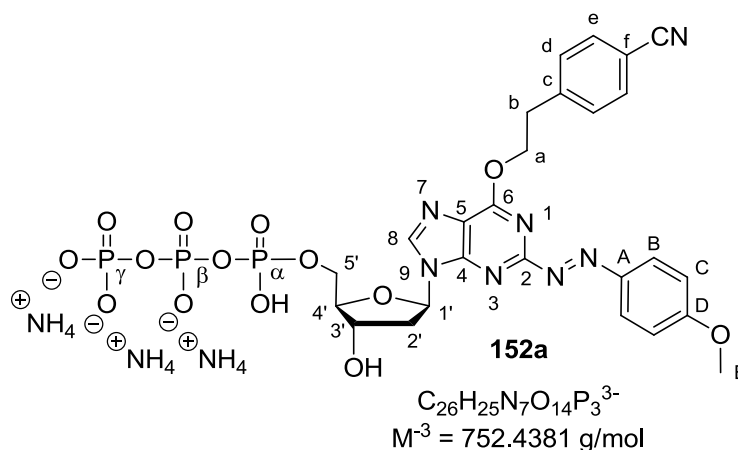


144.2 (C-c), 132.2 (C-e), 129.5 (C-III/IV/VI/B/C/d), 129.8 (C-III/IV/VI/B/C/d), 126.0 (C-III/IV/VI/B/C/d), 125.9 (C-III/IV/VI/B/C/d), 122.8 (C-I), 120.0 (C-III/IV/VI/B/C/d), 118.9 (C-N), 113.1 (C-III/IV/VI/B/C/d), 109.2 (C-f), 84.7 (C-4'), 83.7 (C-1'), 70.3 (C-3'), 68.0 (C-5'), 65.7 (C-a), 55.2 (C-E), 37.8 (C-2'), 34.5 (C-b). – ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, DMSO-*d*₆): -10.26, -10.31 (I+II). – IR Wellenzahl [cm⁻¹]: 2928, 2856, 2226, 1608, 1578, 1507, 1451, 1408, 1300, 1242, 1187, 1067, 1024, 938, 864, 829, 785, 729, 672, 639, 641, 558, 471, 438, 420. – HRMS (ESI⁺, *m/z*): ber.: 720.1733 [M+H]⁺, gef.: 720.1736 [M+H]⁺.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-triphosphat **152a**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 22 durchgeführt. Es wurden 40 mg (56 μmol) des 5-Chlor-*cyc*/oSal-O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-*N*-(4-methoxyphenylazo)-2'-dG-5'-monophosphats **153a** und 87 mg (132 μmol, 2.3 Äquiv.) [N(*n*-Bu)₄]₂H₂P₂O₇ eingesetzt.

Ausbeute: 17 mg (21 μmol, 36%) eines orangefarbenen Feststoffes. – DC: R_f-Wert (Isopropanol/NH₄OAc: 2:1): 0.09. – ¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, D₂O): 8.73 (s, 1H, H-8), 7.64-7.60 (m, 4H, H-d, H-B), 7.53 (d, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, 2H, H-e), 6.70 (d, ³J_{H,H} = 8.8



Hz, 2H, H-C), 6.54 (dd, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 4.86 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, H-a), 4.36-4.30 (m, 1H, H-3'), 4.27-4.19 (m, 3H, H-4', H-5'), 3.79 (s, 3H, H-E), 3.26 (t, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, H-b), 2.83-2.74 (m, 1H, H-2'a), 2.71-2.63 (m, 1H, H-2'b). – ¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, D₂O): 163.6 (C-2), 161.1 (C-6), 160.2 (C-A), 152.3 (C-4), 146.5 (C-c), 144.1 (C-5), 143.0 (C-8), 132.2 (C-d), 130.0 (C-e), 125.5 (C-B), 118.9 (-CN), 109.3 (C-f), 114.8 (C-D), 114.1 (C-C), 86.2 (C-4'), 84.0 (C-1'), 70.4 (C-3'), 68.2 (C-a), 65.1 (C-5'), 55.7 (C-E), 39.6 (C-2'), 35.0 (C-b). – ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -11.02 (d, ²J_{P,P} = 19.7 Hz, P_γ), -11.24 (d, ²J_{P,P} = 19.7 Hz, P_α), -23.34 (dd, ²J_{P,P} = 19.7 Hz, ²J_{P,P} = 19.7 Hz, P_β). – IR Wellenzahl [cm⁻¹]: 2969, 2225, 1599,

1504, 1242, 1139, 1076, 904, 839, 525. - **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 755.0907 [M], gef.: 756.1011 [M+H]⁺.

O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-triphosphat **152b**

Die Synthese wurde gemäß der AAV 22 durchgeführt. Es wurden 41 mg (57 µmol) 5-Chlor-*cycloSal*-O⁶-2-(4-Cyanophenyl)ethyl-2-N-(4-methoxyphenylhydrazino)-2'-dG-5'-monophosphat **153b** und 103 mg (114 µmol, 2 Äquiv.) [N(*n*-Bu)₄]₃HP₂O₇ eingesetzt.

Ausbeute: 17 mg (21 µmol,

36%) eines leicht gelblichen

Feststoffes. - **DC**: R_f-Wert

(Isopropanol/NH₄OAc: 2:1):

0.09. - **¹H-NMR**: δ [ppm]

(400 MHz, D₂O): 8.04 (s, 1H,

H-8), 7.53-7.44 (m, 4H, H-d,

H-B), 7.00 (d, ³J_{H,H} = 8.7 Hz,

2H, H-C), 7.19-7.16 (m, 2H, H-

e), 6.22 (dd, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 5.28, 5.25 (2 * s, 2 * 1H, NH),

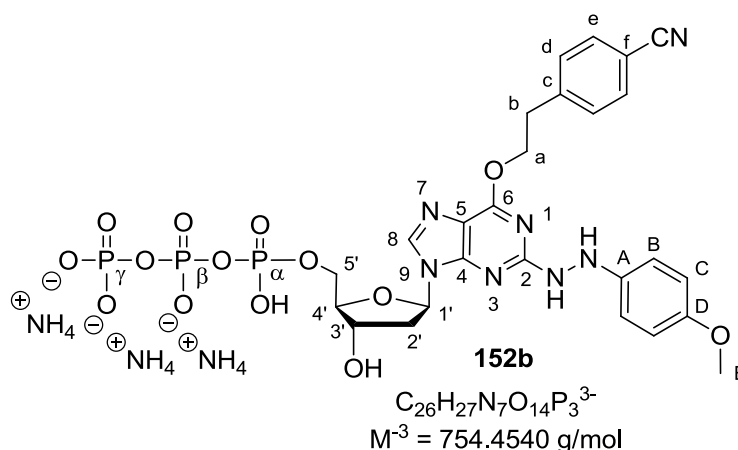
4.91-4.87 (m, 2H, H-a), 4.40-4.37 (m, 1H, H-3'), 4.16-4.07 (m, 3H, H-4', H-5'), 3.93 (s,

3H, H-E), 2.79-2.68 (m, 1H, H-2'a), 2.39 (ddd, ²J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H}

= 4.6 Hz, 1H, H-2'b). - **³¹P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -10.30 (brs, P_α/P_γ), -11.30

(d, ²J_{P,P} = 22.0 Hz, P_α/P_γ), -23.03 (brs, P_β). - **IR** Wellenzahl [cm⁻¹]: 2987, 2901, 1510,

1393, 1249, 1066, 893. - **MS** (MALDI⁺, m/z): ber.: 757.106 [M], gef.: 756.365 [M-H]⁻.



9.7.7 Synthese und Analytik der Oligonucleotide

5'-dC_pdT_pdC_pdG_pdC_pdG(N²-(3,5-Dimethylanilin))_pdC_pdC_pdA_pdT_pdC-3' **138**

M: 3701 g/mol

HPLC: t_R = 45.20 min

OD₂₆₀: 1.15

MS: ESI, m/z (Ladung): 459 (-8), 525 (-7), 613 (-6), 736 (-5).

5'-dC_pdT_pdC_pdG_pdG_pdC_pdG(N²-(4-Anisidin))_pdC_pdC_pdA_pdT_pdC-3' 139

M: 3706 g/mol

MS: Das Oligonucleotid konnte massenspektrometrisch nicht identifiziert werden.

5'-dC_pdT_pdC_pdG_pdG_pdC_pdG(N²-(Anilin))_pdC_pdC_pdA_pdT_pdC-3' 140

M: 3673 g/mol

HPLC: t_R = 30.50 min

OD₂₆₀: 0.53

MS: ESI, m/z (Ladung): 405 (-9), 456 (-8), 521 (-7), 609 (-6), 731 (-5).

5'-dC_pdT_pdC_pdG_pdG_pdC_pdG(N²-(4-Aminobiphenyl))_pdC_pdC_pdA_pdT_pdC-3' 141

M: 3749 g/mol

MS: Das Oligonucleotid konnte massenspektrometrisch nicht identifiziert werden.

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte im 1.00 µM Maßstab mit Hilfe der Phosphoramidit-Methode.

AB392 Synthesizer von Applied Biosystems

Das Standardprotokoll zur Synthese wurde für die modifizierten Oligonucleotide abgewandelt und ein zusätzlicher Kupplungsschritt eingeführt, sowie die Kupplungszeit jeden Schrittes auf 500 Sekunden erhöht. Als Capping-Reagenz wurde eine Mischung aus THF/2,6-Lutidin/Trimethylessigsäureanhydrid (8:1:1 v/v/v) verwendet.^[88,166]

H-8 Synthesizer von K&A Laborgeräte

Das Standardprotokoll zur Synthese wurde für die modifizierten Oligonucleotide abgewandelt und ein zusätzlicher Kupplungsschritt eingeführt, sowie die Kupplungszeit jeden Schrittes auf 90 Sekunden erhöht.

Entschützung und Trägerabspaltung

Zum Ende der Oligonucleotidsynthese wurde durch den Synthesemodus „DMTr-off“ die letzte DMTr-Schutzgruppe entfernt. Die Abspaltung der verbliebenen Schutzgruppen und die Abspaltung des Oligonucleotids vom Träger erfolgten

manuell. Die Abspaltung der CPE-Gruppe erfolgte mit den noch festphasengebundenen Oligonucleotiden. Hierzu wurden die Oligonucleotide mit 0.9 mL abs. Pyridin und 100 μ L dest. DBU versetzt und 26 Stunden bei Raumtemperatur im Thermomixer inkubiert. Die DBU-Lösung wurde anschließend pipettiert und der festen Phase zur Abspaltung des Oligonucleotids vom Trägermaterial, sowie der Schutzgruppen der Nucleobasen ein Gemisch aus 800 μ L konzentriertem Ammoniak und 20 μ L β -Mercaptoethanol zugefügt und für 4 Stunden bei 45 °C im Thermomixer geschüttelt. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und der Rückstand zweimal mit Reinstwasser gewaschen und im Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet.

Reinigung der Oligonucleotide

Die getrockneten Roh-Oligonucleotide wurden in 200 μ L Reinstwasser aufgenommen und in Portionen à 50 μ L mittels HPLC gereinigt. Die Säulentemperatur betrug 25 °C. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. Die verschiedenen Substanzen wurden in einzelnen Fraktionen gesammelt und dann ein Aliquot jeder Fraktion mittels HPLC analysiert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend im Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet und wiederum in 100 μ L Reinstwasser gelöst. Die Konzentration der Oligonucleotide wurde mit Hilfe des „Nanodrop“-Messgerätes bestimmt.

Massenspektrometrische Identifizierung der Oligonucleotide

Verdünnung der Oligonucleotide mit einer Lösung aus 20% Isopropanol in Wasser und 1% Triethylamin auf eine Konzentration von 5 pmol/ μ L. Für die MALDI-Messungen wurde die einige μ L der erhaltenen Fraktionen eingesetzt. Als Matrices wurden THAP und DHB verwendet.

Bestimmung der T_m -Werte

Zur Bestimmung des T_m -Wertes wurden aus den 100 μ L Oligonucleotidlösung ein 1 nmol entsprechendes Aliquot entnommen, dieses am Speed-Vac-Probenkonzentrator bis zur Trockene eingengt, mit 1 nmol des entsprechenden, in Reinstwasser gelösten Gegenstranges versetzt und auf 1 mL mit Phosphat-Puffer (10 mM Phosphat-Puffer, pH 6.8; 140 mM NaCl und 1 mM EDTA) aufgefüllt. Die

Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C durchgeführt. Die Probe wurde jeweils dreimal von 5 °C auf 80 °C erhitzt und dreimal von 80 °C auf 5 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Die Absorption der Probelösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Von den resultierenden, sigmoidalen Kurven wurde jeweils das Maximum der 1. Ableitung zur Bestimmung des Schmelzpunktes berechnet und die einzelnen Werte gemittelt.

Messung der CD-Kurven

Für die Messung des Circular dichroismus wurden die verwendeten Lösungen der Schmelzpunktbestimmung eingesetzt und die molare Elliptizität von 350-200 nm gemessen.

10 Literaturverzeichnis

- [1] UNAIDS; Report on the Global AIDS Epidemic 2012. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf, (letzter Zugriff: 21.11.2012).
- [2] WHO; 10 facts about cancer, <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/index.html> (letzter Zugriff: 31.07.2012).
- [3] Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 868-871.
- [4] Gallo, R. C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 865-867.
- [5] Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, M. O.; Laurent, A. G.; Dauguet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C.; et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **1986**, 233, 343-346.
- [6] Flexner, C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 959-966.
- [7] De Clercq, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, 1, 13-25.
- [8] Pomerantz, R. J.; Horn, D. L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003**, 9, 867-873.
- [9] Coffin, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **1995**, 267, 483-489.
- [10] Larder, B. A.; Darby, G.; Richman, D. D. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **1989**, 243, 1731-1734.
- [11] Thompson, M. A.; Aberg, J. A.; Cahn, P.; Montaner, J. S.; Rizzardini, G.; Telenti, A.; Gatell, J. M.; Gunthard, H. F.; Hammer, S. M.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Reiss, P.; Richman, D. D.; Volberding, P. A.; Yeni, P.; Schooley, R. T. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *J. Am. Med. Assoc.* **2010**, 304, 321-333.
- [12] Katsoulidou, A.; Papachristou, E.; Petrodaskalaki, M.; Sypsa, V.; Anastassopoulou, C. G.; Gargalianos, P.; Karafoulidou, A.; Lazanas, M.; Kordossis, T.; Andoniadou, A.; Hatzakis, A. Comparison of three current viral load assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of virological methods* **2004**, 121, 93-99.
- [13] Pomerantz, R. J. HIV: cross-talk and viral reservoirs. *Nature* **2003**, 424, 136-137.
- [14] Swingler, S.; Brichacek, B.; Jacque, J. M.; Ulich, C.; Zhou, J.; Stevenson, M. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* **2003**, 424, 213-219.

- [15] Sigal, A.; Kim, J. T.; Balazs, A. B.; Dekel, E.; Mayo, A.; Milo, R.; Baltimore, D. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* **2011**, 477, 95-98.
- [16] Richman, D. D. Antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 117-121.
- [17] Hirsch, M. S.; Gunthard, H. F.; Schapiro, J. M.; Brun-Vezinet, F.; Clotet, B.; Hammer, S. M.; Johnson, V. A.; Kuritzkes, D. R.; Mellors, J. W.; Pillay, D.; Yeni, P. G.; Jacobsen, D. M.; Richman, D. D. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 47, 266-285.
- [18] Dybul, M.; Fauci, A. S.; Bartlett, J. G.; Kaplan, J. E.; Pau, A. K. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. *Ann. Intern. Med.* **2002**, 137, 381-433.
- [19] Sarkar, I.; Hauber, I.; Hauber, J.; Buchholz, F. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science* **2007**, 316, 1912-1915.
- [20] Delva, W.; Wilson, D. P.; Abu-Raddad, L.; Gorgens, M.; Wilson, D.; Hallett, T. B.; Welte, A. HIV Treatment as Prevention: Principles of Good HIV Epidemiology Modelling for Public Health Decision-Making in All Modes of Prevention and Evaluation. *PLoS Med.* **2012**, 9, e1001239.
- [21] Wilson, D. P. HIV Treatment as prevention: Natural experiments highlight limits of antiretroviral treatment as HIV prevention. *PLoS Med.* **2012**, 9, e1001231.
- [22] Cohen, M. S.; Chen, Y. Q.; McCauley, M.; Gamble, T.; Hosseinipour, M. C.; Kumarasamy, N.; Hakim, J. G.; Kumwenda, J.; Grinsztejn, B.; Pilotto, J. H.; Godbole, S. V.; Mehendale, S.; Chariyalertsak, S.; Santos, B. R.; Mayer, K. H.; Hoffman, I. F.; Eshleman, S. H.; Piwowar-Manning, E.; Wang, L.; Makhema, J.; Mills, L. A.; de Bruyn, G.; Sanne, I.; Eron, J.; Gallant, J.; Havlir, D.; Swindells, S.; Ribaud, H.; Elharrar, V.; Burns, D.; Taha, T. E.; Nielsen-Saines, K.; Celentano, D.; Essex, M.; Fleming, T. R. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 493-505.
- [23] Goff, S. P. Host factors exploited by retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 253-263.
- [24] Pollard, V. W.; Malim, M. H. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, 52, 491-532.
- [25] Kubota, S.; Siomi, H.; Satoh, T.; Endo, S.; Maki, M.; Hatanaka, M. Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 162, 963-970.
- [26] Kjems, J.; Sharp, P. A. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Journal of virology* **1993**, 67, 4769-4776.
- [27] Malim, M. H.; Hauber, J.; Le, S. Y.; Maizel, J. V.; Cullen, B. R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **1989**, 338, 254-257.
- [28] Dayton, E. T.; Konings, D. A.; Powell, D. M.; Shapiro, B. A.; Butini, L.; Maizel, J. V.; Dayton, A. I. Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *J. Virol.* **1992**, 66, 1139-1151.
- [29] DiMattia, M. A.; Watts, N. R.; Stahl, S. J.; Rader, C.; Wingfield, P. T.; Stuart, D. I.; Steven, A. C.; Grimes, J. M. Implications of the HIV-1 Rev dimer

- structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 5810-5814.
- [30] Fornerod, M.; Ohno, M.; Yoshida, M.; Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **1997**, *90*, 1051-1060.
- [31] Suhasini, M.; Reddy, T. R. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr. HIV Res.* **2009**, *7*, 91-100.
- [32] Kjems, J.; Askjaer, P. Rev protein and its cellular partners. *Adv. Pharmacol.* **2000**, *48*, 251-298.
- [33] Kemper, W. M.; Berry, K. W.; Merrick, W. C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 5551-5557.
- [34] Benne, R.; Brown-Luedi, M. L.; Hershey, J. W. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 3070-3077.
- [35] Kang, H. A.; Hershey, J. W. B. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3934-3940.
- [36] Saini, P.; Eyler, D. E.; Green, R.; Dever, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **2009**, *459*, 118-121.
- [37] Robbins, R. D.; Tersey, S. A.; Ogiwara, T.; Gupta, D.; Farb, T. B.; Ficorilli, J.; Bokvist, K.; Maier, B.; Mirmira, R. G. Inhibition of deoxyhypusine synthase enhances islet cell function and survival in the setting of endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 39943-39952.
- [38] Li, C. H.; Ohn, T.; Ivanov, P.; Tisdale, S.; Anderson, P. eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS one* **2010**, *5*, e9942.
- [39] Kruse, M.; Rosorius, O.; Kratzer, F.; Bevec, D.; Kuhnt, C.; Steinkasserer, A.; Schuler, G.; Hauber, J. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *Journal of Experimental Medicine* **2000**, *191*, 1581-1590.
- [40] Chemnitz, J.; Turza, N.; Hauber, J.; Steinkasserer, A.; Hauber, J. The karyopherin CRM1 is required for dendritic cell maturation. *Immunobiology* **2010**, *215*, 370-379.
- [41] Bevec, D.; Jaksche, H.; Oft, M.; Wohl, T.; Himmelsbach, M.; Pacher, A.; Schebesta, M.; Koettwitz, K.; Dobrovnik, M.; Csonga, R.; Lottspeich, F.; Hauber, J. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **1996**, *271*, 1858-1860.
- [42] Hofmann, W.; Reichart, B.; Ewald, A.; Muller, E.; Schmitt, I.; Stauber, R. H.; Lottspeich, F.; Jockusch, B. M.; Scheer, U.; Hauber, J.; Dabauvalle, M. C. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 895-910.
- [43] Bevec, D.; Hauber, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. *Biol. Signals* **1997**, *6*, 124-133.
- [44] Cooper, H. L.; Park, M. H.; Folk, J. E.; Safer, B.; Braverman, R. Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 1854-1857.
- [45] Shiba, T.; Mizote, H.; Kaneko, T.; Nakajima, T.; Kakimoto, Y. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *244*, 523-531.

- [46] Park, J.-H.; Aravind, L.; Wolff, E. C.; Kaevel, J.; Kim, Y. S.; Park, M. H. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 51-56.
- [47] Umland, T. C.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Davies, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28697-28705.
- [48] Kolodzik, A. Dissertation in Arbeit. *Universität Hamburg* **2012**.
- [49] Liao, D. I.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Davies, D. R. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. *Structure* **1998**, *6*, 23-32.
- [50] Jakus, J.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Folk, J. E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13151-13159.
- [51] Lee, Y. B.; Park, M. H.; Folk, J. E. Diamine and Triamine Analogs and Derivatives as Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase: Synthesis and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3053-3061.
- [52] Bianchi, M.; Bloom, O.; Raabe, T.; Cohen, P. S.; Chesney, J.; Sherry, B.; Schmidtmayerova, H.; Calandra, T.; Zhang, X.; et al. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylhyazone. *Journal of Experimental Medicine* **1996**, *183*, 927-936.
- [53] Sommer, M.-N.; Bevec, D.; Klebl, B.; Flicke, B.; Hoelscher, K.; Freudenreich, T.; Hauber, I.; Hauber, J.; Mett, H. Screening assay for the identification of deoxyhypusine synthase inhibitors. *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 434-438.
- [54] Klink, S.; Han, Z.; Hilgenfeld, R. Personal communication. *Universität Lübeck* **2012**.
- [55] Hauber, I.; Bevec, D.; Heukeshoven, J.; Kraetzer, F.; Horn, F.; Choidas, A.; Harrer, T.; Hauber, J. Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 76-85.
- [56] Balabanov, S.; Gontarewicz, A.; Ziegler, P.; Hartmann, U.; Kammer, W.; Copland, M.; Brassat, U.; Priemer, M.; Hauber, I.; Wilhelm, T.; Schwarz, G.; Kanz, L.; Bokemeyer, C.; Hauber, J.; Holyoake, T. L.; Nordheim, A.; Brummendorf, T. H. Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood* **2007**, *109*, 1701-1711.
- [57] Specht, S.; Sarite Salem, R.; Hauber, I.; Hauber, J.; Gorbig Ulf, F.; Meier, C.; Bevec, D.; Hoerauf, A.; Kaiser, A. The guanylhyazone CNI-1493: an inhibitor with dual activity against malaria-inhibition of host cell pro-inflammatory cytokine release and parasitic deoxyhypusine synthase. *Parasitol Res* **2008**, *102*, 1177-1184.
- [58] Maier, B.; Ogihara, T.; Trace, A. P.; Tersey, S. A.; Robbins, R. D.; Chakrabarti, S. K.; Nunemaker, C. S.; Stull, N. D.; Taylor, C. A.; Thompson, J. E.; Dondero, R. S.; Lewis, E. C.; Dinarello, C. A.; Nadler, J. L.; Mirmira, R. G. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 2156-2170.
- [59] Adams, C. P.; Brantner, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff.* **2006**, *25*, 420-428.
- [60] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.

- [61] Fleming, A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929. *Rev. Infect. Dis.* **1980**, 2, 129-139.
- [62] Steinegger, E.; Hoevel, H. Analytical and biological studies of salicylate drugs, particularly salicin. II. Biological studies. *Pharm. Acta Helv.* **1972**, 47, 222-234.
- [63] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
- [64] Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 55-68.
- [65] Meier, C. cycloSal phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosyl-monophosphate delivery - chemistry meets biology. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
- [66] Kennedy, J. P.; Williams, L.; Bridges, T. M.; Daniels, R. N.; Weaver, D.; Lindsley, C. W. Application of Combinatorial Chemistry Science on Modern Drug Discovery. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 345-354.
- [67] Patel, D. V.; Gordon, E. M. Applications of small-molecule combinatorial chemistry to drug discovery. *Drug. Discov. Today* **1996**, 1, 134-144.
- [68] DeWitt, S. H.; Kiely, J. S.; Stankovic, C. J.; Schroeder, M. C.; Cody, D. M. R.; Pavia, M. R. "Diversomers": An approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 6909-6913.
- [69] Ley, S. V.; Baxendale, I. R.; Longbottom, D. A.; Myers, R. M. Natural products as an inspiration for the discovery of new high-throughput chemical synthesis tools. *Drug. Discovery Develop.* **2007**, 2, 51-89.
- [70] Kubinyi, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, 1, 4-15.
- [71] Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model* **2005**, 45, 177-182.
- [72] Murray, C. W.; Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* **2009**, 1, 187-192.
- [73] Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 6665-6670.
- [74] Penner, N.; Xu, L.; Prakash, C. Radiolabeled Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Studies in Drug Development: Why, When, and How? *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 513-531.
- [75] Dalvie, D.; Obach, R. S.; Kang, P.; Prakash, C.; Loi, C.-M.; Hurst, S.; Nedderman, A.; Goulet, L.; Smith, E.; Bu, H.-Z.; Smith, D. A. Assessment of Three Human in Vitro Systems in the Generation of Major Human Excretory and Circulating Metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 357-368.
- [76] Mulder, G. J.; Kadlubar, F. F.; Mays, J. B.; Hinson, J. A. Reaction of mutagenic phenacetin metabolites with glutathione and DNA. Possible implications for toxicity. *Mol. Pharmacol.* **1984**, 26, 342-347.
- [77] Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Murray, T.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* **2008**, 58, 71-96.
- [78] Dorudi, S.; Hart, I. R. Mechanisms underlying invasion and metastasis. *Curr. Opin. Oncol.* **1993**, 5, 130-135.

- [79] Ames, B. N.; Lee, F. D.; Durston, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 782-786.
- [80] Kadlubar, F. F.; Miller, J. A.; Miller, E. C. Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 805-814.
- [81] Fokkens, W. Phenacetin abuse related to bladder cancer. *Environ. Res.* **1979**, *20*, 192-198.
- [82] Boteju, L. W.; Hanna, P. E. Bioactivation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorenes by N,O-acyltransferase: substituent effects on covalent binding to DNA. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 1651-1657.
- [83] Lai, C. C.; Miller, J. A.; Miller, E. C.; Liem, A. N-sulfooxy-2-aminofluorene is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the livers of infant male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 (B6C3F1) mice. *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 1037-1045.
- [84] Ricicki, E. M.; Soglia, J. R.; Teitel, C.; Kane, R.; Kadlubar, F.; Vouros, P. Detection and quantification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl adducts in human pancreas tissue using capillary liquid chromatography-microelectrospray mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 692-699.
- [85] Turesky, R. J.; Box, R. M.; Markovic, J.; Gremaud, E.; Snyderwine, E. G. Formation and persistence of DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat and nonhuman primates. *Mutat. Res.* **1997**, *376*, 235-241.
- [86] Cui, L.; Sun, H.-L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R.; Skipper, P. L. Identification of Adducts Formed by Reaction of N-Acetoxy-3,5-dimethylaniline with DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1730-1736.
- [87] Böge, N.; Schröder, M.; Meier, C. First route to phosphoramidites of *N*²-hydrazinoaryl- and *N*²-azoaryl-dG adducts and their site-selective incorporation into DNA oligonucleotides. *Synlett* **2008**, 1066-1070.
- [88] Schröder, M. Diplomarbeit. *Universität Hamburg* **2008**.
- [89] Wang, F.; Elmquist, C. E.; Stover, J. S.; Rizzo, C. J.; Stone, M. P. DNA Sequence Modulates the Conformation of the Food Mutagen 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the Recognition Sequence of the NarI Restriction Enzyme. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8498-8516.
- [90] Böge, N.; Gräsl, S.; Meier, C. Synthesis and properties of oligonucleotides containing C8-deoxyguanosine arylamine adducts of borderline carcinogens. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9728-9738.
- [91] Jacobsen, M. I.; Meier, C. First synthesis of C8-arylamine adducts of 2'-deoxyadenosine and incorporation of the phosphoramidite into an oligonucleotide. *Synlett* **2006**, *15*, 2411-2414.
- [92] Böge, N.; Jacobsen, M. I.; Szombati, Z.; Baerns, S.; Di Pasquale, F.; Marx, A.; Meier, C. Synthesis of DNA strands site-specifically damaged by C8-arylamine purine adducts and effects on various DNA polymerases. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11194-11208.
- [93] Reulecke, I.; Lange, G.; Albrecht, J.; Klein, R.; Rarey, M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 885-897.
- [94] Boden, P.; Eden, J. M.; Hodgson, J.; Horwell, D. C.; Hughes, J.; McKnight, A. T.; Lewthwaite, R. A.; Pritchard, M. C.; Raphy, J. Use of a Dipeptide Chemical

- Library in the Development of Non-Peptide Tachykinin NK3 Receptor Selective Antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1664-1675.
- [95] Muccioli, G. G.; Martin, D.; Scriba, G. K. E.; Poppitz, W.; Poupaert, J. H.; Wouters, J.; Lambert, D. M. Substituted 5,5'-Diphenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one as CB1 Cannabinoid Receptor Ligands: Synthesis and Pharmacological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2509-2517.
- [96] DeRuiter, J.; Swearingen, B. E.; Wandrekar, V.; Mayfield, C. A. Synthesis and in vitro aldose reductase inhibitory activity of compounds containing an N-acylglycine moiety. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1033-1038.
- [97] Wang, S.; Li, Z.; Hua, W. Synthesis and characterization of fully conjugated schiff base macrocycles containing 1,3,4-oxadiazole moiety. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 3339-3345.
- [98] Hu, W.-P.; Yu, H.-S.; Chen, Y.-R.; Tsai, Y.-M.; Chen, Y.-K.; Liao, C.-C.; Chang, L.-S.; Wang, J.-J. Synthesis and biological evaluation of thiobenzanilides as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 5295-5302.
- [99] Tandon, V. K.; Chhor, R. B. An efficient one pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles. *Synth. Commun.* **2001**, 31, 1727-1732.
- [100] Manchanda, R.; Agarwal, S. K.; Kumar, P.; Sharma, A. K.; Gupta, K. C.; Chandra, R. Preparation of high-loading polymer supports by polymerization reaction useful for oligonucleotide synthesis. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 2754-2762.
- [101] Akinc, A.; Zumbuehl, A.; Goldberg, M.; Leshchiner, E. S.; Busini, V.; Hossain, N.; Bacallado, S. A.; Nguyen, D. N.; Fuller, J.; Alvarez, R.; Borodovsky, A.; Borland, T.; Constien, R.; de Fougères, A.; Dorkin, J. R.; Narayanannair Jayaprakash, K.; Jayaraman, M.; John, M.; Kotliansky, V.; Manoharan, M.; Nechev, L.; Qin, J.; Racie, T.; Raitcheva, D.; Rajeev, K. G.; Sah, D. W. Y.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Vornlocher, H.-P.; Zimmermann, T. S.; Langer, R.; Anderson, D. G. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 561-569.
- [102] Rogers, C. J.; Dickerson, T. J.; Wentworth, P.; Janda, K. D. A high-swelling reagent scaffold suitable for use in aqueous and organic solvents. *Tetrahedron* **2005**, 61, 12140-12144.
- [103] Miyagawa, A.; Kasuya, M. C. Z.; Hatanaka, K. Immobilization of glycoconjugate polymers on cellulose membrane for affinity separation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, 79, 348-356.
- [104] Cava, M. P.; Levinson, M. I. Thionation reactions of Lawesson's reagents. *Tetrahedron* **1985**, 41, 5061-5087.
- [105] Ueda, S.; Nagasawa, H. Copper-Catalyzed Synthesis of Benzoxazoles via a Regioselective C-H Functionalization/C-O Bond Formation under an Air Atmosphere. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4272-4277.
- [106] Alberico, D.; Scott, M. E.; Lautens, M. Aryl-aryl bond formation by transition-metal-catalyzed direct arylation. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 174-238.
- [107] Turner, G. L.; Morris, J. A.; Greaney, M. F. Direct arylation of thiazoles on water. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 7996-8000.
- [108] Do, H.-Q.; Daugulis, O. Copper-Catalyzed Arylation of Heterocycle C-H Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12404-12405.
- [109] Hein, D. W.; Alheim, R. J.; Leavitt, J. J. The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl- and 2-alkyl-substituted benzimidazoles, benzoxazoles, and benzothiazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 427-429.

- [110] Hausner, S. H.; Alagille, D.; Koren, A. O.; Amici, L.; Staley, J. K.; Cosgrove, K. P.; Baldwin, R. M.; Tamagnan, G. D. Synthesis of 5- and 6-substituted 2-(4-dimethylaminophenyl)-1,3-benzoxazoles and their in vitro and in vivo evaluation as imaging agents for amyloid plaque. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 543-545.
- [111] Hauber, I.; Priyadarshini, P.; Krebstakies, M.; Hauber, J. Personal communication. *Heinrich-Pette-Institut* **2012**.
- [112] Larsen, T. A.; Goodsell, D. S.; Cascio, D.; Grzeskowiak, K.; Dickerson, R. E. The structure of DAPI bound to DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 477-491.
- [113] Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Barton, H. J.; Jones, R. L.; Fox, K.; Wydra, R. L.; Strekowski, L. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochem.* **1990**, *29*, 8452-8461.
- [114] Schröder, M.; Kolodzik, A.; Windshügel, B.; Krebstakies, M.; Priyadarshini, P.; Rarey, M.; Hauber, J.; Meier, C. Rational Drug Design - Screening and Synthesis of Potential Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication. *Antiviral Res.* **2010**, *86*, A67.
- [115] Fischer, J. R.; Lessel, U.; Rarey, M. LoFT: similarity-driven multiobjective focused library design. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1-21.
- [116] Maass, P.; Schulz-Gasch, T.; Stahl, M.; Rarey, M. Recore: a fast and versatile method for scaffold hopping based on small molecule crystal structure conformations. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 390-399.
- [117] Gribble, G. W. Recent developments in indole ring synthesis-methodology and applications. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 1045-1075.
- [118] Fischer, E.; Hess, O. Synthese von Indolderivaten. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 559-568.
- [119] Osby, J. O.; Heinzman, S. W.; Ganem, B. Studies on the mechanism of transition-metal-assisted sodium borohydride and lithium aluminum hydride reductions. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 67-72.
- [120] Prasad, A. S. B.; Kanth, J. V. B.; Periasamy, M. Convenient methods for the reduction of amides, nitriles, carboxylic esters, acids and hydroboration of alkenes using the sodium borohydride-iodine system. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4623-4628.
- [121] Sajiki, H.; Kurita, T.; Esaki, H.; Aoki, F.; Maegawa, T.; Hirota, K. Complete replacement of H₂ by D₂ via Pd/C-catalyzed H/D exchange reaction. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3521-3523.
- [122] Kim, H.-O.; Mathew, F.; Ogbu, C. A convenient synthesis of disubstituted guanidines via the Mitsunobu protocol. *Synlett* **1999**, 193-194.
- [123] Dodd, D. S.; Kozikowski, A. P. Conversion of alcohols to protected guanidines using the Mitsunobu protocol. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 977-980.
- [124] Dodd, D. S.; Wallace, O. B. Solid-phase synthesis of N,N'-substituted guanidines. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5701-5704.
- [125] Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. New Route to Guanidines from Bromoalkanes. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4867-4869.
- [126] Pfaff, K. Bachelorarbeit. *Universität Hamburg* **2011**.
- [127] Hieke, D. Bachelorarbeit. *Universität Hamburg* **2012**.
- [128] Sonogashira, K. Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 46-49.
- [129] Sedelmeier, J.; Ley, S. V.; Lange, H.; Baxendale, I. R. Pd-EnCat TPP30 as a Catalyst for the Generation of Highly Functionalized Aryl- and Alkenyl-Substituted Acetylenes via Microwave-Assisted Sonogashira Type Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4412-4420.

- [130] Reaxa; *Pd EnCat Experimental User Guide 2006*, http://www.reaxa.com/documents/reaxa_pd_encat_user_guide.pdf (letzter Zugriff: 23.08.2011).
- [131] Hiroya, K.; Itoh, S.; Sakamoto, T. Development of an efficient procedure for indole ring synthesis from 2-ethynylaniline derivatives catalyzed by Cu(II) salts and its application to natural product synthesis. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1126-1136.
- [132] Castro, C. E.; Gaughan, E. J.; Owsley, D. C. Indoles, benzofurans, phthalides, and tolans via copper(I) acetylides. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 4071-4078.
- [133] McGrane, P. L.; Livinghouse, T. Synthetic applications of Group IV metal-imido complex - alkyne [2+2] cycloadditions. A concise total synthesis of ($\pm$)-monomarine. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1323-1324.
- [134] Rodriguez, A. L.; Koradin, C.; Dohle, W.; Knochel, P. Versatile indole synthesis by a 5-endo-dig cyclization mediated by potassium or cesium bases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2488-2490.
- [135] Larock, R. C.; Yum, E. K.; Refvik, M. D. Synthesis of 2,3-Disubstituted Indoles via Palladium-Catalyzed Annulation of Internal Alkynes. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7652-7662.
- [136] Amatore, C.; Jutand, A.; Suarez, A. Intimate mechanism of oxidative addition to zerovalent palladium complexes in the presence of halide ions and its relevance to the mechanism of palladium-catalyzed nucleophilic substitutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9531-9541.
- [137] Cacchi, S. The palladium-catalyzed hydroarylation and hydrovinylation of carbon-carbon multiple bonds: new perspectives in organic synthesis. *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62, 713-722.
- [138] Li, F.-N.; Kim, N.-J.; Chang, D.-J.; Jang, J.; Jang, H.; Jung, J.-W.; Min, K.-H.; Jeong, Y.-S.; Kim, S.-Y.; Park, Y.-H.; Kim, H.-D.; Park, H.-G.; Suh, Y.-G. Synthesis and structural optimization of multiple H-bonding region of diarylalkyl (thio)amides as novel TRPV1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8149-8160.
- [139] Robinson, B. Reduction of indoles and related compounds. *Chem. Rev.* **1969**, 69, 785-797.
- [140] Monti, S. A.; Schmidt, R. R., III Reaction of indoles with diborane. *Tetrahedron* **1971**, 27, 3331-3339.
- [141] Adachi, H.; Palaniappan, K. K.; Ivanov, A. A.; Bergman, N.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. Structure-Activity Relationships of 2,N6,5'-Substituted Adenosine Derivatives with Potent Activity at the A2B Adenosine Receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1810-1827.
- [142] Liu, Y.; Shen, L.; Prashad, M.; Tibbatts, J.; Repic, O.; Blacklock, T. J. A Green N-Detosylation of Indoles and Related Heterocycles Using Phase Transfer Catalysis. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 778-780.
- [143] Adrio, J.; Cuevas, C.; Manzanares, I.; Joullie, M. M. Total synthesis and biological evaluation of Tamandarin B analogues. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 5129-5138.
- [144] Jessen, H. J. Diplomarbeit/Dissertation. *Universität Hamburg* **2008**.
- [145] Solter, S.; Dieckmann, R.; Blumenberg, M.; Francke, W. Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3385-3386.
- [146] Bianchi, M.; Ulrich, P.; Bloom, O.; Meistrell, M., III; Zimmerman, G. A.; Schmidtmayerova, H.; Bukrinsky, M.; Donnelley, T.; Bucala, R.; Sherry, B.; Manogue, K. R.; Tortolani, A. J.; Cerami, A.; Tracey, K. J. An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493)

- prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol. Med.* **1995**, *1*, 254-266.
- [147] Ulrich, P.; Cerami, A. Trypanocidal 1,3-arylene diketone bis(guanylylhydrazones). Structure-activity relationships among substituted and heterocyclic analogs. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 35-40.
- [148] Görbig, U. F. Dissertation. *Universität Hamburg* **2007**.
- [149] Schröder, M.; Kolodzik, A.; Windshuegel, B.; Krepstakies, M.; Priyadarshini, P.; Hartjen, P.; van Lunzen, J.; Rarey, M.; Hauber, J.; Meier, C. Derivatives of the Deoxyhypusine Synthase Inhibitor CNI-1493 Suppress HIV-1 Replication. *J. Med. Chem.* **2012**, *submitted*.
- [150] Woriedh, M.; Hauber, I.; Martinez-Rocha, A. L.; Voigt, C.; Maier, F. J.; Schröder, M.; Meier, C.; Hauber, J.; Schäfer, W. Preventing fusarium head blight of wheat and cob rot of maize by inhibition of fungal deoxyhypusine synthase. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **2011**, *24*, 619-627.
- [151] Jessen, H. J.; Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. Bioreversible protection of nucleoside diphosphates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
- [152] Böge, N.; Krüger, S.; Schröder, M.; Meier, C. A new short and efficient synthetic route to C8-N-acetylarylamine 2'-deoxyguanosine phosphoramidites. *Synthesis* **2007**, 3907-3914.
- [153] Jacobsen, M. I.; Meier, C. First synthesis of C8-arylamine adducts of 2'-deoxyadenosine and incorporation of the phosphoramidite into an oligonucleotide. *Synlett* **2006**, 2411-2414.
- [154] Szombati, Z.; Baerns, S.; Marx, A.; Meier, C. Synthesis of C8-Arylamine-Modified 2'-Deoxyadenosine Phosphoramidites and their Site-Specific Incorporation into Oligonucleotides. *ChemBiochem* **2012**, *13*, 700-712.
- [155] Srivastava, P. C.; Nagpal, K. Bromination of nucleosides. *Experientia* **1970**, *26*, 220.
- [156] Kumar, V.; Yap, J.; Muroyama, A.; Malhotra, S. V. Highly efficient method for C-5 halogenation of pyrimidine-based nucleosides in ionic liquids. *Synthesis* **2009**, 3957-3962.
- [157] Prakash, T. P.; Prhavc, M.; Eldrup, A. B.; Cook, P. D.; Carroll, S. S.; Olsen, D. B.; Stahlhut, M. W.; Tomassini, J. E.; MacCoss, M.; Galloway, S. M.; Hilliard, C.; Bhat, B. Synthesis and Evaluation of S-Acyl-2-thioethyl Esters of Modified Nucleoside 5'-Monophosphates as Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1199-1210.
- [158] McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Snoeck, R.; Andrei, G.; De, C. E.; Balzarini, J. Discovery of a New Family of Inhibitors of Human Cytomegalovirus (HCMV) Based upon Lipophilic Alkyl Furano Pyrimidine Dideoxy Nucleosides: Action via a Novel Non-Nucleosidic Mechanism. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847-1851.
- [159] Narang, S. A.; Hsiung, H. M.; Brousseau, R. Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments. *Meth. Enzymol.* **1979**, *68*, 90-98.
- [160] Cacchi, S.; Fabrizi, G.; Goggiamani, A.; Licandro, E.; Maiorana, S.; Perdicchia, D. Synthesis of N,N-Dialkyl-N'-arylhydrazines via Palladium-Catalyzed N-Arylation by Using N,N-Dialkylhydrazines/2LiCl Adducts. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1497-1500.
- [161] Uhlmann, E.; Pfeleiderer, W. Nucleotides .14. Substituted Beta-Phenyl-Ethyl Groups - New Blocking Groups for Oligonucleotide Syntheses by the Phosphotriester Approach. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1688-1703.
- [162] Harwood, E. A.; Hopkins, P. B.; Sigurdsson, S. T. Chemical Synthesis of Cross-Link Lesions Found in Nitrous Acid Treated DNA: A General Method for

- the Preparation of N2-Substituted 2'-Deoxyguanosines. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2959-2964.
- [163] Müller, H. Ueber p-Hydrazinodiphenyl. **1894**, *27*, 3105-3108.
- [164] Demers, J. P.; Klaubert, D. H. Addition of arylmetallics to azodicarboxylates: A novel synthesis of arylhydrazines by aromatic hydrazination. **1987**, *28*, 4933-4934.
- [165] Haack, T.; Boche, G.; Kliem, C.; Wiessler, M.; Albert, D.; Schmeiser, H. H. Synthesis, Characterization, and ³²P-Postlabeling of N-(Deoxyguanosin)-4-aminobiphenyl 3'-Phosphate Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 776-784.
- [166] Böge, N. Dissertation. *Universität Hamburg* **2008**.
- [167] Bae, S.; Lakshman, M. K. Synthetic Utility of an Isolable Nucleoside Phosphonium Salt. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2203-2206.
- [168] Heidmann, W.; Koster, H. Oligonucleotide synthesis on a polymeric support with avoidance of failure sequences. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 547-548.
- [169] Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites - a New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [170] Fuchs, R. P.; Fujii, S. Translesion synthesis in Escherichia coli: Lessons from the NarI mutation hot spot. *DNA Repair* **2007**, *6*, 1032-1041.
- [171] Puglisi, J. D.; Tinoco, I. Absorbance melting curves of RNA. *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.
- [172] Krüger, S. Dissertation. *Universität Hamburg* **2011**.
- [173] Otto, S. Bachelorarbeit. *Universität Hamburg* **2011**.
- [174] Warnecke, S.; Meier, C. Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cycloSal-Nucleotides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [175] Tonn, V. C.; Meier, C. Solid-Phase Synthesis of (Poly)phosphorylated Nucleosides and Conjugates. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
- [176] Wendicke, S.; Warnecke, S.; Meier, C. Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- [177] Wolf, S.; Zismann, T.; Lunau, N.; Meier, C. Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.
- [178] Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. cycloSal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate (cycloSal-d4TMP): Synthesis and antiviral evaluation of a new d4TMP delivery system. *J Med Chem* **1998**, *41*, 1417-1427.
- [179] Rios Morales, E. H. Dissertation. *Universität Hamburg* **2010**.
- [180] Ludek, O. Dissertation. *Universität Hamburg* **2005**.
- [181] Warnecke, S. Dissertation. *Universität Hamburg* **2010**.
- [182] Tonn, V. C. Dissertation. *Universität Hamburg* **2011**.
- [183] Bevec, D.; Kappel, B.; Jaksche, H.; Csonga, R.; Hauber, J.; Klier, H.; Steinkasserer, A. Molecular characterization of a cDNA encoding functional human deoxyhypusine synthase and chromosomal mapping of the corresponding gene locus. *FEBS letters* **1996**, *378*, 195-198.
- [184] Gartner, S.; Markovits, P.; Markovitz, D. M.; Kaplan, M. H.; Gallo, R. C.; Popovic, M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. **1986**, *233*, 215-219.

Anhang

Gefahrstoffverzeichnis

Im folgenden Verzeichnis sind Verbindungen und Lösungsmittel aufgelistet, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Für diese Gefahrstoffe sind die gültigen Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225-319-336-EUH066	210-233-305/351/338
Acetonitril		225-302/312/332-319	210-305/351/338-403/235
Aluminiumoxid	-	-	P260
4-Aminobiphenyl		302-350	201-308+313
2-Aminofluoren		341-351	201-202-281-308+313-405-501
4-Amino-3-iodbenzonitril		315-319-335	261-305/351/338
Ammoniak		314 -335 -400	280-273-304+340-305+351+338-310
Ammoniumchlorid		302-319	305/351/338
Antimon(III)bromid		302-332-411	261-273-301+312-304+340-312-501
Benzol		225-304-315-319-340-350-372	201-210-301+310-305+351+338-308+313-331

Anhang

<i>N,N'</i> -Bis- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-guanidin		315-319-335	261-305/351/338
Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Boran-THF-Addukt		225-260-302-315-318-335	210-223-231-232/261/370-378/422
3-Butin-1-ol		226-315-319-335	210-302/352-304/340-305/351/338
<i>n</i> -Butyllithium		314-304-336-373-411-318-361f-260-225-EUH014	301+330+331-280-305+351+338-273-402+404-210-240-243
<i>t</i> -Butylnitrit		225-332-302	210-233
Calciumchlorid		319	305/351/338
Calciumhydrid		260	402/404
5-Chlor-salicylalkohol		315-319-335	280-305+351+338
5-Chlor-salicylsäure		301	260-262-309+310
2-(4-Cyanophenyl)ethanol		302-312-332	261-280-302+352-304+340-322-501
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en		290-301-314-412	273-280-301/330/331-305/351/338
Dibrommethan		332-412-EUH059	273-501
1,2-Dichlorethan		225-350-302-319-335-315	201-210-302/352-304/340-305/351/338-308/313
Dichloridobis(triphenylphosphin)-palladium(II)	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dichlormethan		351	281-308/313

Anhang

4,5-Dicyanoimidazol		302	260-262
Diethylether		224-302-336- EUH019-EUH066	210-240-403/235
Diisopropylazodi- carboxylat		315-319-335-411	273-302/352-304/340- 305/351/338
1,2 Dimetoxyethan		225-332-360FD	201-210-308+313
4-(Dimethylamino)- pyridin		301-310-315-319	280-302/352- 305/351/338
N,N-Dimethyl- formamid		360D-226-332-312- 319	201-302/352- 305/351/338-308/313
3,5-Dimethyl- phenylhydrazin Hydrochlorid		302-315-319-335	261-302+352- 305+351+338-321- 405-501
Dimethylsulfoxid (deuteriert)	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
1,4-Dioxan		225+EUH019 319+EUH066- 351- 335	281-303+361+353- 305+351+338- 308+313-337+313- 403+235
Di-tert-butyl- dicarbonat		226-330-315-319- 317	210-280-304/340- 305/351/338-302/352
DOWEX 50Wx8		319	280-264-305+351+338
Essigsäure 100%		226-314	280-305+351+338-310
Essigsäurethylester		225-319-336- EUH066	210-240-305/351/338
n-Hexan		225-304-361f-373- 315-336-411	210-240-273-301/310- 331-302/352-403/235
Imidazol		302-314-361d	280-301/330/331- 305/351/338
Kalium		260-314-EUH014	280-301/330/331- 305/351/338-402/404

Anhang

Kaliumcarbonat		315-319	302/352-305/351/338
Kaliumhydrid (35%ige Suspension in Paraffinöl)		260-314-EUH014	280-301/330/331- 305/351/338-402/404
Kaliumhydroxid		314-302-290	280-301/330/331- 305/351/338
Kaliumphosphat		315-318	280-305+351+338
Kalium- <i>tert</i> -butanolat		261-302-314- EUH014	280-301/330/331- 305/351/338-402/404
Kieselgel	-	-	260
Kupfer(II)acetat		302-315-319-335- 400	261-273-305/351/338
Kupfer(I)iodid		302-315-319-335- 400	261-273-305/351/338
Lithium- aluminiumhydrid		260-314	223-231+232-280- 305+351+338- 370+378-422
Magnesium-sulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG.		
Lithiumchlorid		302-315-319	302/352-305/351/338
Magnesium		260-250	210-402/404
Mercaptoethanol		302-411-315-335- 311-319	280-312-302+350-261- 273-301+312- 305+351+338
Methanol		225-301/311/331- 370	210-280-302/352- 403/235
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon		360D-319-335-315	201-308/313- 305/351/338-302/350
Natriumcarbonat		319	260-305/351/338

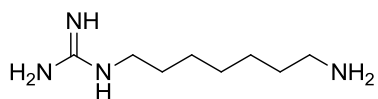
Anhang

Natrium		260-314-EUH014	280-301/330/331-305/351/338-402/404
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Natriumhydrid		260	223-231+232-370+378-422
Natriumhydroxid		314-290	280-301/330/331-305/351/338
Natriumnitrit		272-301-400	220-273-301+310
Natriumsulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Palladium/Kohle		315-319	305+351+338
Pd EnCat TPP30®		351-361f-412	273-281
Petrolether (50-70 °C)		225-304-336-411-EUH066	210-273-243-301/310-331
Phosphorylchlorid		330-302-314-372-EUH014-EUH029	233-271-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Phosphorpentoxid		314	260-280-301/330/331-305/351/338
Pyridin		225-302/312/332	210-233-302/352
Salzsäure (25%)		314-335	261-280-305/351/338-310
Schwefelsäure (95-97%)		290-314	280-301/330/331-305/351/338
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid		228-314	210-280-301/330/331-305/351/338
Tetrahydrofuran		225-319-335-EUH019	210-233-243-305/351/338

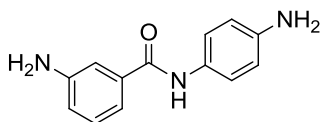
Anhang

Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Thionylchlorid		EU014-EU029-302-314-332	260-264-280-301+312-301+330+331-303+361+353-304+340-305+351+338-310-321-405-501
Toluol		225-304-315-336-361d-373	210-240-301/310-331-302/352-403/235
4-Toluolsulfonylchlorid		315-318	302/352-305/351/338-313
Trichlormethan (deuteriert)		351-302-373-373-315	201-202-260-264-270-280-281-301+312-302+352-308+313-314-321-330-332+313-362-405-501
Triethylamin		225-332-312-302-314-335	210-280-301/330/331-302/352-305/351/338
Triethylamin-Trihydrofluorid		300-310-314-330	260-262-264-280-284-301+310-301+330+331-302+350-303+361+353-304+340-305+351+338-320
N,N,N-Trimethylhexadecylammoniumbromid		302-315-319-335-410	273-302/352-304/340-305/351/338
Triphenylphosphin		302-317-413	262-273-280-302/352
Wasserstoff		220	210-377-381-403
Zinn(II)chlorid		302-314	280-305+351+338-310

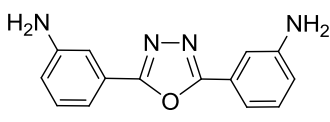
Verbindungsübersicht Teil 1



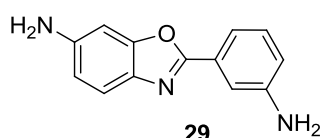
GC7 1



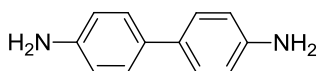
26



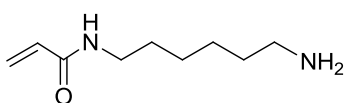
27



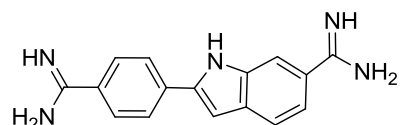
29



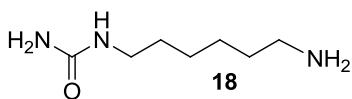
5



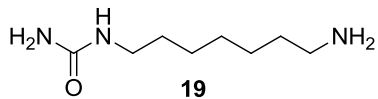
28



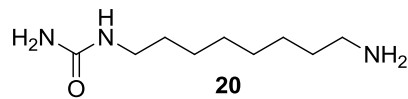
17



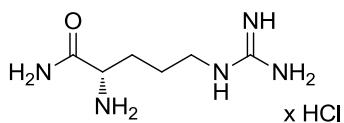
18



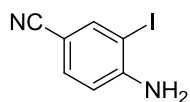
19



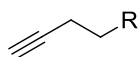
20



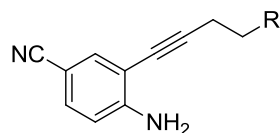
16



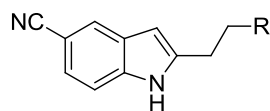
50



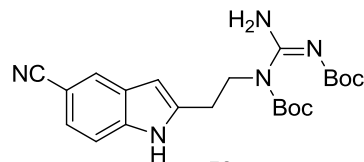
55a: R = Br
55b: R = OH



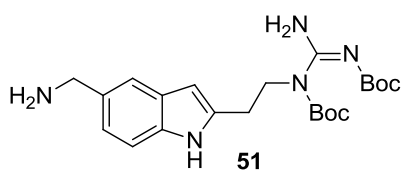
54a: R = Br
54b: R = OH
54c: R = OTBDMS



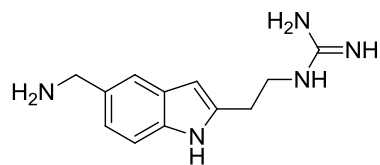
53a: R = Br
53b: R = OH
53c: R = OTBDMS



52

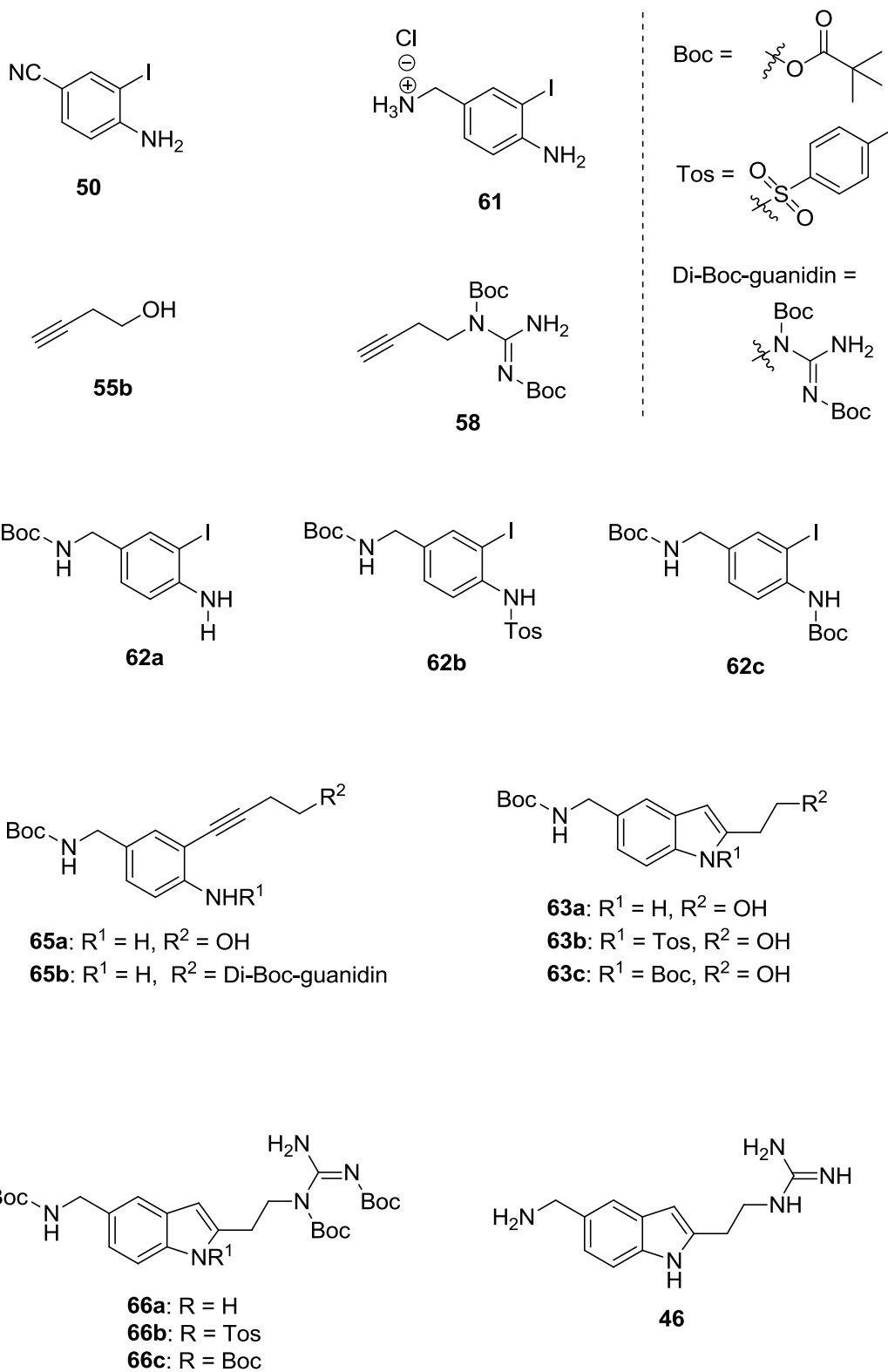


51

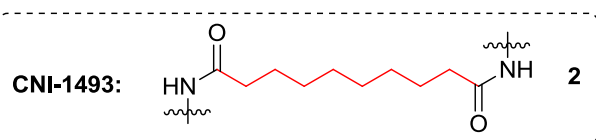
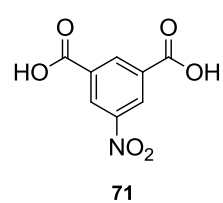
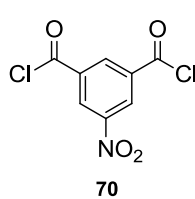
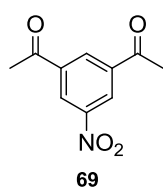
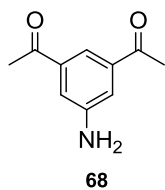
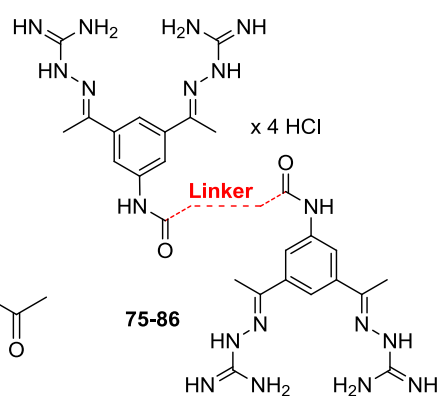
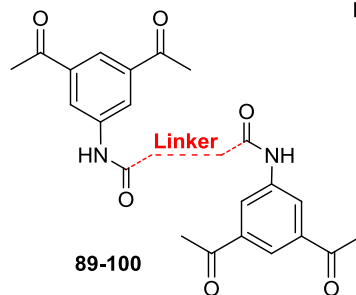
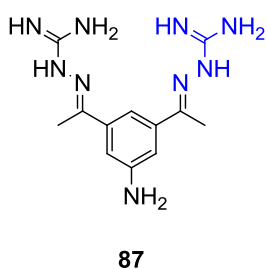
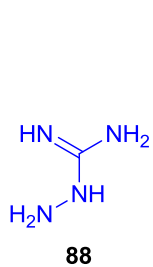
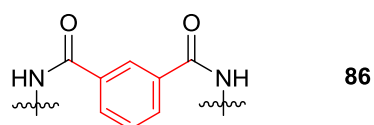
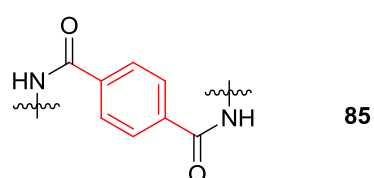
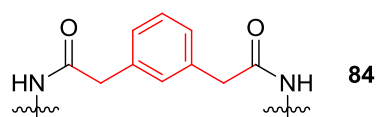
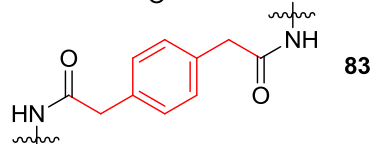
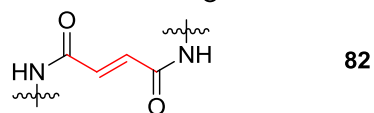
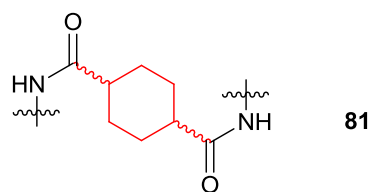
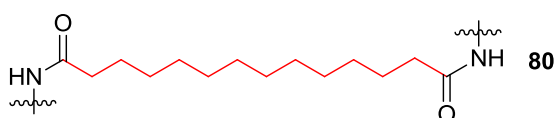
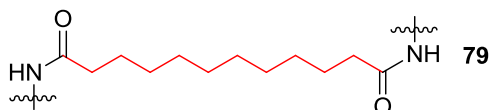
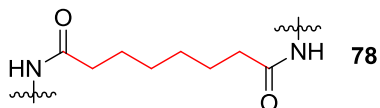
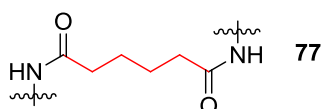
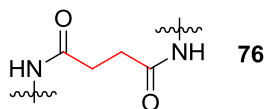
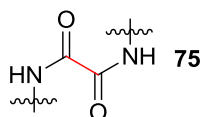


46

Verbindungsübersicht Teil 1.1



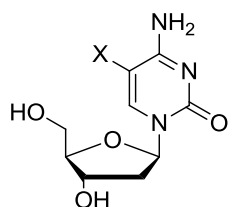
Verbindungsübersicht Teil 2

**Linker:**

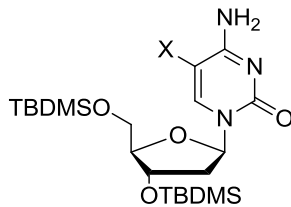
Verbindungsübersicht Teil 3

2'-dC

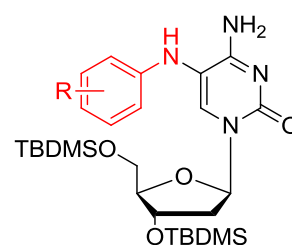
106



105a: X = Br
105b: X = I



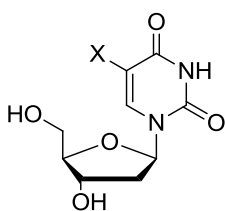
103a: X = Br
103b: X = I



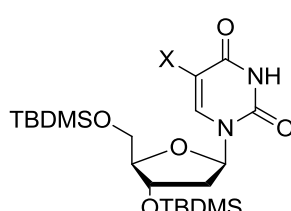
102

2'-dU

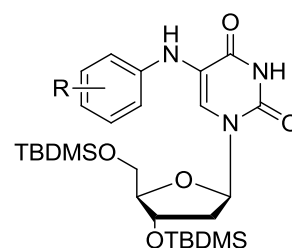
113



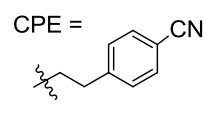
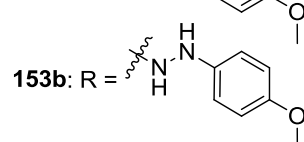
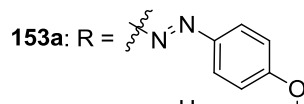
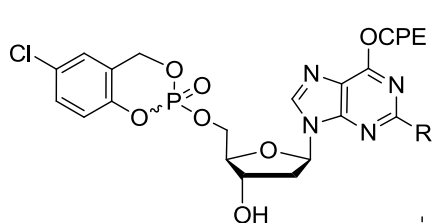
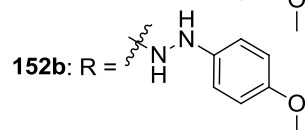
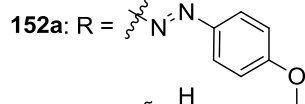
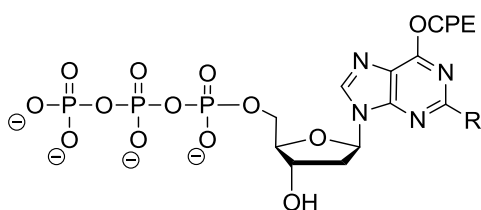
112a: X = Br
112b: X = I



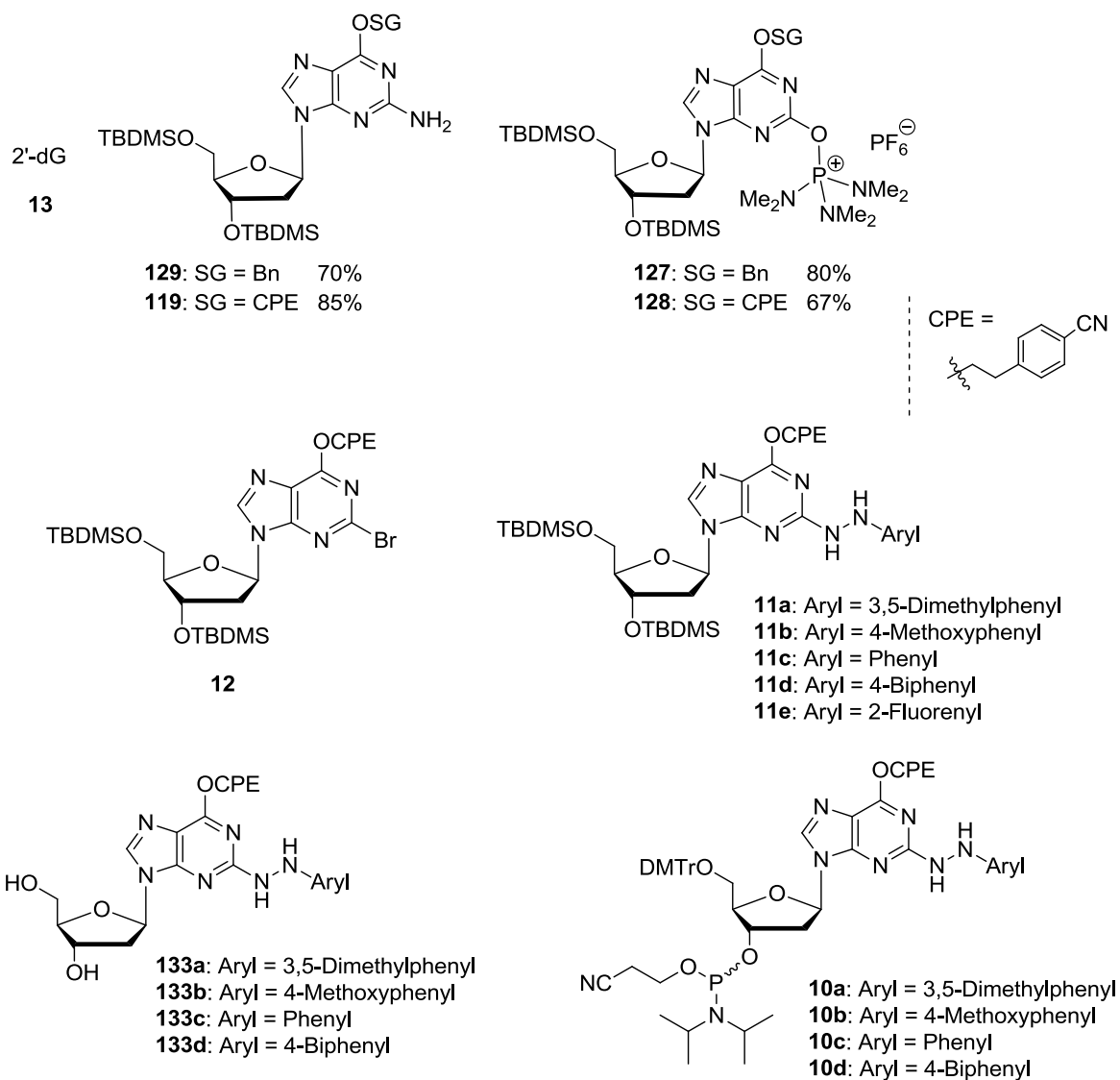
110a: X = Br
110b: X = I



109



Verbindungsübersicht Teil 3.1



Oligonucleotid	Modifikation	Sequenz
136	Gegenstrang	5'-d(GAT GGC GCC GAG)
137	unmodifiziert	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
138	N^2 -(3,5-DMA)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
139	N^2 -(4-Anisidin)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
140	N^2 -(Anilin)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
141	N^2 -(4-ABP)	5'-d(CTC GGC GCC ATC)
142	A-mismatch	5'-d(CTC GGC ACC ATC)
143	T-mismatch	5'-d(CTC GGC TCC ATC)
144	C-mismatch	5'-d(CTC GGC CCC ATC)
145	abasic	5'-d(CTC GGC dRCC ATC)

Lebenslauf

Marcus Schröder

geboren am 11.12.1982 in Hamburg

Schulausbildung

1989-1993	Grundschule Mühlenschule, Holm-Seppensen
1993-1995	Orientierungsstufe Am Kattenberge, Buchholz i.d.N.
1995-2002	Gymnasium am Kattenberge, Buchholz i.d.N. - Abschluss: Abitur

Zivildienst

2002-2003	Zivildienst im Reha Zentrum Waldklinik Jesteburg, Jesteburg
-----------	---

Akademische Ausbildung

10/2003-02/2008	Diplomstudiengang Chemie, Universität Hamburg
03/2008-11/2008	Diplomarbeit: Thema: „Synthese und Analyse von N^2 -Arylamin-modifizierten Oligonucleotiden“, am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Betreuer: Prof. Dr. Chris Meier Abschluss: Diplom-Chemiker (Note: sehr gut)
seit 01/2009	Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg

Auslandserfahrung

09/2006-11/2006	Forschungspraktikum an der Universität Oslo, Norwegen Thema: “Cyclic Five-Membered Palladium Iminoyl Carbenes as Potential Catalysts for C-C Cross-Coupling Reactions”, Betreuer: Prof. Dr. M. Tilset.
-----------------	---

Universitäre Arbeiten

01/2009-09/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Department Chemie der Universität Hamburg: Assistent im Grundpraktikum für Organische Chemie sowie im Integrierten Synthesepraktikum in Anorganischer und Organischer Chemie
-----------------	--

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

- N. Böge, S. Krueger, M. Schröder, C. Meier, A New Short and Efficient Synthetic Route to C8-Acetylarylamine 2'-Deoxyguanosine Phosphoramidites, *Synthesis* **2007**, 3907 - 3914.
- N. Böge, M. Schröder, C. Meier, First Route to Phosphoramidites of N^2 -Hydrazinoaryl- and N^2 -Azoaryl-dG Adducts and their Site-Selective Incorporation into DNA Oligonucleotides, *Synlett* **2008**, 1066 - 1070.
- K. A. Netland, A. Krivokapic, M. Schröder, K. Boldt, F. Lundvall, M. Tilset, Synthesis, X-ray Structures, and Catalytic Applications of Palladium(II) Complexes Bearing *N*-Heterocyclic Iminocarbene Ligands, *J. Organomet. Chem.* **2008**, 693, 3703 - 3710.
- M. Schröder, A. Kolodzik, B. Windshügel, M. Krepstakies, P. Priyadarshini, M. Rarey, J. Hauber, C. Meier, Rational Drug Design - Screening and Synthesis of Potential Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication, *Antiviral Res.* **2010**, 86, A67.
- M. Woriedh, I. Hauber, A. L. Martinez-Rocha, C. Voigt, F. J. Maier, M. Schröder, C. Meier, J. Hauber, W. Schäfer, Preventing Fusarium Head Blight of Wheat and Cob Rot of Maize by Inhibition of Fungal Deoxyhypusine, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, 24, 619 - 627.
- P. Ziegler, T. Chahoud, T. Wilhelm, N. Pällman, M. Braig, V. Wiehle, S. Ziegler, M. Schröder, C. Meier, A. Kolodzik, M. Rarey, J. Panse, J. Hauber, S. Balabanov, T. H. Brümmendorf, Evaluation of Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting BCR-ABL Positive Leukemias, *Invest. New Drugs* **2012**, 30, 2274-2283.

Patentanmeldung

- C. Meier, M. Schröder, M. Rarey, A. Kolodzik, J. Hauber, P. Priyadarshini, M. Krepstakies, Desoxyhypusin-Synthase Inhibitoren, Patent: DE102012103405.2

Posterbeiträge

- M. Schröder, A. Kolodzik, B. Windshügel, M. Krepstakies, P. Priyadarshini, M. Rarey, J. Hauber, C. Meier, Rational Drug Design - Screening and Synthesis of

Potential Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication; *23rd International Conference on Antiviral Research*, 25.-28. April 2010, San Francisco, CA, USA.

- M. Schröder, A. Kolodzik, M. Krepstakies, J. van Lunzen, J. Hauber, C. Meier, Screening and Synthesis of Deoxyhyposine Synthase Inhibitors Targeting a Cellular Factor Needed in HIV-1 Replication; *25th International Conference on Antiviral Research*, 16.-19. April 2012, Sapporo, Japan.

Vortragsbeitrag

- C. Meier, M. Schröder, A. Kolodzik, M. Krepstakies, R. Hilgenfeld, J. van Lunzen, J. Hauber, M. Rarey, Screening and Synthesis of Deoxyhyposine Synthase Inhibitors Targeting a Cellular Factor Needed in HIV-1 Replication; *25th International Conference on Antiviral Research*, 16.-19. April 2012, Sapporo, Japan.

Folgende Bachelorarbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation unter meiner Betreuung angefertigt und teilweise bereits veröffentlicht:

- Katharina Pfaff, *Synthesis of Potential Deoxyhypusine Synthase Inhibitors*, Bachelor-Arbeit, Universität Hamburg, 2011.
- Sara Otto, *Synthesis and Characterization of N²-Arylamine 2'-dG Modified Nucleotides and their Incorporation in Oligonucleotides*, Bachelor-Arbeit, Universität Hamburg, 2011.
- Dennis Hieke, *Optimization of the Synthesis of a Deoxyhypusine Synthase Inhibitor*, Bachelor-Arbeit, Universität Hamburg, 2012.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Synthese neuer Inhibitoren der Desoxyhypusinsynthase als potentielle Wirkstoffe gegen HIV-1“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

(Ort, Datum)

Dipl.-Chem. Marcus Schröder