

SYNTHESE UND TESTUNG POTENTIELLER ELONGIN–C-ANTAGONISTEN ALS NEUARTIGE HIV-THERAPEUTIKA



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Diplom-Chemiker Christoph Menrath

geb. in Würzburg

Mainz 2014

Eingereicht beim Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften am:

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

DANKSAGUNG

Zusammenfassung

Weltweit sind über 34 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. Da die Behandlung mit der HAART-Therapie aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus oft fehlschlägt, ist die stetige Forschung an neuen, verbesserten Wirkstoffen zwingend nötig. Mit einem neuartigen Therapieansatz, der die Aufrechterhaltung des menschlichen antiretroviralen Schutzmechanismus durch Hemmung des APOBEC3G-Abbaus zum Ziel hat, existiert eine neue Möglichkeit zur Bekämpfung der Infektion. Im Gegensatz zu den HAART-Virustatika soll hier das menschliche Immunsystem aufrechterhalten werden, sodass es die Abwehr des Virus selbst übernehmen kann. Der durch das Virus induzierte Abbau von APOBEC3G ist gekoppelt an die Bildung eines Komplexes aus mehreren Proteinen, darunter das virale Protein *vif* (viral infectivity factor) und das humane Protein Elongin-C. Wird eine der Interaktionen dieser Komplexbildung gehemmt, so kann APOBEC3G nicht mehr abgebaut werden und der humane Schutzmechanismus bleibt aufrechterhalten.

Die vorliegende Arbeit widmete sich in diesem Zusammenhang der Suche nach Inhibitoren der *vif*-Elongin-C-Interaktion. Nach Dockingstudien wurden potentielle Kandidaten synthetisiert und anschließend zunächst mit Hilfe der Mikrokalorimetrie (ITC) und der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) auf ihre Affinität zu rekombinant exprimiertem Elongin-C getestet. Zusätzlich wurde ein auf der Mikroskalierten Thermophorese (MST) basierender Bindungsassay etabliert, und die Substanzen auch mit dieser Methode getestet. Während die Bindung in diesen Assays nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, zeigte sich eine Substanz in *In-vitro*-Tests auf Hemmung der APOBEC3G- und *vif*-abhängigen Virusreplikation als sehr vielversprechend. Auch wenn der genaue molekulare Wirkort in weiteren Tests erst noch ermittelt werden muss, stellt diese Molekülstruktur aufgrund der bisherigen Testergebnisse bereits eine vielversprechende Basis für weitere Derivatisierungen dar.

Abstract

Worldwide more than 34 millions of people are infected with the HI virus. Since the treatment with the HAART therapy often fails due to the high viral mutation ratio the research for new drugs is necessary. The novel therapy approach is an attempt to keep the human anti-viral immune system active by preventing the degradation of the human protein APOBEC3G. The virus-induced degradation of APOBEC3G is coupled to the formation of a complex which consists of several proteins, e.g. the viral protein *vif* (viral infectivity factor) and the human protein Elongin–C. By preventing one of the interactions of the formation of this complex, degradation of APOBEC3G is not possible any longer and the human anti-retroviral immune system stays active.

In this context the aim of the present PhD thesis was the search for inhibitors of the *vif*-Elongin–C-interaction. After docking studies potential candidates were synthesized and tested for their affinity to recombinantly expressed Elongin–C. The methods used were isothermal calorimetry (ITC) and surface plasmon resonance spectroscopy (SPR). In addition a binding assay based on microscale thermophoresis (MST) was established and the substances additionally tested with this method. While it was not able to verify a binding in these assays, one substance delivered promising results in *In-vitro*-assays which analyzed the inhibition of the APOBEC3G- and *vif*-dependent replication of the virus. Although the exact molecular target has to be identified in further tests, this molecule structure represents a promising basis for further derivatives.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| abs. | absolut |
| Äq. | Äquivalent |
| Bn | Benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl |
| CDCl ₃ | deuteriertes Chloroform |
| CD ₃ OD | deuteriertes Methanol |
| d | Tage |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EE | Essigsäureethylester |
| ESI-MS | Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie |
| Et | Ethyl |
| EtOH | Ethanol |
| FD-MS | Felddesorptions-Massenspektrometrie |
| Ges. | gesättigt |
| h | Stunde |
| HBTU | <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat |
| HOBt | <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol |
| iPr | <i>iso</i> -Propyl |
| IR | Infrarotspektroskopie |
| i. Vak. | im Vakuum |
| Me | Methyl |
| min | Minute |
| MST | Mikroskalierte Thermophorese |
| NEt ₃ | Triethylamin |

| | |
|-----|---|
| NMR | <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon |
| NMR | Magnetische Kernresonanzspektroskopie |
| PE | Petrolether |
| Ph | Phenyl |
| PPA | Propylphosphonsäuretrianhydrid |
| R | Rest |
| RT | Raumtemperatur |
| SC | Säulenchromatographie |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie |
| tBu | <i>tert</i> -Butyl |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 AIDS..... | 1 |
| 2 Kenntnisstand..... | 9 |
| 2.1 Der Aufbau des HI-Virus | 9 |
| 2.1.1 Allgemeiner Aufbau | 9 |
| 2.1.2 Der Aufbau des viralen Genoms | 12 |
| 2.2 Der Replikationszyklus des HI-Virus | 16 |
| 2.2.1 Adsorption | 16 |
| 2.2.2 Penetration und Uncoating | 16 |
| 2.2.3 Integration in das Wirtszellgenom..... | 17 |
| 2.2.4 Morphogenese und Ausschleusung..... | 21 |
| 2.3 Aktuelle HIV-Therapie: Die Highly Active Anti-Retroviral Therapy | 23 |
| 2.3.1 Nucleosidische bzw. Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI bzw. NTRTI) | 24 |
| 2.3.2 Nichtnucleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) | 25 |
| 2.3.3 Protease-Inhibitoren (PI) | 26 |
| 2.3.4 Integrase-Inhibitoren (INI) | 28 |
| 2.3.5 Entry- und Fusions-Inhibitoren (EI und FI)..... | 30 |
| 2.4 Immunologische Reaktionen nach der HIV-Infektion | 32 |
| 2.4.1 Die Rolle der APOBEC3-Proteine in den CD4-T-Lymphozyten bei der Abwehr von Retroviren | 32 |
| 2.4.2 Spezialfall HI-Virus: Außerkräftsetzung der APOBEC3G-basierten retroviralen Abwehr des Immunsystems durch das akzessorische <i>vif</i> -Protein..... | 34 |
| 2.4.3 Im Zusammenhang mit <i>vif</i> und APOBEC3G stehende, neuartige therapeutische Angriffspunkte | 41 |
| 3 Ausgangssituation und Zielsetzung | 44 |
| 4 Dockingstudien zur Optimierung von A19 | 59 |
| 5 Synthesen | 62 |
| 5.1 Darstellung der CM55-Derivate..... | 62 |
| 5.2 Darstellung der A19-Derivate | 63 |

| | |
|---|-----|
| 5.3 Inhibitoren anderer Stoffklassen | 75 |
| 5.3.1 Inhibitor mit Indol-Grundgerüst | 76 |
| 5.3.2 Auf neuen Dockingstudien basierende Inhibitoren..... | 79 |
| 6 Testergebnisse und Diskussion | 85 |
| 6.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)..... | 85 |
| 6.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) | 86 |
| 6.2.1 Physikalische Grundlagen und Messverfahren..... | 86 |
| 6.2.2 Messungen..... | 87 |
| 6.3 Mikroskalierte Thermophorese (MST) | 90 |
| 6.3.1 Physikalische Grundlagen und Messverfahren..... | 90 |
| 6.3.2 Kontrollmessung | 92 |
| 6.3.3 Protein-Labeling..... | 95 |
| 6.3.4 Kapillartests..... | 97 |
| 6.3.5 Erstes Screening..... | 99 |
| 6.3.6 Genauere Messungen | 105 |
| 7 Weitere Tests | 109 |
| 7.1 Testung auf die Hemmung des APOBEC3G-Abbaus mittels anderer Testverfahren ... | 109 |
| 7.1.1 Testung auf Hemmung der <i>vif</i> -Dimerisierung | 109 |
| 7.1.2 Testung auf Hemmung des <i>vif</i> -abhängigen APOBEC3G-Abbaus..... | 110 |
| 7.1.3 Testung auf Hemmung der APOBEC3G- und <i>vif</i> -abhängigen Infektiosität..... | 111 |
| 7.1.4 Testergebnisse und Ausblick..... | 111 |
| 7.2 Testung auf die Hemmung parasitärer Cystein-Proteasen | 115 |
| 7.3 Testung auf Cytotoxizität und antitrypanosomale Aktivität | 117 |
| 8 Zusammenfassung und Ausblick | 120 |
| 9 Summary..... | 124 |
| Experimentalteil | 127 |
| 10 Allgemeine Vorbemerkungen | 127 |
| 10.1 Verwendete Messgeräte | 127 |
| 10.2 Chromatographische Methoden | 129 |
| 10.3 Verwendete Chemikalien | 129 |
| 10.4 Arbeitsmethoden..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| 11 Allgemeine synthetische Methoden | 131 |
| 11.1 Methode A: Synthesen von Carbonsäureamiden und -estern..... | 131 |
| 11.2 Methode B: Esterhydrolyse | 133 |
| 11.3 Methode C: Nucleophile Substitutionen an Alkoholen..... | 134 |
| 11.4 Methode D: Reduktionen | 134 |
| 11.5 Methode E: Nucleophile Substitutionen mit Aminen | 135 |
| 11.6 Methode F: Einführung von Schutzgruppen | 136 |
| 11.7 Methode G: Entfernung von Schutzgruppen | 138 |
| 11.8 Methode H: Reaktionen am Aromaten | 139 |
| 11.9 Methode I: Nucleophile Addition von Aminen an Carbonylverbindungen zu Iminen | 140 |
| 11.10 Methode J: α -Methylierung von Carbonylverbindungen mit Methyljodid..... | 141 |
| 12 Synthetisierte Zielverbindungen | 142 |
| 13 Synthetisierte Zwischenstufen | 195 |
| Anhang..... | 213 |
| Literaturverzeichnis..... | 217 |
| Quellenverzeichnis | 225 |
| <i>Curriculum Vitae</i> | 227 |

1 Einleitung

1.1 AIDS

Erstmals 1981 beschrieben stellt AIDS (acquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immunschwächesyndrom) heute eine weltweit verbreitete, unbehandelt tödlich verlaufende Krankheit des Immunsystems dar. Ausgelöst wird es durch die zwei Virustypen HIV-1 und HIV-2 (human immunodeficiency virus, Humanes Immundefizienz-Virus), die sich ursprünglich aus Varianten des SIV-Virus (simian immunodeficiency virus, „affenartiges“ Immundefizienz-Virus) entwickelt haben (s. Kapitel 2.1.2), und wahrscheinlich in den 1920er-Jahren auf den Menschen übertragen wurden. Von dort aus hat sich HIV-1 weltweit verbreitet und ist auch für die AIDS-Epidemie verantwortlich, während sich das Verbreitungsgebiet von HIV-2 weiterhin auf Westafrika bzw. Länder, die mit Westafrika Kolonialbeziehungen pflegten, beschränkt.^[1, 2]

Laut UNAIDS waren Ende 2011 weltweit 34 Millionen Menschen infiziert. Eine erschreckend hohe Zahl, 4.6 Millionen mehr als Ende 2001. Allerdings ist die Anzahl der Neuinfektionen sowie die Anzahl der Todesfälle durch AIDS seitdem zurückgegangen, was Tabelle 1 übersichtlich darstellt.^[3]

| | 2001 | 2011 |
|--|----------------|---------------|
| HIV-Infizierte weltweit | 29.4 Millionen | 34 Millionen |
| Anzahl Neuinfektionen | 3.2 Millionen | 2.5 Millionen |
| Todesfälle durch AIDS | 1.9 Millionen | 1.7 Millionen |
| Anteil HIV-infizierter Personen | | |
| Erwachsene | 0.8 % | 0.8 % |
| Jugendliche (15-24), weiblich | 0.4 % | 0.3 % |
| Jugendliche (15-24), männlich | 0.7 % | 0.5 % |

Tabelle 1: Weltweite HIV-Infektionen Anteil an der Gesamtbevölkerung Ende 2011

Die Abbildungen 1-3 zeigen zusätzlich die Anzahl HIV-infizierter Menschen, die Anzahl an Neuinfektionen sowie die Anzahl der Todesfälle im Zusammenhang mit AIDS im zeitlichen Verlauf von 1990 bis 2011.^[3]

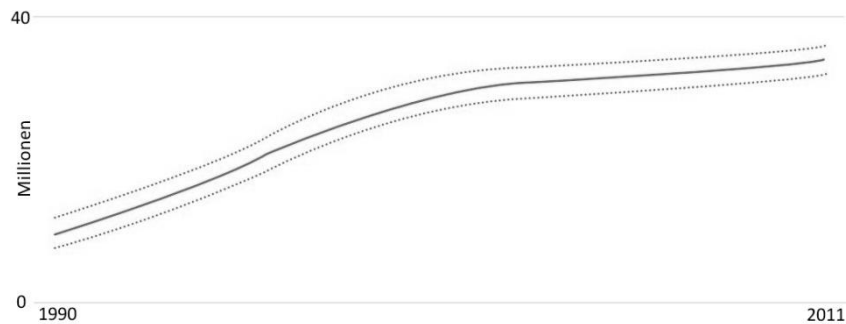


Abbildung 1: Anzahl weltweit HIV-infizierter Menschen

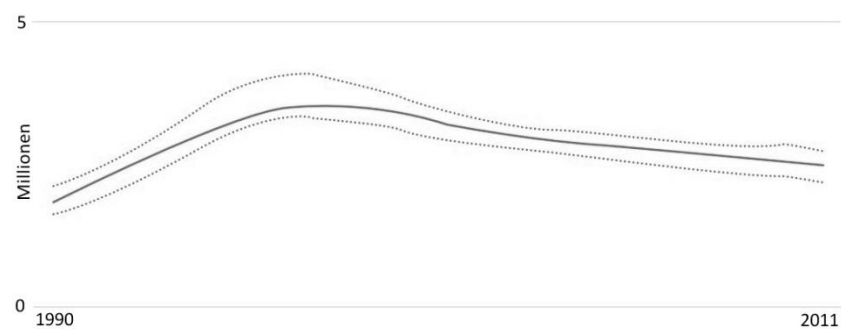


Abbildung 2: Anzahl weltweiter HIV-Neuinfektionen

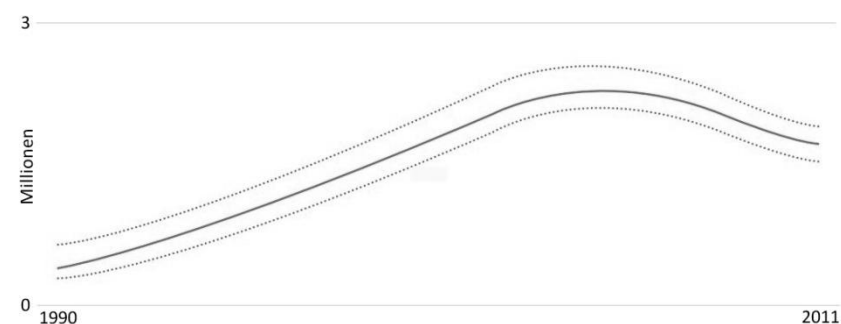


Abbildung 3: Anzahl weltweiter, im Zusammenhang mit AIDS stehender Todesfälle

Der Höhepunkt der Todesfälle durch AIDS lag im Jahre 2005, als etwa 2.3 Millionen Menschen an der Krankheit starben. Der Rückgang der Neuinfektionen und der Todesfälle ist auf die sich stetig verbessernde Aufklärung der Bevölkerung sowie die zunehmend besseren Therapiemöglichkeiten zurückzuführen (s. Kapitel 2.3). Da beides jedoch aufgrund der deutlich schlechteren sozialen und wirtschaftlichen Verhältnisse gerade in den

Entwicklungsländern erheblich schwieriger umsetzbar ist, ist hier die Anzahl HIV-infizierter Personen sowie diejenige der HIV-Neuinfektionen deutlich größer, wie Abbildung 4 deutlich darstellt.

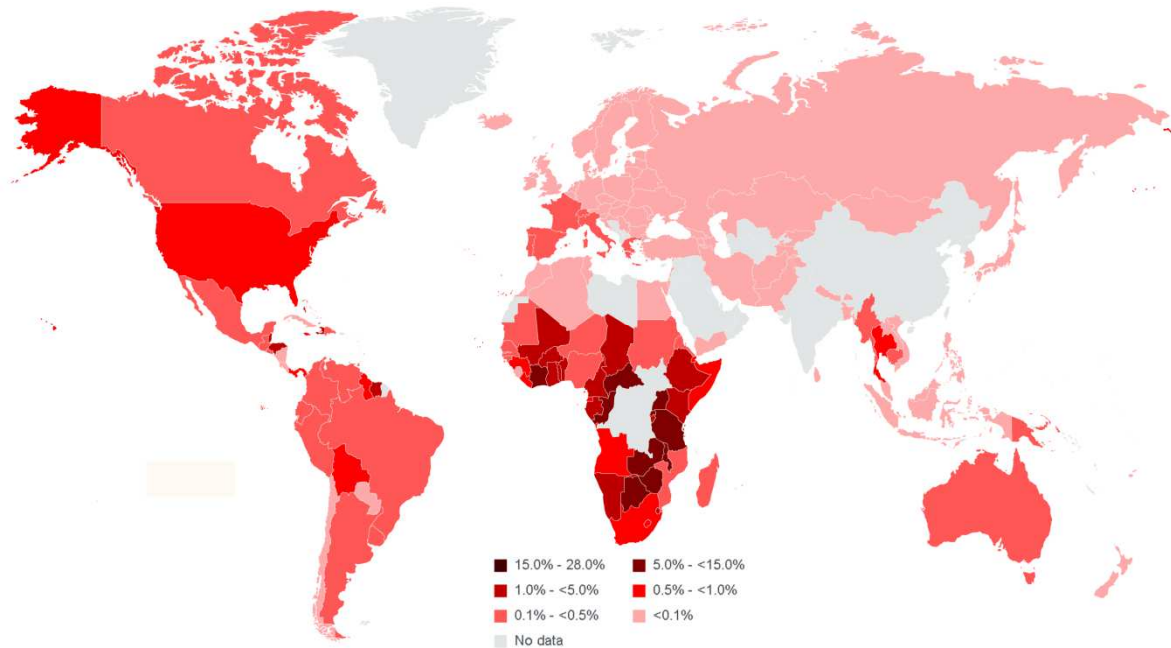


Abbildung 4: Anteil der HIV-infizierten Bevölkerung Ende 2011

In Deutschland waren laut *UNAIDS Report Update 2012* Ende 2011 etwa 73000 Menschen mit dem HI-Virus infiziert, 29000 mehr als 2001. Die Anzahl der Neuinfektionen betrug 2889 – seit 2001 erstmals ein, wenn auch kleiner, Rückgang gegenüber dem Vorjahr (2939 Neuinfektionen). Diese setzen sich folgendermaßen zusammen:^[4]

| Nach Infektionswege | | Nach Geschlecht | |
|--|--------|----------------------|--------|
| Homosexueller Kontakt zwischen Männern: | 54.5 % | Frauen: | 16.0 % |
| | | Männer: | 84% |
| Heterosexueller Kontakt: | 18.8 % | davon: | |
| Intravenöser Drogenabusus | 3.1 % | Homosexuelle Männer: | 84 % |
| Mutter-Kind-Übertragung | 0.5 % | | |
| Keine Angabe | 23.1 % | | |

Tabelle 2: HIV-Infektionswege und -Neuerkrankungen in Deutschland 2009

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, stellt ungeschützter Geschlechtsverkehr die größte Gefahr dar, sich mit dem HI-Virus zu infizieren. Innerhalb dieser Gruppe stellen homosexuelle Männer mit 54.5 % bzw. 1574 Neuinfektionen (projektiert 70.8 % bzw. 2044 Neuinfektionen) nach wie vor die mit Abstand größte Risikogruppe dar. Eine Übertragung einer HIV-infizierten Mutter auf ihr ungeborenes Kind kann bei der Geburt erfolgen, da hier ein Blutkontakt stattfindet – in solchen Fällen wird das Kind deshalb im Allgemeinen per Kaiserschnitt zur Welt gebracht. Weiterhin können Mütter ihre Kinder beim Stillen infizieren, weshalb hier auf Alternativen zurückgegriffen werden sollte. Weitere Infektionsmöglichkeiten stellen das Tätowieren sowie Blut- und Organtransplantationen dar, wobei letztere seit der Einführung von HIV-Routine-Tests vor Transplantationen im Jahre 1985 keine Rolle mehr spielen (2011: keine Neuinfektion).

Die Pathogenese des HI-Virus ist durch eine chronische Verminderung der Anzahl CD4⁺-Lymphozyten gekennzeichnet. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem, weshalb es bei deren Verminderung zur Immunschwäche kommt und in deren Folge zu den opportunistischen („typischen“) Erkrankungen sowie teilweise zur akuten HIV-Krankheit, („akute Infektion“, Stadium I). Der Krankheitsverlauf von AIDS wurde im Jahre 1993 vom *Center for Disease Control* (CDC) in drei verschiedene Stadien eingeteilt, von denen sich jedes, je nach Konzentration der T-Lymphozyten, in drei Subklassen unterteilen lässt:^[1, 2, 5, 7]

Stadium I bzw. A: Im ersten Stadium, auch „Akute Infektion“ oder „Primärinfektion“ genannt, treten bei nur 20-30 % der Infizierten klinische Symptome auf, zumeist zehn bis dreißig Tage nach der Erstinfektion. Üblicherweise treten hierbei Fieber, grippale Muskelschmerzen, Müdigkeit, Nachtschweiß, Durchfall, Übelkeit, Kopf-, Gelenk- und Halsschmerzen, sowie Pilzinfektionen im Mund auf. Da gerade die erstgenannten Symptome jedoch denjenigen einer (leichten) Grippe ähneln und meistens weniger als vierzehn Tage andauern, werden sie in den meisten Fällen nicht in den Zusammenhang mit einer HIV-Infektion gebracht. Zusätzlich kann es zu massiven Lymphknotenschwellungen kommen. In diesem Stadium vermehrt sich

das HI-Virus massiv, weshalb die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen, die vom Virus befallen werden, erniedrigt sein kann. Antikörper gegen HIV können vorhanden sein, aber auch fehlen.

Stadium II bzw. B: Die asymptomatische Phase, auch als subklinische Persistenz- oder Latenzphase bezeichnete Krankheitsphase beginnt einige Wochen nach dem ersten Stadium und kann sich über mehrere Wochen bis hin zu einigen Jahrzehnten erstrecken. Dieses Stadium verläuft zumeist symptomfrei, da das Immunsystem trotz der sich stark vermehrenden Viren noch in der Lage ist, die Infektion unter Kontrolle zu halten. In dieser Krankheitsphase sind die Infizierten erstmals infektiös. Da die Krankheit im zweiten Stadium erstmals sicher nachweisbar ist, leiden viele der Betroffenen unter massiven psychischen Problemen. Nach dem heutigen Stand der Medizin bedürfen die Patienten, deren CD4⁺-T-Lymphozytenzahl bei über 200/μl liegt, in diesem Krankheitsverlauf noch keiner antiretroviralen Behandlung.

Stadium III bzw. C: In diesem Stadium, auch symptomatische Phase genannt, das ein bis fünfzehn Jahre nach Erstinfektion beginnt, setzt die Endphase der Erkrankung ein, das AIDS-Vollbild wird hier erreicht. Bereits einige Jahre vor Auftreten der typischen Krankheitssymptome tritt in den meisten Fällen das Stadium der Lymphadenopathie (LAS) ein, das sich durch eine über mehrere Monate dauernde Vergrößerung mindestens zweier Lymphknoten kennzeichnet. Auf dieses Stadium kann der sogenannte AIDS-related complex (ARC) folgen. Hier kommt es zu weiteren, jedoch ebenfalls meist nicht AIDS-typischen Symptomen („AIDS-Vorboten“). Hierzu zählen Angiomatose, Zervixdysplasie, Gürtelrose, Listeriose, Beckenentzündungen, Neuropathien, Fieber, Diarrhö, Nachtschweiß, Gewichtsverlust sowie diverse Erkrankungen der Zunge. Die Krankheit kann in dieser LAS- bzw. ARC-Phase über Jahre stabil bleiben, jedoch auch binnen weniger Wochen in das AIDS-Vollbild übergehen. Kennzeichnend für diese Phase ist eine Vielzahl

opportunistischer Infektionen („AIDS-typische“ Infektionen), die auf ein massiv geschwächtes Immunsystem zurückzuführen sind. Außerdem gilt eine $CD4^+$ -T-Lymphozytenzahl von weniger als 200 pro μl Blut auch ohne solche Symptome als kennzeichnend für dieses Stadium. Zu den opportunistischen Infektionen zählen geistiger Zerfall bis hin zur Demenz, chronische Lungenentzündung, diverse Pilzinfektionen am ganzen Körper, bakterielle Infektionen wie Tuberkulose, Infektionen durch Protozoen (Toxoplasmosen), Netzhautentzündungen sowie Herpesinfektionen. Zusätzlich tritt eine Vielzahl verschiedener Tumoren auf. Hierzu gehören vor allem verschiedene Kaposi-Sarkome, außerdem hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (z.B. Lymphom des Zentralnervensystems, Zervixkarzinom). Da die Therapiemöglichkeiten stetig verbessert werden (siehe Kapitel 2.3), treten diese opportunistische Infektionen heute in den westlichen Ländern eher selten auf.

Den Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion unter Berücksichtigung der Konzentration der $CD4^+$ -T-Lymphozyten sowie derjenigen der HIV-RNA-Kopien wird in Abbildung 5 übersichtlich dargestellt.

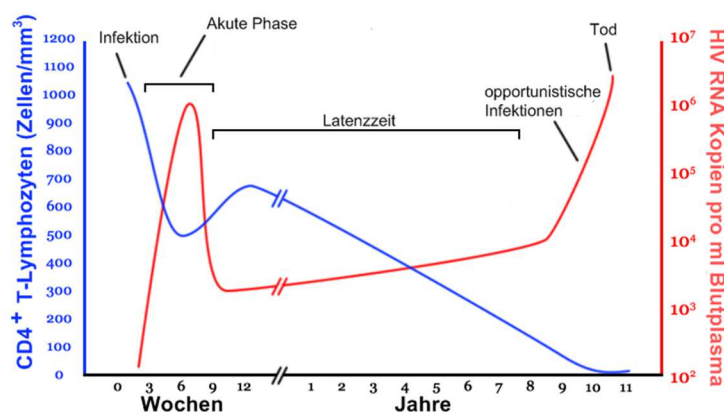


Abbildung 5: Verlauf einer HIV-Infektion

Eine HIV-Infektion ist heute auf verschiedene Arten nachweisbar.^[1, 2, 5] Zum einen besteht die Möglichkeit, die HIV-Antikörper nachzuweisen. So beruht der typische, standardmäßig durchgeführte „HIV-Test“ auf dem Nachweis der Antikörper im ELISA (Enzyme-linked

Immunsorbent Assay). Der Nachweis von HIV-1 und HIV-2 im ELISA-Test der vierten Generation, die seit 1999 im Einsatz ist, basiert wie bei den älteren Generationen auf dem Nachweis der Antikörper durch den Einsatz der viralen Glycoproteine gp120 und gp41 (s. Kapitel 2.1.2) als Antigene, also nicht auf dem Nachweis der Viren direkt. Zusätzlich kann diese Generation jedoch auch virale HIV-1-p24-Capsidprotein-Antigene nachweisen, die bereits vor den Antikörpern im Körper auftreten – eine Tatsache, die die bisherige diagnostische Lücke zumindest teilweise aufhebt, denn Antikörper gegen HI-Viren werden im Allgemeinen erst drei bis sechs Wochen nach der Infektion gebildet (siehe Abbildung 6).

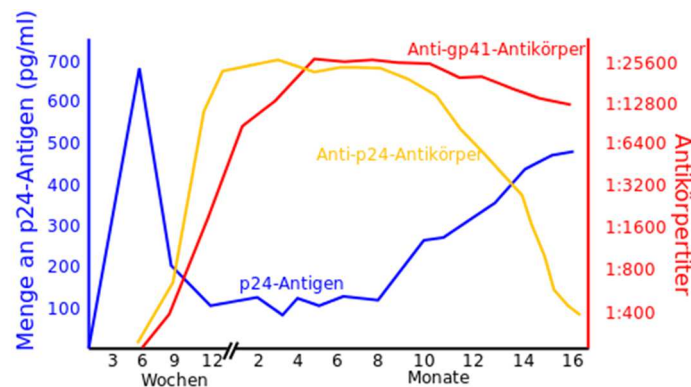


Abbildung 6: Bildung von Antikörpern und -genen im Verlauf der HIV-Infektion

Obwohl der ELISA-Test äußerst zuverlässige Ergebnisse liefert (bis zu 99 % Richtigkeit zwölf Wochen nach Infektion), kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen, weshalb positive Ergebnisse durch einen weiteren Test – den Antikörpernachweis im Western-Blot – bestätigt werden müssen. Ziel dieses Tests ist es, herauszufinden, ob ein positiver Nachweis im ELISA auf einer unspezifischen Reaktion beruht. Dazu wird ein virales Proteingemisch durch Elektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran übertragen. Versetzt man diese Membran nun mit Patientenserum, kann durch Bindung an entsprechende Proteinbanden (mindestens zwei) ein positiver Nachweis bestätigt werden. Da, wie oben bereits erwähnt, in den ersten Wochen nach der Infektion allerdings nur HIV-1-p24-Capsidprotein-Antigene gebildet werden und demnach in dieser Phase auch nur diese an die Proteinbanden binden können, muss der Western-Blot einige Wochen später erneut durchgeführt werden, um das Ergebnis durch Bindung an mehrere Banden zu bestätigen. Schließlich lässt sich die HI-Infektion noch über die Existenz viraler RNA oder proviraler DNA (s. Kapitel 2.2) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen. Hierzu wird im

Allgemeinen zunächst die RNA aus dem Serum durch die Reverse Transkriptase (s. Kapitel 2.2.3) in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR vervielfältigt. Heutzutage ist der Nachweis in Echtzeit und somit auch die Bestimmung der Viruskonzentration im Serum möglich. Da dieser Test die Viren direkt nachweist und äußerst empfindlich ist, jedoch auch deutlich teurer, findet er nur in bestimmten Situationen Anwendung, wie beispielsweise im diagnostischen Fenster anderer Test, zur Überprüfung von Blutspenden oder zur Bestimmung der Viruslast vor Einsatz der HAART, der heute gängigen Therapiemethode bei einer HIV-Infektion (s. Kapitel 2.3). Weiterhin existiert eine Reihe verschiedener HIV-Schnelltests, die das Virus bereits direkt nach der Infektion nachweisen können (beispielsweise nach Blutkontakt mit HIV-Infizierten). Ihre Rate falsch positiver Ergebnisse ist hier jedoch deutlich höher, weshalb sie unbedingt durch weitere Tests bestätigt werden müssen.^[1, 2, 5, 6, 7,]

2 Kenntnisstand

2.1 Der Aufbau des HI-Virus

2.1.1 Allgemeiner Aufbau

Als Viren bezeichnet man kleine, 16 bis 300 nm große, infektiöse Partikel, deren Verbreitung extrazellulär stattfindet, allerdings zur Vermehrung (Replikation) eine Wirtszelle benötigen. Sie stellen selbst keine Zellen dar, enthalten aber den genetischen Code, der zu ihrer Replikation benötigt wird. Da sie diese allerdings nicht selbst durchführen können, müssen sie eine Wirtszelle infizieren, damit diese den genetischen Code vervielfacht. Die etwa 3000 bekannten Virusarten befallen Zellen sämtlicher Arten von Lebewesen, seien es Eukaryoten (Pflanzen, Tiere, Pilze) oder Prokaryoten (Bakterien und Archaeen). Viren der letzten Gruppe bezeichnet man auch als Bakteriophagen. Die Zelle wird durch die Infektion mit einem Virus stets geschädigt. So kann sie beim Befall gewisser Viren völlig zerstört werden (z.B. HI-Virus), chronisch infiziert überleben, d.h., sie überlebt, produziert aber stets geringe Mengen an Viren (z.B. Herpesviren), oder das Virusgenom verbleibt in einem latenten Zustand, in dem keine weiteren Viruspartikel gebildet werden (z.B. einige tierpathogene Retroviren). Schließlich kann eine Virusinfektion eine Zelle zur unkontrollierten, kontinuierlichen Teilung anregen, was in einer Entartung zur Tumorzelle endet (z.B. Hepatitis B- und C-Virus, Humanes T-lymphotropes Virus HTLV).^[1, 2, 7]

Infektiöse Viruspartikel werden auch als Virionen bezeichnet. Im Inneren der Virionen befindet sich das virale Genom. Dieses kann entweder in Form viraler DNA oder RNA vorliegen, diese können sowohl einzel- als auch doppelsträngig, linear, zirkulär oder geteilt sein und unterschiedliche Polaritäten aufweisen. Liegt die virale Einzelstrang-RNA in der gleichen Orientierung vor wie die mRNA, so bezeichnet man diese als positiv orientiert – ist dies nicht der Fall, als negativ orientiert. Man klassifiziert die Viren deshalb zum einen nach ihrem Genom: Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom, das einer mRNA entspricht, bezeichnet man als ss(+)RNA-Viren (z.B. Picorna-, Toga-, Corona- und Flaviviridae), die noch die Unterfamilie der ss(+)RNA-Viren mit dsDNA-Zwischenstufe beinhalten (Retroviridae).

Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom, das nicht einer mRNA entspricht, bezeichnet man als ss(-)RNA-Viren, hier unterscheidet man solche mit kontinuierlichem Genom (z.B. Rhabdo-, Borna-, und Filoviridae) und solche mit geteiltem Genom (z.B. Arena-, Bunya- und Orthomyxoviridae). Viren mit doppelsträngigem RNA-Genom werden als dsRNA-Viren bezeichnet (Birna- und Reoviridae), solche mit doppelsträngigem DNA-Genom als dsDNA-Viren (z.B. Polyo-, Papillo-, Adeno-, Herpes- und Poxviridae).^[1, 2, 5, 7]

Das virale Genom kann auf mehrere verschiedene Arten umhüllt sein. Zunächst kann es von einem sogenannten Nucleocapsid umgeben sein. Dieses besteht aus zellulären Histonen – viralen Proteinen, die das Genom komplexieren. Das Nucleocapsid kann anschließend noch von einer weiteren Schicht Strukturproteinen, dem sogenannten Capsid, umgeben sein. Diese Proteinschicht ist bei einigen Viren von einer weiteren Lipidhülle umgeben, deren Zusammensetzung der einer Zellmembran ähnelt. Die der Art des Genoms folgende, weitere Klassifikation der Viren erfolgt zunächst nach der Symmetrie ihrer Capside, anschließend nach dem Vorhandensein einer Lipidhülle, nach ihrer Größe, dem Ort ihrer Replikation sowie letztendlich nach der Ähnlichkeit ihres Genoms.^[1, 2, 5, 7]

Dieser Klassifikation folgend lassen sich die beiden HI-Virus-Typen gemäß ihres als ss(+)RNA vorliegenden Genoms, das während der Replikation in einer dsDNA-Zwischenstufe vorliegt, der Familie der Retroviridae (Reverse Transkriptase Onkoviridae) zuteilen. Ihren Namen verdankt diese Virusfamilie der biologisch einzigartigen Fähigkeit, RNA in dsDNA umschreiben zu können (in allen anderen Fällen geschieht das in umgekehrter Richtung), für deren Ausführung das virale Enzym Reverse Transkriptase zuständig ist (s. Kapitel 2.2.3) sowie der Tatsache, dass viele Viren dieser Familie Tumoren auslösen können. Retroviridae sind die einzigen Viren, bei denen das Genom diploid vorliegt, und die eine zelluläre RNA (tRNA) benötigen. Des Weiteren sind sie die einzigen RNA-Viren, die von wirtszelleigenen Transkriptionenzymen übersetzt und neu synthetisiert werden, und die einzigen ss(+)RNA-Viren, deren Genom nicht sofort als Matrix-RNA (mRNA) bei der Infektion benutzt werden kann. Das HI-Virus enthält in seinem Genom bereits sämtliche Informationen zur Replikation, weshalb man es zu den exogenen Retroviren zählt. Da die genannte Reverse Transkription bereits zu Beginn der Virusreplikation erfolgt, gliedern sich die HI-Viren in die Unterfamilie der Orthoretrovirinae ein. Schließlich lassen sie sich innerhalb dieser Unterfamilie der

Gattung der Lentivirinae zuordnen. Ihre Namensgebung (lat. *lentus* = langsam) beruht auf der Tatsache, dass sie zumeist chronische, also langsam fortschreitende Krankheiten verursachen. Sie wurden bisher aufgrund ihrer hohen Spezifität nur in Säugetieren gefunden und verbleiben aufgrund ihrer Fähigkeit, das Immunsystem umgehen zu können (s. Kapitel 2.4), lebenslang im Wirtskörper. Im Vergleich zu anderen Retroviren sind Lentiviren außerordentlich variabel in ihrer Genom-Sequenz, da sie ihre eigenen Gene beeinflussen können. Unter allen Virusarten weisen sie die sich am schnellsten verändernden (evolvierenden) Genome auf.

Das HI-Virus ist ein kugelförmig aufgebautes Viruspartikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm. Es besitzt sowohl ein konisches Capsid als auch eine Lipidhülle und zählt damit zu den behüllten Viren. In diese Hülle integriert sind die beiden Glycoproteine gp120 (externes Glycoprotein EP, 120 kDa) und gp41 (transmembranes Glycoprotein TP, 41 kDa), die nichtkovalent miteinander verbunden sind. gp120, das Hauptantigen des HI-Virus, hat während des Replikationszyklus die Aufgabe, die Adsorption an zelluläre Oberflächenkomponenten sicherzustellen, in diesem Fall die CD4-Rezeptoren von T-Lymphozyten (siehe Kapitel 2.2.1). Weitere Domänen dieses Glycoproteins bestimmen, welcher zusätzliche zelluläre Rezeptortyp zur Adsorption benötigt wird (CCR5 oder CXCR4). gp41 ist für die anschließende Fusion mit der Zellmembran verantwortlich. Die Innenseite der Hüllmembran ist mit den sogenannten Matrixproteinen p17 (MA, 17 kDa) assoziiert, die für ihre Struktur verantwortlich sind. Die sich auf diese Matrixproteinschicht befindenden Linker-Proteine p6 (LI, 6 kDa) sind für die Verbindung zwischen der Hüllmembran und dem Capsid zuständig. Letzteres besteht aus den Capsidproteinen p24 (CA, 24 kDa), welche ihm seine stabile Struktur verleihen. Das Capsid beinhaltet, wie bereits erwähnt, das virale Genom, das im Falle des HI-Virus diploid vorliegt. Die beiden RNA-Genome, die in ihren Charakteristika einer zellulären mRNA entsprechen, werden von Nucleocapsidproteinen p7 (NC, 7 kDa) komplexiert. Weiterhin finden sich im Inneren des Capsids die für die Replikation essentiellen viralen Enzyme Reverse Transkriptase p51/66 (RT), Protease p9 (PR) und Integrase p32 (IN).^[1, 5, 7]

Der Aufbau des HI-Virus ist in Abbildung 7 übersichtlich dargestellt.

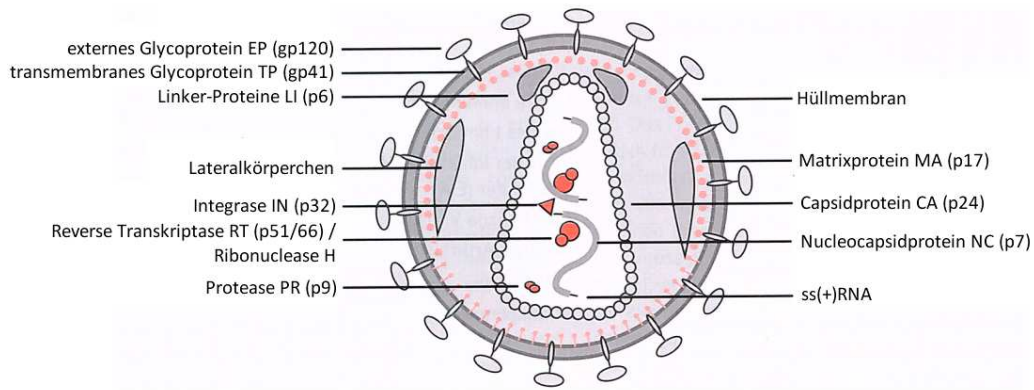


Abbildung 7: Schematische Darstellung des HI-Virus

2.1.2 Der Aufbau des viralen Genoms

Wie bereits erwähnt, gehört das HI-Virus zur Familie der Retroviridae. Bei allen Retroviren liegt das virale Genom in Form einzelsträngiger, positiv orientierter RNA (ss(+)-RNA) vor. Die Genome sämtlicher Retroviren codieren für die drei Hauptgene *gag*, *pol* und *env*. Da sich das HI-Virus der Gattung der Lentivirinae zuordnen lässt und diese zu den komplexen Retroviren zählen, codiert sein Genom für weitere akzessorische und regulatorische Gene: *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *nef* sowie *vpu* (HIV-1) und *vpx* (HIV-2). Bevor auf die genauere Beschreibung der Funktionen der einzelnen Gene sowie den Aufbau eingegangen werden soll, ist der Aufbau des Genoms von HIV-1 und HIV-2 in den Abbildungen 8 und 9 schematisch dargestellt.

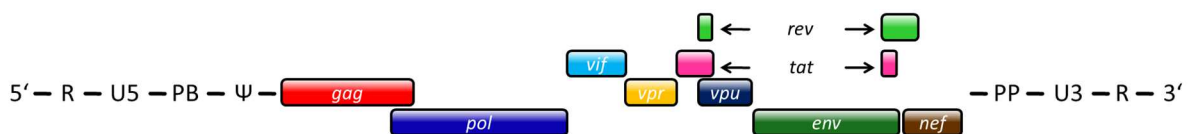


Abbildung 8: Genom des Virus HIV-1

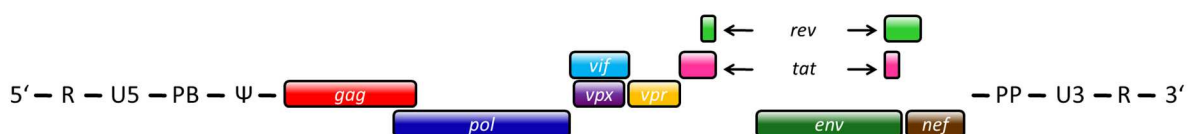


Abbildung 9: Genom des Virus HIV-2

Die Genome der beiden Virustypen besitzen lediglich 60 % Sequenzhomologie und unterscheiden sich unter anderem durch den Austausch des HIV-1-Gens *vpu* durch *vpx* bei HIV-2. Dieser Unterschied lässt sich auf verschiedene Ursprünge der beiden Virustypen zurückführen. So gilt HIV-1 als direkter Nachfolger des Virus SIVcpz, ein bei Schimpansen AIDS-ähnliche Symptome auslösender Virustyp. Da sich das HI-Virus schnell verändert (siehe Kapitel 2.2.3), teilt man HIV-1 heute in die vier Untergruppen M, N, O und P sowie acht Subgruppen (A, B, C, D, F, H, J, K) ein. HIV-2 lässt sich auf das SIVsmm-Virus zurückführen, das Mangaben (meerkatzenähnliche Primaten) befällt, hier jedoch nicht zur Geltung kommt. Man unterscheidet bei HIV-2 acht Untergruppen (A bis H).^[1, 5, 7]

Wie alle eukaryotischen mRNAs enthält die RNA des HI-Virus ein 3'- und ein 5'-Ende. Diese bezeichnen die Stellung der OH-Gruppe (3'-Position) bzw. des Phosphatrestes (5'-Position) im Vergleich zur DNA-Base an der Desoxyribose (1'-Position). Die Primer-Bindungsstelle (PB) im 5'-Bereich des viralen Genoms dient als Hybridisierungsstelle für ein Molekül zellulärer tRNA, die mit ihrem 3'-Ende hiermit wechselwirkt, und ist bei der reversen Transkription unabdingbar. An die PB-Region des Genoms schließt sich die Sequenzregion U5 an, die bei der Integration des Provirus in das Genom der Zelle unabdingbar ist; die R-Stelle (R=redundant) ist bei beiden Enden der RNA identisch. Die regulatorische Sequenz ψ , die bei der Morphogenese (siehe Kapitel 2.2.4) die Aufgabe hat, die RNA-Genome der neu gebildeten Viruspartikel an die Nucleocapsidproteine anzulagern, befindet sich zwischen der PB-Region und den codierenden Genen. Zwischen dieser regulatorischen Sequenz und der Primer-Bindungsstelle befindet sich schließlich noch eine Spleiß-Donorstelle, die für die Produktion der bei HI-Viren vielfach gespleißten mRNA-Moleküle verwendet wird, von denen die akzessorischen und regulatorischen Proteine translatiert werden (siehe Kapitel 2.1.2). Die Polypurin-Stelle PP am 3'-Ende der RNA initiiert die Synthese der dsDNA während der Reversen Transkription, die darauf folgende Sequenzregion U3 beinhaltet – ebenso wie U5 – für die Integration essentielle Basenfolgen, da aus diesen beiden Sequenzregionen hierbei die sogenannten *Long Terminal Repeats* (LTR) gebildet werden (siehe Kapitel 2.2.4). Zusätzlich befinden sich hier wichtige Promotoren und cis-aktive Elemente, die für die Genexpression des in das Zellgenom integrierte Provirus zuständig sind.^[1, 5, 7, 8, 11, 13]

Zwischen den beiden Enden der RNA befinden sich die für die viralen Proteine codierenden Gene. Sie lassen sich in mehrere Klassen einteilen.^[1, 5, 7, 8, 11, 13]

Das Gen *gag* codiert für die Klasse der gruppenspezifischen Antigene (*gag*-Proteine). Während der Morphogenese (siehe Kapitel 2.2.4) wird daraus zunächst das *gag*-Vorläuferprotein pr55 synthetisiert, das anschließend durch die HIV-Protease in die einzelnen Komponenten (MA, CA, NC und LI) gespalten wird. Die *gag*-Proteine sind demnach essentiell für den strukturellen Aufbau des Viruspartikels.

Aus dem *pol*-Gen und dem Ende des *gag*-Gens wird während der Morphogenese das *gag/pol*-Vorläuferprotein pr160 synthetisiert. Die anschließende Spaltung dieses Vorläuferproteins erfolgt nicht durch die HIV-Protease, sondern verläuft autokatalytisch. Hierbei entstehen die für die Replikation des HI-Virus essentiellen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase.

Das *env*-Gen (*envelope*) codiert für die Membranproteine EP und TP. Zunächst wird von einer einfach gespleißten mRNA das Vorläuferprotein gp160 translatiert, das während der Morphogenese im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum durch die zelleigene Protease Furin in die beiden Membranproteine gespalten wird.

Die Gruppe der regulatorischen Proteine wird von den Genen *tat* und *rev* codiert. Aus dem *tat*-Gen werden während der Morphogenese die *tat*-Proteine p9/14 (*transactivator of transcription*, Transaktivatoren der Transkription) gebildet. Im Zellkern angelangt verstärken sie die Transkription des LTR-Promotors und verhindern den Abbruch der durch die RNA-Polymerase II verursachten Polymerisation (siehe Kapitel 2.2.3). Da Lentiviren zu den komplexen Retroviren zählen, aber dennoch ein nur sehr kompaktes Genom besitzen, benötigen sie zusätzliche Proteine, die die Synthese ihrer Genprodukte auch nach der Transkription regulieren können. Die aus dem *rev*-Gen gebildeten *rev*-Proteine p19 (*regulator of expression of virion proteins*, Regulator der Expression virionaler Proteine) haben die Aufgabe, dies zu gewährleisten. Sie sind für die zeitliche Steuerung der Genexpression sämtlicher viraler Proteine, mit Ausnahme von *rev* und *tat*, während des Replikationszyklus verantwortlich.

Schließlich codieren die Gene *vif*, *vpr*, *nef* und *vpu* bzw. *vpx* für die Gruppe der akzessorischen Proteine. Das *vif*-Protein p23 (*viral infectivity factor*) ist während des Replikationszyklus des Virus essentiell für die Unterbindung der zelleigenen retroviralen Abwehr (siehe Kapitel 2.4.1), und fördert die Infektion peripherer Blutlymphozyten. Das Protein *vpr* p11/15 (*virion-assoziiertes Protein R*) wird wie *vif* aus einfach gespleißter mRNA translatiert. Seine Hauptaufgabe besteht darin, den Transport des Präintegrationskomplexes, bestehend aus dsDNA, Integrase und Reverse Transkriptase, in den Zellkern sicherzustellen (siehe Kapitel 2.2.3). Das *nef*-Protein p25/27 (*Negativfaktor*) ist vor allem für die Pathogenese des HI-Virus wichtig. So sorgt es für die Synthese cytotoxischer T-Zellen und Antikörper. Durch eine eigene Kinasefunktion wirkt es autophosphorylierend und induziert eine Signalkaskade, die die infizierten Zellen stimuliert und so die Expression von Viruspartikeln induziert. Weiterhin werden chemotaktische Faktoren aktiviert, die andere T-Zellen „anlocken“, wodurch diese schneller infiziert werden können. Sie reduzieren die Menge der CD4-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was zu einer besseren Aufnahme und Freisetzung der Viruspartikel führt, und sorgen durch Reduktion der MHC-Klasse-I-Antigene dafür, dass die infizierten Zellen nicht vom Immunsystem angegriffen werden. Mit *vpu* p14/16 (*virales Protein U*) existiert im HIV-1-Gen ein weiteres Gen, das für ein akzessorisches Protein codiert. Es fördert die Expression von Nachkommenviren durch Verhinderung der Komplexbildung von gp160 und CD4-Rezeptoren; zusätzlich fördert es deren Ubiquitinylierung und bewirkt dadurch deren Abbau. Letztgenannte Funktion wird beim HIV-2 aufgrund dessen geringeren Affinität zu genanntem Rezeptor nicht benötigt, weshalb dieses im Genom auch kein *vpu*-Gen aufweist. Stattdessen findet man hier das Gen für das *vpx*-Protein p13/16 (*virales Protein X*), das eine große Homologie zu *vpr* ausweist. Es steigert die Replikationsfähigkeit der Viren in den peripheren Blutlymphozyten und Makrophagen.

Die Aufgaben der einzelnen, aus den Genen synthetisierten Proteine werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.2 Der Replikationszyklus des HI-Virus

2.2.1 Adsorption

Der erste Schritt der Replikation ist die Bindung des Viruspartikels an die Zelloberfläche. Wie bereits erwähnt, können sich Viren nicht selbständig vermehren, sondern benötigen hierzu eine Wirtszelle – sie sind demnach Parasiten. Da nicht jeder Zelltyp imstande ist, diese Replikation zu gewährleisten, befallen Viren nur spezifische Zellen, die sie mit Hilfe deren Oberflächenrezeptoren identifizieren. Beim HI-Virus sind dies die T-Lymphozyten, deren CD4-Rezeptoren, Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, als Erkennungsmerkmal für die damit ein Rezeptor-Ligand-Paar eingehenden gp120-Oberflächenproteine des HI-Virus dienen. Für die Verschmelzung mit der Zelle sind die CD4-Rezeptoren allerdings nicht ausreichend. Nach der Bindung an die CD4-Rezeptoren kommt es im gp120 zu einer Konformationsänderung, wodurch eine Bindung zu weiteren Rezeptoren ermöglicht wird, die die Affinität des Virus zur Zelloberfläche erhöht. Diese sind bei den HI-Viren die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5, weshalb man zwischen CXCR4- und CCR5-tropen HI-Viren unterscheidet. Eine bestimmte genetische Veränderung, die eine Mutation am CCR5-Rezeptor zur Folge hat, macht betroffene Menschen deshalb erheblich schwerer infizierbar für HI-Viren letzteren Typs.

2.2.2 Penetration und Uncoating

Der Kontakt von gp120 mit CD4 und einem Chemokinrezeptor führt dazu, dass das ansonsten „versteckt“ gefaltete transmembrane Glycoprotein gp41 freigelegt wird. Dieses kann sich nun entfalten und stellt dabei mit seinem aminoterminalen Ende eine Verbindung zur Zellmembran her. Durch die erneute Faltung werden Virushülle und Zelle zusammengezogen, wodurch es zu deren Verschmelzung kommt. Bei behüllten Viren wie dem HI-Virus findet diese direkt statt.

Die folgende Abbildung verdeutlicht diesen Vorgang.

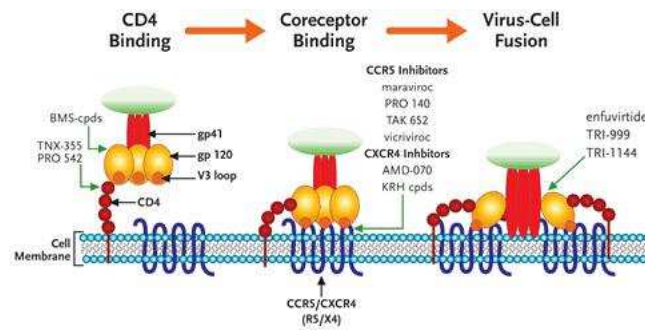


Abbildung 10: Verschmelzung des HI-Virus mit der Zellmembran

Das Viruspartikel kann nun in das Innere der Zelle aufgenommen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Penetration*. Das darauf folgende *Uncoating* bezeichnet die Freisetzung der viralen Bestandteile. Dieser Vorgang, bei dem sich die Capsidmembran des Virus auflöst, ist bis heute nicht genau geklärt. Nach dem Uncoating liegen die viralen Bestandteile des HI-Virus (Nucleinsäure, Proteine, Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) im Cytoplasma der Zelle vor.^[1, 5, 7, 10, 11]

2.2.3 Integration in das Wirtszellgenom

Das in ss(+)-RNA-Form vorliegende Genom des HI-Virus ist nicht in der Lage, in den Zellkern einzutreten, weshalb nun die sogenannte *Reverse Transkription* stattfindet. Hierzu bildet sich aus der Reversen Transkriptase, dem diploiden Virusgenom sowie weiteren viralen

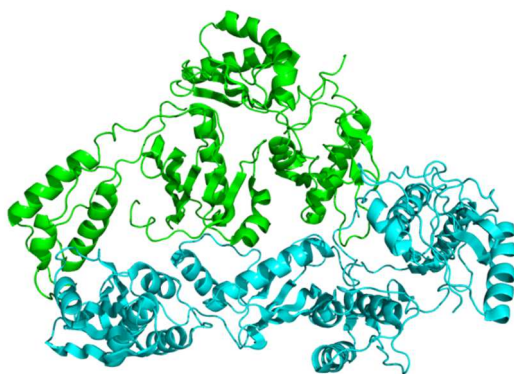


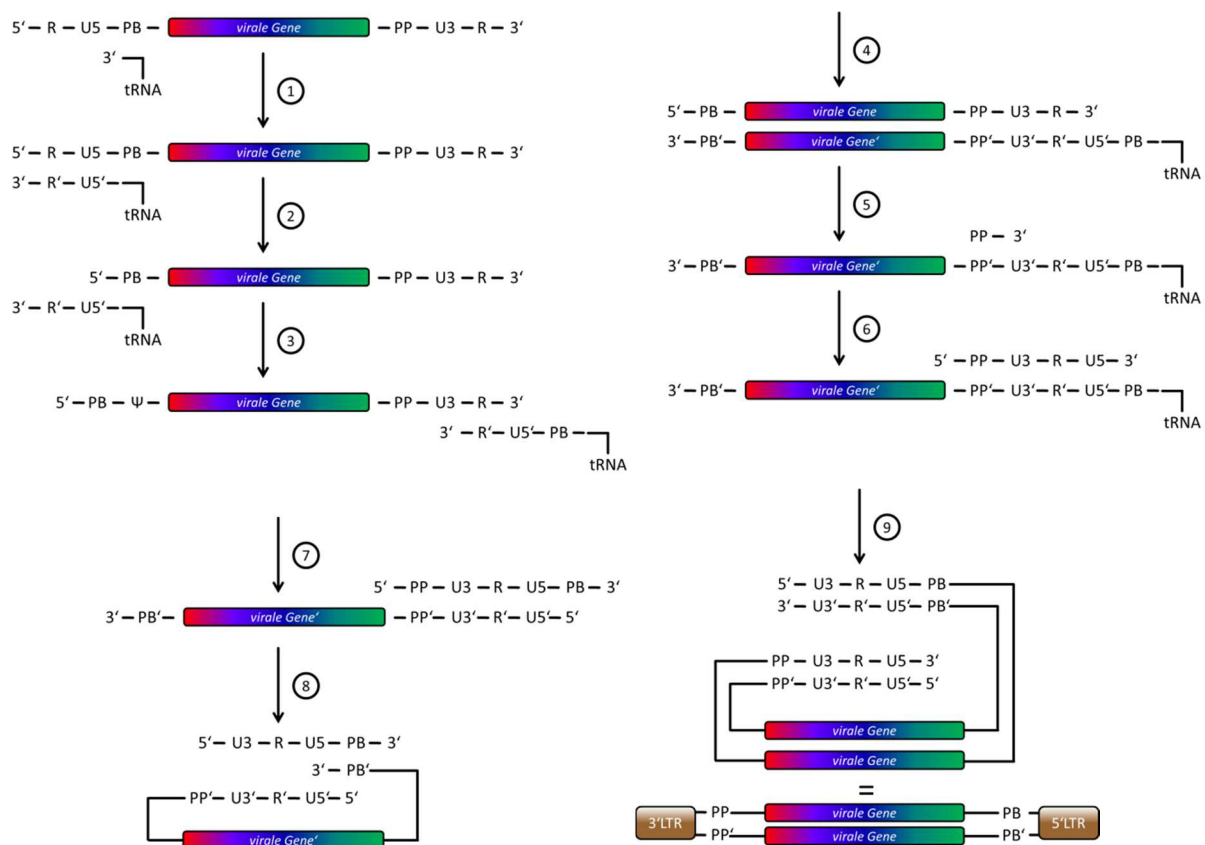
Abbildung 11: Reverse Transkriptase (pdb-Code PDB-3HVT)

Proteinen der *Reverse Transkriptionskomplex*. Die Reverse Transkriptase (Abbildung 11) hat während dieser Phase die im biologischen Reich einzigartige Aufgabe, die virale ss(+)-RNA, welche in dieser Form nicht als Matrix-RNA (mRNA) in den Zellkern eingebaut und dort abgelesen werden kann, in doppelsträngige, provirale cDNA umzuschreiben. Der Vorgang der Reversen Transkription beginnt an 3'-Ende der tRNA, die an

der Primer-Bindungsstelle des viralen Genoms gebunden ist. Die Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert nun in 5' → 3'-Richtung einen zum U5-R-Bereich komplementären DNA-Strang

2 Kenntnisstand

und verknüpft ihn mit dem 3'-Ende der tRNA. Ihre RNase-H-Funktion baut anschließend den U5-R-Bereich an der ursprünglichen SS(+)-RNA ab. Der neu synthetisierte Molekülteil wird folgend zum 3'-Ende des RNA-Genoms transportiert, bindet mit seinem R-Teil nichtkovalent (hybridisiert) an dessen R-Teil und dient hier als Primer für einen zur RNA komplementären DNA-Strang. Nun wird durch erneute RNase-H-Funktion der ursprüngliche RNA-Strang mit Ausnahme des Polypurin-Bereichs abgebaut. Anschließend beginnt die Synthese des ersten doppelsträngigen DNA-Abschnitts – mit der PP-Stelle als Primer, der sich bis über die tRNA hinaus erstreckt. Letztere wird im nächsten Schritt durch die RNase-H-Funktion abgebaut. Die beiden Enden des ersten DNA-Stranges können nun über ihre PB-Region hybridisieren, und formen dabei einen Zyklus. Die nun stattfindende Vervollständigung des 5'-Endes der ursprünglichen RNA sowie des 3'-Endes der neu gebildeten DNA liefert das doppelsträngige, provirale DNA-Molekül (dsDNA), deren Enden man als *Long Terminal Repeats* (LTR) bezeichnet. Abbildung 12 stellt diesen sehr komplexen Vorgang übersichtlich dar.



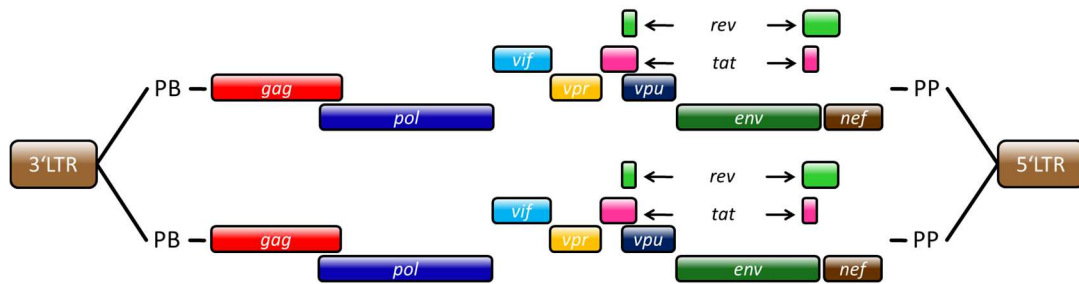


Abbildung 12: Mechanismus der Reversen Transkription

Beginn der DNA-Strang-Synthese (1), Abbau des RNA-Teils des Hybridstrangs (2), Transfer des tRNA-Teils (3), erste DNA-Synthese (4), Abbau des U3-R-Bereichs im RNA-Strang (5), Synthese des ersten dsDNA-Abschnitts (6), tRNA-Abbau (7), PB-Hybridisierung (8), DNA-Synthese (9)

Da die Reverse Transkriptase über keine Korrekturlesefunktion verfügt und daher relativ ungenau arbeitet, entstehen bei diesem Vorgang häufig Fehler. Die Folge davon sind Mutationen im viralen Genom der Nachfolgeneration, was HI-Viren (bzw. Retroviridae allgemein) sehr variabel macht, was der Grund für das sehr schnelle Auftreten von gegenüber antiretroviralen Wirkstoffen resistenten Virusstämmen ist. Den zuvor als reversen Transkriptionskomplex bezeichneten Verbund aus viralem Genom und Proteinen bezeichnet man nach der Reversen Transkription als *Präintegrationskomplex (PIC)*, der nun in den Zellkern eintreten kann, was durch die viralen Proteine *vpr* und Matrixprotein p17 ermöglicht wird. [1, 5, 7, 10, 11, 12]

Im Zellkern angekommen beginnt die Integration der proviralen cDNA in das Erbgut der Zelle, was durch die hier als Endonuclease wirkende Integrase (Abbildung 13) durchgeführt

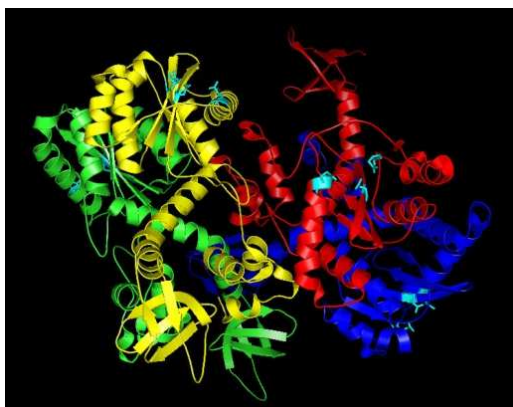


Abbildung 13: Integrase
(pdb-Code 3OS1)

wird. Dazu bildet diese mit der cDNA einen Komplex, entfernt an jedem ihrer 3'-Enden zwei Nucleotide und schneidet in einem zweiten Schritt die Zell-DNA an einer zufälligen Stelle. Durch die Entfernung der Nucleotide entstehen an der cDNA 5'-überhängende, einzelsträngige Dinucleotide; ebenso entstehen beim Schneiden der zellulären DNA 5'-überhängende Enden. Im folgenden Schritt, den man als *Ligation* bezeichnet, werden letztere

von der Integrase mit den 3'-Enden des viralen Genoms verbunden, die 5'-überhängenden Dinucleotide werden entfernt. Da die Basenpaare von viraler und zellulärer DNA nicht komplementär sind, werden diese durch zelluläre Reparaturenzyme angepasst, anschließend sorgen Ligasen für die Schließung des DNA-Doppelstranges. Den Mechanismus der Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle stellt Abbildung 14 übersichtlich dar.

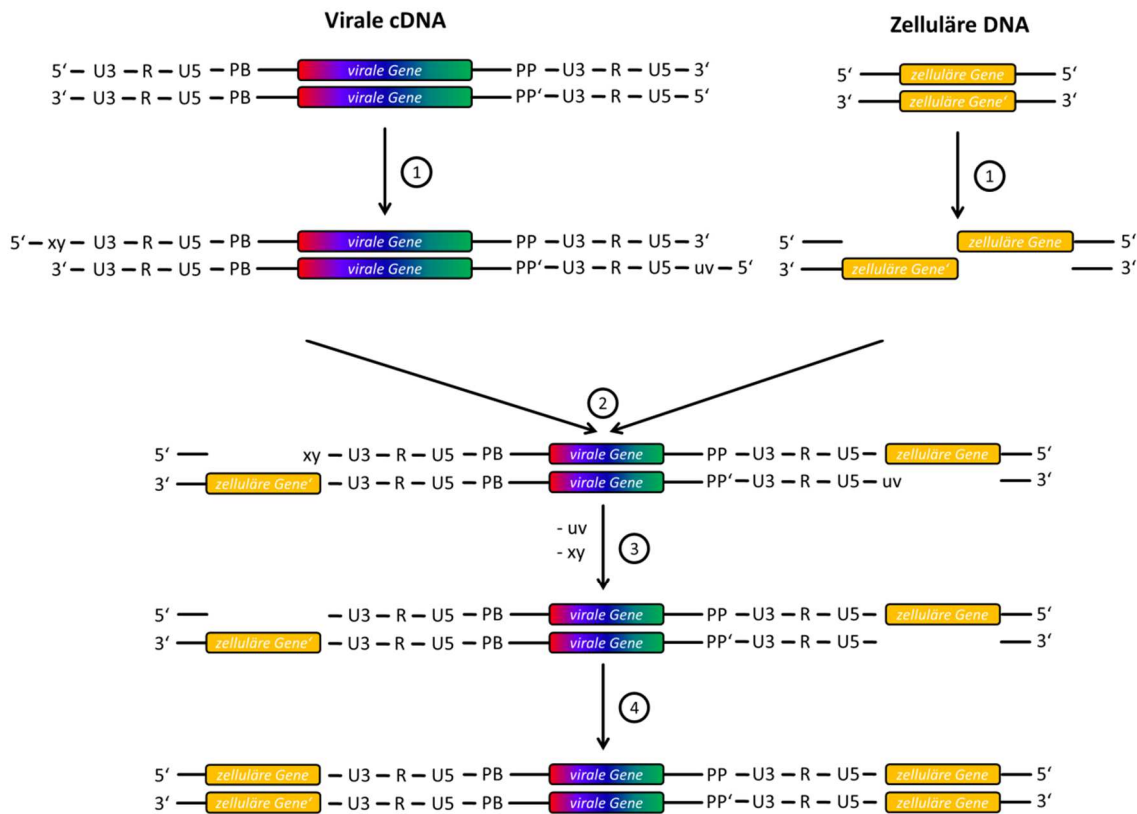


Abbildung 14: Mechanismus der Integration

Schneiden der DNA (5'-überhängende Enden) (1), Verbindung der viralen und zellulären DNA (2), Entfernung der Dinucleotide (3), enzymatisches Auffüllen mit komplementären Basen (4)

Den nun vorliegenden Zustand bezeichnet man als *Provirus*. In diesem Zustand erreicht der Krankheitsverlauf der HIV-Infektion die zweite Phase, da dieses Provirus über einen sehr langen Zeitraum persistent vorliegen kann, in welchem keine infektiösen Partikel produziert werden. Grund dafür ist das willkürliche Schneiden der zellulären DNA. Wird hierbei ein hochgradig methylierter oder inaktiver Bereich gewählt, findet keine oder eine nur geringe Produktion von Nachkommenviren statt. [1, 5, 7, 10, 11, 13]

2.2.4 Morphogenese und Ausschleusung

Nachdem die Integration der proviralen cDNA in das Wirtszellgenom abgeschlossen ist, beginnt deren Transkription. Diese wird maßgeblich von den *Long Terminal Repeats*

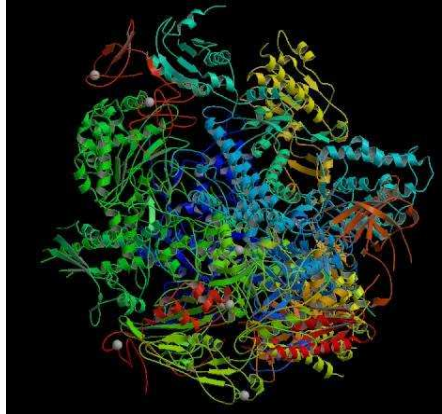


Abbildung 15: RNA-Polymerase II
(pdb-Code 1Y1W)

gesteuert, da diese u.a. für zelluläre Transkriptionsfaktoren (trans-Elemente) codieren, die die Transkription initiieren. Für die Transkription der DNA in RNA verantwortlich ist die zelluläre RNA-Polymerase II, ein Enzym aus der Klasse der Nucleotidyltransferasen (Abbildung 15). Da auch sie über keinerlei Korrekturlesefunktion verfügt, entstehen bei diesem Vorgang häufig Mutationen. Da die Umwandlung von RNA cDNA nur einmal, diejenige von DNA in RNA allerdings mehrere tausend Male stattfindet, ist zweiter Vorgang in viel größerem Ausmaß für Mutationen der Nachkommenviren und eventuell mögliche Resistenzen verantwortlich. Die Anwesenheit des *tat*-Proteins verhindert den Abbruch der Transkriptionsprodukte; hierbei entstehen zunächst vor allem mehrfach gespleißte (miteinander verbundene) mRNAs. Diese können nun direkt vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert werden, um hier in die regulatorischen Proteine *tat*, *rev* und *nef* translatiert zu werden. Anschließend erfolgt der Rücktransport in den Zellkern. Hier verstärkt *tat* die transkribierende Wirkung der RNA-Polymerase II erheblich und sorgt zusätzlich für die verstärkte Bildung einfach und ungespleißter RNA-Spezies. Das Protein *rev* bindet hier an deren RRE-Elemente (*rev response element*) und ermöglicht so deren Transport in das Cytoplasma, da diese per se die Zellkernmembran nicht durchdringen können. Im Cytoplasma angekommen erfolgt entweder die Translation der RNAs oder deren Verpackung in die entstehenden Viruspartikel. Die Translation der einfach gespleißten und ungespleißten RNAs findet an den Ribosomen statt. Aus ersteren werden die viralen Proteine von *env*, *vpr*, *vif* sowie *vpu* bzw. *vpx* translatiert, aus letzteren die *gag*- und *gag/pol*-Vorläuferproteine. Durch ein Signalpeptid am aminoterminalen Ende können die *env*-Vorläuferproteine in die Zellmembran eingeschleust werden, wo sie von zellulären Proteasen in die Glycoproteine gp120 und gp41 gespalten werden, die sich anschließend dort integrieren. Aus der ungespleißten, also genomischen mRNA, werden die *gag*- und *gag/pol*-

Vorläuferproteine synthetisiert, welche sich anschließend an der Cytoplasmamembran akkumulieren. Die Nucleocapsidproteinanteile des *gag*-Vorläuferproteins hybridisieren nun an die regulatorische Sequenz Ψ der ungespleißten mRNA, und bilden mit zwei dieser mRNAs einen Komplex. Dadurch sorgen sie dafür, dass ausschließlich solche mRNA (die genomischer RNA entspricht) in die neu gebildeten Viruspartikel diploid verpackt wird. Ebenfalls wird so sichergestellt, dass sich das virale Genom an der Cytoplasmamembran ansammelt. Diese beginnt sich bei Kontakt mit RNA auszustülpfen und es bilden sich Vesikel, die sich anschließend abschnüren.

Da in den nun gebildeten, noch unreifen Viruspartikeln eine hohe Konzentration des

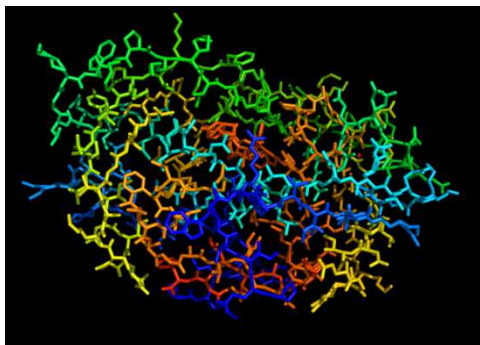


Abbildung 16: HIV-1-Protease
(pdb-Code 1TW7)

gag/pol-Vorläuferproteins sowie ein leicht saurer pH-Wert vorliegen, kann dessen Proteasedomäne dimerisieren. In einem autokatalytischen Prozess kann sich die HIV-Protease so aus den Vorläuferproteinen herauspalten. Die HIV-Protease, ein aus 99 Aminosäuren bestehendes Enzym aus der Gruppe der Aspartatproteasen (Abbildung 16), ist im folgenden

Schritt für die Spaltung der *gag*- und *gag/pol*-Vorläuferproteine in ihre Bestandteile (Matrixprotein (MA), Capsidprotein (CA), Nucleocapsidprotein (NC) und Link-Protein (LI), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT)) verantwortlich. Dieser Schritt geschieht erst im bereits freigesetzten Viruspartikel, da die sonst bereits innerhalb der Zelle freigesetzten Proteine die Verbindung mit der Zellmembran verhindern würden. Im selben Zug bewirken strukturelle Umlagerungen, während der sich das Capsid bildet, die Reifung zum infektiösen Viruspartikel.^[1, 5, 7, 10, 11, 12, 13]

Die Replikation des HI-Virus wird abschließend von Abbildung 17 übersichtlich zusammengefasst.

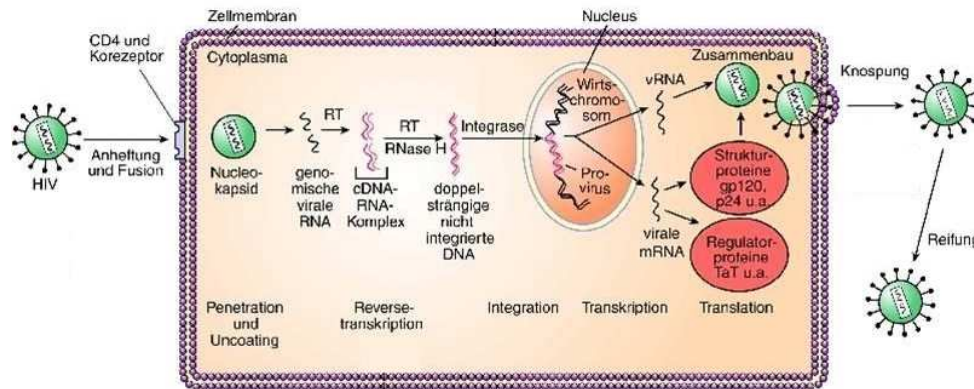


Abbildung 17: Replikationszyklus des HI-Virus

Die Zelle wird durch diesen Vorgang zerstört und stirbt ab, womit ihre entscheidenden Wirkungen für das Immunsystem verloren gehen. Im folgenden Kapitel sollen therapeutische Möglichkeiten, die Infektion mit dem HI-Virus zu bekämpfen, werden.

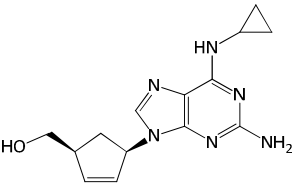
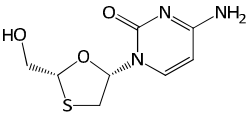
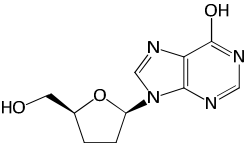
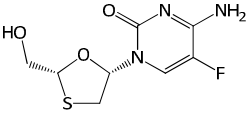
2.3 Aktuelle HIV-Therapie: Die Highly Active Anti-Retroviral Therapy

Die Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART), auch cART (combined Anti-Retroviral Therapy) genannt, stellt die heute übliche Therapie zur Bekämpfung einer HIV-Infektion dar. Aufgrund der Tatsache, dass sich das HI-Virus in das Genom der Wirtszellen integriert, ist es bis heute nicht möglich, es vollständig aus dem Körper zu eliminieren. Man versucht bei der HAART deshalb, mit einem Medikamenten-Cocktail aus mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Wirkstoffen die Ausbreitung des Virus im Körper zu verhindern oder zumindest zu bremsen, um die Zahl der T-Lymphozyten auf einem hohen Niveau zu halten und somit den Ausbruch des AIDS-Vollbildes zu verhindern bzw. hinauszuzögern. Die lebenslange Einnahme antiviraler Medikamente ist aus diesem Grund unverzichtbar. Die Notwendigkeit einer guten Langzeitverträglichkeit und einer hohen Compliance sowie die bereits erwähnte Ausbildung resistenter Virusstämme erschweren die Suche nach geeigneten Wirkstoffen zusätzlich. Die verschiedenen Substanzklassen dieser antiretroviralen Wirkstoffe sowie ihre Vertreter sollen anschließend erläutert werden.

2.3.1 Nucleosidische bzw. Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI bzw. NTRTI)

Eine Möglichkeit der Bekämpfung einer HIV-Infektion besteht darin, die Reverse Transkriptase an ihrer Funktion zu hindern, also an der Umschreibung der viralen RNA in provirale cDNA. Die erste Klasse an Reverse Transkriptase-Inhibitoren sind die NRTI bzw. NTRTI. Diese Wirkstoffe weisen als Nucleosidanaloga eine hohe Ähnlichkeit mit den natürlichen Nucleosiden auf. Zunächst werden sie wie ihre natürlichen „Verwandten“ intrazellulär durch spezifische Kinasen phosphoryliert, anschließend erfolgt ihre Bindung an die Substratbindestelle der Reversen Transkriptase – sie sind also kompetitive Hemmstoffe. Wie die natürlichen Nucleotide werden diese nun in die provirale cDNA eingebaut. Der entscheidende Unterschied zu den natürlichen Nucleotiden ist die fehlende 3'-OH-Gruppe an der Ribose. Dies führt dazu, dass an dieser Stelle keine Kettenverlängerung stattfinden kann und der neu gebildete DNA-Strang an dieser Stelle abbricht. Der Grund für viele Nebenwirkungen der NRTI bzw. NTRTI ist ihre mitochondriale Toxizität, die durch die Hemmung der mitochondrialen DNA-Polymerase- γ hervorgerufen wird und eine Langzeitbehandlung deshalb oft erschwert. Aufgrund der relativ hohen Mutationsrate der Reversen Transkriptase und der dadurch verbundenen Resistenzentwicklung werden stets mindestens zwei verschiedene NRTI bzw. NTRTI bei der HAART eingesetzt.^[14, 15, 18]

In der folgenden Tabelle sind Name, Beispielpreparat sowie Strukturformel der Vertreter dieser Wirkstoffklasse gelistet.^[20]

| Strukturformel | Name, Beispielpreparat | Strukturformel | Name, Beispielpreparat |
|---|------------------------|--|--------------------------|
|  | Abacavir Ziagen® |  | Lamivudin Epivir® |
|  | Didanosin Videx® |  | Emtricitabin Emtriva® |

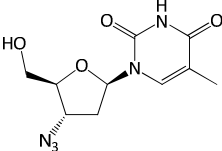
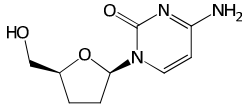
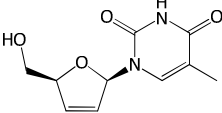
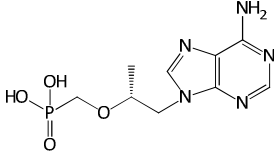
| | | | |
|---|------------------------|--|---|
|  | Zidovudin Retrovir® |  | Zalcitabin Hivid® <i>(nicht mehr im Handel)</i> |
|  | Stavudin Zerit® |  | Tenofovir (NTRTI) Viread® |

Tabelle 3: Bisher zugelassene NRTI und NTRTI

Mit Fosalvudin, Elvucitabin und Fozivudintidoxil existieren weitere experimentelle NRTI.^[16, 17]

2.3.2 Nichtnucleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

Die zweite Klasse der Reversen Transkriptase-Inhibitoren stellt die der nichtnucleosidischen (NNRTI) dar. Im Unterschied zu den NRTI und NTRTI binden die NNRTI nicht an die Substratbindestelle der Reversen Transkriptase, sondern an eine weitere Bindungsstelle, die neben der Substratbindestelle liegt – sie binden demnach allosterisch. Durch die Bindung an diese Bindungsstelle erfolgt eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum, was die Reverse Transkriptase in einen inaktiven Zustand überführt. Da die Reverse Transkriptase von HIV-2 nicht über diese zweite Bindungsstelle verfügt, wirken NNRTI ausschließlich gegen Infektionen mit HIV-1. Problematisch ist bei dieser Wirkstoffklasse die sehr schnelle Resistenzentwicklung (teilweise bereits einige Tage nach Therapiebeginn), da bei Mutationen der zweiten Bindungsstelle das aktive Zentrum weiterhin aktiv ist. Ein Vorteil hingegen ist die weitgehend gute Verträglichkeit der NNRTI.^[14, 15]

Die zugelassenen NNRTI samt Strukturformel und Beispielpräparat sind in der folgenden Tabelle gelistet.^[20]

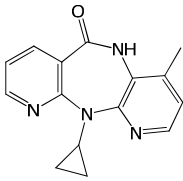
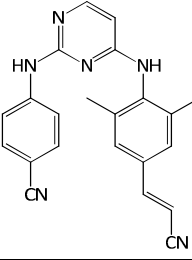
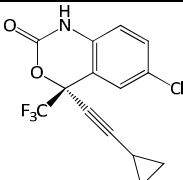
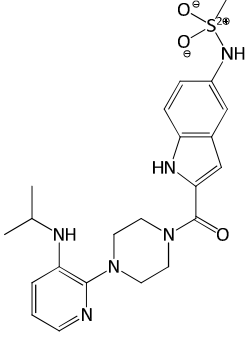
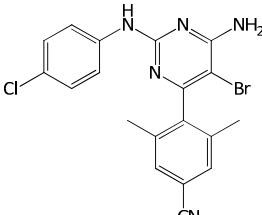
| Strukturformel | Name, Beispiel- präparat | Strukturformel | Name, Beispiel- präparat |
|--|--------------------------------|---|--------------------------------|
|  | Nevirapin Viramune® |  | Rilpivirin Edurant® |
|  | Efavirenz Sustiva® |  | Delavirdin Rescriptor® |
|  | Etravirin Intelence® | | |

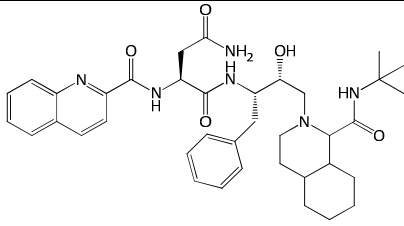
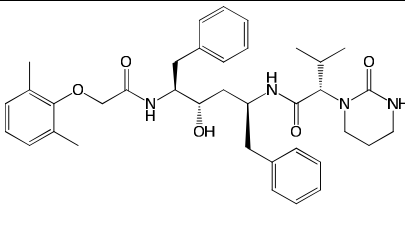
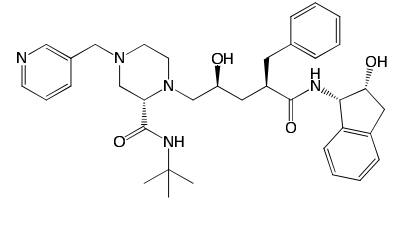
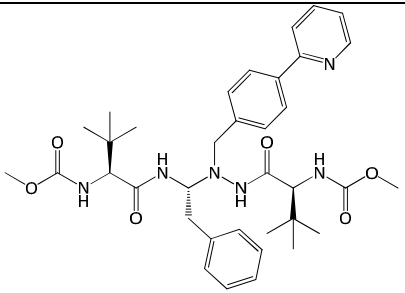
Tabelle 4: Bisher zugelassene NNRTI

2.3.3 Protease-Inhibitoren (PI)

Eine weitere Möglichkeit, das HI-Virus an seiner Ausbreitung im Körper zu hindern, besteht darin, mit Wirkstoffen die Protease zu blockieren. Da die Protease für die Reifung der Viruspartikel zuständig ist, verhindert ihre Blockade die Bildung infektiöser Virionen. Sie ist ein Homodimer mit zwei Aspartatresten im aktiven Zentrum (Asp25 und Asp25'), welche für die Spaltung des *gag/pol*-Vorläuferproteins zuständig sind. Die Aspartatreste dienen hierbei katalytisch als Protonendonator und -akzeptor und leiten den nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls ein, der die Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Prolin zur Folge hat. Ziel der Entwicklung von Protease-Inhibitoren war deshalb, für die Phe-Pro-Peptidbindung einen bioisosteren Ersatz zu liefern, der nicht gespalten werden kann und dadurch die Protease hemmt. Fast alle heute therapeutisch eingesetzten Protease-Inhibitoren sind peptidomimetische Wirkstoffe, die Hydroxyethylen-Einheiten als Ersatz erhalten. Sie bilden mit den Aspartatresten der Protease

Wasserstoffbrückenbindungen aus und blockieren so ihr aktives Zentrum für das natürliche Substrat. Bei den HIV-Protease-Inhibitoren unterscheidet man vier verschiedene Generationen: PI der ersten Generation waren die ersten, auf dem Markt verfügbaren HIV-Protease-Inhibitoren. Ihre extrem schlechte Bioverfügbarkeit und die dadurch bedingte häufige Tabletteneinnahme hatten eine sehr schlechte Compliance sowie eine hohe Rate an Nebenwirkungen zur Folge. Bei den PI der zweiten Generation wurden deshalb hauptsächlich die Bioverfügbarkeit und die Compliance verbessert, was aufgrund der lebenslangen Einnahme von großer Bedeutung war. Ein Wirkstoff dieser Klasse (Ritonavir) zeigt außerdem bei Kombipräparaten mit anderen PI eine verstärkende Wirkung (Boostereffekt). Inhibitoren der dritten Generation wurden aufgrund der Resistenzentwicklung der HIV-Stämme entwickelt. Die vierte Generation stellt den neuesten Stand der Entwicklungen dar. Mit Tipranavir existiert hier erstmals ein nicht-peptidomimetischer Wirkstoff, der gute Wirkungen auch gegen HIV-Stämme zeigt, die bereits resistent gegen Protease-Inhibitoren sind. Häufig auftretende und teils schwere Nebenwirkungen schränken seinen Einsatz jedoch ein.^[14, 15, 19]

Die folgende Tabelle zeigt die bisher zugelassenen PI.^[20]

| Strukturformel | Name, Beispielpräparat | Strukturformel | Name, Beispielpräparat |
|---|-------------------------------------|--|--|
|  | Saquinavir (1. Gen) Invirase® |  | Lopinavir (3. Gen) Kaletra® (Kombipräparat mit Ritonavir) |
|  | Indinavir (1. Gen) Crixivan® |  | Atazanavir (3. Gen) Reyataz® |

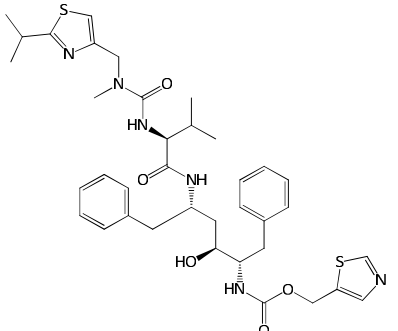
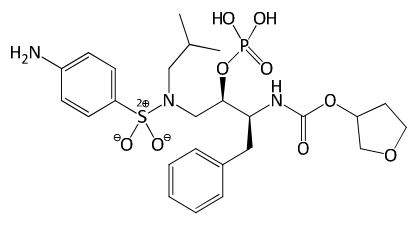
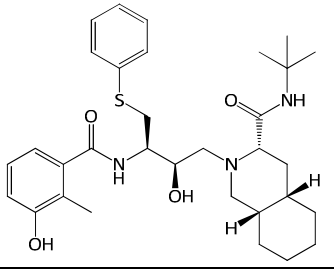
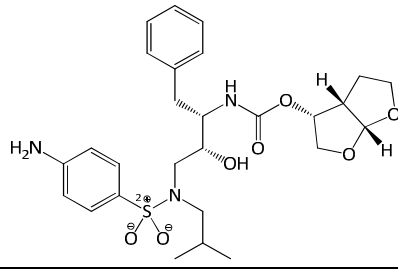
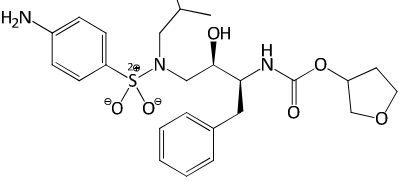
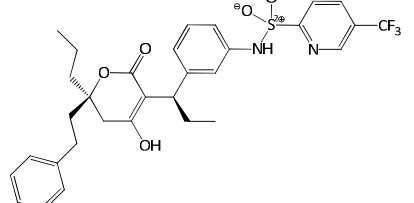
| | | | |
|--|--|---|--------------------------------------|
|  | Ritonavir (2. Gen) Norvir® |  | Fosamprenavir (3. Gen) Telzir® |
|  | Nelfinavir (3. Gen) Viracept® |  | Darunavir (3. Gen) Prezista® |
|  | Amprenavir (3. Gen) Agenerase® (nicht mehr im Handel) |  | Tipranavir (4. Gen) Aptivus® |

Tabelle 5: Bisher zugelassene PI

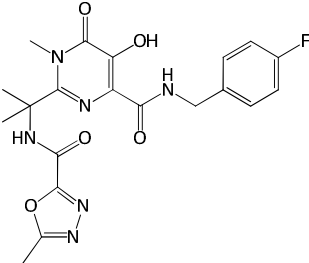
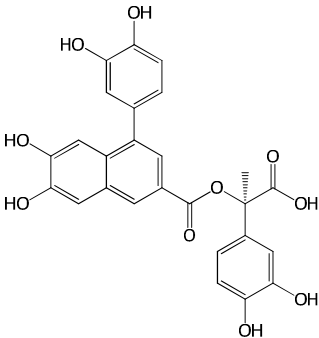
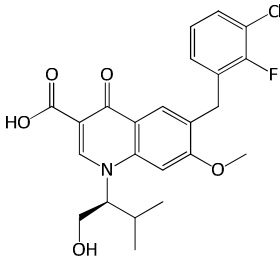
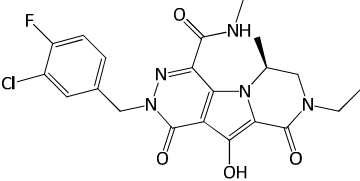
Ein sich derzeit in der Entwicklung befindender PI ist CTP-518. Seine chemische Struktur entspricht derjenigen von Atazanavir, es wurden lediglich einige Wasserstoffatome durch isotope Deuteriumatome ersetzt. Erste Tests bescheinigen den vollen Erhalt des Hemmpotentials, jedoch einen erheblich verlangsamten Abbau in der Leber und damit eine deutlich höhere Halbwertszeit. Dies könnte die notwendige therapeutische Dosis deutlich senken.^[21]

2.3.4 Integrase-Inhibitoren (INI)

Wie bereits beschrieben, hat die Integrase die Aufgabe, die provirale cDNA in das Wirtszellgenom zu integrieren. Scheitert dies, kann die Zelle das virale Genom nicht vervielfältigen, die Vermehrung des Virus findet somit nicht statt. Genau dies ist das Ziel bei der Entwicklung von Integrase-Inhibitoren gewesen. Diese noch relativ junge Klasse antiviraler Wirkstoffe teilt sich in mehrere Gruppen ein, die sich in ihrer Wirkungsweise

unterscheiden. Man unterscheidet Pyranodipyrimidine (verhindern die Bildung des Präintegrationskomplexes), Prozessierungs-Inhibitoren (verhindern die Entfernung der LTR an der viralen DNA), Strangtransfer-Inhibitoren (STI, verhindern die Integration der proviralen cDNA in das Wirtszellgenom) und Lückenreparatur-Inhibitoren (verhindern die Auffüllung der bei der Integration entstandenen Lücken im Genom).

Bisher sind nur zwei Integrase-Inhibitoren der ersten Generation zugelassen (Raltegravir und Elvitegravir), beide aus der Klasse der Strangtransfer-Inhibitoren, die durch Bindung in das katalytische Zentrum der Integrase diese an der Ausübung ihrer Aktivität hindern. Einige weitere Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien, auch befinden sich bereits solche der zweiten Generation in Entwicklung. MK-2048 ist der erste Inhibitor der zweiten Generation, der eine erheblich höhere Hemmwirkung zeigt; BI-224436 ist der erste allosterische Integrase-Inhibitor (non-catalytic site integrase inhibitor, NCINI). Die folgende Tabelle zeigt einige dieser Wirkstoffe.^[14, 15, 22, 23, 24, 25, 26]

| Strukturformel | Name, Beispiel- präparat | Strukturformel | Name, Beispiel- präparat |
|---|--|--|--|
|  | Raltegravir (STI) Isentress® |  | Globoidnan A <i>Schwamm- extrakt, experimentell</i> |
|  | Elvitegravir (STI) Stribild® (Kombiprä- parat) |  | MK-2048 (2. Gen.) <i>In Entwicklung</i> |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | <p>Dolutegravir (STI) <i>In klinischen Studien</i></p> | | <p>BI-224436 (NCINI) <i>In Entwicklung</i></p> |
|--|--|--|--|

Tabelle 6: Integrase-Inhibitoren

Von Dolutegravir (GSK572) befindet sich bereits eine geringfügig modifizierte Weiterentwicklung (GSK744) in experimentellem Status. Gebunden an Nanopartikel (GSK744LAP) zeigt diese Substanz eine außerordentlich hohe Halbwertszeit (bis zu 50 Tage), die eine einmalige monatliche Einnahme ermöglichen und die Compliance erheblich verbessern könnte.^[27]

2.3.5 Entry- und Fusions-Inhibitoren (EI und FI)

Mit einer relativ jungen Klasse antiretroviraler Wirkstoffe versucht man, die infektiösen Viruspartikel am Eintritt in die Wirtszelle, also in die CD4-T-Lymphozyten, zu hindern. Da es mehrere Möglichkeiten gibt, dies zu gewährleisten, unterscheidet man hier zwei verschiedene Typen: Die Entry- und die Fusions-Inhibitoren. Die Entry-Inhibitoren unterteilt man in zwei verschiedene Typen, nämlich in Attachement-Inhibitoren (AI) und Corezeptor-Antagonisten (CA). AI sollen die Bindung des externen Glycoproteins gp120 an die CD4-Rezeptoren verhindern, was entweder durch Blockade von gp120 oder CD4 stattfinden kann. Mit den Corezeptor-Antagonisten versucht man, die bereits erwähnte, notwendige Bindung des Viruspartikels an weitere Chemokinrezeptoren (CXCR4 oder CCR5) zu unterbinden, indem man diese blockiert; man unterscheidet demnach zwischen CXCR4- und CCR5-CA. Der Nachteil der CA ist demzufolge, dass sie lediglich gegen CXCR4- oder CCR5-trope HI-Viren wirksam sind. Schließlich sollen Fusions-Inhibitoren die Verschmelzung des Virus mit der Wirtszelle verhindern, indem sie das transmembrane Glycoprotein gp41 blockieren. Da die genannten Wirkstoffklassen relativ jung sind, existieren bisher kaum auf dem Markt erhältliche Präparate. Die einzigen beiden zugelassenen Wirkstoffe sind Maraviroc und Enfuvirtid T20. Ersterer ist ein CCR5-Antagonist, letzterer gehört zur Klasse der Fusions-

Inhibitoren. Die therapeutische Anwendung beider Wirkstoffe ist allerdings eher gering, da eine relativ schnelle Resistenzentwicklung der HI-Viren beobachtet wird und Enfuvirtid T20 zusätzlich extrem teuer in der Herstellung ist. Einige weitere Wirkstoffe befinden sich in klinischen Phasen oder in der Entwicklung. Tabelle 7 zeigt die wichtigsten Vertreter der beiden Inhibitorklassen. [14, 15, 26, 28, 29, 30, 31, 32]

| Strukturformel | Name, Beispielpräparat | Strukturformel | Name, Beispielpräparat |
|--|--|-------------------------|--|
| | Maraviroc (CCR5-CA) Celsenti® | | Cenicriviroc (TAK-652) (CCR5-CA) <i>In klinischen Studien</i> |
| Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH ₂ | Enfuvirtid T20 (FI) Fuzeon® | | |
| | Vicriviroc (CCR5-CA) <i>In klinischen Studien</i> | Monoklonaler Antikörper | PRO 140 (CCR5-CA) <i>In klinischen Studien</i> |
| | | Monoklonaler Antikörper | Ibalizumab (TNX-355) (CD4-AI) <i>In klinischen Studien</i> |
| | AMD-070 (CXCR4-CA) <i>In klinischen Studien</i> | | |

Tabelle 7: Entry- und Fusions-Inhibitoren

Abschließend zeigt Abbildung 18 die Angriffspunkte der verschiedenen Inhibitorklassen in der Gesamtübersicht. Es sei nochmals erwähnt, dass aufgrund der Resistenzentwicklung

des HI-Virus bei der HAART stets mindestens drei verschiedene Virostatika verabreicht werden.

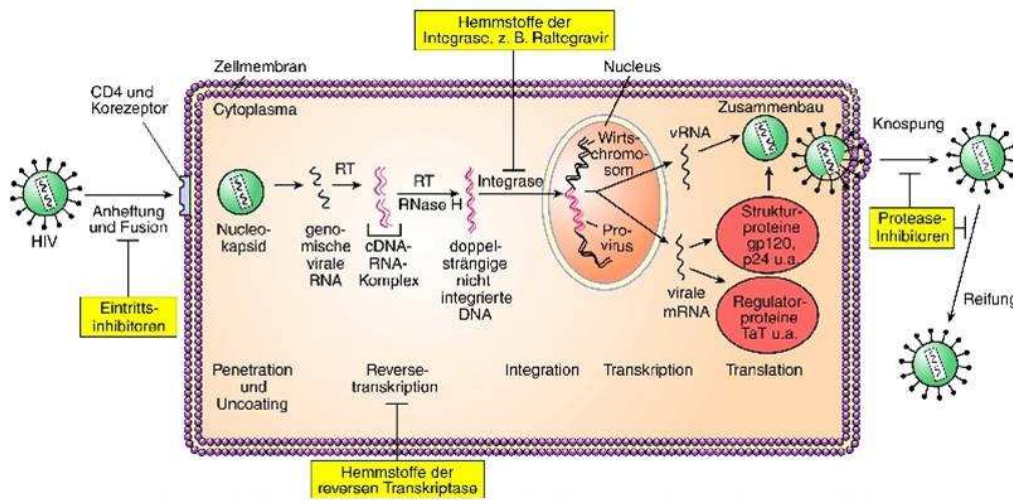


Abbildung 18: Wirkungsorte der verschiedenen Inhibitorklassen

2.4 Immunologische Reaktionen nach der HIV-Infektion

2.4.1 Die Rolle der APOBEC3-Proteine in den CD4-T-Lymphozyten bei der Abwehr von Retroviren

Die sich in den CD4-T-Lymphozyten befindenden APOBEC3-Proteine (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*) sind Mitglieder der Familie der APOBEC-Cytidin-Desaminasen. Diese Familie beinhaltet die AID-Desaminasen (*activation-induced deaminase*) APOBEC 1, 2, 3A–3G und 4, alle spielen bei der Abwehr retroviraler Infektionen eine entscheidende Rolle. Durch ihre Fähigkeit, Cytidin- zu Uridin-Nucleotiden in mRNA- oder ssDNA-Strängen zu desaminieren und somit das virale Genom entscheidend zu schädigen, spielen bei einer Infektion mit dem HI-Virus APOBEC3G und 3F eine entscheidende Rolle. Beide ähneln sich sowohl von der Struktur als auch von der Wirkung sehr und wechselwirken bei ihrer Funktion miteinander.

APOBEC3G, ein ca. 95 kDa schweres, symmetrisches Enzym (Abb. 19), setzt sich aus zwei C-terminal verbundenen homologen Untereinheiten zusammen, die jeweils zwei homologe

katalytische Zentren (N-terminale (CD1) und C-Terminale (CD2) Domäne) beinhalten. Innerhalb jeder dieser Domänen befindet sich eine Koordinationsstelle für Zn^{2+} . CD1 ist katalytisch inaktiv, jedoch essentiell bei der Bindung an DNA oder RNA; CD2 ist katalytisch aktiv und für die Desaminierung zuständig (*zinc dependent-deaminase, ZDD*).

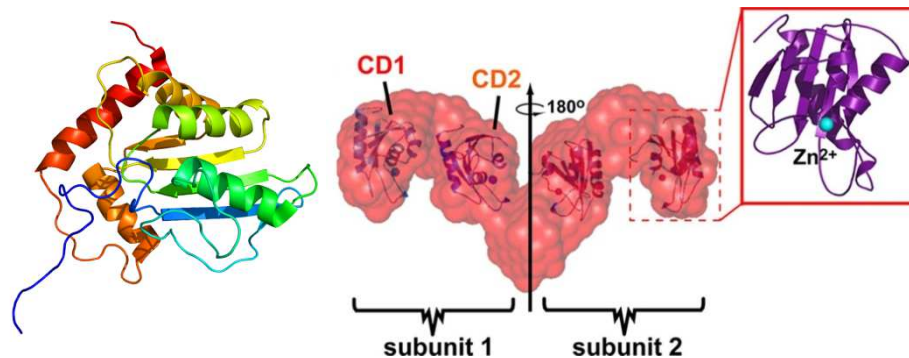


Abbildung 19: ABOBEC3G-Homologiemodell und Modell mit Oberflächenstruktur sowie katalytisch aktiven Zentren

Als für die Abwehr retroviraler Infektionen zuständige Desaminase wird APOBEC3G *nach* der Replikation durch Bindung an RNA und *gag* in die neu gebildeten Viruspartikel eingeschleust. Es greift in den neu infizierten Zellen beim Vorgang der reversen Transkription ein und bewirkt zahlreiche Desaminierungen von Desoxycytidin zu Desoxyuridin in 3'→5'-Reihenfolge im (-)DNA-Strang des viralen HIV-Genoms, der bei der reversen Transkription zuerst gebildet wird. Der wahrscheinliche Vorgang dieser Desaminierung ist in Abbildung 20 dargestellt.

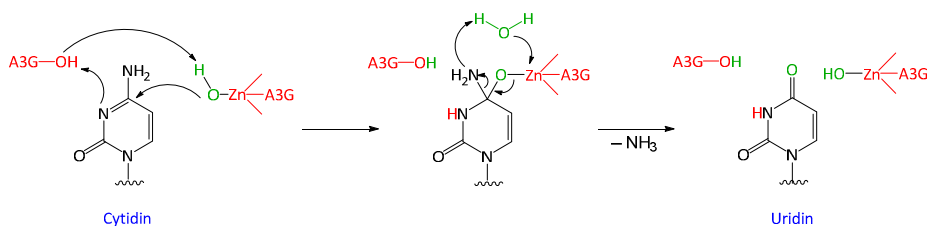


Abbildung 20: APOBEC3G-induzierte Desaminierung von Cytidin zu Uridin an CD2

Die Desaminierung von Cytidin zu Uridin (bzw. Desoxycytidin zu Desoxyuridin) hat verheerende Auswirkungen auf die provirale DNA und führt schließlich zu Desoxyguanin→Desoxyadenin-Hypermutationen. Dies führt zu fehlerhaften oder nonsense-Codons in den gebildeten Vorläuferproteinen, was letztendlich dazu führt, dass die neu

gebildeten Viruspartikel nicht mehr existenzfähig sind und ihre Replikationsfähigkeit verloren haben. Wie bereits erwähnt hat APOBEC3G auch einen Einfluss auf die reverse Transkription. Die Reverse Transkriptase nutzt die am 3'-Ende des viralen Genoms gebundene tRNA als Initiator der reversen Transkription (Kapitel 2.2.3). Hier wirkt APOBEC3G als Inhibitor und verhindert die DNA-Strang-Synthese, was drastische Einflüsse auf die Produktion viraler ssDNA hat. Zusätzlich wird APOBEC3G ein negativer Einfluss auf die Integration der proviralen DNA in Zellgenom nachgesagt.^[34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43]

Eine Frage, die lange ungeklärt blieb, war, weshalb ausschließlich jenes APOBEC3G, das *nach* der Replikation in die neu gebildeten Viruspartikel eingeschleust wurde, antiviral aktiv ist, jedoch nicht solches, das bereits in der neu infizierten Zelle vorhanden ist, also: Warum wird APOBEC3G erst als „Trojanisches Pferd“ im Viruspartikel aktiv? Die Antwort scheint simpel: *Zelluläres* APOBEC3G ist nicht in der Lage, auf das virale Genom zuzugreifen, das in die Zelle freigesetzt wird, da es selbst von zellulärer DNA umgeben, also gekapselt, vorliegt. Da hier jedoch die reverse Transkription stattfindet, kann *zelluläres* APOBEC3G in diesen Vorgang *nicht* eingreifen. Zusätzlich erschwert wird dieser Vorgang dadurch, dass die bei der reversen Transkription zunächst gebildete ssDNA gegen *zelluläres* APOBEC3G abgeschirmt wird. Wird APOBEC3G jedoch bereits mit den Viruspartikeln in die CD4-T-Lymphozyten eingeschleust, liegt es bereits an der viralen RNA gebunden und damit nicht gekapselt vor, wodurch es seine mutagene Aktivität entfalten kann. Es sei an dieser Stelle nochmals erwähnt, dass alle oben beschriebenen Vorgänge sowohl auf APOBEC3G als auch 3F zutreffen.^[34, 44]

Eine Besonderheit des HI-Virus, nämlich sein akzessorisches Protein *vif*, ermöglicht ihm, diesen retroviralen Schutzmechanismus der CD4-T-Lymphozyten außer Kraft zu setzen. Der Mechanismus soll im folgenden Kapitel erläutert werden.

2.4.2 Spezialfall HI-Virus: Außerkraftsetzung der APOBEC3G-basierten retroviralen Abwehr des Immunsystems durch das akzessorische *vif*-Protein

Die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Vorgänge, die zur Zerstörung der Replikations- und Infektionsfähigkeit der neu gebildeten HI-Viruspartikel führen, treten so in der Realität leider

nicht auf, sondern wurden so nur in speziell darauf ausgelegten Assays beobachtet. Der Grund hierfür ist das in diesen Assays deaktivierte akzessorische Protein *vif* (*viral infectivity factor*).^[45, 46] In seiner Evolution hat das HI-Virus mit diesem Protein eine einzigartige Möglichkeit entwickelt, der retroviralen Immunabwehr zu entgehen und sich vor der Zerstörung durch APOBEC3G bzw. 3F zu schützen.

Vif ist ein aus 192 Aminosäuren bestehendes und etwa 23 kDa schweres Protein. Während seine genaue Struktur noch immer nicht vollständig geklärt werden konnte, konnten einige Regionen seiner Aminosäurekette bereits strukturell aufgeklärt sowie ihre Aufgabe ermittelt werden. Abbildung 21 zeigt diese Regionen in der Übersicht.

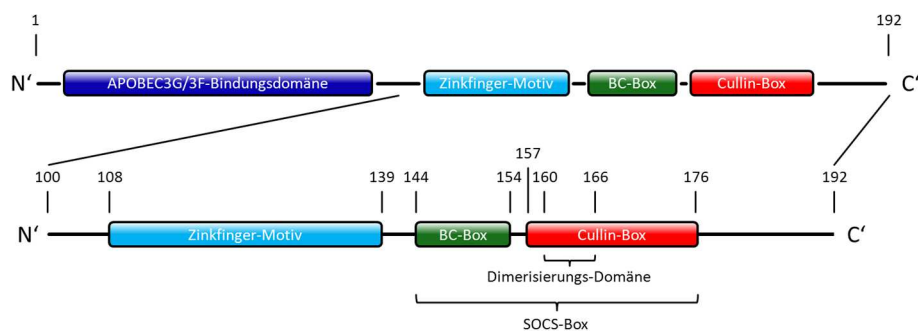


Abbildung 21: Die verschiedenen Regionen in der Aminosäurekette von *vif*

Am N-terminalen Ende der Aminosäurekette befindet sich die 83 Aminosäuren (AS) lange APOBEC3G/3F-Bindungsdomäne, die als Substrat für diese beiden Proteine dient. Von der 108. bis einschließlich 139. AS befindet sich das sogenannte Zinkfinger-Motiv. Es bindet mit hoher Affinität an Cullin-5, einen Teil der *E3-Ubiquitin-Hostligase*. Die BC-Box, die sich von der 144. bis zur 154. AS erstreckt, bindet mit außerordentlich hoher Affinität, die auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist, an einen weiteren Teil der E3-Ubiquitin-Hostligase – den Elongin-B/C-Komplex. Dieser Komplex, bestehend aus den beiden Proteinen Elongin-B und -C, ist über letzteres an die BC-Box gebunden. Elongin-C, ein aus 112 Aminosäuren bestehendes, in Säugetierzellen vorkommendes Protein, ist eine positive Regulator-Untereinheit des heterotrimeren RNA-Polymerase II-Elongationsfaktors Elongin (SIII). Elongin-C bildet zusätzliche, wenn auch sehr schwache, Wechselwirkungen zu Cullin-C5. Schließlich befindet sich im Bereich der 157. bis einschließlich 176. AS noch die Cullin-Box, die – ebenso wie das Zinkfinger-Motiv – an Cullin-5 bindet, wenn auch um den Faktor

zehn schwächer. Zusätzlich befindet sich in der Cullin-Box im Bereich der 160. bis einschließlich der 166. AS die Dimerisierungsdomäne, die für die Dimerisierung von *vif* essentiell ist. Es sei noch erwähnt, dass an Cullin-5 noch das Ringbox-2-Protein sowie das Enzym E2 gebunden sind, die zwar nicht mit *vif* interagieren, jedoch später von Bedeutung sind. [47, 48, 49,50]

Die folgenden Abbildungen zeigen die Bindung des *vif*-Proteins an die E3-Ubiquitin-Hostligase als Homologiemodell sowie als vereinfacht dargestelltes Modell.

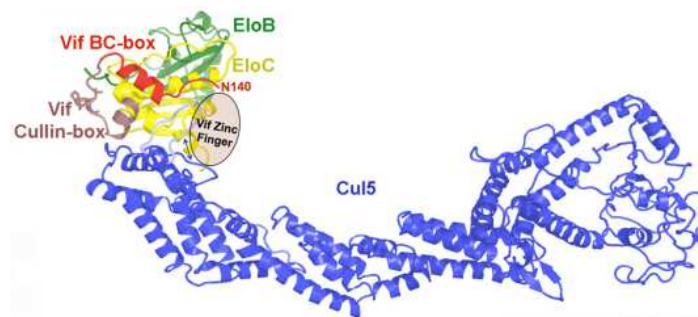


Abbildung 22: Homologiemodell des *vif*-E3-Komplexes (ohne Rbx2 und E2)

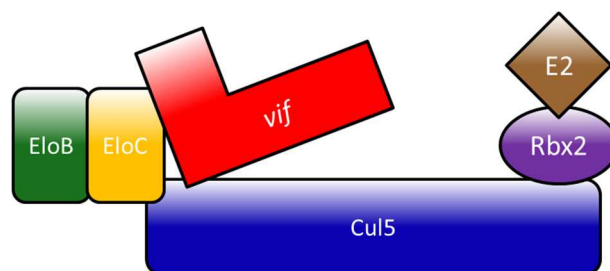


Abbildung 23: vereinfachte Darstellung des *vif*-E3-Komplexes

Bleibt nur noch zu klären, wozu *vif* diese ganzen Wechselwirkungen eingeht. Dazu muss zunächst die biologische Funktion der E3-Ubiquitin-Hostligase erläutert werden. Ihre Aufgabe besteht darin, zusammen mit dem *Modifikation aktivierendes Enzym E1* sowie dem *Modifikation konjugierendes Enzym E2* Proteine zu markieren. Diese Markierung geschieht durch die sogenannte *Ubiquitylierung*. In einem komplexen Zusammenspiel von E1, E2 und E3 werden dabei Ubiquitin-Moleküle auf die Zielproteine übertragen (siehe Abbildung 28). Ubiquitin ist ein evolutionär hochkonserviertes, aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Masse von etwa 8.5 kDa. Je nach Anzahl der Ubiquitin-Moleküle, die an das Protein gebunden werden sowie der Art und Weise der Bindung spricht man von einer Mono-,

Oligo-, Multi- oder Polyubiquitinierung. Mono- und multiubiquitinylierte Proteine werden im Allgemeinen in ihrer intrazellulären Verteilung beeinflusst, oligoubiquitinylierte Proteine beeinflussen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Bei polyubiquitinylierten Zielproteinen unterscheidet man zwischen solchen, bei denen die Ubiquitin-Moleküle über Lysin-63 verbunden sind und solchen, bei denen dies über Lysin-48 erfolgt. Erste erfahren einen *lysosomalen* Abbau, indem sie dem Lysosom zugeführt werden – einem Enzym, das Biopolymere zersetzt und beispielsweise für die Apoptose zuständig ist. Letztere werden ebenfalls abgebaut, allerdings *proteasomal* durch das 26S-Proteasom. Die Aufgaben der Ubiquitinierung sind sehr vielfältig und umfassen den Abbau fehlerhaft gefalteter Proteine, Transkriptions- und Signaltransduktionsregulation sowie vielem mehr.^[51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58]

Wie bereits erwähnt, bilden die BC- und die Cullin-Box von *vif* zusammen die SOCS-Box und wechselwirken mit Bereichen von Elongin-C und Cullin-5 der E3-Ligase. Der Name dieser SOCS-Box rührt daher, dass an dieser Bindungsstelle von Elongin-C und Cullin-5 normalerweise Proteine der SOCS-Familie binden; es handelt sich hierbei demnach um eine *SOCS-spezifische E3-Ubiquitin-Hostligase*. Die SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signaling protein*, Abbildung 24) gehören zu einer Familie von *JAK-STAT-Signaltransduktionsweg-Inhibitoren* (Januskinase-Signaltransduktion und Aktivator der

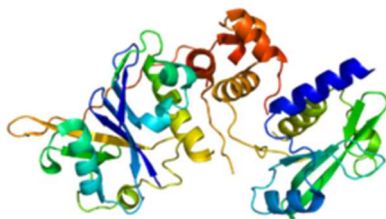


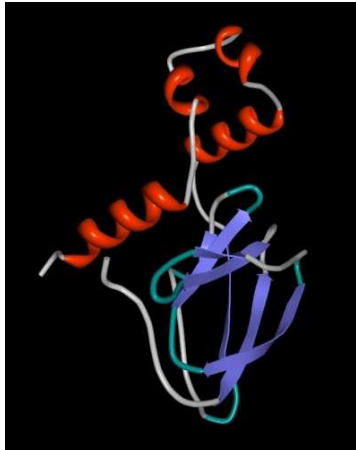
Abbildung 24: SOCS2-Protein
(pdb-Code 2C9W)

Transkription). Der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg hat in eukaryotischen Zellen die Aufgabe, die Information extrazellulärer Signalpeptide durch die Zellmembran in den Zellkern weiterzuleiten, um dort die Promotoren der Zielgene zu aktivieren. Die Zytokinrezeptoren des JAK-STAT-Signaltransduktionswegs können als Rezeptoren für

Wachstumshormone, Erythropoethin, Prolaktin, Interferone sowie Interleukine fungieren; der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg hat somit einen entscheidenden Einfluss auf Zellwachstum und -differenzierung. Sämtliche SOCS-Proteine haben in ihrer Aminosäurekette zwei Stellen gemein, nämlich die SOCS-Box und die SH2-Domäne. Als Inhibitoren binden sie über die SH2-Domäne an die Januskinase und über die SOCS-Box an die spezifische Bindungsstelle der SOCS-spezifischen E3-Ubiquitin-Hostligase. Sie bewirken so die Ubiquitinierung der Januskinase, was den Signaltransduktionsweg unterbricht. Die SOCS-Proteine tragen somit als negative Regulatoren entscheidend zur Regulierung von

Zellwachstum und -differenzierung bei. Da mehrere verschiedene JAKs und STATs existieren, gibt es entsprechend auch verschiedene SOCS-Proteine (SOCS1 – SOCS7 sowie CIS).^[59, 60, 61]

Ein weiteres Protein, das mit seiner SOCS-Box die SOCS-spezifische E3-Ubiquitin-Hostligase adressieren kann, ist das VHL-Protein (*Von Hippel–Lindau tumor suppressor protein, pVHL*)



(Abbildung 25), ein Protein, das das Von Hippel–Lindau-Syndrom unterdrückt. Es besitzt ein Gewicht von etwa 30 kDa und fungiert als Tumorsuppressor. Für das Wachstum stark durchbluteter Tumore ist der Transkriptionsfaktor HIF1a (hypoxia inducible factor 1a) von großer Bedeutung, da er für deren starke Angiogenese, also das schnelle Wachstum der Blutgefäße, essentiell ist. Ist HIF1a aktiv, findet diese Angiogenese besonders schnell statt, was ein schnelles Tu-

Abbildung 25: VHL-Protein morwachstum zur Folge hat. In normalen Zellen wird die HIF1a-Aktivität durch Hydroxylierung reguliert. In Anwesenheit von 2-Oxoglutarat, Eisen und Sauerstoff wird HIF1a durch HIF-Hydroxylasen hydroxyliert, wodurch eine Bindestelle für pVHL entsteht. Durch weitere Bindung an die SOCS-spezifische E3-Ubiquitin-Hostligase ermöglicht das VHL-Protein die Lysin-48-Polyubiquitinylierung von HIF1a, was zu dessen proteasomalem Abbau führt. Beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom, einer autosomal-dominant vererbten Krankheit, findet man eine Mutation in der Bande p25/26 des dritten Chromosoms. Diese Mutation führt zu einer strukturellen Veränderung der SOCS-Box des VHL-Proteins, sodass dieses nicht mehr an die E3-Ligase binden kann. Die Aktivität des HIF1a kann somit nicht mehr reguliert werden, was zur verstärkten Angiogenese führt. Das Von-Hippel-Lindau-Syndrom äußert sich symptomatisch demnach durch das Auftreten von Hämangiomen und Hämangioblastomen, also gutartiger, geschwulstähnlicher Ausbildungen äußerst stark durchbluteter und gefäßreicher Blutgefäßknäuel. Die Hämangiome treten bevorzugt in der Netzhaut auf und können zur Erblindung führen, während Hämangioblastome hauptsächlich im Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark auftreten. Sporadisch treten solche Symptome auch in Nieren, Nebennieren und Bauchspeicheldrüse auf. In seltenen Fällen können sich aus diesen Blutgefäßknäueln auch bösartige Tumoren entwickeln.^[62, 63, 64, 65, 66]

Ein Vergleich der SOCS-Box von *vif* mit derjenigen der SOCS-Proteine sowie der des VHL-Proteins belegt die außerordentlich große Ähnlichkeit dieser drei SOCS-Boxen.^[49]

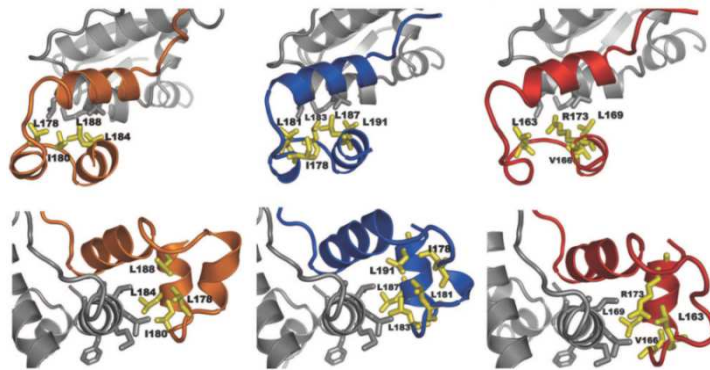


Abbildung 26: Vergleich der SOCS-Boxen von pVHL (links), SOCS2 (Mitte) und *vif* (rechts) aus zwei verschiedenen Blickwinkeln (oben, unten)

Eine genauere Betrachtung der Bindung der an Elongin-C bindenden BC-Boxen zeigt ebenfalls nahezu perfekte Übereinstimmungen.

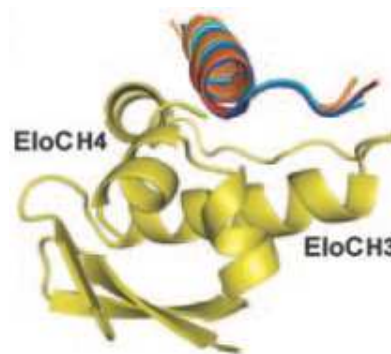


Abbildung 27: Vergleich der BC-Boxen von pVHL (orange), SOCS2 (blau), SOCS4 (cyan) und *vif* (rot)

Nach Erläuterung der biologischen Aufgabe der SOCS-spezifischen E3-Ubiquitin-Hostligase klärt sich auch die Frage, wozu das akzessorische *vif*-Protein des HI-Virus an jene Ligase bindet. In analoger Weise, wie die SOCS-Proteine an die Januskinase und das VHL-Protein an HIF1a und anschließend an die E3-Ubiquitin-Hostligase binden, um sie durch Polyubiquitinylierung für den proteasomalen Abbau zu markieren, führt *vif* diesen Vorgang mit APOBEC3G bzw. 3F durch: Durch Bindung mit seiner APOBEC3G/3F-Bindungsdomäne an diese Enzyme sowie an die SOCS-spezifische E3-Ubiquitin-Hostligase mit seiner SOCS-Box werden jene Cytidin-Desaminasen, die für die retrovirale Abwehr des HI-Virus durch das Immunsystem absolut unverzichtbar sind, polyubiquitinyliert und so dem proteasomalen Abbau zugeführt. Dadurch bricht das antiretrovirale Immunsystem zusammen und ist nicht

mehr in der Lage, sich gegen eine Infektion mit dem HI-Virus zur Wehr zu setzen.^[34, 48, 49, 67, 68, 69]

Der komplexe Vorgang dieser Markierung und des anschließenden Abbaus ist in der folgenden Abbildung übersichtlich dargestellt.

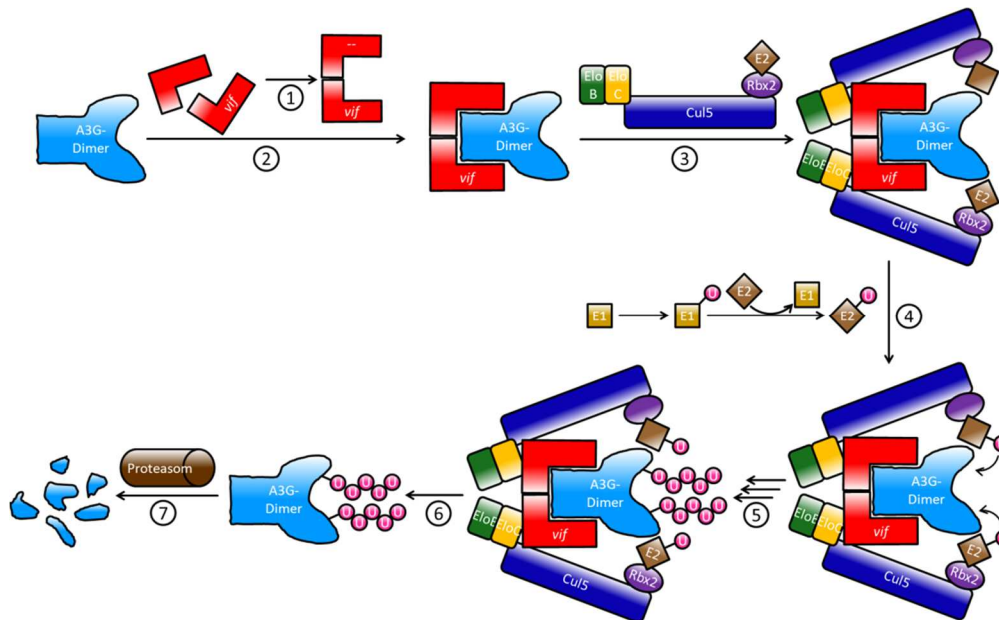


Abbildung 28: Schematische Darstellung des proteasomalen Abbaus von APOBEC3G

Im ersten Schritt findet eine Dimerisierung zweier *vif*-Proteine statt, die durch Wechselwirkungen zwischen ihren Dimerisierungs-Domänen (siehe Abbildung 21) ermöglicht wird. Diese Dimerisierung ist für den Abbau von APOBEC3G erforderlich, da dieses, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, ebenfalls als Dimer vorliegt und ein *vif*-Monomer nur einen Teil dieses APOBEC3G-Dimers adressieren könnte, der andere aber weiterhin antiviral aktiv bliebe. Als Dimer ist *vif* folglich in der Lage, über seine APOBEC3G/3F-Bindungsdomänen ein APOBEC3G-Dimer in Schritt 2 vollständig zu adressieren. Im nächsten Schritt binden die beiden dimerisierten *vif*-Monomere über ihre SOCS-Boxen an jeweils eine SOCS-spezifische E3-Ubiquitin-Hostligase. In einem Nebenprozess bildet das *Modifikation aktivierende Enzym* E1 über Cystein eine Thioesterbindung zur C-terminalen Carboxylgruppe von Ubiquitin aus. Die dazu notwendige Energie wird durch die Spaltung von Adenosin-Triphosphat (ATP) bereitgestellt. Im so vorliegenden Zustand ist das Ubiquitin-Molekül aktiviert und kann in Schritt 4 auf das *Modifikation konjugierende Enzym* E2 übertragen

werden, das die Bindung ebenfalls über eine Cystein-Thioester-Bindung herstellt. Da E2, wie bereits erwähnt, Teil der E3-Ubiquitin-Hostligase ist, können die Ubiquitin-Moleküle nun auf das markierte APOBEC3G-Dimer, übertragen werden. Bei diesem Vorgang wird zwischen einer ϵ -Aminogruppe von Lysin von APOBEC3G eine Isopeptidbindung zum C-terminalen Glycin des Ubiquitin-Moleküls gebildet. E1 überträgt nun erneut ein Ubiquitin-Molekül auf E2, dieses wiederum überträgt es auf das zuvor an APOBEC3G „angehängte“ Ubiquitin; die Bindung hierbei findet über Lysin-48 des ersten Ubiquitin-Moleküls statt (Schritt 5). Dieser Vorgang wiederholt sich nun für beide APOBEC3G-Monomere so lange, bis mindestens fünf Ubiquitin-Moleküle in einer Kette daran gebunden sind. Das APOBEC3G-Dimer ist somit polyubiquitinyliert und für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert. Im folgenden Schritt spaltet sich der E3-*vif*-Komplex vom APOBEC3G-Dimer ab, letzteres wird anschließend proteasomal hydrolysiert und somit zerstört.^[34, 47, 67, 70]

Durch die Enzyme und Vorgänge, an denen *vif* und APOBEC3G beteiligt sind, ergeben sich neue therapeutische Möglichkeiten, in den Replikationszyklus des HI-Virus einzugreifen und somit eine Ausbreitung und die Entwicklung des AIDS-Vollbildes zu verhindern.

2.4.3 Im Zusammenhang mit *vif* und APOBEC3G stehende, neuartige therapeutische Angriffspunkte

Nachdem in den Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 die Aufgaben und Funktionsweisen von APOBEC3G und *vif* bzw. die Vorgänge, an denen sie beteiligt sind, beschrieben wurden, werden in diesem Kapitel die sich daraus ergebenden komplett neuen Möglichkeiten, eine Infektion mit dem HI-Virus zu therapieren, erläutert.

Die erste Angriffsmöglichkeit bietet das *zellulär* vorliegende APOBEC3G. Wie bereits beschrieben, liegt dieses von zellulärer DNA umgeben, also gekapselt, vor, wodurch es seine antiretrovirale Wirkung nicht entfalten kann. Ein therapeutischer Ansatz besteht nun darin, mit Hilfe geeigneter Wirkstoffe das gekapselte APOBEC3G zu „befreien“, damit dieses antiretroviral aktiv werden und die Wirkung des mit den Viruspartikeln eingeschleusten APOBEC3G verstärken kann. Logischerweise ist diese Wirkstoffklasse allein nicht

ausreichend, um eine Infektion mit dem HI-Virus erfolgreich zu bekämpfen, da auch das „befreite“ APOBEC3G durch *vif* proteasomal abgebaut wird.

Betrachtet man den Vorgang der Markierung für den proteasomalen Abbau von APOBEC3G, ergeben sich sogar drei verschiedene Angriffspunkte, die in Abbildung 29 dargestellt sind.

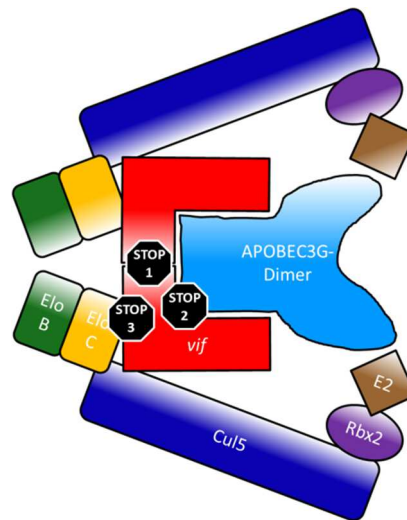


Abbildung 29: Mögliche Angriffspunkte antiretroviral wirkender Substanzen

Die erste der in Abbildung 29 dargestellten Möglichkeiten, den proteasomalen Abbau von APOBEC3G zu verhindern, besteht darin, die Dimerisierung von *vif* zu verhindern. Wie bereits erwähnt, befindet sich die Dimerisierungs-Domäne von *vif* innerhalb seiner Cullin-Box. Die Aufgabe wäre, für diese Bindestelle Inhibitoren zu entwickeln, die jene Dimerisierung verhindern. Dieser Vorgang der *vif*-Dimerisierung ist essentiell für die Markierung von APOBEC3G, da dieses auch als Dimer vorliegt und ansonsten nicht abgebaut werden könnte (siehe Kapitel 2.4.2). Die zweite Möglichkeit, den antiretroviralen Schutz durch APOBEC3G aufrecht zu erhalten, besteht darin, die Interaktion zwischen *vif* und APOBEC3G durch geeignete Inhibitoren zu unterbinden. Es bedarf hier keiner großen Erklärung, dass dieses somit nicht markiert und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden könnte. Die dritte Möglichkeit schließlich besteht darin, mit geeigneten Substanzen die Interaktion zwischen *vif* und Elongin-C zu unterbinden. Der *vif*-APOBEC3G-Komplex könnte somit, analog zum mutierten VHL-Protein, über die SOCS-Box von *vif* nicht mehr an die E3-Ubiquitin-Hostligase binden und dadurch nicht mehr für den proteasomalen Abbau markiert werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende neuartigen Inhibitorklassen benennen:

1. „Befreiung“ des gekapselt vorliegenden, zellulären APOBEC3G: APOBEC3G-Aktivatoren
2. Inhibitoren der *vif*-Dimerisierung: - *vif*-Dimerisierungs-Antagonisten
3. Inhibitoren der APOBEC3G-*vif*-Interaktion: - APOBEC3G-Antagonisten
- *vif*-Antagonisten
4. Inhibitoren der *vif*-Elongin–C-Interaktion: - *vif*-Antagonisten
- Elongin–C-Antagonisten

Die Inhibitoren der dritten und vierten Klasse sollen in den kommenden Kapiteln genauer behandelt werden.

3 Ausgangssituation und Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation knüpft an die vorangegangene Diplomarbeit an. Deren Thema lautete „Neuartiger HIV-Therapieansatz: Synthese von APOBEC3G-*vif*- und *vif*-Elongin-C-Interaktions-Inhibitoren und Testung auf antiretrovirale Wirkung“. Daraus geht hervor, dass sich diese Diplomarbeit mit der Synthese der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Inhibitoren der dritten und vierten Klasse widmete. Die Auseinandersetzung mit den APOBEC3G-*vif*-Interaktions-Inhibitoren, genauer gesagt den APOBEC3G-Antagonisten, geht auf eine Publikation aus dem Jahre 2008 von Nathans et al. zurück.^[71] In dieser wird von der Synthese und Tests von Substanzen berichtet, die die Interaktion zwischen APOBEC3G und *vif* erfolgreich unterbinden, allen voran die Substanz RN18. Diplom-Chemiker Ferdinand Matz hatte sich in seiner Diplomarbeit bereits mit der Optimierung dieser Substanz beschäftigt, auf diese Verbesserungen sollte deshalb aufgebaut werden. Nachdem sich bei Testungen (B. Nowotny, A. Rethwilm, Institut für Virologie der Universität Würzburg) allerdings gezeigt hatte, dass die Testergebnisse von Nathans et al. letztlich auf Artefakten beruhten, wurde die Weiterentwicklung dieser Substanzklasse nicht fortgesetzt. Ein weiterer Umstand beendete die Verfolgung der APOBEC3G-*vif*-Interaktion als therapeutisches Ziel zur Verhinderung des APOBEC3G-Abbaus: Die Struktur von APOBEC3G sowie diejenige der dazugehörigen Bindungseinheit waren nicht bekannt und somit sämtliche Verbesserungen der RN18-Substanzklasse *ligandbasiert*. Dies führte zu einer Änderung des Ziels, nämlich zur Verfolgung der Idee, den APOBEC3G-Abbau durch Inhibitoren der *vif*-Elongin-C-Interaktion zu verhindern. Im Unterschied zu APOBEC3G war die Struktur von Elongin-C bereits durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (pdb-Code 3DCG^[49], Abbildung 30); da die dazugehörige Bindungsstelle von *vif* sowie dessen Bindungseinheit ebenfalls bekannt waren (Abbildungen 31-33), konnte an dieser Stelle *strukturbasiertes* Design betrieben werden.

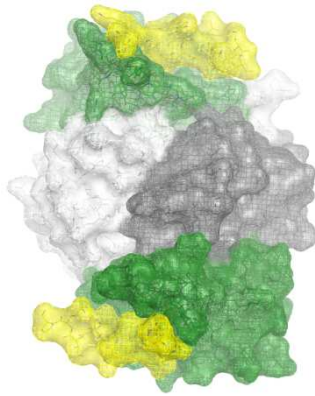


Abbildung 30: Kristallstruktur von Elongin-C mit Bindungseinheit von vif (obere gelbe Einheit)

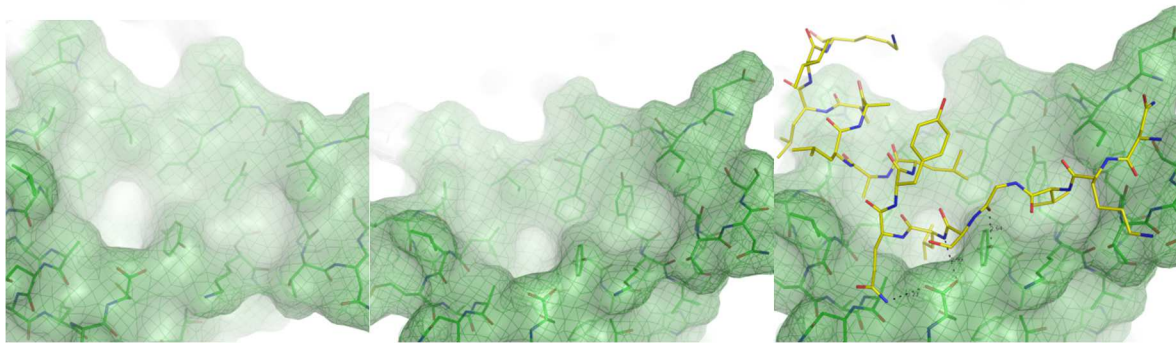


Abbildung 31-33: Bindetasche von Elongin-C aus zwei verschiedenen Blickwinkeln sowie selbige mit dazugehöriger Bindungseinheit von vif

Die Dockingberechnungen, die die Basis für die Synthese entsprechender Inhibitoren und damit den Hauptteil meiner Diplomarbeit sowie der Doktorarbeit von Ferdinand Matz bildeten, wurden von Apotheker Armin Welker (Arbeitskreise Prof. Sotriffer und Prof. Schirmeister, Institut für Pharmazie der Universität Würzburg) im Rahmen seiner Promotion durchgeführt. Für die Dockingberechnungen wurde das Programm GOLD verwendet, das auf genetischen Algorithmen basiert. Mit Hilfe der Chemscore-Scoring-Funktion wurden dabei bis zu dreißig Durchläufe pro Ligand durchgeführt und anschließend diejenigen festgehalten, die bei ihrem besten Lauf einen Chemscore zwischen 44 und 46 aufwiesen. Diese wurden *in silico* weiterentwickelt und als potentielle Inhibitoren betrachtet.

Die aktive Bindetasche von Elongin-C beinhaltet zwei lipophile Zentren, die von folgenden Aminosäuren aufgespannt werden:

Zentrum 1: Valin-73, Tyrosin-76, Phenylalanin-93, Isoleucin-95, Leucin-103, Leucin-104, Alanin-107 sowie Cystein-112

Zentrum 2: Tyrosin-76, Tyrosin-79, Lysin-80, Tyrosin-83, Threonin-84 sowie Isoleucin-90

Die beiden Zentren werden durch Tyrosin-76 voneinander getrennt.

Abbildung 34 und 35 zeigen die Bindetasche von Elongin-C einmal ohne und einmal mit den beteiligten Aminosäuren. In letzterer sind jene Aminosäuren, die Zentrum 1 aufspannen, rot markiert; diejenigen, die Zentrum 2 aufspannen, gelb. Die blau markierte Aminosäure ist Tyrosin-76, die die Trennwand zwischen den beiden Zentren bildet.

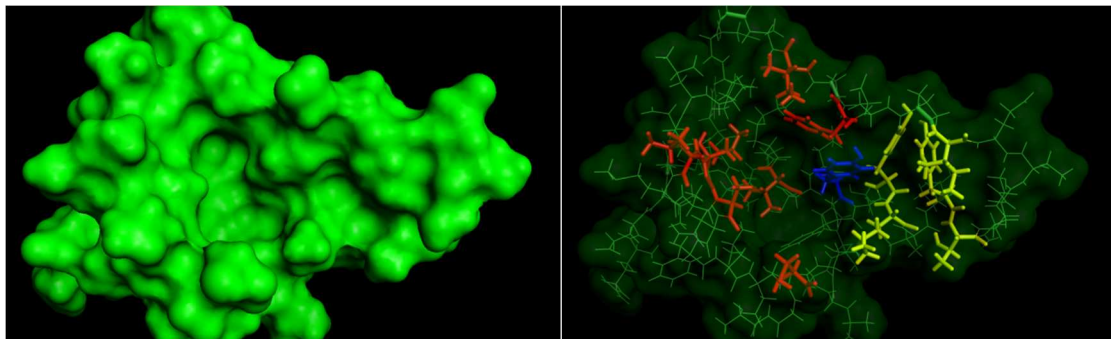


Abbildung 34 und 35: Bindetasche von Elongin-C, einmal ohne und einmal mit Markierung der beteiligten Aminosäuren

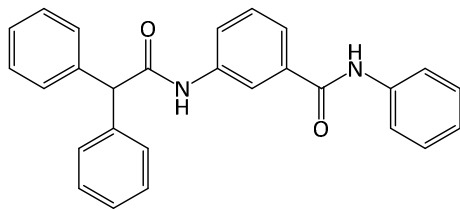
Die Inhibitoren der ersten Dockingrunde bildeten diejenigen der ersten Generation und zeichnen sich durch folgende gemeinsame Wechselwirkungen zur Bindetasche von Elongin-C aus:

- Bereitstellung einer Akzeptorstelle für das phenolische OH-Proton von Tyrosin-76
- Bereitstellung einer Akzeptorstelle für das phenolische OH-Proton von Tyrosin-79
- Lipophile Wechselwirkungen mit dem Benzolring von Tyrosin-76
- Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu beiden hydrophoben Bindezentren

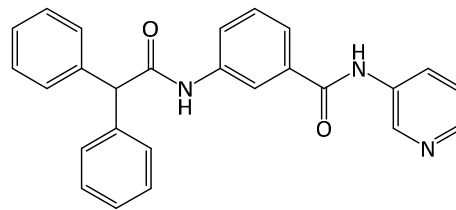
Zusätzlich dazu wiesen die Inhibitoren der ersten Dockingrunde noch weitere spezifische Wechselwirkungen zu Aminosäuren der Bindetasche auf.

3 Ausgangssituation und Zielsetzung

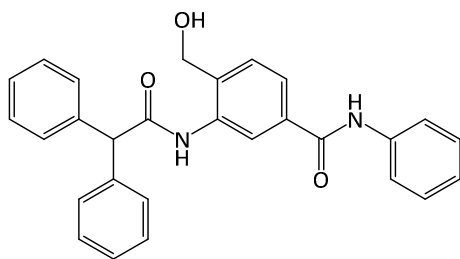
Von den Inhibitoren der ersten Syntheserunde war ein Teil kommerziell erhältlich, der Rest wurde im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit sowie der Promotionsarbeit von Ferdinand Matz synthetisiert. Die folgenden Abbildungen zeigen diese Inhibitoren in der Übersicht.



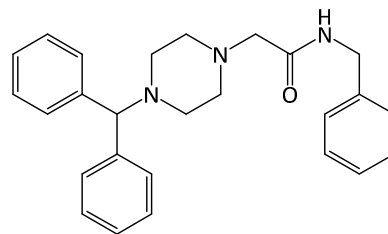
CM34



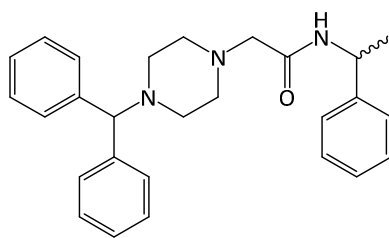
CM41



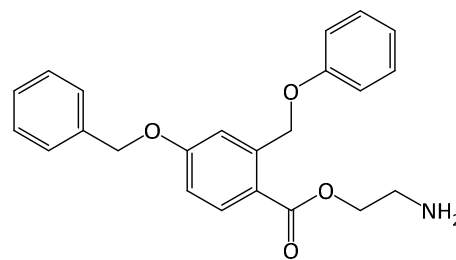
CM69



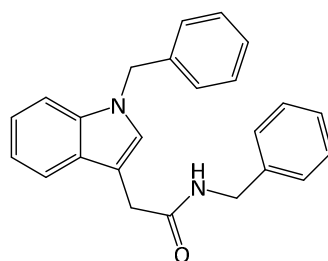
CM46



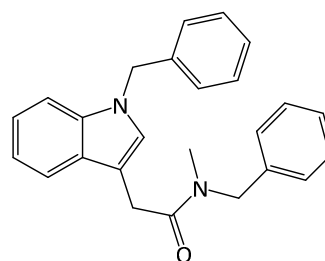
CM51



CM71



CM47



CM48

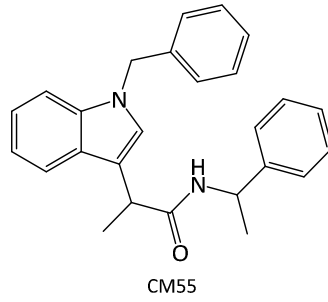
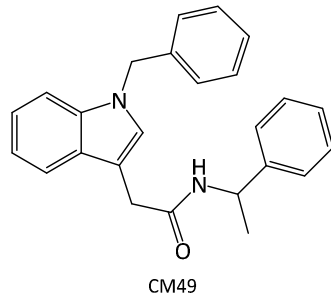


Abbildung 36: Inhibitoren der ersten Generation, synthetisiert im Rahmen der Diplomarbeit

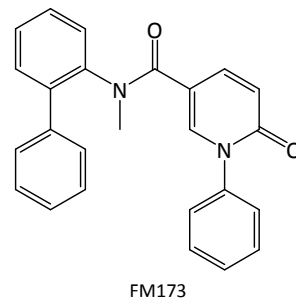
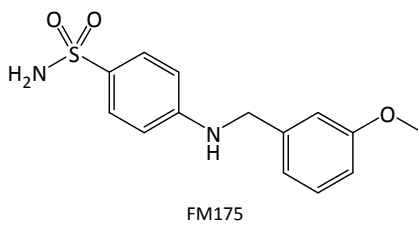
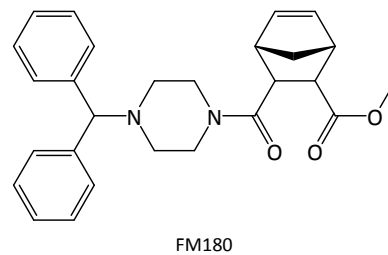
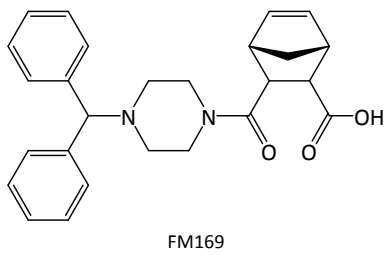
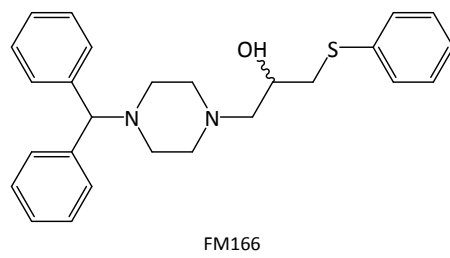
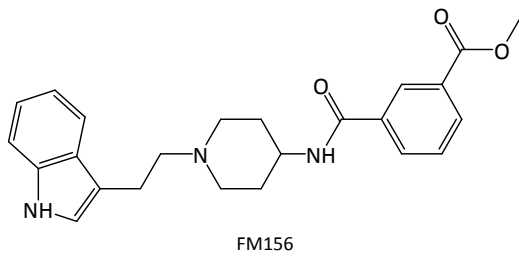
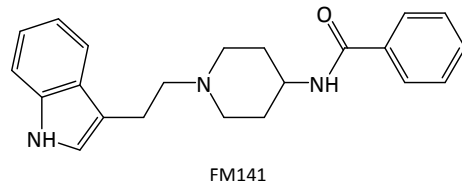
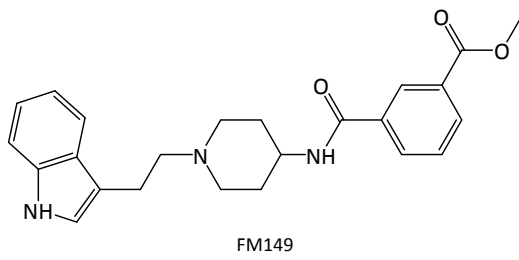
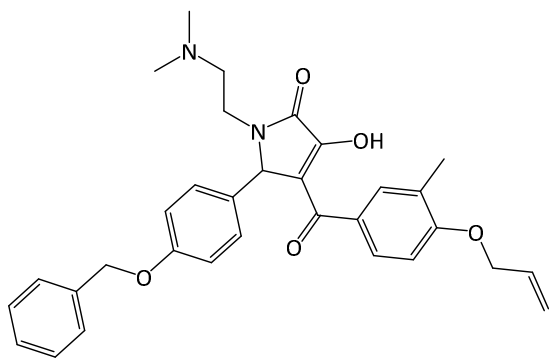
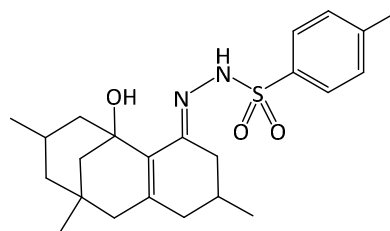


Abbildung 37: Inhibitoren der ersten Generation, synthetisiert von Ferdinand Matz

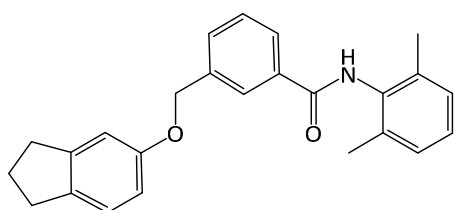
3 Ausgangssituation und Zielsetzung



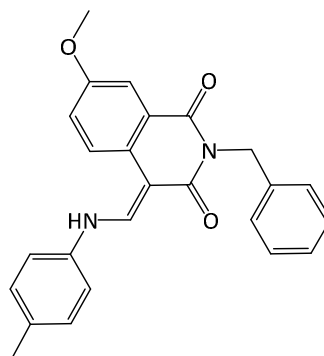
A1



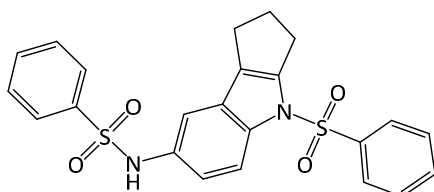
A2



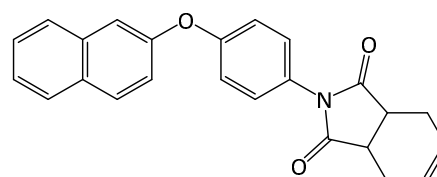
A3



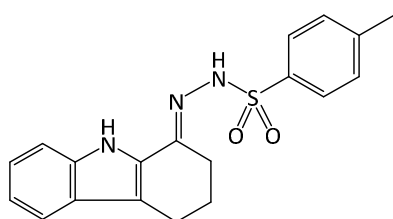
A4



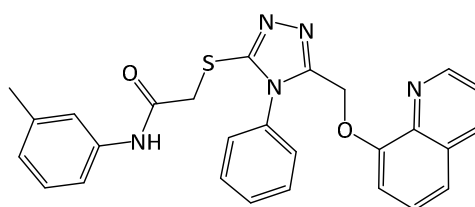
A5



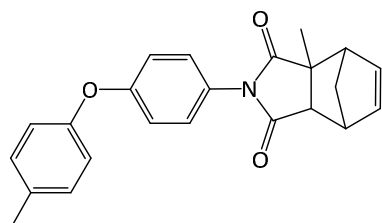
A6



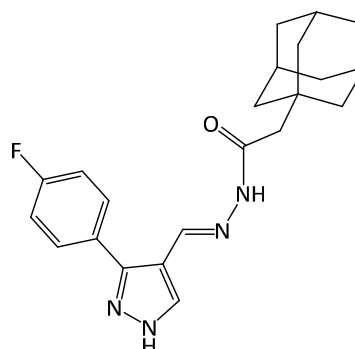
A7



A8

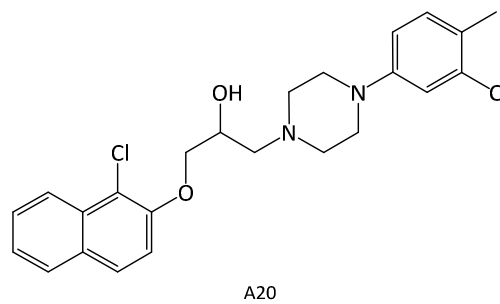
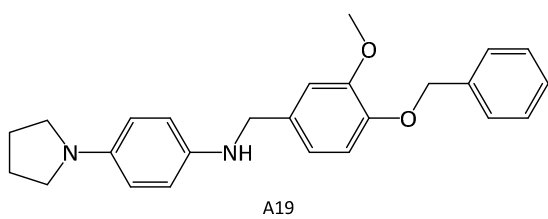
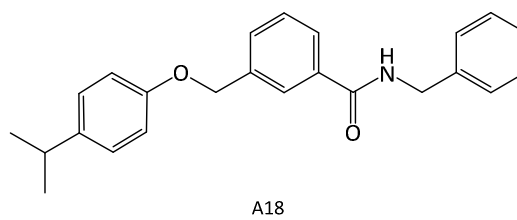
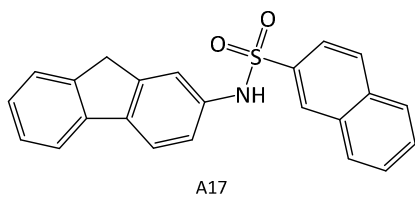
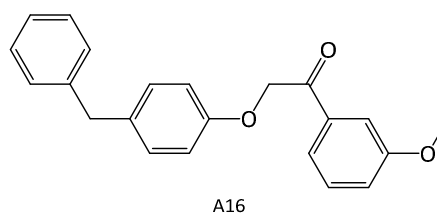
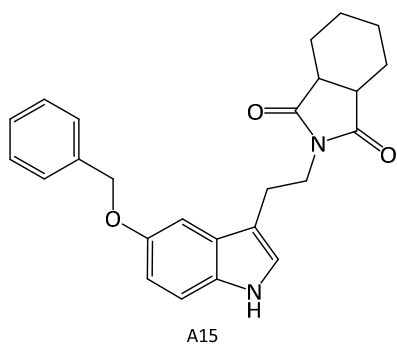
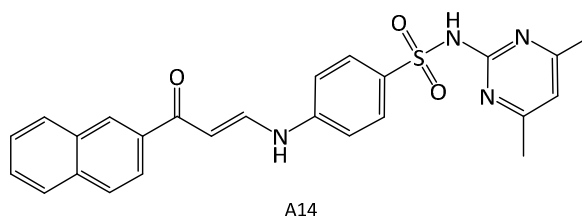
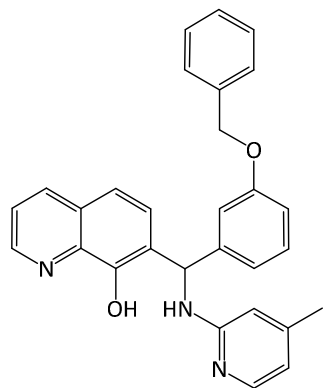
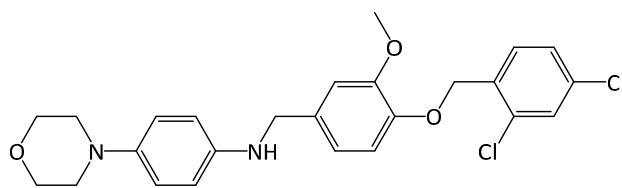
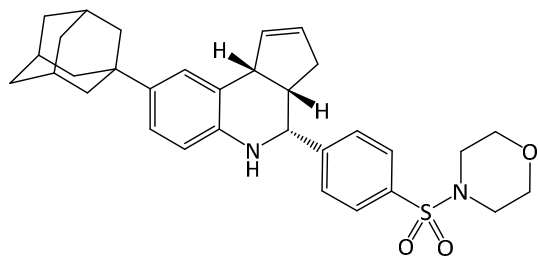


A9



A10

3 Ausgangssituation und Zielsetzung



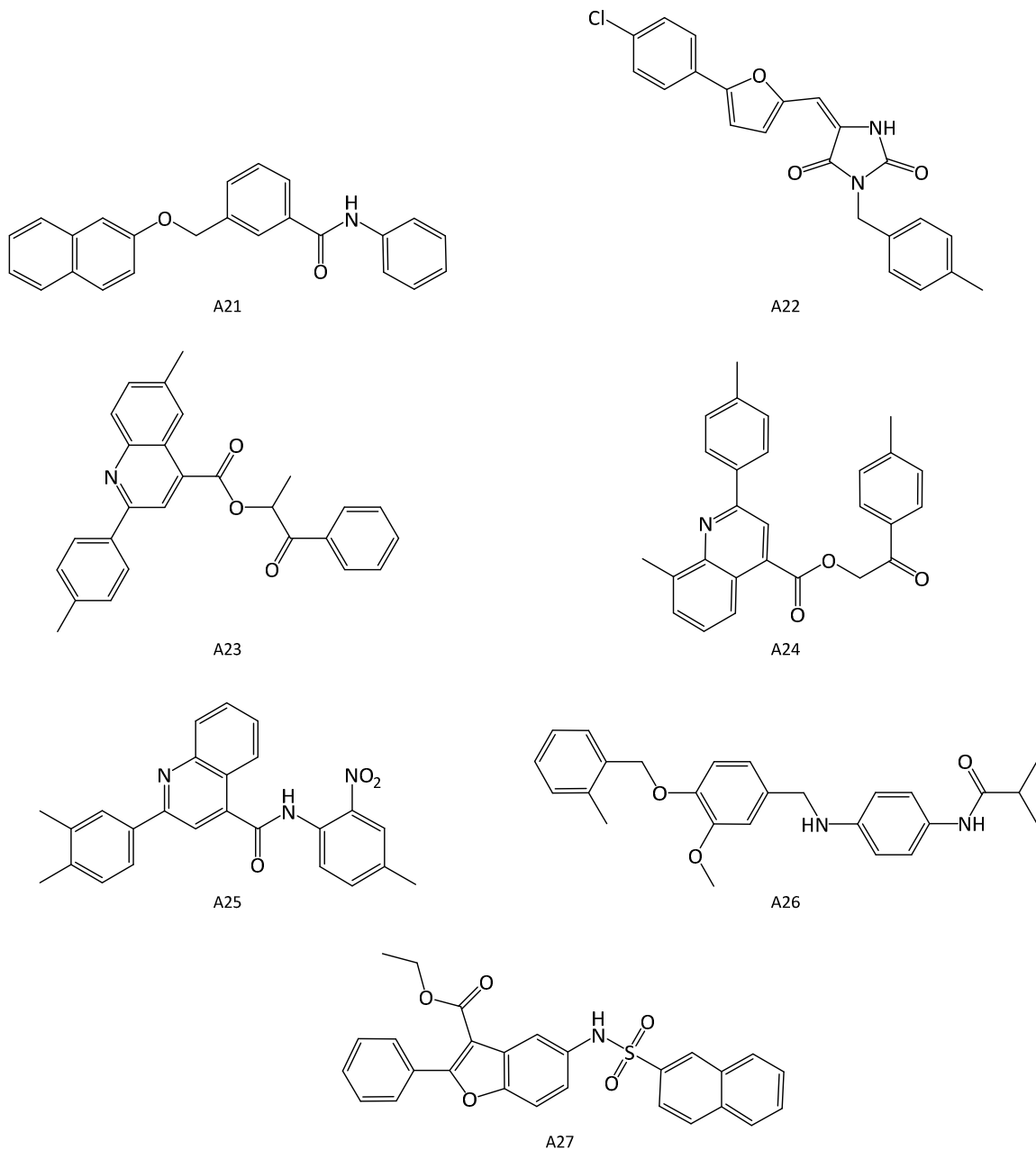


Abbildung 38: Kommerziell erhältliche Inhibitoren der ersten Generation

Die Inhibitoren der ersten Dockingrunde wurden nach der Synthese *in vitro* in einem zellulären Assay auf Hemmung der *vif*-Elongin-C-Interaktion getestet. Dazu wurde von Dr. Boris Nowotny aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Rethwilm, Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, im Rahmen seiner Promotionsarbeit ein geeignetes Testverfahren entwickelt.

293T-*vif*-Tet-Off/EYFP-A3G-Assay

Dieser Assay misst das Hemmpotential der Inhibitoren über Messung des APOBEC3G-Abbaus. Grundlage dieses Testsystems bilden Zellen einer HEK293T-Zelllinie, die sowohl *vif* als auch EYFP-APOBEC3G (*enhanced yellow fluorescent protein-APOBEC3G*) exprimieren. Letzteres unterscheidet sich von natürlichem APOBEC3G durch die Markierung mit EYFP derart, dass es bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 510 nm gelb fluoresziert (535 nm). Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um das Hemmpotential zu messen: Interagiert *vif* mit EYFP-APOBEC3G (EYFP-A3G), wird letzteres dem proteasomalen Abbau zugeführt und verliert dadurch seine Fluoreszenzaktivität. Die Expression von *vif* durch die HEK293T-Zellen ist durch das Tetracyclin-Antibiotikum Doxycyclin steuerbar – in Anwesenheit von Doxycyclin (+Dox) wird die Expression unterbunden, infolgedessen EYFP-A3G nicht abgebaut – die Fluoreszenzintensität ist maximal. Bei Abwesenheit (–Dox) bleibt die Expression von *vif* bestehen, EYFP-A3G wird dem proteasomalen Abbau zugeführt und abgebaut – die Fluoreszenzintensität erreicht ihr Minimum. Über Messung der Fluoreszenzintensität bei Abwesenheit von Doxycyclin und Anwesenheit eines Inhibitors lässt sich dessen Hemmpotential bestimmen. Die beiden folgenden Abbildungen stellen die Funktionsweise des Assays grafisch dar.

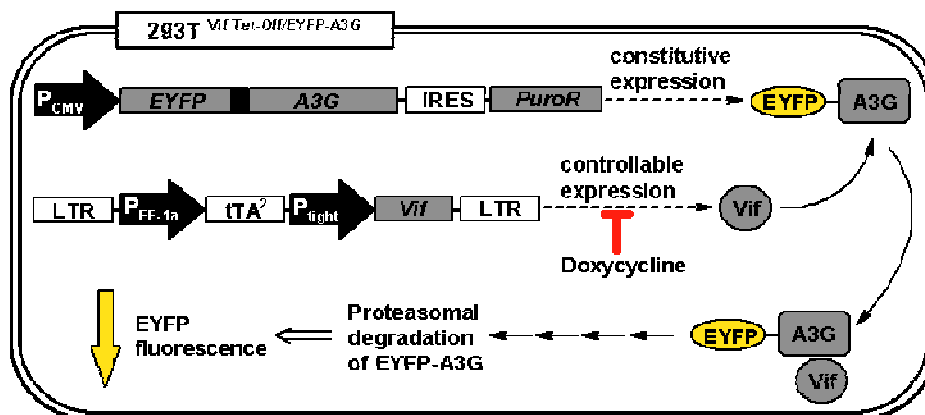


Abbildung 39: Grafische Darstellung der zellulären Abläufe des 293T-*vif*-Tet-Off/EYFP-A3G-Assays

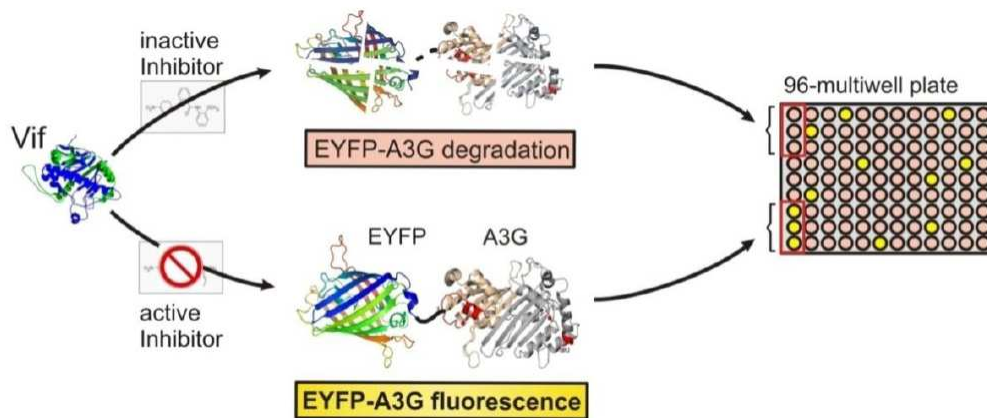


Abbildung 40: Funktionsweise des 293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G-Testverfahrens

Die Fluoreszenzemission erfolgt bei 535 nm und wurde an einem Safire²-Semi-HTS-Fluoreszenzspektrometer der Firma *TECAN* gemessen. Als Lichtquelle dienten hierbei Leuchtdioden, die Licht der Wellenlänge 510 nm emittieren. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit einem low-dark-current-Photomultiplier. Die synthetisierten bzw. kommerziell erworbenen Substanzen wurden bei acht verschiedenen Konzentrationen getestet (6, 9, 13, 20, 30, 44, 67 und 100 μM), zusätzlich wurden die Intensitäten ohne Inhibitor und ohne Doxycyclin (-Dox) sowie ohne Inhibitor und mit Doxycyclin (+Dox) gemessen und als Vergleichswerte herangezogen.

In einem weiteren Testverfahren wurden die Substanzen auf ihre Toxizität getestet.

MTT-Assay

Mit dem *MTT*-Assay ist es möglich, Substanzen auf ihre toxische Eigenschaft zu testen. Er beruht auf der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (*MTT*), einem gelben Farbstoff, der in reduzierter Form eine blauviolette Farbe zeigt. Die zu testenden Zellen werden mit *MTT* versetzt. *MTT* wird in lebenden Zellen durch die Cofaktoren NADH und NADPH reduziert; diese Reduktion findet jedoch nur mithilfe von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums statt. Wirkt eine Substanz cytotoxisch, werden diese Enzyme zerstört, es kann demnach keine Reduktion von *MTT* mehr stattfinden. Die

3 Ausgangssituation und Zielsetzung

Intensität der blauviolettten Farbe kann somit zur Messung der Cytotoxizität benutzt werden. Quantifiziert wurde jeweils der Anteil der noch vitalen Zellen.

Mit Hilfe dieser beiden Tests wurden die Substanzen der ersten Dockingrunde auf ihre hemmende bzw. cytotoxische Eigenschaft getestet.

Die Ergebnisse der von Ferdinand Matz synthetisierten Substanzen sind in seiner Dissertation nachzulesen; von den kommerziell erworbenen Substanzen lagen am Ende der Diplomarbeit noch keine Testergebnisse vor. Von den im Rahmen der Diplomarbeit synthetisierten Substanzen erwies sich CM55 als diejenige Substanz mit der besten Hemmleistung, die zugleich eine relativ geringe Cytotoxizität aufwies (Abbildung 41).

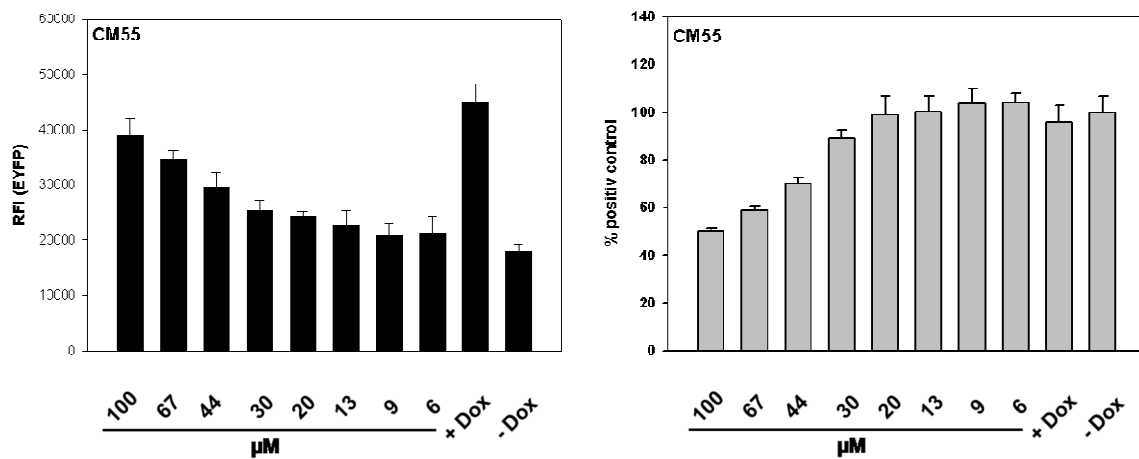


Abbildung 41: Ergebnisse des 293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G- (links) und des MTT-Assays (rechts) mit CM55

In Abbildung 42 ist nochmals die Struktur von CM55 dargestellt, außerdem diejenige von CM49.

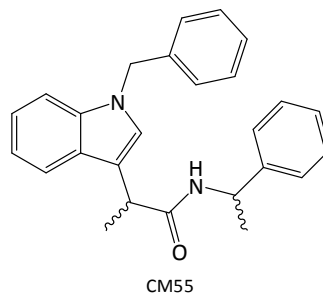
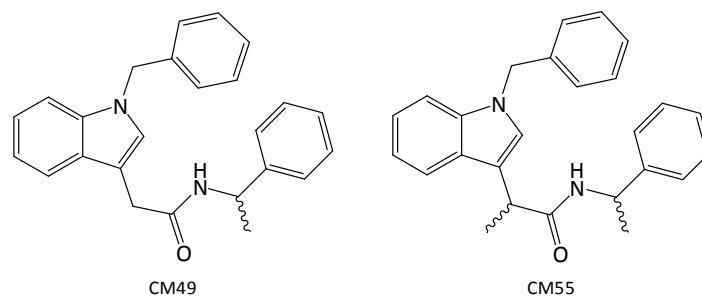


Abbildung 42: Strukturen von CM49 und CM55

Wie anhand der Strukturen erkennbar ist, unterscheiden sich die beiden Substanzen nur durch die Methylgruppe in α -Position zur Amid-Carbonylgruppe. Da die Hemmung des APOBEC3G-Abbaus durch CM55 allerdings deutlich über derjenigen von CM49 lag, war das erste Ziel der sich an die Diplomarbeit anschließenden und hier vorliegenden Promotionsarbeit die Synthese weiterer Derivate von CM55, die an der α -Position zur Amid-Carbonylgruppe durch andere Alkyl- oder Arylreste substituiert sind (Abbildung 43).

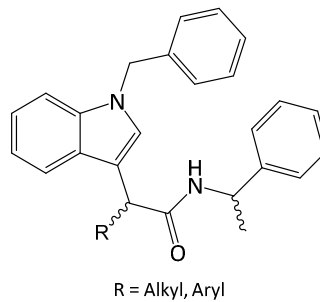


Abbildung 43: Variation von CM55

Die Arbeit an der Synthese verschiedener CM55-Derivate wurde allerdings sehr schnell eingestellt, da nun die zunächst vielversprechenden Testergebnisse der kommerziell erworbenen Substanzen vorlagen.

Von den kommerziell erworbenen Substanzen zeigten einige wenige eine einigermaßen hohe Hemmung, jedoch übertrafen die Ergebnisse von A19 alle Erwartungen:

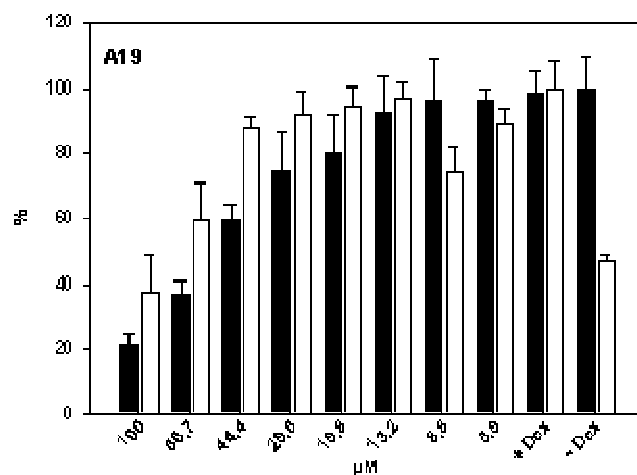


Abbildung 44: Testergebnisse von A19 (schwarz: 293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G-Assay, weiß: MTT-Assay)

Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, liefert A19 im *293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G*-Assay hervorragende Ergebnisse. Selbst bei einer Konzentration von 6 μM hemmt A19 den APOBEC3G-Abbau zu nahezu 100 %, hinzu kommt eine relativ geringe Toxizität bis zu einer Konzentration von 44.4 μM . Die schlechteren Hemmwerte bei höheren Konzentrationen dürften ihre Ursache in der hier vorliegenden Toxizität haben. Diese Tatsachen machten die weitere Derivatisierung von CM55 zunächst hinfällig, stattdessen wurde der Schwerpunkt nun auf die Weiterentwicklung von A19 verlegt, um die bereits hervorragenden Testergebnisse weiter zu verbessern.

Zunächst wurde jedoch in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jochen Bodem (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) ein weiterer Test durchgeführt, der die Aktivität der bereits mit dem *293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G*-Assay getesteten Substanzen direkt an HI-Viren untersuchen sollte. Hierzu wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet: Die eine dieser Zelllinien exprimiert ausschließlich HI-Viren, die andere sowohl HI-Viren als auch APOBEC3G. Beide Zelllinien wurden nun mit den zu testenden Substanzen versetzt und anschließend die Infektiosität der exprimierten HI-Viren kontrolliert. Da *vif*-Elongin-C-Interaktions-Inhibitoren lediglich den Abbau von APOBEC3G verhindern sollen, sollten dementsprechend die HI-Viren der Zelllinie ohne APOBEC3G weiterhin infektiös sein, diejenigen der Zelllinie mit APOBEC3G jedoch nicht mehr. Als Vergleich dazu wurden die beiden Zelllinien mit reinem DMSO versetzt und die Infektiosität anschließend ebenfalls kontrolliert. Sämtliche Substanzen wurden bei einer Konzentration von 30 μM getestet. Abbildung 45 zeigt die Testergebnisse einiger Substanzen, unter Ihnen A19.

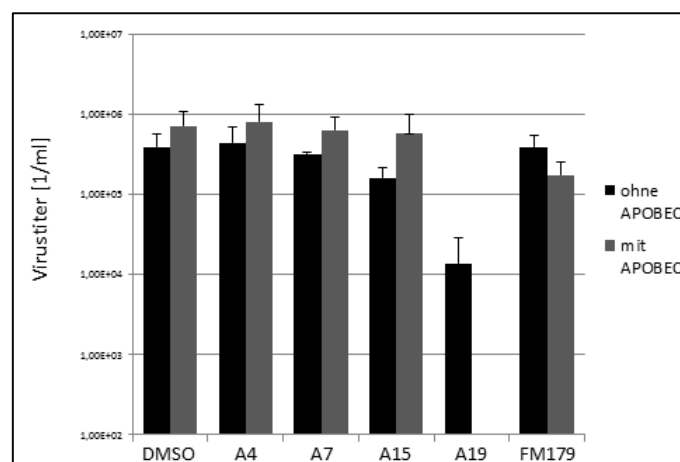


Abbildung 45: Testergebnisse einiger *vif*-Elongin-C-Interaktions-Inhibitoren

Schwarze Balken zeigen die Viruslast der Zelllinie ohne APOBEC3G, graue diejenige der Zelllinie mit APOBEC3G. Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, zeigt die Substanz A19 auch in diesem Test äußerst vielversprechende Ergebnisse: Die Viruslast der Zelllinie ohne APOBEC3G ist, wie zu erwarten, nach wie vor hoch, da die Substanz bei Abwesenheit von APOBEC3G wirkungslos ist. Bei der Zelllinie mit APOBEC3G hingegen ist die Viruslast gleich null; die HI-Viren sind demnach nicht mehr in der Lage, sich zu vermehren. Dies bestätigt: A19 verhindert den Abbau von APOBEC3G, sodass dieses seine antiretrovirale Aktivität voll entfalten kann.

Das Ergebnis dieses Test bestätigte das des vorangegangenen *293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G*-Assays und bekräftigte das Vorhaben, der Derivatisierung von CM55 den Rücken zuzuwenden und sich voll auf die Weiterentwicklung von A19 (Abbildung 46) zu konzentrieren.

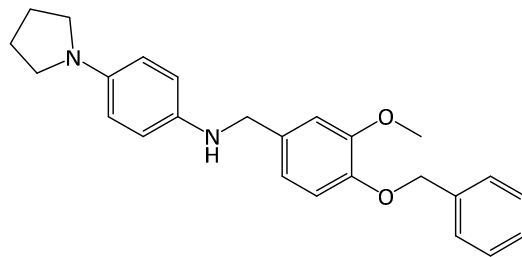


Abbildung 46: Struktur von A19

Die Optimierung von A19 sollte durch Derivatisierung der beiden Moleküleenden erfolgen. Dazu wurde das Molekül gedanklich geteilt; die Derivatisierung des hydrophoben Molekülteils wurde im Rahmen einer anderen Dissertation durchgeführt, diejenige des Aminteils sollte Ziel der vorliegenden Dissertation sein (Abbildung 47).

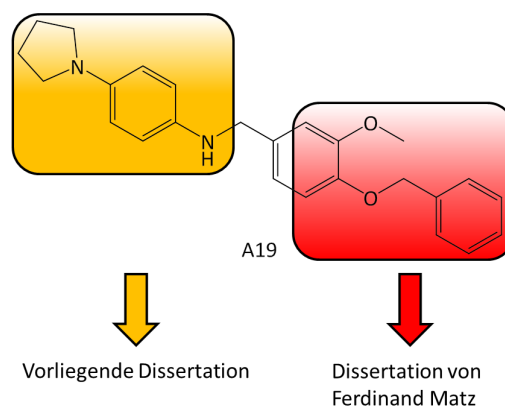


Abbildung 47: Aufteilung der Derivatisierung von A19

Die Derivatisierung der beiden Moleküle sollte auf Basis zuvor durchgeführter Docking-Berechnungen erfolgen, die im folgenden Kapitel näher betrachtet werden sollen.

4 Dockingstudien zur Optimierung von A19

In Kapitel drei wurde bereits näher auf die Bindetasche von Elongin-C eingegangen; die beteiligten Aminosäuren wurden beschrieben und in den Abbildungen 34 und 35 grafisch dargestellt. Im Folgenden soll hier der Bindemodus von A19 im Protein genauer beschrieben werden, da basierend auf dessen Molekülgerüst weitere Derivatisierungen des Aminteils durchgeführt werden sollten.

Die folgende Abbildung zeigt die Lage von A19 in der Bindetasche von Elongin-C.

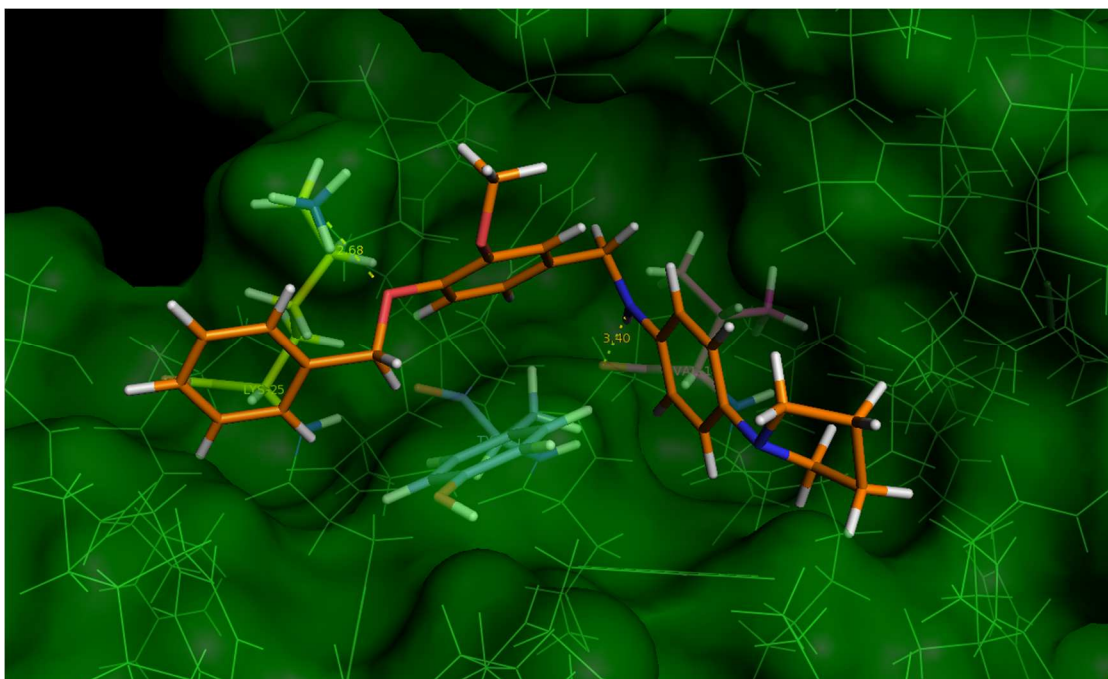


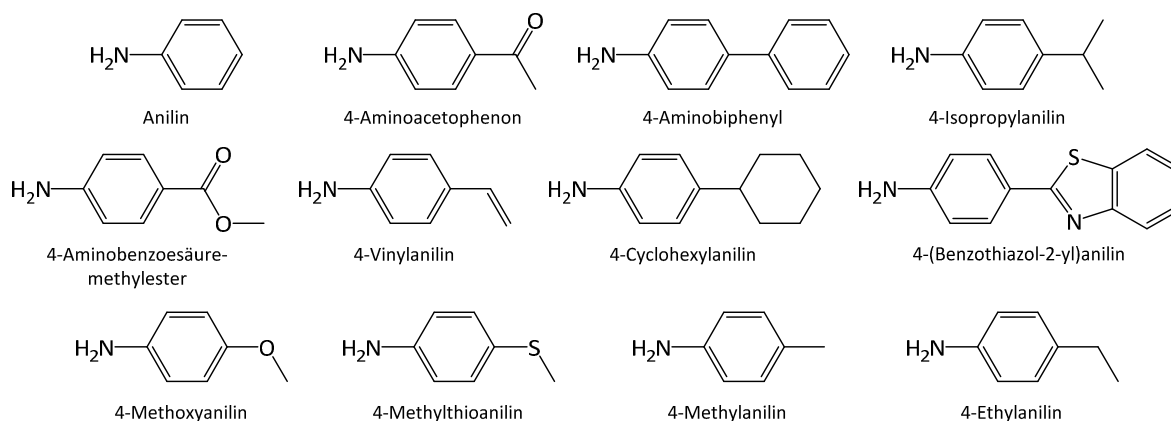
Abbildung 48: Lage von A19 in der Bindetasche von Elongin-C

Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, bildet der hydrophobe benzyliche Molekülteil von A19 starke unpolare Wechselwirkungen zu Zentrum 2 der Bindetasche aus, der Pyrrolidinring von A19 solche zu Zentrum 1; zusätzlich bilden der 1,4-Diaminoaromat und der zweifach alkoxy-substituierte Aromat von A19 über ihre π -Systeme Wechselwirkungen zu Tyrosin-76. Außerdem bildet A19 Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei an der Aufspannung der Bindetasche beteiligten Aminosäuren aus. Die erste wird zwischen dem benzylichen Sauerstoff von A19 und einem Wasserstoffatom der Aminogruppe in ϵ -Position von Lysin-80 (Zentrum 2, Länge: 2.68 Å) gebildet, die zweite zwischen dem Wasserstoffatom

der anilinschen Aminogruppe von A19 und dem carbonylischem Sauerstoffatom von Valin-73 (Zentrum 1, Länge: 3.40 Å). Die durch Tyrosin-76 gebildete Trennwand zwischen den beiden Zentren der Bindetasche wird durch die CH₂-NH-Einheit überbrückt.

Zur Derivatisierung des Aminteils wurden umfangreiche Dockingstudien durchgeführt, bei denen der Pyrrolidinring durch andere Substituenten ersetzt wurde. Hierbei wurde versucht, den energetischen Gewinn bei der Protein-Ligand-Bindung durch zusätzliche bzw. stärkere hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen zu maximieren, außerdem sollten die sterischen Einflüsse des Substituenten untersucht werden. Stärkere hydrophobe Wechselwirkungen können beispielsweise durch Vergrößerung des Pyrrolidinrings um eine CH₂-Einheit zum Piperidinring oder durch den Ersatz durch einen Phenyl-, Benzothiazol- oder Cyclohexylring erreicht werden. Stärkere hydrophile Wechselwirkungen können beispielsweise durch den Ersatz des Pyrrolidinrings durch Piperazin ermöglicht werden, was die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zur Bindetasche erlaubt. Die sterischen Einflüsse von Substituenten in dieser Position können ermittelt werden, indem der Pyrrolidinring durch verschieden große Alkylreste ersetzt wird. Zu guter Letzt kann man mit Hilfe elektronenziehender Substituenten an Stelle des Pyrrolidinrings versuchen, die Bindungsaffinität des Liganden über eine Erhöhung der Acidität des Amin-Wasserstoffs zu steigern. Da dies auch durch den Ersatz der CH₂-NH-Einheit durch eine Amidgruppe möglich ist, sollten von sämtlichen A19-Derivaten auch die entsprechenden Amide synthetisiert werden.

In Abbildung 49 sind jene Anilinderivate dargestellt, die aufgrund der Ergebnisse der Docking-Berechnungen zur Derivatisierung des Aminteils von A19 verwendet werden sollten.



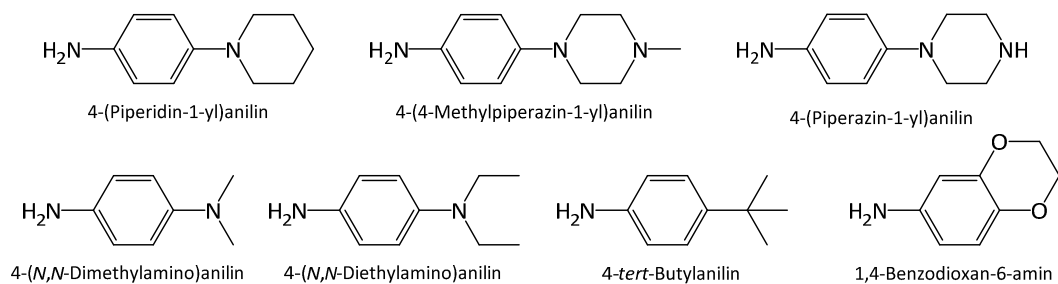


Abbildung 49: Anhand von Docking-Berechnungen ermittelte Anilinderivate

Die Synthese der Amin- und Amidderivate von A19 wird in Kapitel 5.2 ausführlich beschrieben.

5 Synthesen

5.1 Darstellung der CM55-Derivate

Wie bereits erwähnt, war die erste Zielsetzung der vorliegenden Dissertation die Derivatisierung der Substanz CM55 in α -Position der Carbonylgruppe. Die Synthese dieser Derivate ließ sich am Beispiel des Methylderivates gemäß Abbildung 50 umsetzen.

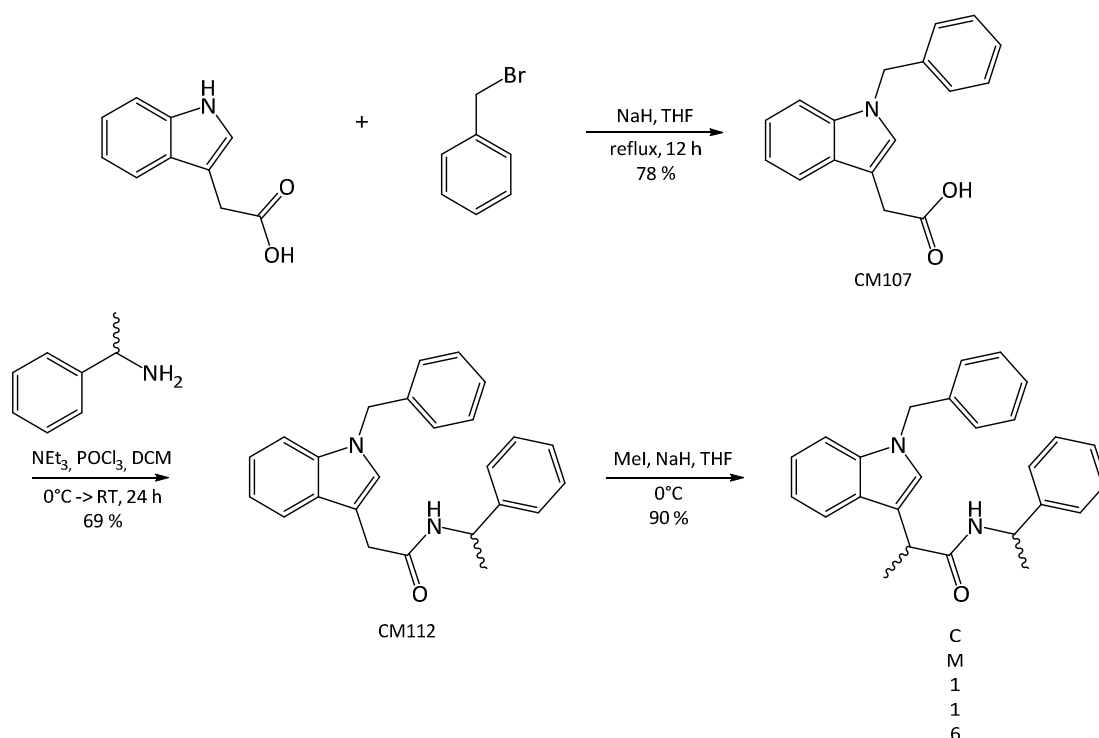


Abbildung 50: Darstellung von Derivaten des CM55

Beim ersten Reaktionsschritt handelt es sich um eine nucleophile Substitution. Hier wird der Stickstoff des Indolgerüsts zunächst durch die starke Base Natriumhydrid deprotoniert und greift anschließend nucleophil am elektrophilen Kohlenstoffatom von Benzylbromid an. Bromid verlässt bei diesem Angriff das Molekül als Abgangsgruppe; es bildet sich Bromwasserstoff, der wiederum durch Natriumhydrid, das im Überschuss vorliegt, neutralisiert wird. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 78 %. Im nächsten Reaktionsschritt findet eine durch Phosphorylchlorid vermittelte Amidkupplung mit (*R,S*)-1-Phenylethylamin statt; die Ausbeute dieser Reaktion betrug 69 %. Im letzten Reaktionsschritt erfolgt die

Alkylierung in α -Position der Carbonylgruppe statt. Hier wirkt Natriumhydrid erneut als starke Base, um den α -Kohlenstoff der Carbonylgruppe zu deprotonieren. Dieser greift anschließend das elektrophile Kohlenstoffatom von Methyljodid nucleophil an, Iodid geht als Abgangsgruppe ab und wird in Form von Iodwasserstoff von Natriumhydrid im Überschuss neutralisiert. Das Endprodukt CM116 entstand bei dieser Reaktion mit einer Ausbeute von 90 %, das Diastereomerenverhältnis konnte mittels der Integralverhältnisse der Methylprotonen im NMR-Spektrum am α -Kohlenstoff auf 1:2 bestimmt werden.

5.2 Darstellung der A19-Derivate

Wie bereits erwähnt, soll die Ausgangssubstanz A19 am Aminteil derivatisiert werden. Hierzu wird das Molekül retrosynthetisch in den Amin- und den hydrophoben Molekülteil gespalten (Abbildung 51).

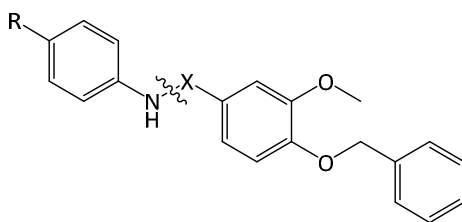


Abbildung 51: Retrosynthetische Spaltung der A19-Derivate

Die einfachste Methode, die bei der Retrosynthese gespaltene Bindung synthetisch aufzubauen, besteht in der Reduktion des durch Amidkupplung des Anilinderivates mit der Carbonsäure gewonnenen Carbonsäureamids zum entsprechen Amin. Folglich befindet sich beim Amid an der Stelle X eine Carbonylgruppe. Der Vorteil dieser Syntheseroute beruht nicht nur auf der verhältnismäßig einfachen Syntheseroute, sondern auch auf der Tatsache, dass hier die entsprechenden Amide, die nach den Docking-Berechnungen ebenfalls Zielmoleküle sein sollten, als Vorstufe der Amine bereits zur Verfügung stehen und nicht in einem weiteren Reaktionsweg dargestellt werden müssen. Abbildung 52 veranschaulicht diesen Reaktionsweg.

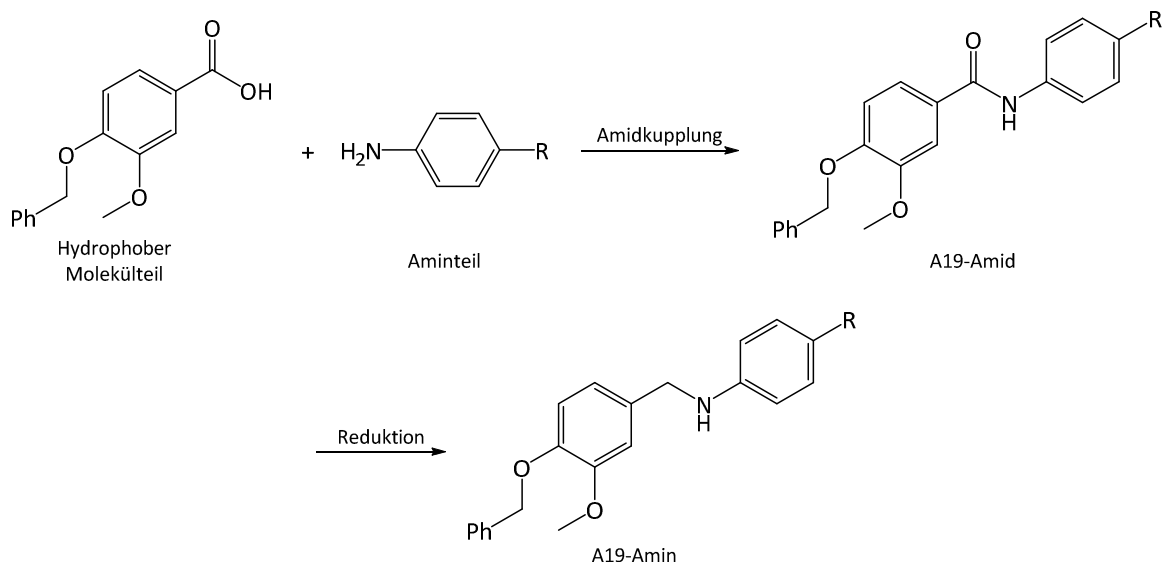


Abbildung 52: Syntheseroute der A19-Amide und –Amine

Der hydrophobe Molekülteil, 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure, konnte, ausgehend von Vanillinsäure, wie folgt dargestellt werden.

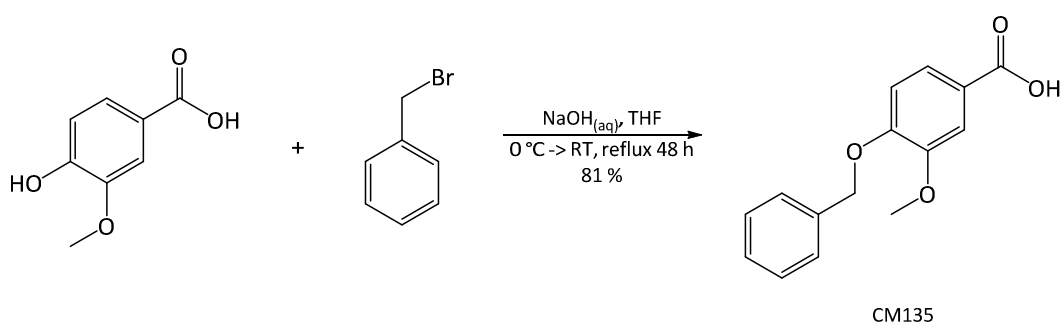


Abbildung 53: Syntheseroute der A19-Amide und –Amine: Synthese der Carbonsäure

Bei diesem Reaktionsschritt wird die aromatische Hydroxylgruppe mit Benzylbromid verethert. Dabei greift das freie Elektronenpaar des Sauerstoffatoms am elektrophilen Benzyl-Kohlenstoffatom an. In einer nucleophilen Substitution spaltet sich Bromid als Abgangsgruppe ab, das mit einem Proton Bromwasserstoff bildet, der durch Kaliumcarbonat neutralisiert wird. Ein Teil des Benzylbromids reagiert auch mit der Säuregruppe unter Veresterung, wird allerdings durch Natriumhydroxid in einer alkalischen Esterhydrolyse wieder zur Säure gespalten.

Die Anilinderivate waren teilweise kommerziell erhältlich, teilweise mussten sie synthetisiert werden, einige wurden aufgrund der hohen Handelspreise aus deutlich günstiger

erhältlichen Edukten dargestellt. Die beiden folgenden Abbildungen geben darüber Aufschluss.

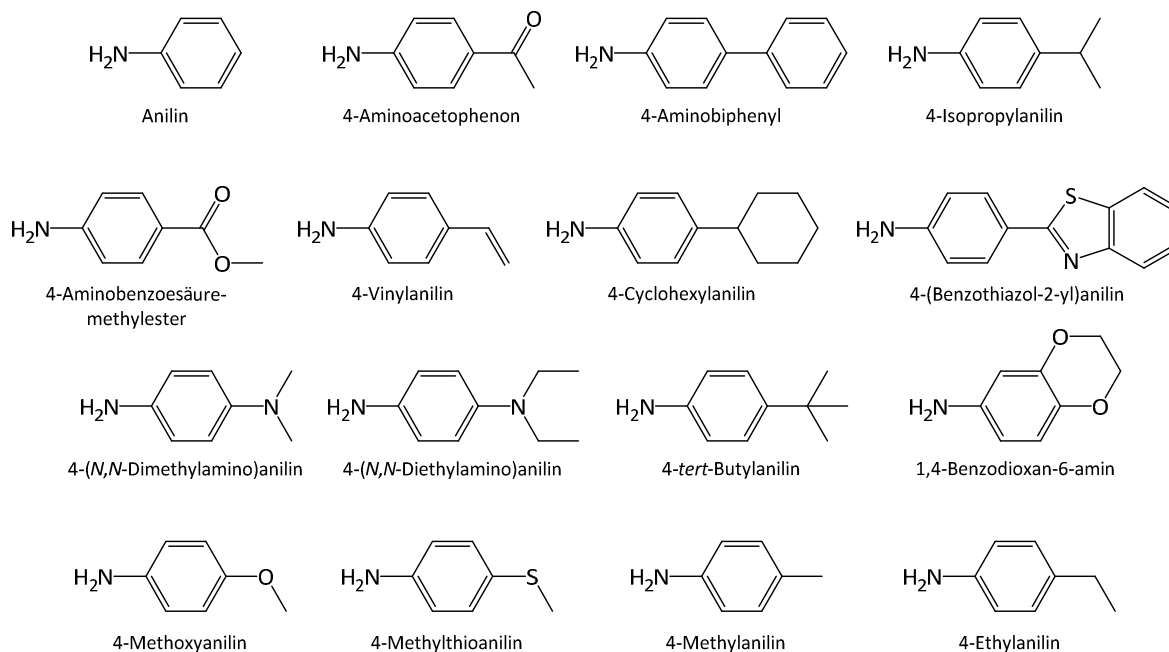


Abbildung 54: Kommerziell erworbene Anilinderivate und 2-Aminobenzothiazol

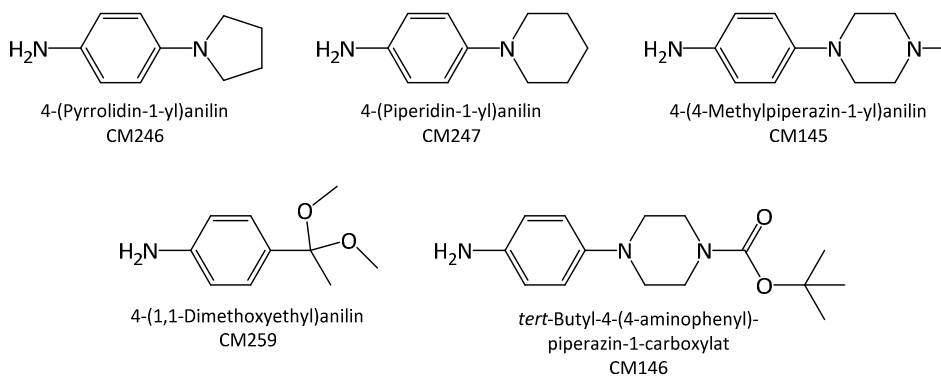


Abbildung 55: Synthetisierte Anilinderivate

Im Folgenden soll auf die Synthese der Anilinderivate eingegangen werden.

Die beiden Anilinderivate mit über den entsprechenden Stickstoff gebundener Pyrrolidin- bzw. Piperidineinheit in *para*-Stellung (CM246 bzw. CM247) wurden nach folgendem Schema synthetisiert:

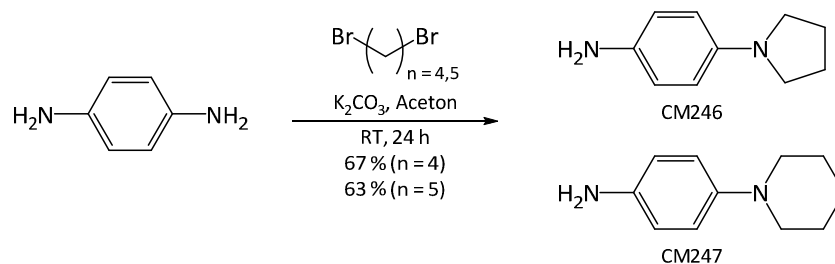


Abbildung 56: Darstellung des Pyrrolidin- und Piperidinbausteins

Die Synthese beruht auf einer nucleophilen Substitution von 1,4-Diaminobenzol mit 1,4-Dibrombutan bzw. 1,5-Dibrompentan. Da bei der Reaktion eines Diamins mit einem Dibromalkan prinzipiell sehr viele verschiedene Reaktionsprodukte denkbar sind (Di- bzw. Polymerisierung, doppelte Ringbildung, Substitution eines Amin-Stickstoffs mit zwei Molekülen Dibromalkan) ist darauf zu achten, das Diamin im Überschuss vorzulegen sowie die Reaktionstemperatur relativ gering zu halten. Diese Kriterien wurden umgesetzt, indem drei Äquivalente 1,4-Diaminobenzol vorgelegt wurden und die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Die gewünschten Produkte konnten so in Ausbeuten von 67 % bzw. 63 % erhalten werden.

Die Anilinderivate CM143 und CM145 wurden wie folgt dargestellt.

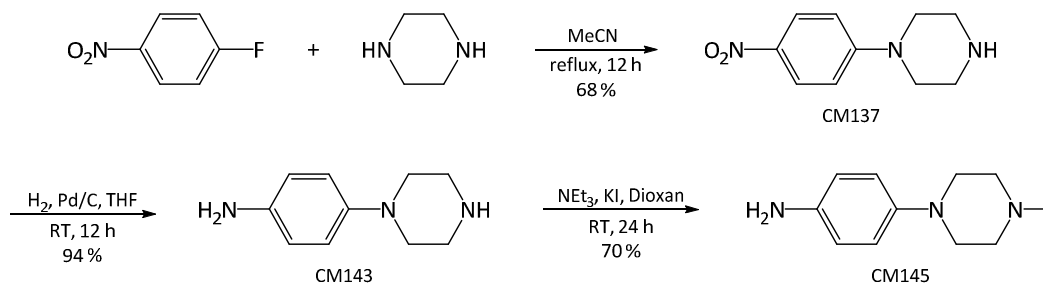


Abbildung 57: Darstellung von CM143 und CM145

Im ersten Reaktionsschritt reagiert 1-Fluoro-4-nitrobenzol mit Piperazin in einer nucleophilen aromatischen *ipso*-Substitution zu 1-(4-Nitrophenyl)piperazin, die Ausbeute dieser Reaktion betrug 68 %. Im folgenden Schritt erfolgt die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe zu einer Aminogruppe. Dazu wird das Produkt der vorigen Reaktion bei erhöhtem Druck mit Wasserstoff sowie Palladium auf Aktivkohle als Katalysator umgesetzt. Das Produkt dieser Reaktion, 4-(Piperazin-1-yl)anilin (CM143), konnte hierbei mit einer Ausbeute von 94 % erhalten werden. Anschließend erfolgt die Umsetzung zu CM145. Bei

diesem Reaktionsschritt findet eine nucleophile Substitution statt, bei der der sekundäre Stickstoff des Piperazinrings das elektrophile Kohlenstoffatom von Methyljodid angreift. Iodid verlässt bei diesem Angriff das Molekül als Abgangsgruppe; es bildet sich Iodwasserstoff, der durch Triethylamin, das im Überschuss vorliegt, neutralisiert wird. Eine Methylierung am Anilin-Stickstoff findet bei dieser Reaktion aufgrund dessen geringerer Basizität und damit Nucleophilie im Vergleich zum Piperazin-Stickstoff ($pK_s = \text{ca. } 4.6 \text{ bzw. } 4.2$) mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit statt. Das Produkt (CM145) konnte so mit einer Ausbeute von 70 % erhalten werden.

Da, wie soeben erwähnt, die Nucleophilie des Anilin-Stickstoffs deutlich geringer ist als die des Piperazin-Stickstoffs, jedoch erster mit der synthetisierten Carbonsäure (CM135) eine Amidkupplung eingehen soll, ist es nötig, letzteren zuvor mit einer Schutzgruppe zu versehen. Die hierfür geeignete Schutzgruppe ist die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc), die wie folgt eingeführt wurde.

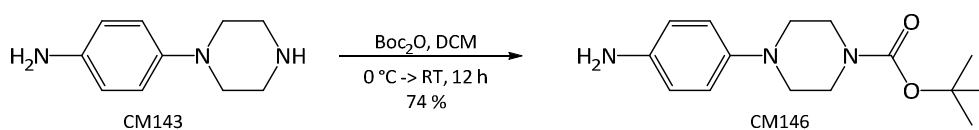
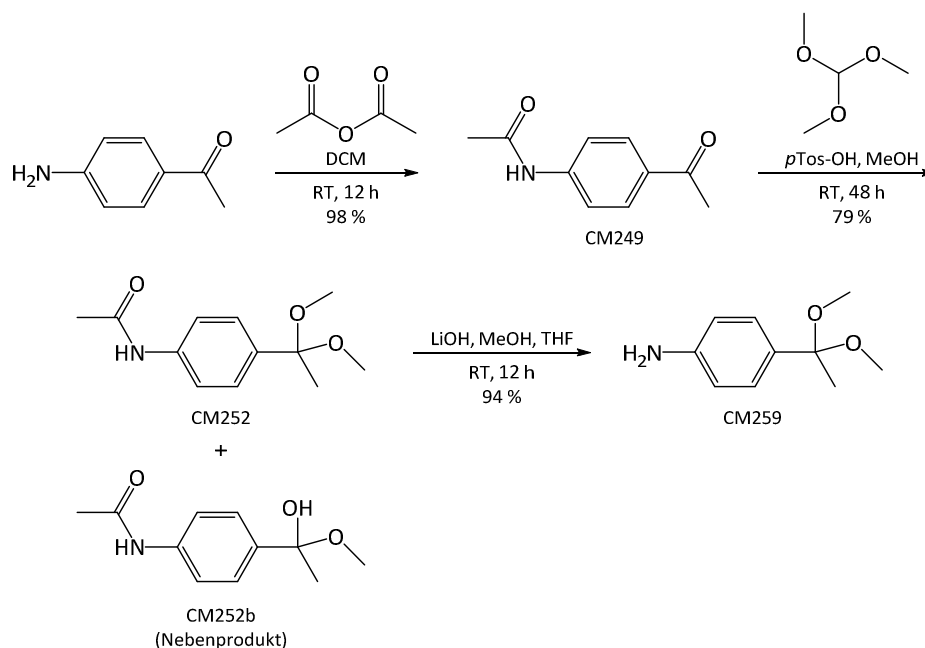


Abbildung 58: Einführung der Boc-Schutzgruppe an CM143

Die Boc-Schutzgruppe wird mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) eingeführt. Letzteres wird dabei vom Piperazin-Stickstoff nucleophil am elektrophilen Carbonyl-Kohlenstoff angegriffen, als Nebenprodukte entstehen bei diesem Reaktionsschritt Isobuten und Kohlendioxid.

Die Synthese des letzten Anilinderivates, CM259, hatte ebenfalls das Ziel, eine Schutzgruppe einzuführen. Diesmal sollte der Carbonyl-Kohlenstoff von 4-Aminoacetophenon geschützt werden, um dessen Reduktion bei der späteren Reduktion der Amide zu den Aminen zu verhindern. Eine hierzu geeignete Schutzgruppe ist die Dimethylacetal-Schutzgruppe. Sie wurde gemäß dem folgenden Reaktionsschema eingeführt.

**Abbildung 59: Synthese von CM259**

Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die Einführung einer Schutzgruppe an die aromatische Aminogruppe. Hier wurde nicht die Boc-, sondern die Acetyl-Schutzgruppe gewählt, mehr dazu später. Die Acetylierung konnte mit Hilfe von Essigsäureanhydrid bei einfachen Reaktionsbedingungen in nahezu quantitativer Ausbeute (98 %) durchgeführt werden. Der nächste Schritt dient der Einführung einer Schutzgruppe an die Carbonylfunktion, um sie, wie bereits erwähnt, gegen eine Reduktion zu schützen. Eine hierfür geeignete Schutzgruppe ist die Dimethylacetal-Schutzgruppe, die gegenüber den meisten Reduktionsmitteln inert ist. Nun lässt sich auch der Grund für die Wahl der Acetyl-Schutzgruppe erkennen: Die Dimethylacetal-Schutzgruppe lässt sich bei niedrigen pH-Werten entfernen und ist gegenüber hohen pH-Werten stabil. Da die Boc-Schutzgruppe hier ähnliche bis gleiche Eigenschaften besitzt, ließe sie sich anschließend nicht mehr entfernen, ohne auch die Dimethylacetal-Schutzgruppe mit zu entfernen. Die Acetyl-Schutzgruppe wird zwar bei niedrigen pH-Werten ebenfalls abgespalten, kann allerdings ebenso bei hohen pH-Werten sehr leicht abgespalten werden, ohne dabei Gefahr zu laufen, die Dimethylacetal-Schutzgruppe zu entfernen. Die Dimethylacetal-Schutzgruppe kann unter Verwendung von Trimethylorthoformiat mit *para*-Toluolsulfonsäure als Katalysator eingeführt werden. Die Ausbeute dieses Reaktionsschrittes betrug 79 %, als Nebenprodukt konnte das Halbacetal identifiziert werden. Der letzte Schritt besteht in der bereits erwähnten Entfernung der

Acetyl-Schutzgruppe des Anilins. Dies kann in alkalischer Lösung mit Lithiumhydroxid erfolgen. Das Endprodukt CM259 konnte bei dieser Reaktion mit einer Ausbeute von 94 % gewonnen werden.

Die kommerziell erworbenen bzw. synthetisierten Anilinderivate wurden nun unter Bildung der Amide mit der Carbonsäure CM135 gekuppelt.

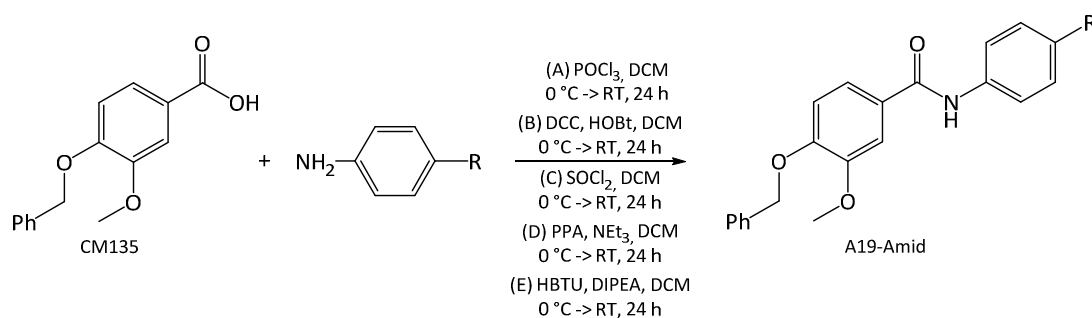


Abbildung 60: Amidkupplung der Carbonsäure mit den Anilinderivaten

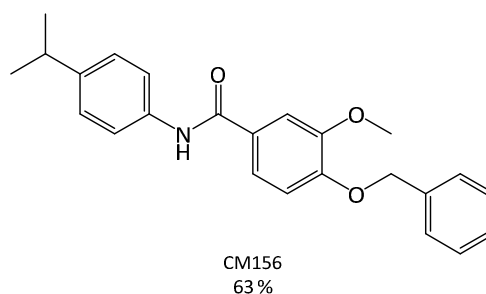
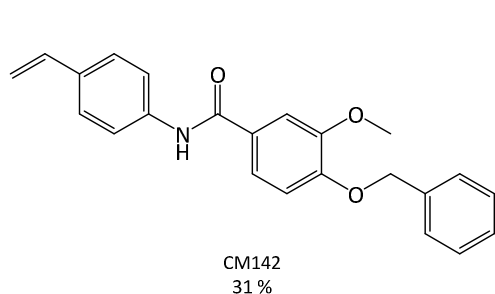
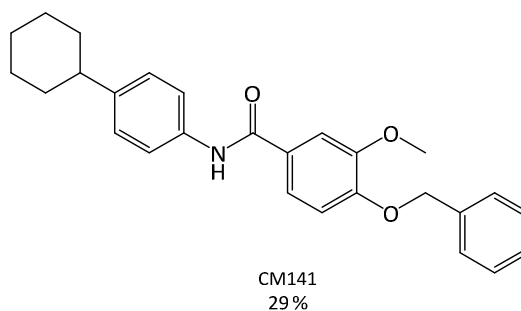
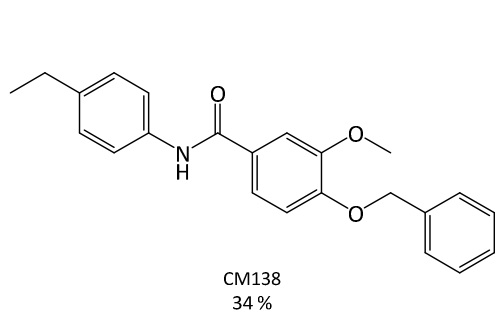
Bei der Reaktion der Carbonsäure CM135 mit den Anilinderivaten entstehen unter Bildung einer Amidfunktion die A19-Amide. Die Kupplung von Carbonsäuren mit Aminen zu Amiden verläuft nicht ohne vorherige Aktivierung der Säurefunktion. Bei den Synthesen der A19-Amide wurden fünf verschiedene Kupplungsreagenzien verwendet, die teils sehr große Differenzen in den Ausbeuten zeigten. Tabelle 3 stellt dies in der Übersicht grob dar.

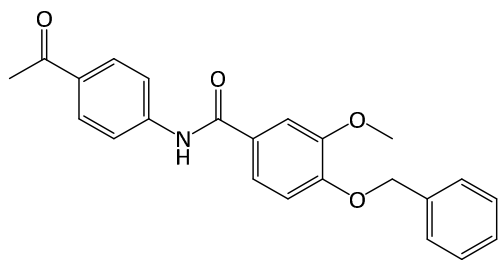
| Aktivierungsreagenz | relative Ausbeute | Abtrennung der Nebenprodukte |
|--|-------------------|------------------------------|
| Phosphorylchlorid (POCl ₃) | mittel | Extraktion |
| Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), <i>N</i> -Hydroxy-benzotriazol (HOBT) | mittel | Filtration |
| Sulfurylchlorid (SOCl ₂) | mittel | Extraktion |
| Propylphosphonsäuretrianhydrid (PPA) | niedrig | Extraktion |
| <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) | hoch | Säulenchromatographie |

Tabelle 3: Übersicht der Kupplungsreagenzien

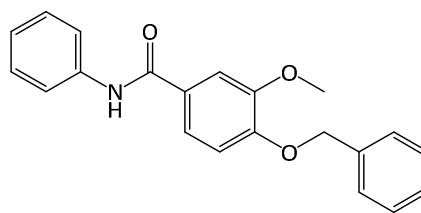
Wie anhand der Tabelle zu sehen ist, liefert HBTU die höchsten Ausbeuten bei der Amidkupplung. Die Nebenprodukte dieses Aktivierungsreagenz sind allerdings nur in organischen Lösungsmitteln löslich, verbleiben daher bei der Aufarbeitung in der organischen Phase und müssen neben weiteren Nebenprodukten säulenchromatographisch abgetrennt werden. Die Nebenprodukte von Sulfurylchlorid, Phosphorylchlorid und PPA sind allesamt wasserlöslich, verbleiben daher in der Wasserphase und erleichtern somit die chromatographische Aufreinigung der Produkte; sie liefern diese allerdings nur in mittleren bis niedrigen Ausbeuten. Die Nebenprodukte von DCC/HOBt können weitgehend abfiltriert werden, müssen aber ebenfalls säulenchromatographisch vollständig abgetrennt werden. Nicht außer Acht zu lassen ist, dass die Ausbeuten relativ zueinander betrachtet werden müssen. Im Allgemeinen waren die Ausbeuten der A19-Amide eher gering, was auf die schwache Nucleophilie der aromatischen Aminogruppe zurückzuführen ist. Diese wird durch *para*-Substituenten mit elektronenziehendem Effekt zusätzlich geschwächt, was in den meisten Fällen zu noch niedrigeren Ausbeuten führte. Umgekehrt führten Substituenten mit elektronen-schiebendem Effekt zu entsprechend höheren Ausbeuten.

Durch die Amidkupplung von CM135 mit den Anilinderivaten konnten folgende A19-Amide synthetisiert werden:

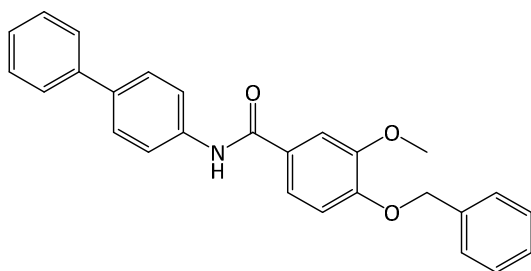




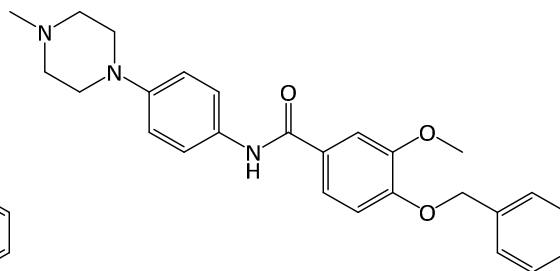
CM157
21 %



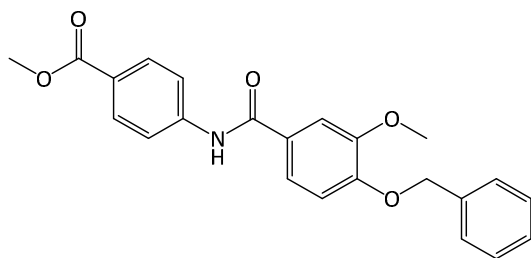
CM167
58 %



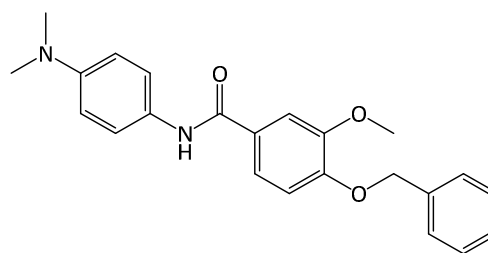
CM209
19 %



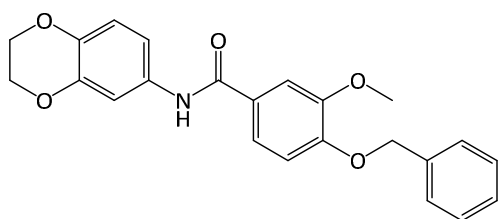
CM210
16 %



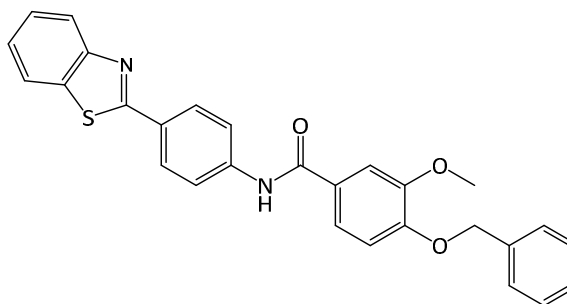
CM211
15 %



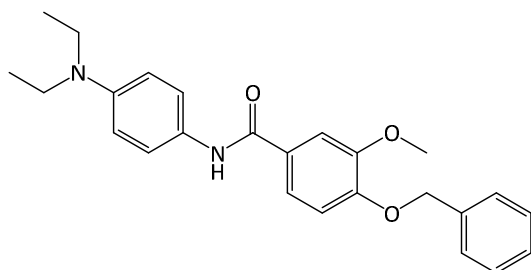
CM214
26 %



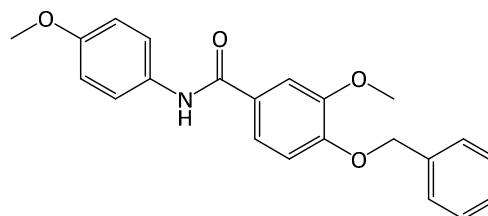
CM217
95 %



CM218
17 %



CM220
22 %



CM221
57 %

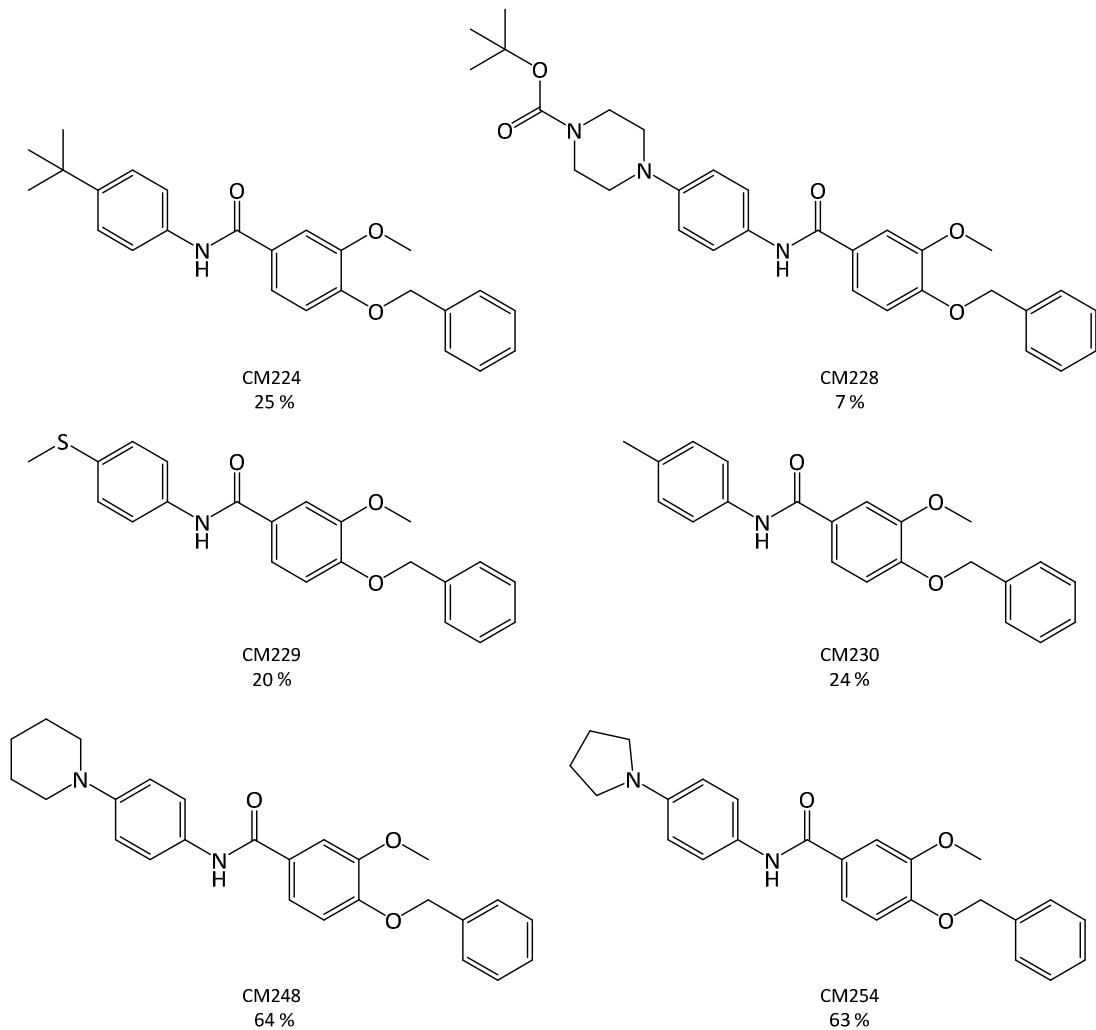


Abbildung 61: Synthetisierte A19-Amide

Die zuvor eingeführte Boc-Schutzgruppe am Stickstoff des Piperazinrings von CM228 konnte nun wieder abgespalten werden:

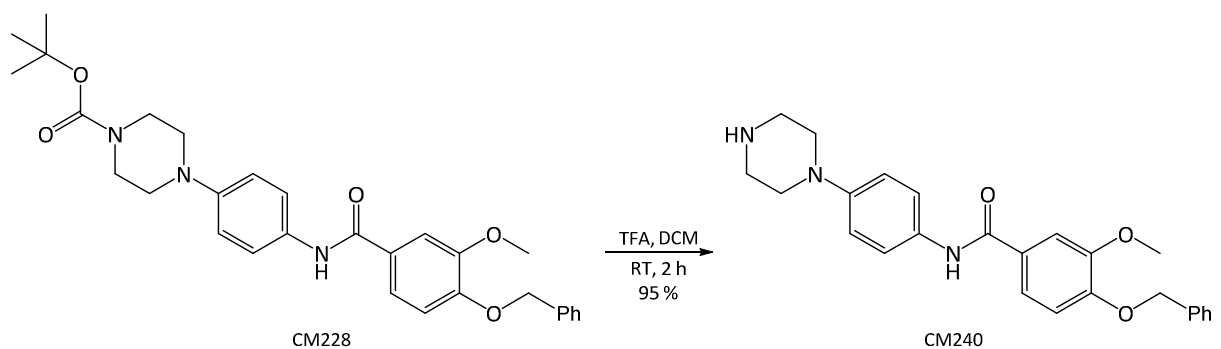


Abbildung 62: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von CM228

Die Abspaltung von Boc-Schutzgruppen kann im stark sauren Milieu mit Trifluoressigsäure erfolgend. Da die bei dieser Reaktion auftretenden Nebenprodukte, Kohlendioxid und Isobuten, in gasförmigem Zustand vorliegen, kann die Umsetzung sehr leicht visuell über einen Blasenähler kontrolliert werden. Die Ausbeuten dieser Reaktion sind im Allgemeinen sehr hoch, so konnte auch in diesem Fall das Produkt CM240 mit einer Ausbeute von 95 % erhalten werden.

Die so erhaltenen zwanzig A19-Amide konnten nun mittels Reduktion zu den A19-Aminen umgesetzt werden.

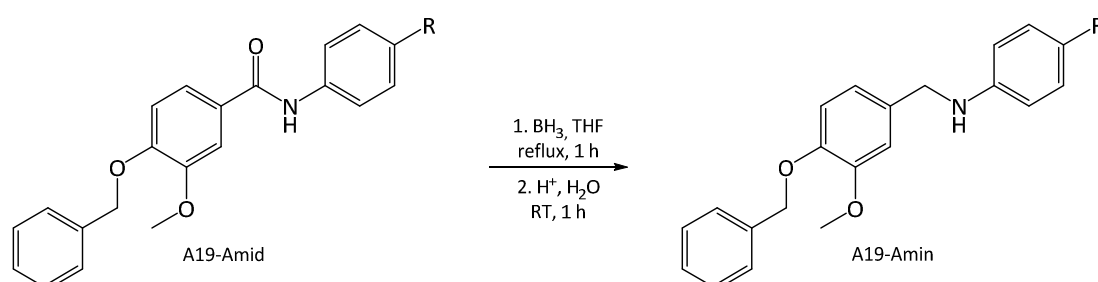
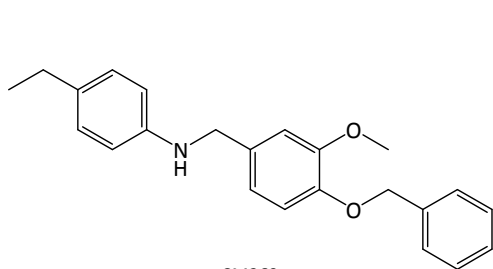


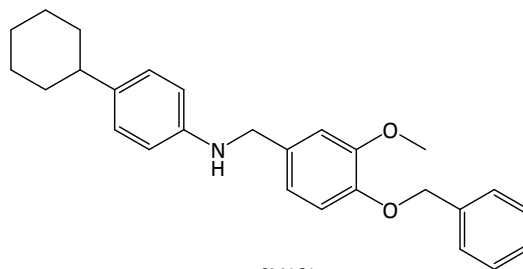
Abbildung 63: Reduktion der A19-Amide zu den entsprechenden Aminen

Das Mittel der Wahl bei der Reduktion von Amiden zu Aminen ist Boran, das im Komplex mit Tetrahydrofuran erhältlich ist und in dieser Reaktion als Lewis-Säure vom Carbonyl-Sauerstoff nucleophil angegriffen wird. Im zweiten Reaktionsschritt wird das hierbei gebildete Zwischenprodukt im sauren Milieu zum entsprechenden protonierten Amin und Borsäure umgesetzt. Eine Ausnahme bildet das Derivat CM142: Aufgrund der C-C-Doppelbindung in vinyloger Stellung zum Aromaten darf hier eine Reduktion mit Boran nicht angewandt werden, da dieses C-C-Doppelbindungen ebenfalls zu C-C-Einfachbindungen reduziert. Dies kann umgangen werden, indem man zur Reduktion des Amids Lithiumaluminiumhydrid verwendet, das als „hartes“ Reduktionsmittel keine C-C-Doppelbindungen reduziert. Diese Reaktion scheiterte jedoch auch nach diversen Versuchen nach verschiedenen Vorschriften aus ungeklärten Gründen.

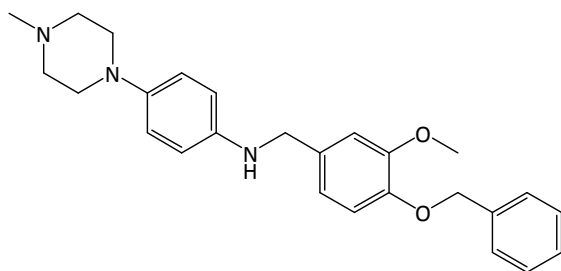
Nach erfolgreicher Reduktion konnten folgende A19-Amine mit den angegebenen Ausbeuten erhalten werden:



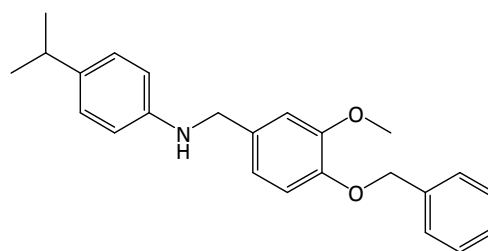
CM269
54 %



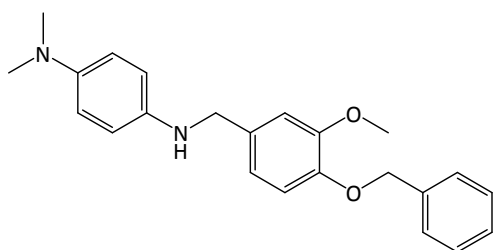
CM161
54 %



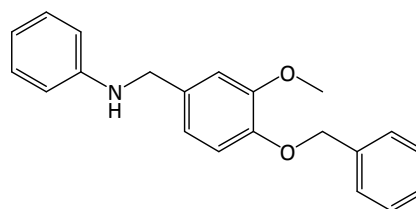
CM235
32 %



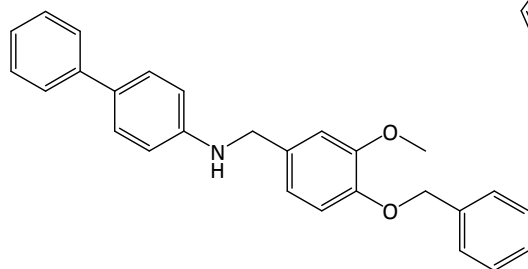
CM160
65 %



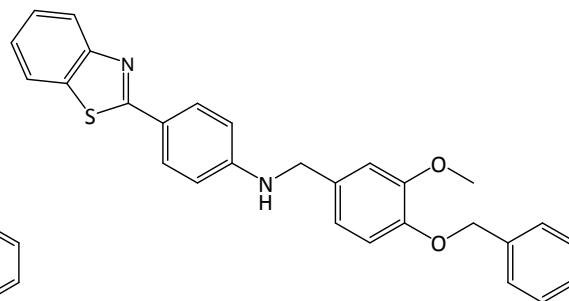
CM237
44 %



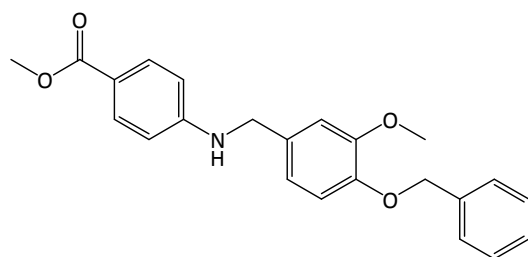
CM216
64 %



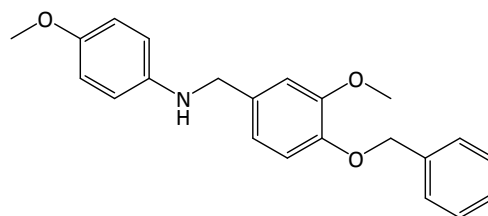
CM215
64 %



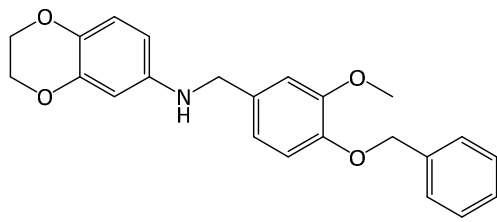
CM260
41 %



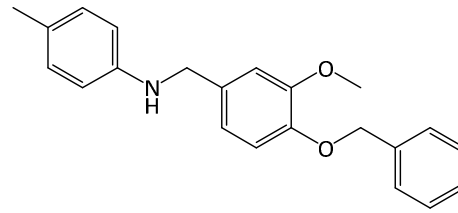
CM257
21 %



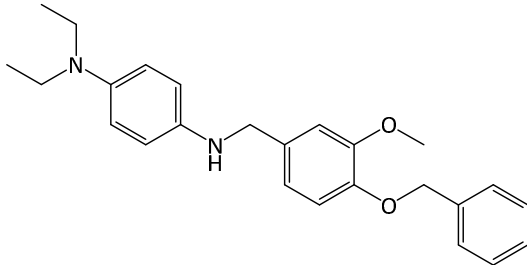
CM245
20 %



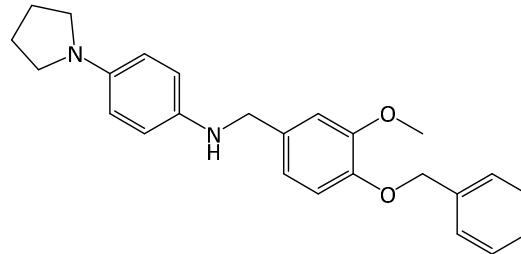
CM236
41 %



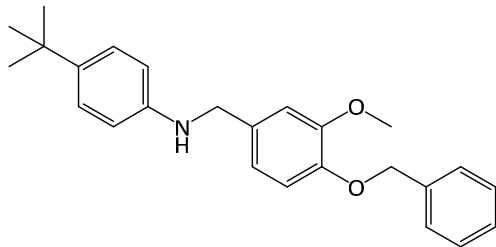
CM242
54 %



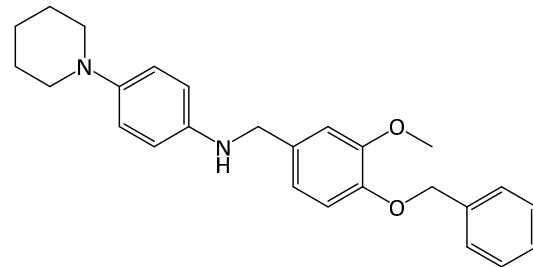
CM244
13 %



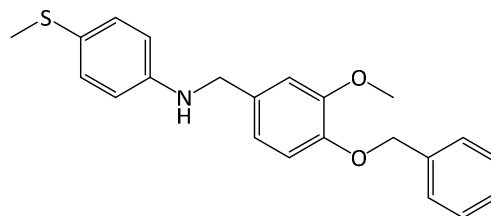
CM261
63 %



CM243
31 %



CM254
33 %



CM241
54 %

Abbildung 64: Synthetisierte A19-Amine

Insgesamt konnten somit 38 verschiedene Derivate von A19 synthetisiert werden.

5.3 Inhibitoren anderer Stoffklassen

Zusätzlich zum CM55- und A19-Projekt wurde noch an Inhibitoren zweier weiterer Stoffklassen gearbeitet. Die Synthese dieser Inhibitoren konnte zum Teil aus Zeitgründen,

zum Teil aus synthesespezifischen Gründen nicht fertiggestellt werden, dennoch sollen die durchgeführten bzw. geplanten Syntheseschritte folgend dargestellt werden.

5.3.1 Inhibitor mit Indol-Grundgerüst

Ein weiterer, potentieller Inhibitor, der Bestandteil der ersten Dockingrunde war, ist der bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit erwähnte Inhibitor „CM100“.

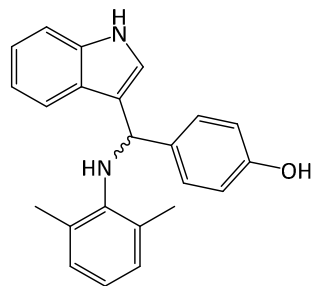
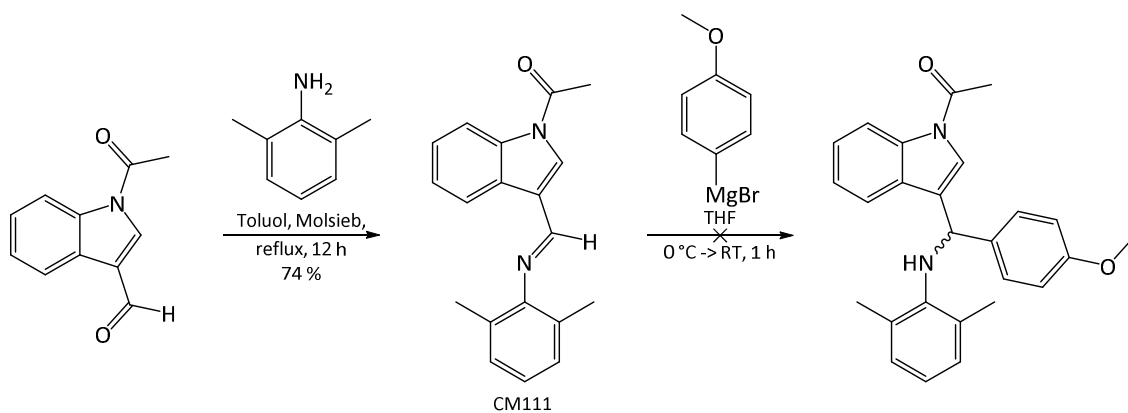


Abbildung 65: Struktur von CM100

Da die Synthese dieses Inhibitors in der Diplomarbeit nicht mehr begonnen wurde, wurde sie in der Doktorarbeit in Angriff genommen. Zwischenzeitlich durch die höhere Priorität des A19-Projekts unterbrochen, wurde die Synthese von CM100 nach Fertigstellung der A19-Derivate fortgesetzt, konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr fertiggestellt werden.

Nach der retrosynthetischen Spaltung des Moleküls wurde zunächst folgendes Syntheschema erarbeitet:



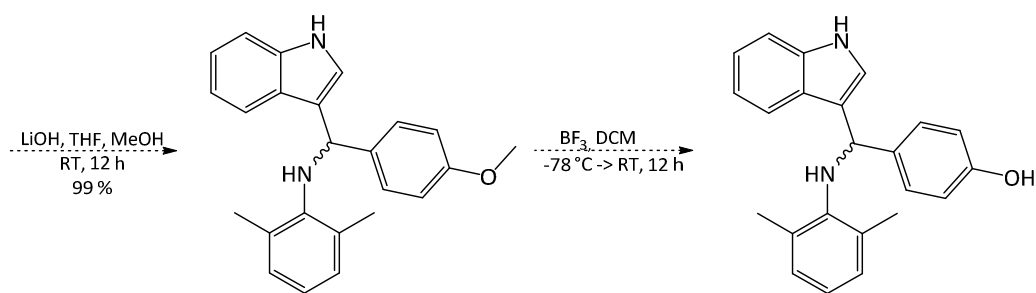
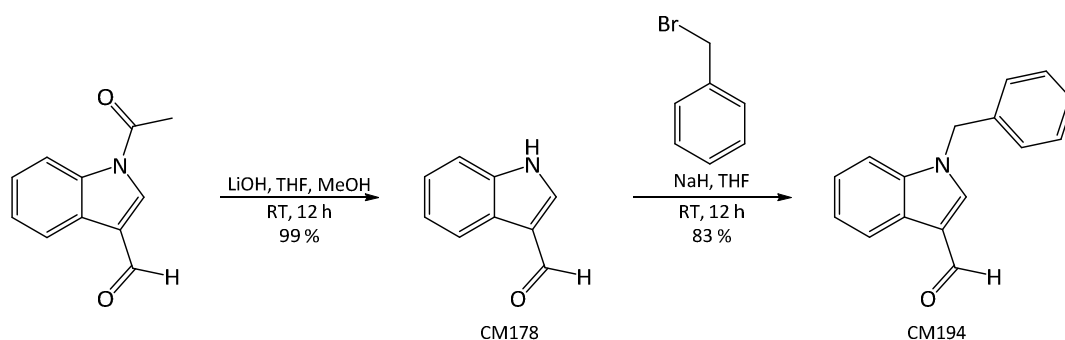


Abbildung 66: Erster Syntheseversuch zu CM100

Ausgehend von acetyl-geschütztem 1*H*-Indol-3-carboxaldehyd reagiert im ersten Reaktionsschritt dessen Aldehydgruppe mit 2,6-Dimethylanilin (2,6-Xylidin) mit einer Ausbeute von 76 % unter Wasserabspaltung zum entsprechenden Imin. Im anschließenden Schritt erfolgt eine Addition an die C-N-Doppelbindung mit dem Grignard-Reagenz (4-Methoxyphenyl)magnesiumbromid. Nach der folgenden Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe im stark alkalischen Milieu mit Hilfe von Lithiumhydroxid erfolgt im letzten Schritt die Etherspaltung der Methoxy- zur Hydroxygruppe mit Bortribromid.

Der so geplante Syntheseweg ließ sich allerdings nur bis zum Imin durchführen, die Addition der Grignard-Verbindung misslang auch nach mehreren Versuchen. Um zu verhindern, dass die Addition auch an der Acetyl-Gruppe stattfindet, konnte die Grignard-Verbindung allerdings nicht im Überschuss eingesetzt und die Reaktion nicht bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden. Aufgrund der stark basischen Eigenschaften der Grignard-Verbindung, die ein *N*-ungeschütztes Indol deprotonieren würde, wodurch der Imin-Kohlenstoff aufgrund einer Elektronenverschiebung nicht mehr als elektrophile Stelle zur Verfügung stünde, konnte allerdings auch auf eine Schutzgruppe nicht verzichtet werden. Deshalb wurde ein weiteres, folgendes Reaktionsschema erarbeitet, das eine andere Schutzgruppe für den Indol-Stickstoff vorsieht.



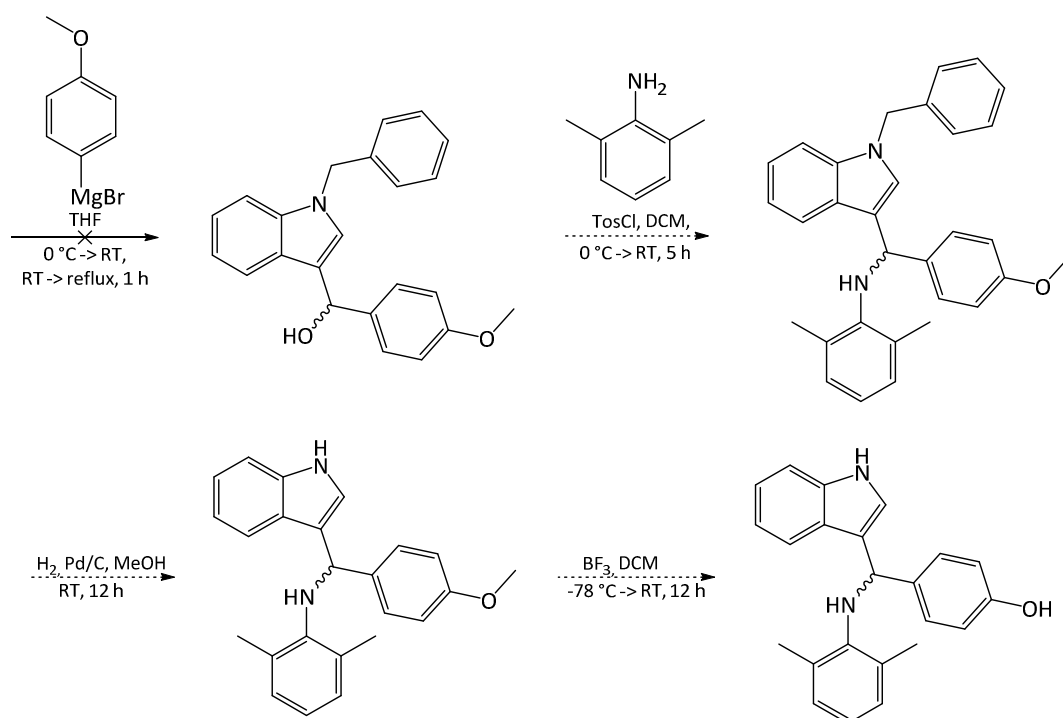


Abbildung 67: Zweiter Syntheseversuch zu CM100

Das Ziel der ersten beiden Reaktionsschritte ist der Austausch der Acetyl- durch eine Benzyl-Schutzgruppe. Dazu wird zunächst die Acetyl-Schutzgruppe gemäß oben genannter Methode mittels Lithiumhydroxid abgespaltet, die Ausbeute dieser fast quantitativ ablaufenden Reaktion betrug 99 %. Anschließend findet die Benzylierung des Stickstoffs statt, die bereits in der Darstellung von CM55 beschrieben wurde. Dank der Benzyl-Schutzgruppe ist es nun möglich, das Grignard-Reagenz im Überschuss einzusetzen sowie die Reaktionstemperatur zu erhöhen, ohne die Gefahr der Bildung von Nebenprodukten zu riskieren. Im nächsten Reaktionsschritt wird die entstandene Hydroxylgruppe mittels *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in eine Abgangsgruppe überführt und durch die Aminogruppe von 2,6-Xylidin (2,6-Dimethylanilin) substituiert. Nach der anschließenden Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator, die die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe zur Folge hat, erfolgt gemäß dem ersten Reaktionsschema die Abspaltung der Ethergruppe.

Leider ließ sich auch dieser Reaktionsweg nicht realisieren. Wie beschrieben, konnten die beiden ersten Reaktionsschritte problemlos durchgeführt werden, jedoch scheiterte erneut die Addition der Grignard-Verbindung.

Es wurde nun ein neues Reaktionsschema entworfen, das keine Verwendung von Grignard-Reagenzien vorsieht.

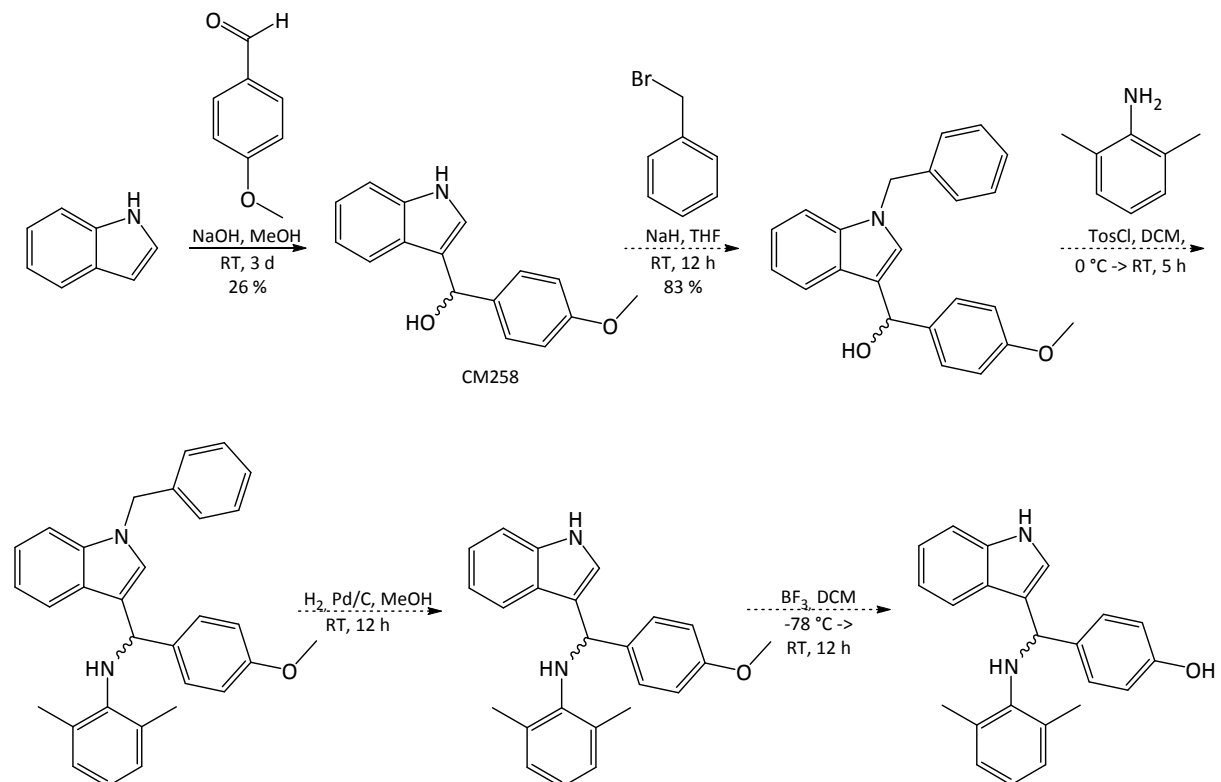
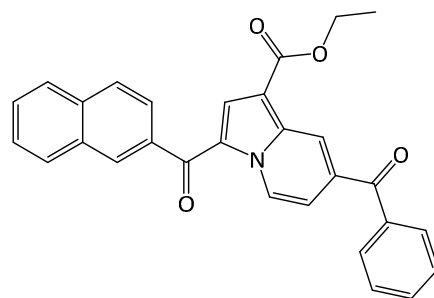


Abbildung 68: Dritter Syntheserversuch zu CM100

Dieses Syntheschema beruht auf der Ausnutzung der äußerst hohen Reaktivität des 3'-Kohlenstoffs des Indolgerüsts in elektrophilen aromatischen Substitutionen. So reagiert dieser Kohlenstoff bereits im stark basischen Milieu mit *p*-Methoxybenzaldehyd (*p*-Anisaldehyd) zum entsprechenden Alkohol. Diese Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 26 % durchgeführt werden. Die weiteren Schritte bis zu CM100 wurden bereits in den vorherigen Synthesemata erklärt, konnten jedoch aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

5.3.2 Auf neuen Dockingstudien basierende Inhibitoren

Im Jahre 2012 wurde ein erster Elongin-C-Inhibitor von T. Zuo et al.^[72] publiziert, dessen Struktur in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

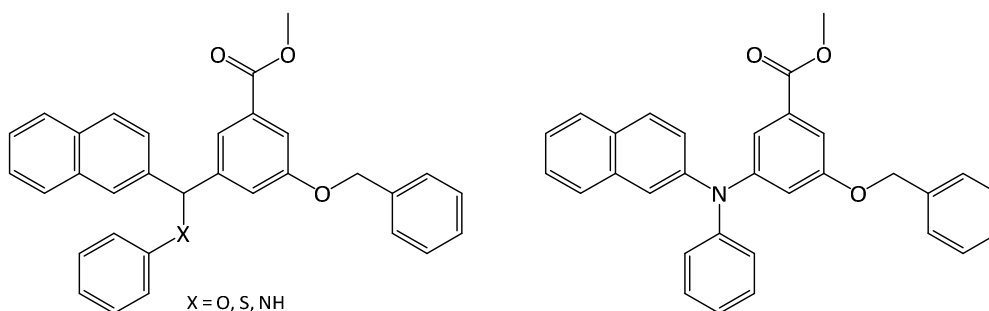


VEC-5

Abbildung 69: Struktur des publizierten Elongin-C-Inhibitors VEC-5

Die in der Publikation beschriebene antiretrovirale Aktivität wurde mittels Infektiositätstests nachgewiesen, die Interaktion mit Elongin-C durch SPR-Messungen. Da die SPR-Messungen jedoch nicht die Bindung an Elongin-C direkt, sondern lediglich eine verminderte Interaktion zwischen Elongin-C und *vif* nachweisen konnten, aus der die Verfasser auf die Bindung der Substanz schließen, kann hier lediglich von einem indirekten Nachweis die Rede sein.

Dennoch wurden auch auf Basis dieser Struktur neue Dockingstudien durchgeführt, die unter anderem die folgenden beiden Molekülstrukturen lieferten:

**Abbildung 70: Molekülstrukturen neuer potentiellen Inhibitoren**

Auch diese beiden Moleküle wurden retrosynthetisch zerlegt und ein Reaktionsweg entworfen. Die folgende Abbildung stellt diesen Reaktionsweg für das erste der beiden Moleküle dar.

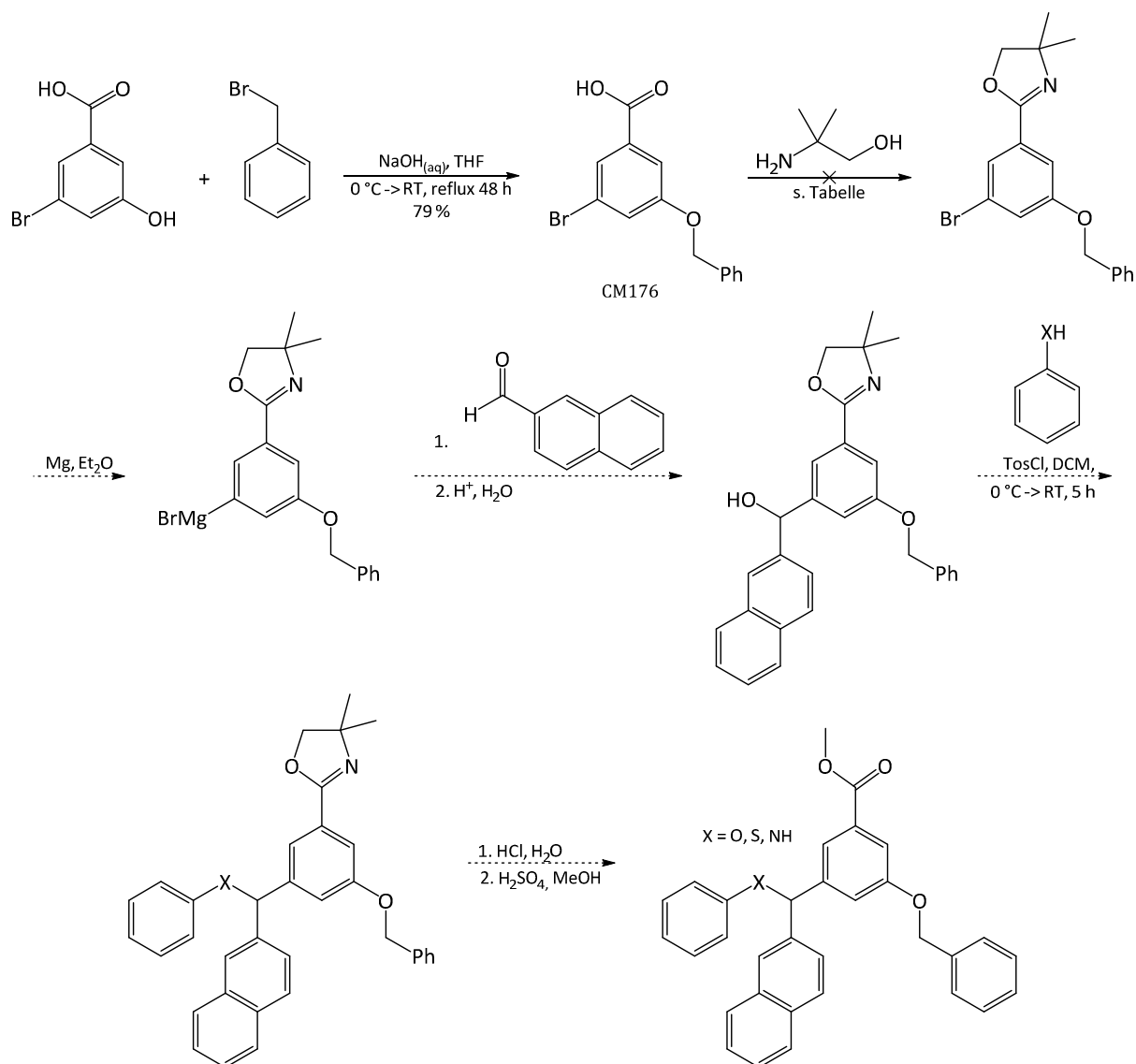


Abbildung 71: Syntheschema des ersten neuen potentiellen Inhibitors

Im ersten Reaktionsschritt findet eine Benzilylierung der phenolischen OH-Gruppe statt, die bereits in Abbildung 53 beschrieben wurde. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 79 %. Der nächste Schritt besteht darin, die Carboxylgruppe zu schützen. Dies ist notwendig, da im folgenden Schritt eine Grignard-Reaktion stattfinden soll. Eine der wenigen Schutzgruppen, die Carboxylgruppen gegen den nucleophilen Angriff von Grignard-Reagenzien schützen, ist die 1,3-Oxazolin-Schutzgruppe. Sie kann normalerweise mit verschiedenen Reagenzien durch die Reaktion der entsprechenden Carbonsäure mit 2-Amino-1-propanol oder einem in 2-Position alkylierten Derivat eingeführt werden, was aber nicht gelang. Folgende Methoden wurden hier getestet:

| Kupplungsreagenz | Reaktionsbedingungen |
|------------------|--|
| Ersorb-4 | Toluol, reflux, 12 h ^[73] |
| Deoxo-Fluor | DCM, DIPEA, 0 °C → RT, 1 h ^[74] |
| - | Mikrowelle, 170 °C, 15 min ^[75] |

Tabelle 4: Übersicht der Methoden

Das erste getestete Reagenz war Ersorb-4, ein Zeolithe-basiertes, schwach saures Adsorbens, das stark hygroskopisch wirkt. In refluxierendem Toluol soll damit eine einfache Umsetzung zu den entsprechenden 1,3-Oxazolinen stattfinden, was aber nicht gelang. Die zweite getestete Methode nutzt Deoxo-Fluor (Bis(2-methoxyethyl)aminoschwefeltrifluorid) als Kupplungsreagenz. Deoxo-Fluor ist extrem hygroskopisch und reagiert mit Wasser unter Bildung von Fluorwasserstoff. Als Lösungsmittel kommt hier Dichlormethan zum Einsatz, als Base DIPEA. Auch hier konnte jedoch das gewünschte Produkt nicht erhalten werden. Die letzte getestete Methode fand ohne Kupplungsreagenz sowie ohne Lösungsmittel in der Mikrowelle statt. Bei 170 °C im *open-vessel*-Modus sollte so das gewünschte Produkt entstehen, leider konnte dieses auch hier nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Methode, die jedoch aus Zeitgründen nicht mehr getestet werden konnte, besteht darin, zuerst mit Hilfe von HBTU durch Amidkupplung das Säureamid herzustellen und anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt unter Verwendung von Triphenylphosphin den Oxazolinring zu schließen.

Der nächste Schritt gemäß Syntheschema bestünde in der Überführung der geschützten Carbonsäure in die entsprechende Grignard-Verbindung mit Hilfe von Magnesium in Diethylether. Anschließend kann damit ein nucleophiler Angriff auf den elektrophilen Kohlenstoff der Aldehydgruppe von 2-Naphtaldehyd durchgeführt werden, wobei der ansprechende Alkohol entsteht. Im nächsten Schritt wird die so generierte OH-Gruppe mittels *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in eine Abgangsgruppe überführt und in einer nucleophilen Substitution durch Anilin (X = NH), Phenol (X = O) oder Thiophenol (X = S) substituiert. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppe mit Salzsäure; im letzten Reaktionsschritt findet schließlich eine Veresterung mit Methanol in Gegenwart von Schwefelsäure als Katalysator zum gewünschten Produkt statt.

Der Reaktionspfad, der für den zweiten potentiellen Inhibitor entworfen wurde, sieht folgendermaßen aus:

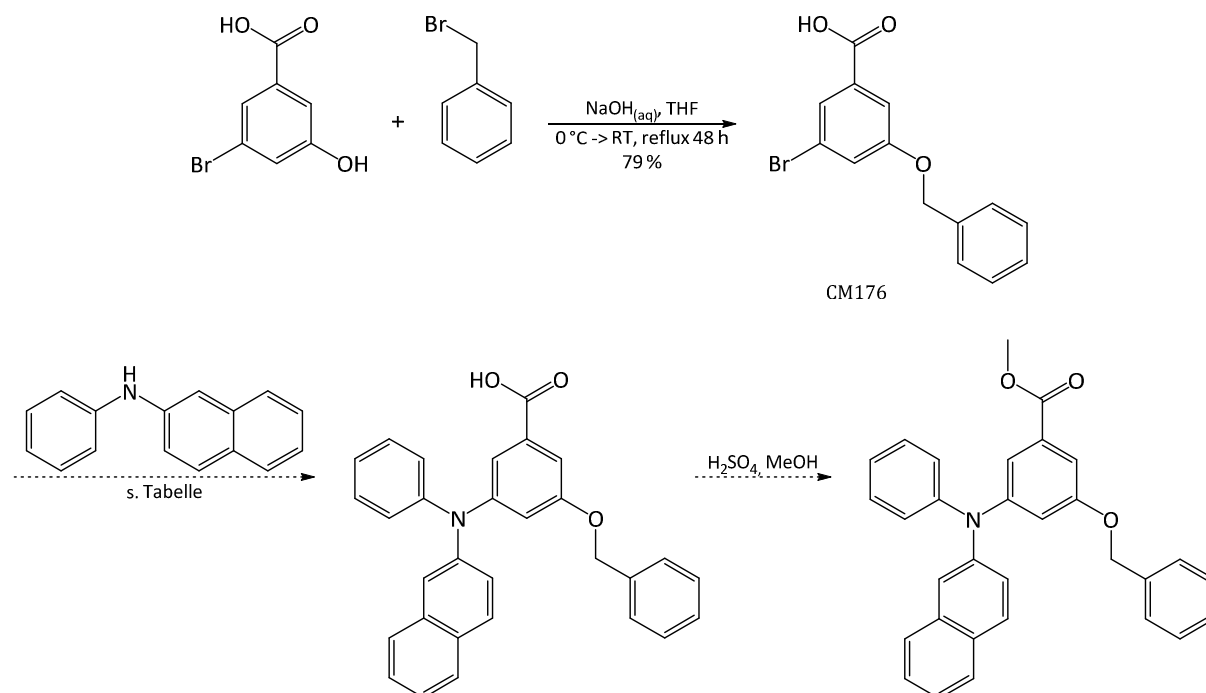


Abbildung 72: Reaktionspfad zum zweiten, neuen potentiellen Inhibitor

Der erste Reaktionsschritt besteht, analog zu Abbildung 53, in der Benzylierung der phenolischen OH-Gruppe. Beim anschließenden Schritt findet eine Kupplung des Bromaromaten mit 2-Naphthyl-benzylamin statt. Diese wurde mit folgenden Methoden getestet:

| Methode | Katalysator | Base | Lösungsmittel | Reaktionsbedingungen |
|-------------------|--|---------------------------------|---------------|-------------------------|
| 1 ^[76] | Cu ₂ O | NaOtBu | NMP | 110 °C, 24 h |
| 2 ^[77] | Fe ₂ O ₃ | NaOtBu | DMSO | 130 °C, 36 h |
| 3 ^[78] | CuI, 1,10-Phenanthrolin | Cs ₂ CO ₃ | DMSO | Mikrowelle, 150 °C, 6 h |
| 4 ^[79] | P(tBu) ₃ , Pd ₂ (dba) ₃ | NaOtBu | Toluol | 100 °C, 7 h |

Tabelle 5: Getestete Kupplungsmethoden

Bei der ersten Methode wird Kupfer(I)oxid als Katalysator verwendet, als starke Base kommt Natrium-*tert*-butylat zum Einsatz. Unter Verwendung des stark polaren, hochsiedenden Lösungsmittels *N*-Methyl-2-pyrrolidon wird das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei 110 °C gerührt. Die zweite Methode ist ähnlich; hier wird jedoch Eisen(III)oxid als Katalysator

verwendet, als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid. Bei der dritten Methode kommt Kupfer(I)iodid im Zusammenspiel mit 1,10-Phenanthrolin als Chelatbildner zum Einsatz, die Base ist Cäsiumcarbonat. Bei allen drei Methoden konnte auch nach mehreren Versuchen keine Kupplung nachgewiesen werden. Die letzte getestete Methode war eine Buchwald-Hartwig-Kupplung. Diese palladiumkatalysierte Kupplungsmethode ermöglicht die Kupplung von Arylhalogeniden mit primären oder sekundären Aminen. Als Pd-Verbindung kam hier Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) zusammen mit Tri-*tert*-Butylphospin zum Einsatz. Die erfolgreiche Kupplung konnte nachgewiesen werden, allerdings erfolgte auch die Abspaltung des Benzylrests an der phenolischen OH-Gruppe. Dies dürfte auf die stark basischen Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein. Die weitere Umsetzung wurde auch hier nicht verfolgt, da es zunächst galt, die A19-Derivate auf hemmende Eigenschaften zu testen.

6 Testergebnisse und Diskussion

Nach den guten Ergebnissen, die die Substanz A19 in den ersten Tests zeigte (siehe Kapitel 3) wurden zunächst auch die von Ferdinand Matz synthetisierten Derivate sowohl dem *293T-vif-Tet-Off/EYFP-A3G-Assay* als auch dem Infektiositätstest unterzogen, deren Ergebnisse mit viel Spannung erwartet wurden. Erstaunlicherweise zeigte keine der getesteten Substanzen eine Wirkung in einem der beiden Testsysteme, und auch die zuvor sehr guten Ergebnisse mit der Leitsubstanz A19 konnten nicht reproduziert werden. Man entschied daher, die Tests an Zellen oder Viren zunächst einzustellen und die Priorität auf Testmethoden zu verlagern, mit denen es möglich ist, die Interaktion der synthetisierten Substanzen mit Elongin–C direkt nachzuweisen. Diese Testmethoden sollen in diesem Kapitel erläutert werden.

Um die Bindung der Substanzen an Elongin–C nachweisen zu können, ist es nötig, das Protein (bzw. den Komplex mit Elongin–B) zu isolieren. Arbeiten hierzu wurden von Ferdinand Matz im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Caroline Kisker am Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt.

Der Proteinkomplex Elongin–B/C wurde in Bakterien der Art *Escherichia coli*, Stamm BL21-DE3, exprimiert, die hierfür mit dem pACYCDUET-EICB-Vektor transfiziert wurden. Die nach der Expression und Aufreinigung durchgeführte SDS-PAGE zeigte mit Banden bei 11 und 14 kDa die erfolgreiche Isolation des Proteinkomplexes.

Mit dem so gewonnen Protein konnten nun Tests durchgeführt werden, die die Interaktion der Substanzen direkt nachweisen können.

6.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie basiert darauf, dass bei chemischen oder biologischen Prozessen Wärme freigesetzt bzw. aufgenommen wird, so auch bei der Bindung eines Liganden an ein Protein. Diese Wärme kann mit Hilfe eines Mikrokalorimeters gemessen

werden. Hierzu wird in der Probenkammer die Proteinlösung vorgelegt, anschließend die Inhibitorlösung eingespritzt und die Temperaturdifferenz gemessen.

Arbeiten nach diesem Messprinzip wurden von Ferdinand Matz mit A19 durchgeführt. In den Versuchen hierzu konnte jedoch ein Bindungsnachweis nicht eindeutig erbracht werden. Da zum einen der Proteinverbrauch bei dieser Testmethode sehr groß und zum anderen die Löslichkeit von A19 in einer wässrigen Lösung von pH = 7 sehr schlecht ist, wurden weitere Versuche nach diesem Verfahren vorerst eingestellt.

6.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

6.2.1 Physikalische Grundlagen und Messverfahren

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung eines Liganden an ein Protein direkt nachzuweisen, bietet die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance, SPR*). Hierbei wird ein aus Glas bestehender und mit Gold bedampfter Biosensorchip mit polarisiertem Licht bestrahlt, das zuvor durch ein Prisma gelenkt wurde. Dieses polarisierte Licht bewirkt beim Auftreffen auf die Goldoberfläche eine Anregung von freien Elektronen zu Plasmaschwingungen, deren Schwingungen sich parallel zur Metalloberfläche ausbreiten. Diese als Oberflächenplasmonen bezeichneten Oberflächenwellen äußern sich im totalreflektierten Licht als Intensitätsminima. Die Winkel des reflektierten Lichts der Intensitätsminima reagieren stark auf eine Veränderung der Metalloberfläche. Diesen Umstand macht man sich zunutze, indem man an die Rückseite eines Goldchips die Target-Moleküle bindet und sie mit einer Lösung des Liganden „spült“. Je größer die Affinität des Liganden, je mehr Moleküle also am Goldchip haften bleiben, desto stärker ändert sich der Winkel der Intensitätsminima des reflektierten Lichts. Dieser kann gemessen und somit eine Aussage über die Affinität des Liganden getroffen werden. Abbildung 73 veranschaulicht die Funktionsweise.

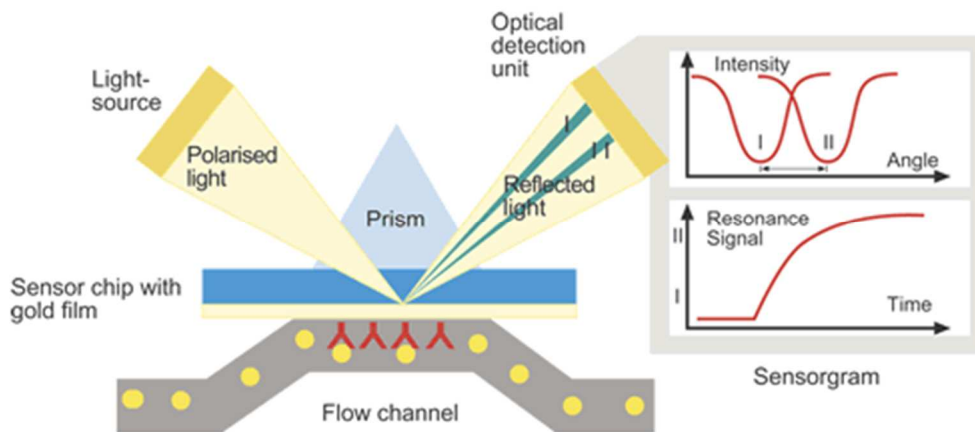


Abbildung 73: Funktionsprinzip der SPR-Messung

Auf der Goldoberfläche befindet sich eine Schicht Dextran, die mit Carboxymethyl-Gruppen versehen ist. Diese Gruppen ragen in das umgebende Medium hinein und werden einem ersten Schritt aktiviert, um kovalente Amidbindungen mit Stickstoffatomen des Proteins auszubilden. Der Goldchip ist somit immobilisiert. Nun wird dieser Goldchip, der sich in einer Fließzelle befindet, mit der Probenlösung umspült. Bindet diese Probensubstanz nun an das Protein, so erfährt der Goldchip eine Massenänderung, welche eine Änderung des Winkels des reflektierten Lichts und somit eine Verschiebung der Intensitätsminima zu Folge hat. Da diese Änderung proportional zur gebundenen Masse ist, kann darauf leicht auf die Bindungsaffinität zurückgeschlossen werden. Über einen Detektor wird am Bildschirm das Messdiagramm ausgegeben.

Um einen Referenzwert zu erhalten, ist die Fließzelle, in der sich der Goldchip befindet, in zwei Unterzellen unterteilt, in denen jeweils eine Hälfte des Chips mit der Probenlösung umspült wird. Da jedoch nur der beiden Hälften immobilisiert wurde, kann über den Differenzwinkel des reflektierten Lichtes auf die Bindungsaffinität der Probensubstanz geschlossen werden.

6.2.2 Messungen

Die SPR-Messungen wurden an einem Biacore™ T200 Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer der Firma *GE Healthcare* durchgeführt.

Nachdem der Goldchip in die Messzelle eingebracht worden war, musste er zunächst mit dem Elongin-B/C-Komplex immobilisiert werden. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf dieser Immobilisierung.

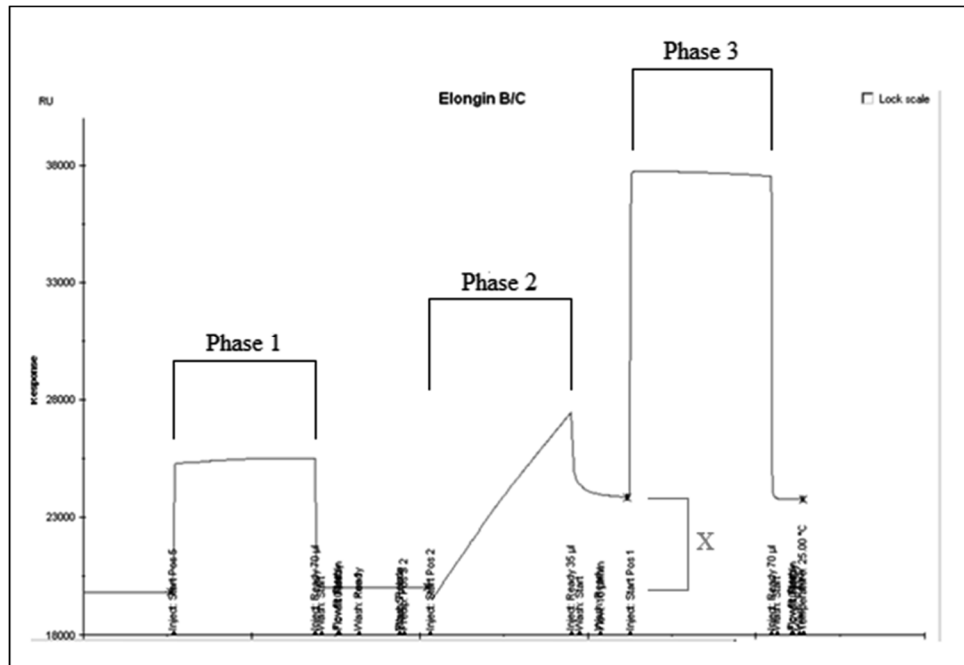


Abbildung 74: Immobilisierung des Goldchips

Die erste Phase besteht darin, die sich auf der Dextranschicht befindenden methylierten Carboxylgruppen zu aktivieren, sie also für die Bindung an das Protein zugänglich zu machen. In der zweiten Phase wird eine der beiden Messzellen mit der Protein-Lösung gespült. Bei diesem Vorgang bilden sich kovalente Amidbindungen zwischen den aktivierten Carboxylgruppen auf dem Goldchip und dem Proteinkomplex aus. Nach diesem Vorgang ist deutlich eine Änderung des Winkels des reflektierten Lichts bzw. ein Massenanstieg erkennbar, was eine erfolgreiche Immobilisierung des Chips beweist. In der dritten Phase werden schließlich sämtliche aktivierten Carboxylgruppen, die keine Amidbindungen zum Proteinkomplex ausbilden konnten, deaktiviert. Dies soll verhindern, dass sie möglicherweise an die zu testenden Liganden binden und somit eine falschpositive Massenzunahme zur Folge haben.

Nach erfolgreicher Immobilisierung konnte nun mit der Testung der Substanzen begonnen werden. Zunächst wurde die Ursubstanz A19 injiziert. In Abbildung 75 ist der Kurvenverlauf dieser Messung dargestellt.

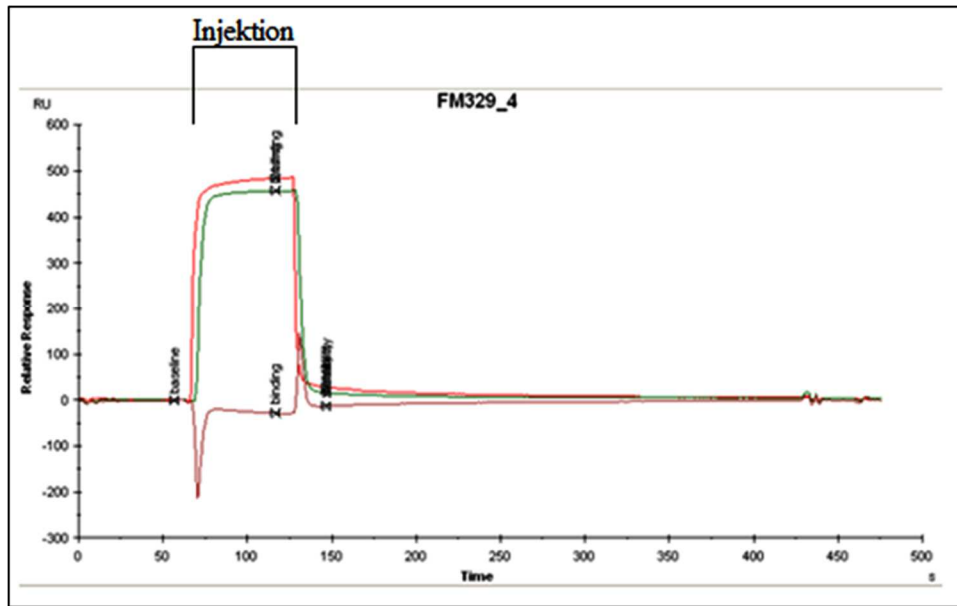


Abbildung 75: Messung von A19

Die rote Linie gibt die Winkel- bzw. Massenänderung des Lichts der Referenzzelle wieder, die grüne Linie die der Messzelle, die braune die Differenz der beiden Zellen. Ein positiver Bindungsnachweis wäre erbracht, wenn nach Injektion in der Messzelle eine größere Massenzunahme beobachtet werden konnte, als in der Referenzzelle. Wie unschwer zu erkennen ist, ist die Winkeländerung, und damit die Massenänderung, jedoch in beiden Zellen nahezu identisch, und auch die braune Linie zeigt eine Massenänderung von praktisch gleich null. Ein Nachweis für die Interaktion zwischen dem Elongin-B/C-Komplex und FM329 ist somit nicht erbracht.

In folgenden Messungen wurden nun noch einige weitere A19-Derivate auf ihre Bindungsaffinität getestet, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung dargestellt sind.

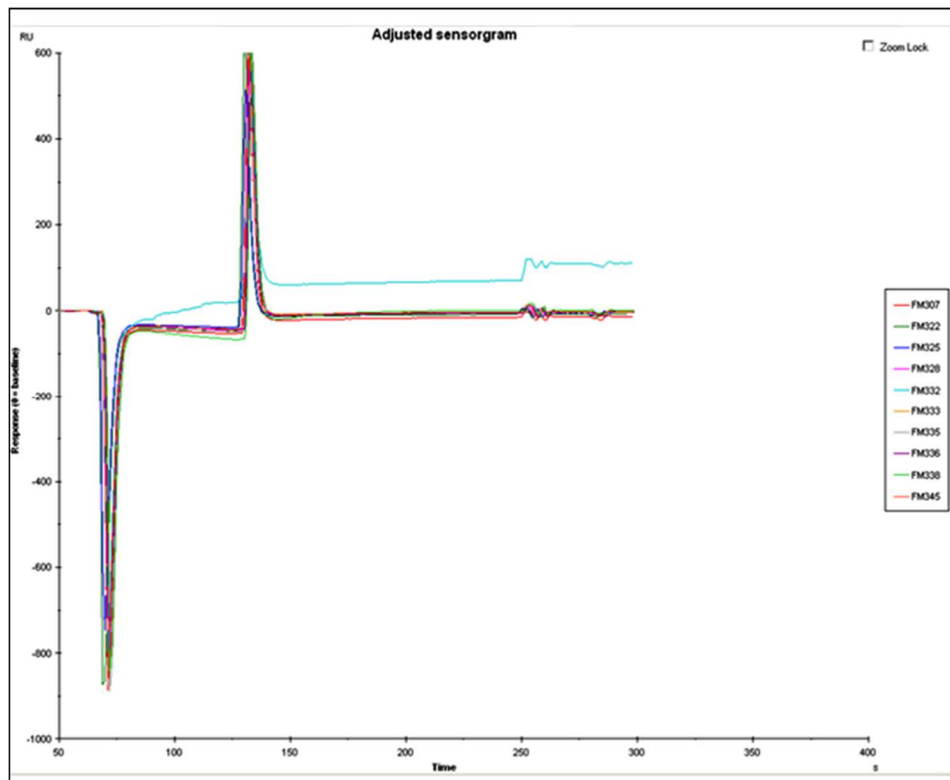


Abbildung 76: Messergebnisse weiterer A19-Derivate

In dieser Abbildung sind jeweils nur die Differenzlinien der einzelnen Messungen abgebildet. Da die hellblaue Linie aus einem Messfehler resultiert, lässt sich auch nach dieser Messung die Schlussfolgerung ziehen, dass für keines der getesteten A19-Derivate ein Nachweis für die Bindung an den Proteinkomplex erbracht werden konnte.

6.3 Mikroskalierte Thermophorese (MST)

6.3.1 Physikalische Grundlagen und Messverfahren

Eine sehr neue Messmethode nutzt eine stoffspezifische Eigenschaft aus, um Veränderungen zu messen: Die mikroskalierte Thermophorese (*Microscale Thermophoresis*, MST) nutzt die physikalische Größe der Thermophorese, auch Thermodiffusion genannt, um das Bindungsverhalten von Liganden an Zielmoleküle zu bestimmen. Die Thermophorese beschreibt die Teilchenbewegung in einem Fluid entlang eines Temperaturgradienten. Sie ist

eine stoffspezifische Größe und von Parametern wie Molekülgröße, Ladung oder Solvationshülle abhängig. Jede Änderung dieser Parameter hat dementsprechend auch eine Veränderung der Thermophorese zur Folge. Diesen Umstand macht man sich bei der MST zunutze, um über die Messung dieser Molekülgröße auf die Bindungsaffinität zu schließen.

Für die Messung wird zunächst das Zielprotein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dieses wird anschließend in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit einer Verdünnungsreihe der zu testenden Substanz vermischt und in eine Glaskapillare aufgezogen. Die Glaskapillaren werden nun mit Hilfe eines Schlittens in das Messgerät gefahren.

Die folgende Abbildung stellt das nun folgende Messverfahren übersichtlich dar.

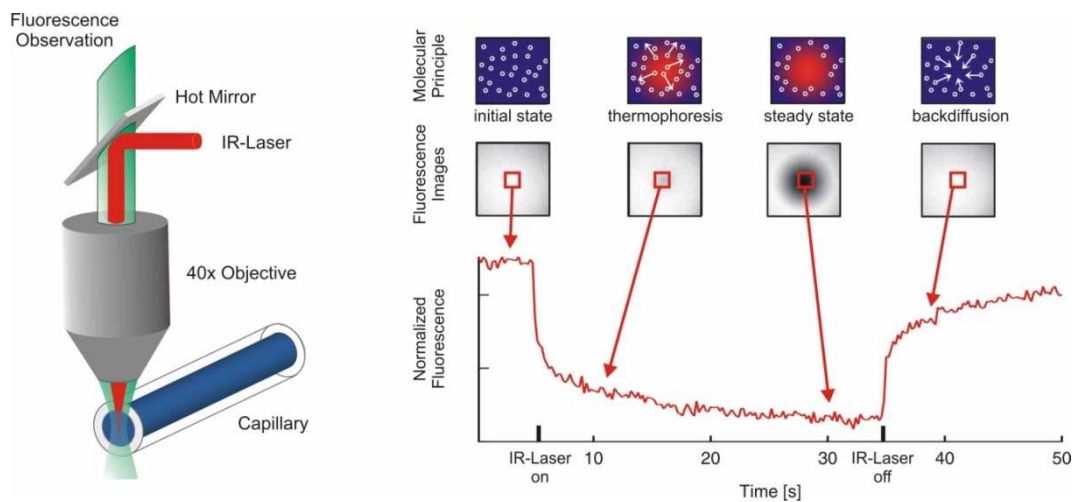


Abbildung 77: Messverfahren der MST

Zunächst wird mit Hilfe eines Infrarotlasers die jeweilige Glaskapillare punktuell erhitzt und somit ein Temperaturgradient erzeugt. Die sich darin befindenden Moleküle, die zuvor gleichmäßig verteilt waren (*initial state* der Abbildung), beginnen nun mit der Bewegung entlang des Temperaturgradienten (*thermophoresis*). Diese Bewegung kann mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors gemessen werden, der die Fluoreszenzintensität an einem bestimmten Punkt und damit die Konzentration des zuvor markierten Zielmoleküls misst. Der zunächst starke Abfall der Fluoreszenzintensität ist auf den Temperatursprung zurückzuführen, anschließend erfolgt die thermophoretische Konzentrationsänderung am Messpunkt. An einem bestimmten Punkt endet diese Molekülbewegung – es stellt sich ein Gleichgewicht ein (*steady state*). Nach der Deaktivierung des IR-Lasers erfolgt zunächst der umgekehrte

Temperatursprung, anschließend beginnt die Rückdiffusion der Moleküle (*backdiffusion*) und es stellt sich der Ausgangszustand ein.

Über Messung der Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen dem Ausgangspunkt (*initial state*, nach ca. 5 s) und dem Punkt, an dem die Thermophorese ein Gleichgewicht erreicht (*steady state*, nach ca. 30 s) lässt sich auf die Anzahl der gebundenen Moleküle und über die Messung der verschiedenen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe auf die Bindungsaffinität zurückschließen.

6.3.2 Kontrollmessung

Für die MST-Messungen kam ein Gerät des Typs Monolith™ NT.115 der Firma *NanoTemper* zum Einsatz.

Zunächst galt es, mittels einer Kontrollmessung die Funktionsweise des Gerätes sowie die der Arbeitsmethoden zu überprüfen. Hierzu ist das Kontroll-Kit *Monolith™ NT.115 Control Kit RED* derselben Firma erhältlich, das mit Hilfe eines standardisierten Verfahrens nach Anleitung genau dieses überprüfen kann.

Das Kontroll-Kit enthält ein bereits Cy5-gelabeltes DNA-Aptamer sowie eine 10 mM-Lösung des dazu spezifischen Liganden AMP. Da das Aptamer bereits gelabelt, also mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, ist die Labeling-Prozedur nicht mehr nötig. Zusätzlich enthält das Kontroll-Kit noch einen passenden Reaktionspuffer. Zunächst wird mit Hilfe des Reaktionspuffers eine 1:2-Verdünnungsreihe des AMP-Liganden hergestellt, sodass dieser am Ende in zwölf verschiedenen Konzentrationen mit jeweils 10 µl Volumen vorliegt. Nach Zugabe von 120 µl des Reaktionspuffers zum Aptamer werden von diesem Gemisch jeweils 10 µl zu den Lösungen der Verdünnungsreihe gegeben. Nach gutem Durchmischen werden die zwölf präparierten Lösungen in Kapillaren gefüllt; der Messvorgang kann nun beginnen. Die Messung geschieht bei 20 % LED- und 16 % MST-Power, die präparierten Lösungen befinden sich in einem Konzentrationsbereich von 5000 – 2.5 µM.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis der Kontrollmessung.

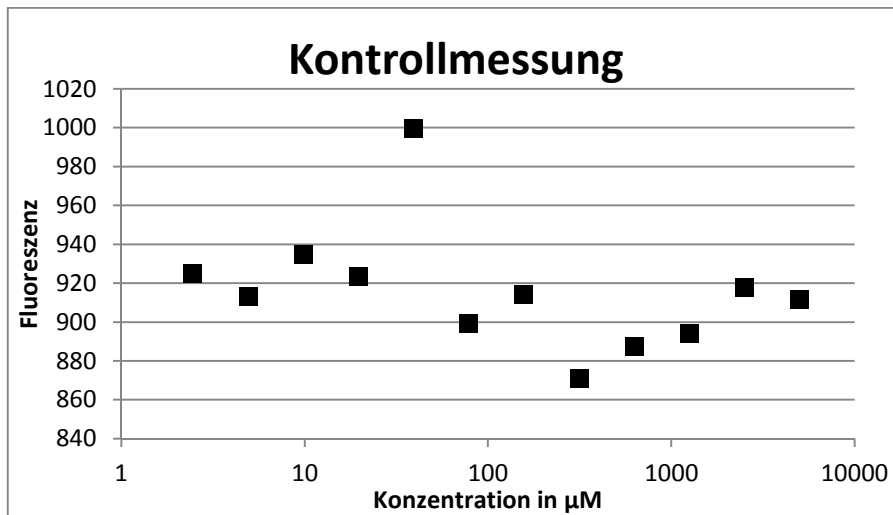


Abbildung 78: Absolute Fluoreszenzintensitäten der Kontrollmessung

Beim Messvorgang wird nicht nur die Thermophorese gemessen, sondern auch die absoluten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben. Dies ist deshalb von Bedeutung, da die Ergebnisse der Thermophoresemessungen nur dann aussagekräftig und miteinander vergleichbar sind, wenn die absoluten Fluoreszenzintensitäten in etwa gleich hoch sind, da zu stark abweichende Fluoreszenzintensitäten falsche Thermophoresewerte verursachen können. Wie man anhand von Abbildung 78 erkennen kann, befinden sich die Fluoreszenzintensitäten der zwölf Proben der Verdünnungsreihe in einem Bereich von etwa 870 bis 1000 – die prozentuale Abweichung ist gering, die Thermophoresewerte können also gut miteinander verglichen werden.

Betrachtet man die Thermophoresekurven der Kontrollmessung, ergibt sich folgendes Bild:

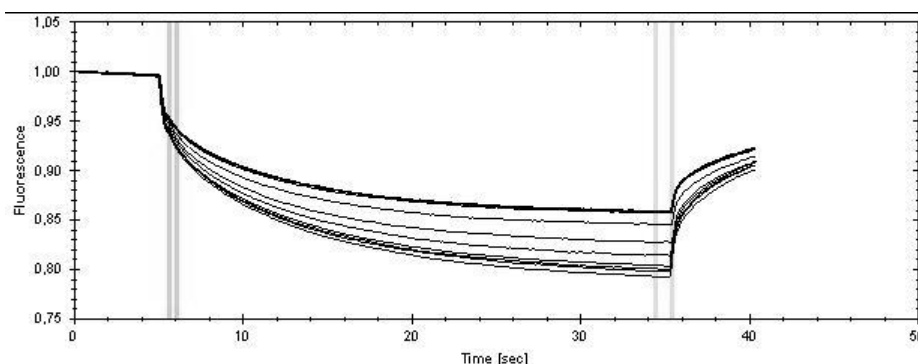


Abbildung 79: Thermophoresekurven der Kontrollmessung

Die Thermophoresekurven zeigen einen nahezu idealen Verlauf. Der Bereich zwischen den linken senkrechten Linien bildet den Startpunkt der thermophoretischen Bewegung nach dem Temperatursprung, der Bereich zwischen den rechten den Gleichgewichtspunkt (*steady state*). Betrachtet man nun die Thermophoresewerte der einzelnen Kurven und trägt sie gegen die Konzentration auf, ergibt sich folgendes Diagramm:

Diese sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

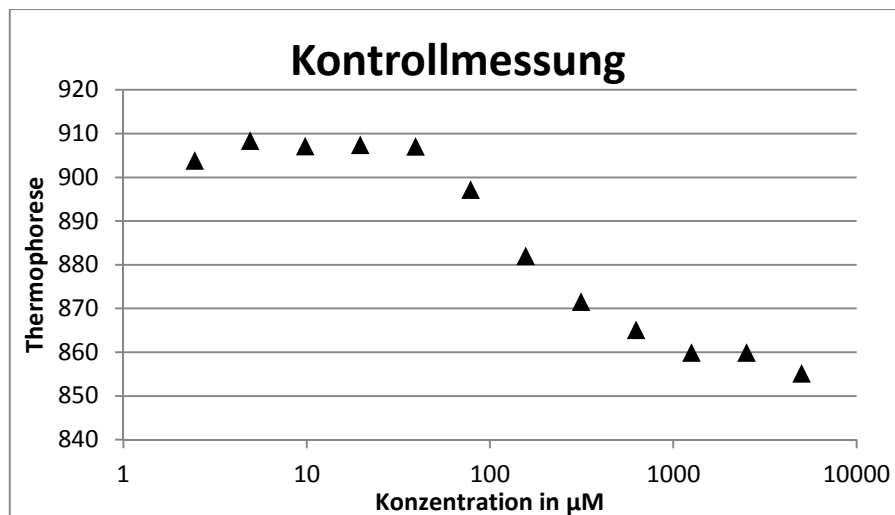


Abbildung 80: Thermophoresewerte der Kontrollmessung

Die Abbildung zeigt einen nahezu idealen sigmoiden Kurvenverlauf, der typisch für eine Bindung des Liganden an das Zielmolekül ist. Am Wendepunkt dieser Kurve lässt sich die Konzentration des IC_{50} -Wertes ablesen. Mit Hilfe der Auswertungssoftware *NT Analysis* lässt sich eine sigmoide Kurve über die Messpunkte legen und der IC_{50} -Wert berechnen. Hier konnte ein Wert von 168 µM bestimmt werden. Dieser weicht zwar vom Sollwert (ca. 100 µM) ab, der nahezu ideale Kurvenverlauf bestätigt allerdings eine erfolgreiche Kontrollmessung, was wiederum die korrekte Funktionsweise des Gerätes und der Arbeitsmethode belegt. Nun konnte mit den Messungen der synthetisierten Substanzen bzw. den Vorbereitungen hierzu begonnen werden.

6.3.3 Protein-Labeling

Bevor mit der Labeling-Prozedur begonnen werden konnte, wurde zunächst ein SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese) des Proteinkomplexes angefertigt, um zu überprüfen, ob dieses noch intakt war. Anschließend wurde es mit demjenigen verglichen, das bei der Proteinaufreinigung angefertigt worden war.

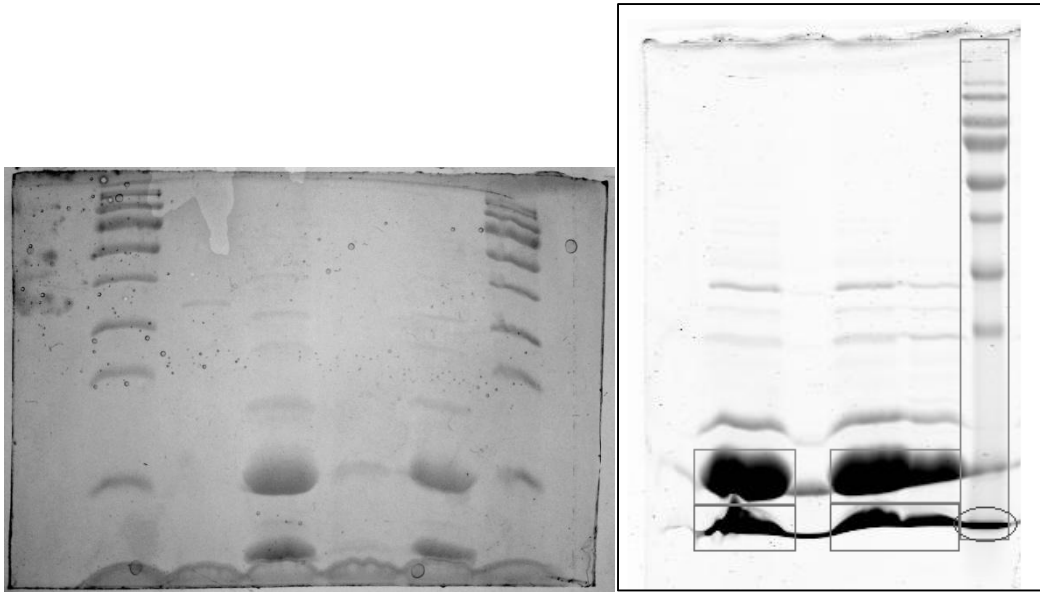


Abbildung 81: Vergleich der beiden SDS-PAGE (links Überprüfung, rechts direkt nach Expression)

Der Vergleich zeigt deutlich, dass der Proteinkomplex noch erhalten ist; auf beiden SDS-PAGE kann man mit Hilfe der Markerbanden zwei starke Banden bei 11 kDa (Elongin-B) und 14 kDa (Elongin-C) sehen, die gemeinsam den ca. 25 kDa schweren Komplex bilden.

Mit der so gewonnenen Gewissheit, dass der Proteinkomplex noch intakt ist, konnte mit der Labeling-Prozedur begonnen werden.

Für das Labeling des Elongin-B/C-Komplexes mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das *Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS* der Firma *NanoTemper* verwendet. Der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS bindet als NHS-Ester an Aminogruppen des Proteinkomplexes (beispielsweise über Seitenketten von Lysin) und ermöglicht somit die Detektion der Fluoreszenzintensität mit einem Maximum im Bereich von 650 – 670 nm

Wellenlänge. Sämtliche Substanzen, die für die Labeling-Prozedur vonnöten sind, sind im Labeling-Kit enthalten.

Der erste Schritt besteht darin, die Pufferlösung des Proteins zu wechseln. Das ist deshalb nötig, da der Puffer, in dem das Protein nach der Aufreinigung vorliegt (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin) mit DTT einen reduzierenden Stoff enthält, der das Labeling negativ beeinflussen könnte. Weiterhin sind Puffersubstanzen mit primären Aminogruppen oder Imidazol ungeeignet, da diese ebenfalls an die NHS-Estergruppen des Farbstoffs binden können. Hierfür enthält das Labeling-Kit einen geeigneten Labeling-Puffer sowie eine Chromatographiesäule, mit der mittels Pufferaustauschchromatographie ein Pufferwechsel durchgeführt werden kann. Da die Ausgangskonzentration der exprimierten Proteinlösung sehr hoch ist (44 mg/ml, entspricht ca. 1.76 mM), wurde diese zunächst auf ca. 100 μ M verdünnt. Nach der Durchführung dieses Arbeitsschrittes liegt das Protein in einer Konzentration von etwa 100 μ M im Labeling-Puffer vor.

Nun kann mit dem eigentlichen Labeling begonnen werden. Dazu wird zunächst der Labeling-Puffer in reinem DMSO gelöst. Die hierzu benötigte Menge ist angegeben, da das Labeling-Kit mit zwei verschiedenen Farbstoffmengen erhältlich ist. Nun wird die Proteinlösung auf etwa 20 bis 30 μ M verdünnt, und die Konzentration der Farbstofflösung anschließend mit reinem DMSO so angepasst, dass sie etwa doppelt bis dreifach so hoch ist wie diejenige der Proteinlösung. Nachdem Protein- und Farbstoff-Lösung in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt wurden, wird die Lösung eine halbe Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Der letzte Schritt der Labeling-Prozedur besteht in der Aufreinigung des gelabelten Proteins, d.h. in der Eliminierung freien, also nicht reagierten Farbstoffs sowie im erneuten Pufferwechsel hin zum endgültigen Testpuffer. Auch dieser Schritt wird mit Hilfe der Säulenchromatographie durchgeführt. Der für diese Versuche gebräuchliche Puffer ist der sogenannte MST-Puffer. Er setzt sich aus einer wässrigen Lösung von 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ sowie 0.05 % Tween-20 (ein Detergens) zusammen. Am Ende dieses chromatographischen Vorgangs erhält man etwa 500 μ l in MST-Puffer gelöstes Elongin-B/C mit einer Konzentration von 10 – 15 μ M.

Vor dem eigentlichen Messvorgang ist es erforderlich, die Fluoreszenzintensität der Lösung des gelabelten Proteins zu bestimmen, da eine zu geringe Intensität zu stark von äußeren Einflüssen, wie beispielsweise dem Hintergrundrauschen, abhängig ist. Dazu werden vier verschieden konzentrierte Proteinlösungen (Mischungsverhältnis 1:3, 1:5, 1:10 und 1:20 mit MST-Puffer) hergestellt, und mit Hilfe der Funktion *Capillary Scan* ihre Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Die optimale Intensität liegt hier im Bereich von etwa 150 – 500; es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Proteinlösung bei den Tests im Volumenverhältnis 1:1 mit der Ligandlösung verdünnt wird und die Fluoreszenzintensität demnach auf etwa 50 % des Ursprungswertes fällt. Folglich ist für die Messungen jene Proteinverdünnung geeignet, die beim *Capillary Scan* eine Intensität im Bereich von 300 – 1000 zeigt.

6.3.4 Kapillartests

Die nächste Aufgabe bestand darin, den am besten geeigneten Kapillartyp herauszufinden. Die Kapillaren sind unbehandelt, hydrophil oder hydrophob beschichtet erhältlich. In Abhängigkeit der hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften des zu testenden Proteins bzw. Enzyms ist einer dieser Kapillartypen der am besten geeignete. Um dies herauszufinden, gibt es zwei Möglichkeiten. Die eine Möglichkeit besteht darin, beim *Capillary Scan*, der die Fluoreszenzintensität der Kapillaren *vor* der eigentlichen Messung bestimmt, die Form der Peaks zu betrachten. Sind diese symmetrisch und nicht „wellig“ oder „zackig“, ist der Kapillartyp gut geeignet, andernfalls ist er ungeeignet. Bei dieser rein visuellen Methode stellten sich die hydrophob beschichteten Kapillaren als Favoriten heraus. Da ungeeignete Kapillartypen zudem dazu neigen, teils sehr unterschiedliche Thermophoreseergebnisse zu liefern, wurde ein darauf basierendes Verfahren angewandt. Hierzu wurde in jeweils 16 Kapillaren der drei Typen die gelabelte Proteinlösung abgefüllt und die Thermophorese gemessen. Die Ergebnisse dieses Tests sind in den folgenden Abbildungen gezeigt.

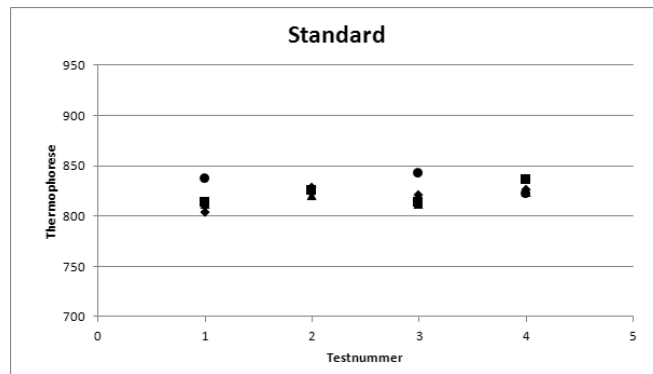


Abbildung 82: Thermophoresemessung der Standardkapillaren

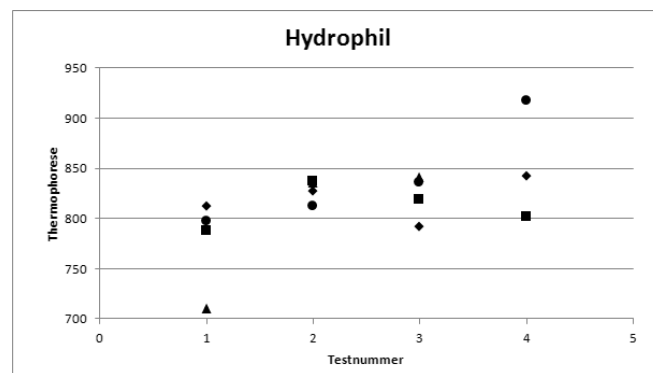


Abbildung 83: Thermophoresemessung der hydrophilen Kapillaren

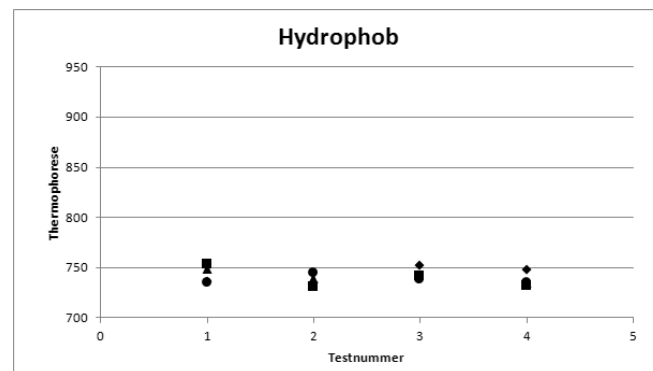


Abbildung 84: Thermophoresemessung der hydrophoben Kapillaren

Wie deutlich zu erkennen ist, sind die hydrophob beschichteten Kapillaren am besten geeignet. Die Thermophoresewerte der hydrophil beschichteten zeigen starke Abweichungen, die schon bei den unbeschichteten Standardkapillaren deutlich abnehmen und bei den hydrophoben schließlich fast verschwinden. Dieses Verhalten deutet auf eine stark hydrophile Oberfläche des Proteinkomplexes hin.

Nach diesen Ergebnissen wurden für sämtliche Tests ausschließlich Kapillaren des Typs *K003 Monolith™ NT.115 Hydrophobic Capillaries* verwendet.

6.3.5 Erstes Screening

Um Protein, Arbeitsmaterialien und Zeit zu sparen, wurde zunächst mit allen zu testenden, potentiellen *vif*-Elongin-C-Interaktions-Inhibitoren ein grobes Screening durchgeführt. Getestet wurden sämtliche Inhibitoren der ersten Generation, die im Rahmen der Diplomarbeit (siehe Abbildung 34) oder von Ferdinand Matz (siehe Abbildung 35) synthetisiert oder kommerziell erworben wurden (siehe Abbildung 36). Hinzu kamen einige von Ferdinand Matz synthetisierte Inhibitoren der zweiten Generation und A19-Amine sowie sämtliche im Rahmen dieser Dissertation synthetisierte A19-Amine (siehe Abbildung 64). Auf die Testung der A19-Amide sowie des publizierten Inhibitors VEC-5 (siehe Abbildung 69) wurde aufgrund ihrer extrem schlechten Löslichkeit in wässriger Lösung und in den meisten organischen Lösungsmitteln verzichtet. Die noch nicht bereits in anderen Abbildungen gezeigten Strukturen der potentiellen Inhibitoren sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

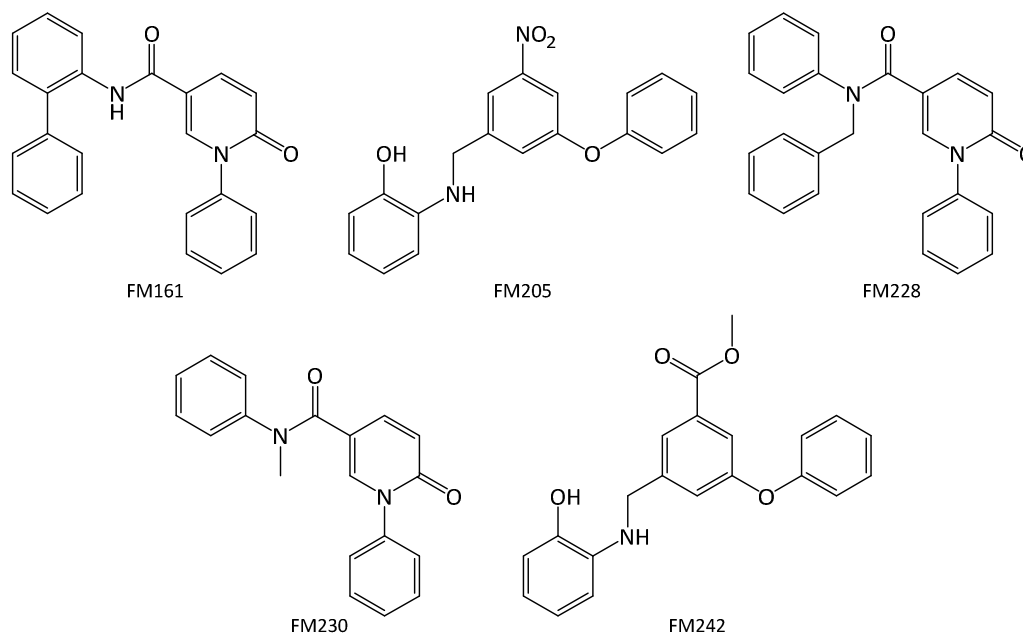
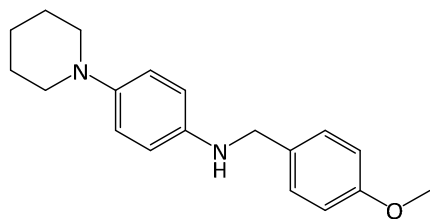
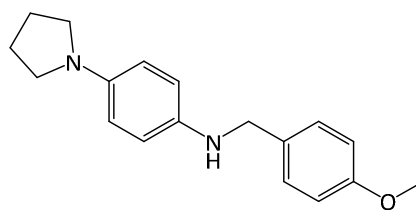


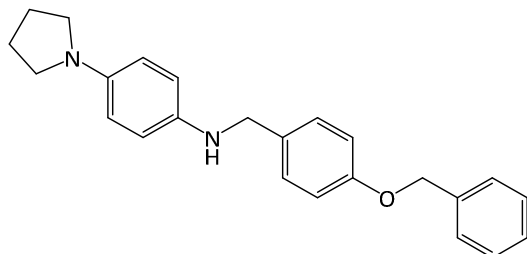
Abbildung 85: Getestete Inhibitoren der zweiten Generation, synthetisiert von Ferdinand Matz



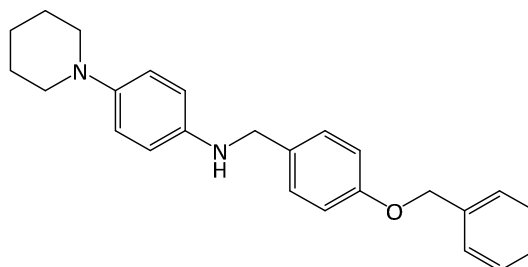
FM306



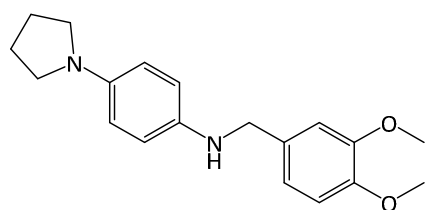
FM307



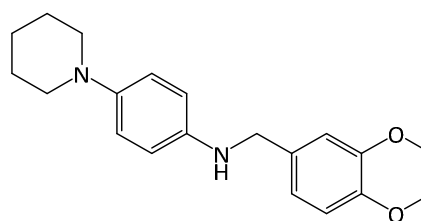
FM332



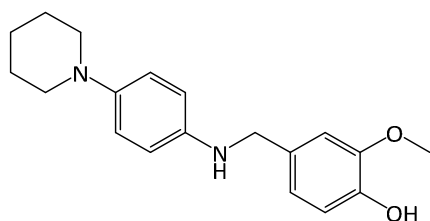
FM333



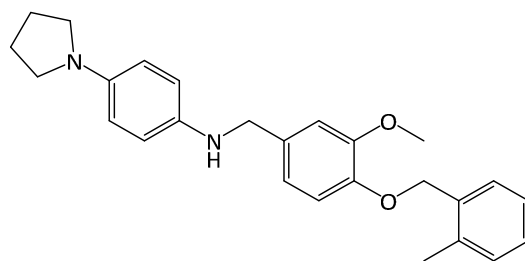
FM335



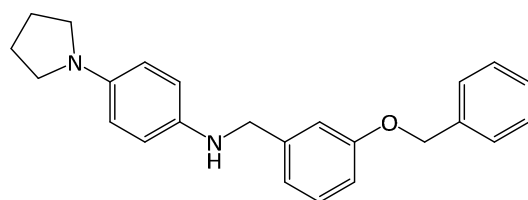
FM336



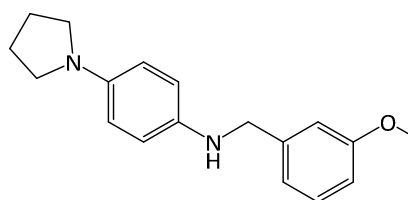
FM345



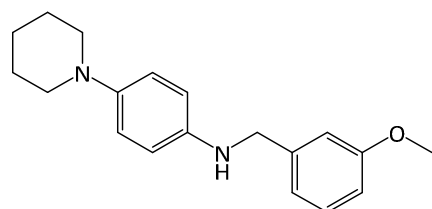
FM357



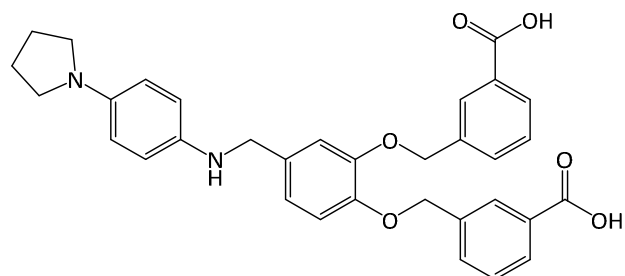
FM390



FM392



FM393



FM412

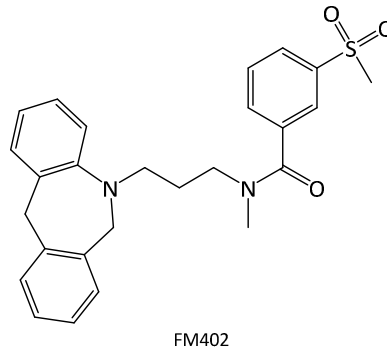


Abbildung 86: A19-Amine, synthetisiert von Ferdinand Matz sowie FM402 (3. Generation)

Für das Screening wurde von jedem potentiellen Inhibitor eine Verdünnungsreihe aus acht Konzentrationen hergestellt. Die höchste Konzentration betrug jeweils 10 mM. Um auch bei nur acht verschiedenen Konzentrationen einen ausreichen großen Messbereich abzudecken, wurde als Verdünnungsfaktor 1:3 gewählt; die niedrigste Messkonzentration betrug somit 4.57 μ M. Diese Ober- und Untergrenze wurde als ausreichend erachtet, da eine Substanz mit einem IC_{50} -Wert >10 mM den Namen „Inhibitor“ nicht verdient und auf der anderen Seite ein IC_{50} -Wert <4.57 μ M nicht zu erwarten war. Von denjenigen Inhibitoren, die in diesem Screening eine mögliche Bindung an den Protein-Komplex zeigten, sollte anschließend eine Konzentrationsreihe, bestehend aus sechzehn 1:2-Verdünnung, zur genaueren Messung angefertigt werden. Die Verdünnungsreihe wurde mit 30 % DMSO und 70 % MST-Puffer angefertigt. Die jeweiligen Substanzen wurden dabei zunächst im DMSO-Anteil gelöst, anschließend wurde der MST-Puffer-Anteil hinzugegeben. Nach fünf Minuten im Ultraschallbad bei 50 °C wurden mögliche ungelöste Bestandteile zwei Minuten bei 1.5 g abzentrifugiert und anschließend die Verdünnungsreihe erstellt. Da der gelabelte Proteinkomplex in reinem MST-Puffer vorliegt, ergibt sich bei einer 1:1-Verdünnung von Substanz- und Proteinlösung eine Zusammensetzung von 15 % DMSO und 85 % MST-Puffer. Diese DMSO-Konzentration sollte aufgrund möglicher denaturierender Effekte auf den Proteinkomplex nicht überschritten werden.

Beim Screening wurden ausschließlich die Ergebnisse der Thermophoresemessungen betrachtet und für eine mögliche Feinmessung in Betracht gezogen. Die LED-Power betrug bei sämtlichen Messungen 40 %, die MST-Power 60 %.

Der besseren Übersicht halber werden nachfolgende nur einige Beispieldiagramme abgebildet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Thermophoresemessungen der Substanzen CM216 und CM261 (A19).

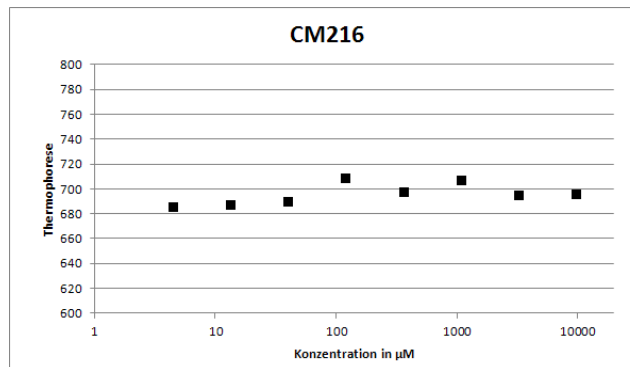


Abbildung 87: Thermophoresemessung von CM216

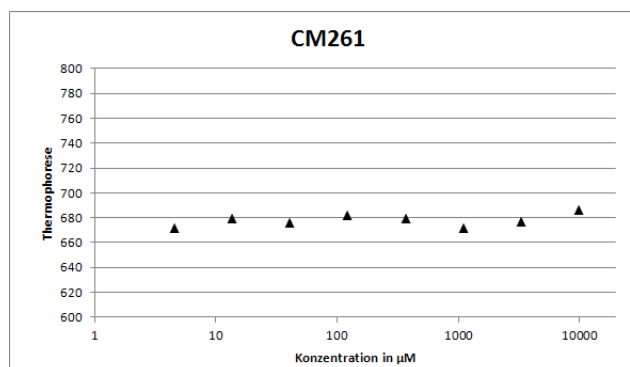


Abbildung 88: Thermophoresemessung von CM261

Die Thermophoresemessungen von CM216 und CM261 liefern ein eindeutiges Bild: Beide Substanzen zeigen keinerlei Bindungsaffinität zum Elongin-B/C-Komplex. Die Thermophorese ist für jede Substanz bei allen Konzentrationen nahezu identisch; die sehr geringen Abweichungen liegen im Toleranzbereich und können beispielsweise auf das Hintergrundrauschen zurückgeführt werden. Das Messergebnis von CM261 (A19) bestätigt das Ergebnis der SPR-Messung: A19 zeigt keinerlei Bindungsaffinität zu Elongin-C!

Die folgenden Abbildungen zeigen die Thermophoresemessungen der Substanzen FM336 und FM392.

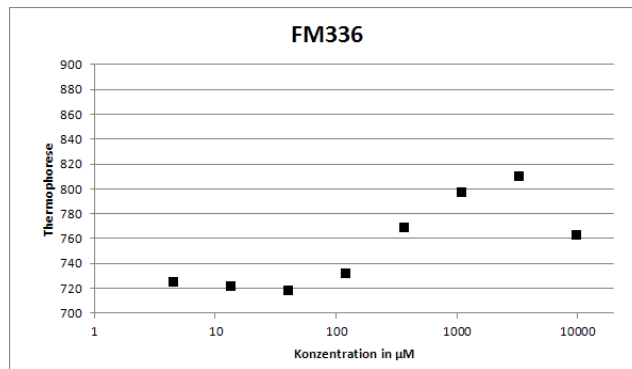


Abbildung 89: Thermophoresemessung von FM336

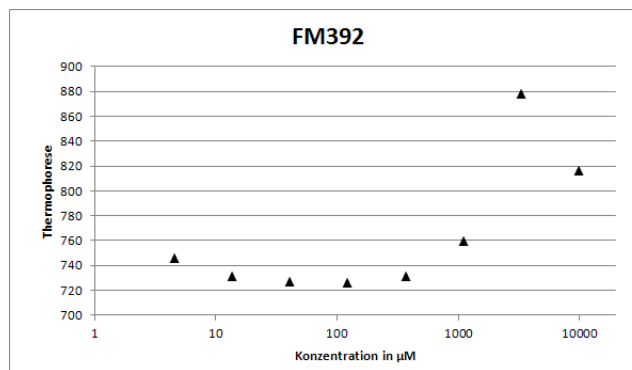


Abbildung 90: Thermophoresemessung von FM392

Bei diesen beiden Substanzen zeigt sich beim Screening ein anderes Bild. FM336 zeigt ab einer Konzentration von etwa 100 μM einen deutlichen Anstieg der Thermophoresekurve, deren Steigung ab etwa 1 mM wieder leicht abnimmt. Der Messpunkt bei 10 mM zeigt eine deutlich niedrige Thermophoresis, dies könnte aber auch auf ein Artefakt bzw. eine Fehlmessung zurückzuführen sein. Da ein sigmoider Kurvenverlauf durchaus denkbar wäre, wurde für FM336 eine genauere Messung mit sechzehn Konzentrationen durchgeführt.

Auch FM392 zeigt einen starken Anstieg der Kurve ab etwa 700 μM . Der Messpunkt bei 10 mM ist auch hier im Vergleich zum vorherigen ungewöhnlich niedrig, trotzdem wurde auch mit FM336 eine genauere Messung durchgeführt.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Screening-Ergebnisse sämtlicher potentieller Inhibitoren sowie die Information darüber, ob eine mögliche Bindung an das Zielprotein vorliegt und damit eine genauere Messung folgen sollte.

| Substanz | Mögliche Bindung | Substanz | Mögliche Bindung |
|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| CM34 | nein | FM149 | ja |
| CM41 | nein | FM161 | nein |
| CM46 | nein | FM166 | ja |
| CM47 | nein | FM169 | nein |
| CM48 | nein | FM173 | nein |
| CM51 | nein | FM175 | ja |
| CM112 | nein | FM180 | nein |
| CM160 | nein | FM205 | ja |
| CM161 | nein | FM228 | nein |
| CM215 | nein | FM230 | nein |
| CM216 | nein | FM242 | ja |
| CM236 | ja | FM306 | ja |
| CM237 | nein | FM307 | ja |
| CM241 | nein | FM332 | nein |
| CM242 | nein | FM333 | ja |
| CM243 | nein | FM335 | ja |
| CM244 | nein | FM336 | ja |
| CM245 | nein | FM345 | nein |
| CM254 | nein | FM357 | ja |
| CM257 | ja | FM390 | ja |
| CM260 | ja | FM392 | ja |
| CM261 | nein | FM393 | ja |
| CM269 | ja | FM402 | ja |
| FM111 | ja | FM412 | ja |
| FM141 | ja | | |

Tabelle 6: Ergebnisse des Screenings

Wie zu erkennen ist, zeigten bereits beim Screening sehr viele Substanzen keinerlei Bindung. Mit den nun folgenden genaueren Messungen sollten diejenigen mit potentieller Bindung nochmals überprüft werden.

6.3.6 Genauere Messungen

Die Substanzen aus Tabelle 6, bei denen eine potentielle Bindung erkennbar war, sollten nun genauer untersucht werden. Wie bereits erwähnt, wurden hierzu von den zu testenden Substanzen Verdünnungsreihen mit jeweils sechzehn 1:2-Verdünnungen im ebenfalls oben erwähnten Lösungsmittelverhältnis hergestellt. Da auch bei diesen Verdünnungsreihen die höchste Konzentration 10 mM betrug, konnte ein Konzentrationsbereich von 10 mM bis 0.31 μM abgedeckt werden. Die Messbedingungen der Feinmessungen waren ebenfalls die gleichen wie beim Screening.

Im Folgenden wird am Beispiel von FM306 ein Messergebnis detailliert erläutert. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Thermophoremessung.

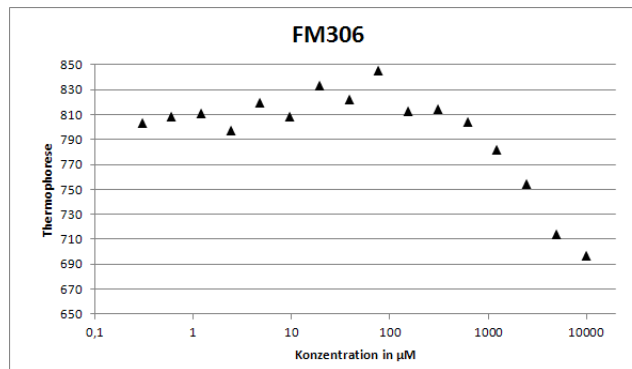


Abbildung 91: Thermophoresemessung von FM306

Ab einer Konzentration von etwa 600 μM ist ein starker Abfall der thermophoretischen Molekülbewegung zu erkennen; die leicht abnehmende Steigung ab 5 mM könnte den Wendepunkt der sigmoiden Kurve darstellen. Um die Verlässlichkeit dieser Messwerte zu überprüfen, wurden anschließend die Messwerte der absoluten Fluoreszenz betrachtet. Diese sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

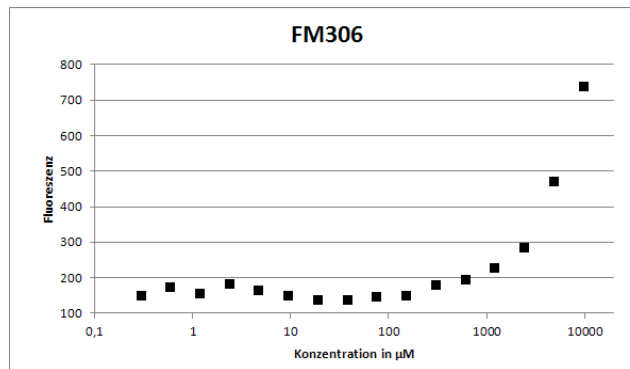


Abbildung 92: Fluoreszenzmessung von FM306

Nach Betrachtung dieser Messergebnisse war die Interpretation der Thermophoresemessung leider nicht mehr haltbar. Der drastische Anstieg der Fluoreszenz ab etwa 625 μM lässt einen Vergleich der Thermophoresewerte ab dieser Konzentration nicht mehr zu, da die Fluoreszenzabweichung ab hier deutlich zu groß ist. Ein solcher Fluoreszenzanstieg ist möglicherweise auf eine Eigenfluoreszenz von FM306 zurückzuführen, deren Ausmaß ab 625 μM das Messergebnis derart verfälscht, dass es nicht mehr interpretierbar ist. Nach Entfernung der Messpunkte ab 625 μM sind die Ergebnisse der Thermophoresemessung vergleichbar, allerdings ergibt sich demnach auch folgendes Bild:

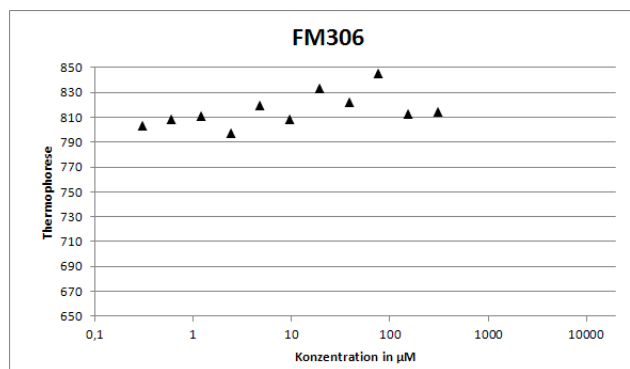


Abbildung 93: Thermophoresemessung von FM306 nach Entfernung der Messpunkte ab 625 μM

Es ist unschwer zu erkennen, dass kein sigmoider Kurvenverlauf vorliegt, die Abweichungen der einzelnen Messpunkte liegen im Toleranzbereich.

Nach dieser Messung lässt sich folgende Aussage treffen: FM306 zeigt keinerlei Affinität zu Elongin-C!

In den folgenden zwei Abbildungen sind die Thermophorese- und Fluoreszenzmessung von CM257 abgebildet.

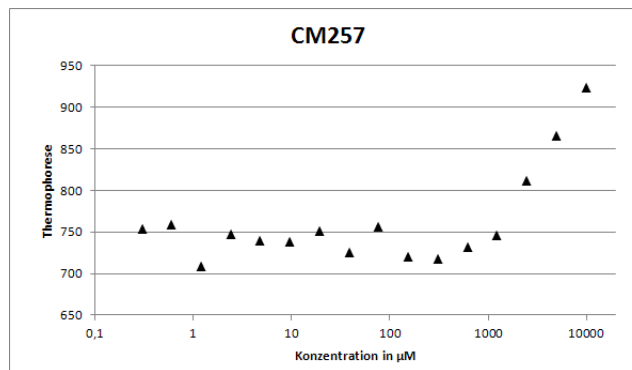


Abbildung 94: Thermophoresemessung von CM257

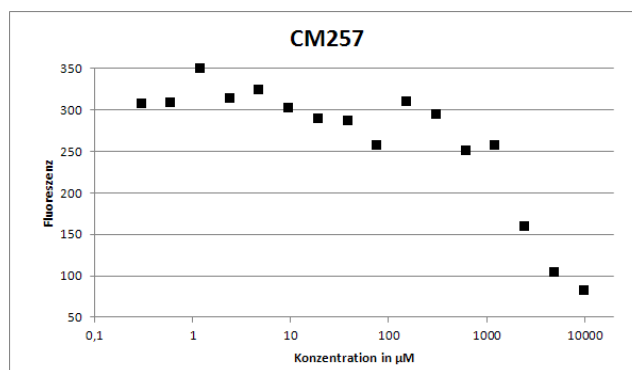


Abbildung 95: Fluoreszenzmessung von CM257

CM257 zeigt ein zu FM306 umgekehrtes Verhalten. Auch hier ist anhand der Thermophoresemessung ein potentieller sigmoider Kurvenverlauf denkbar, allerdings mit positiver Steigung im Wendepunkt. Wie bei FM306 sind jedoch die Messpunkte der höheren Konzentrationen nicht mit den restlichen vergleichbar, was anhand der Fluoreszenzmessung erkennbar ist. Die Fluoreszenzintensitäten der Messpunkte ab 1.25 mM weichen hier derart stark von denjenigen der geringeren Konzentrationen ab, dass sie zur Interpretation nicht mehr in Betracht gezogen werden können. Die hier deutlichen geringeren Intensitäten sind möglicherweise auf eine sehr schlechte Löslichkeit zurückzuführen, die eine Trübung der Lösung und dadurch eine Minderung der Fluoreszenz zur Folge haben. Nach Entfernung dieser Messpunkte lässt sich auch bereits anhand der obigen Kurven erkennen, dass CM257 ebenfalls keinerlei Affinität zu Elongin-C aufweist.

Auch bei allen anderen genaueren Messungen zeigte sich: Entweder war überhaupt kein sigmoider Kurvenverlauf der Thermophoresewerte erkennbar oder aber es zeigten sich im Zusammenhang mit den Fluoreszenzwerten Zustände wie bei FM306 oder CM257. Die Thermophores- und Fluoreszenzdiagramme der restlichen Messungen sind im Anhang zu finden.

Abschließend lässt sich deshalb feststellen, dass keine der getesteten Substanzen eine Bindungsaffinität zu Elongin-C aufweist. Die MST-Messungen bestätigen damit das Ergebnis der bereits mittels SPR getesteten Substanzen.

7 Weitere Tests

7.1 Testung auf die Hemmung des APOBEC3G-Abbaus mittels anderer Testverfahren

In Kapitel 2.4.3 wurden die verschiedenen Möglichkeiten, den Abbau von APOBEC3G zu unterbinden, ausführlich erklärt. Abbildung 96 zeigt erneut eine Übersicht über die Eingreifmöglichkeiten.

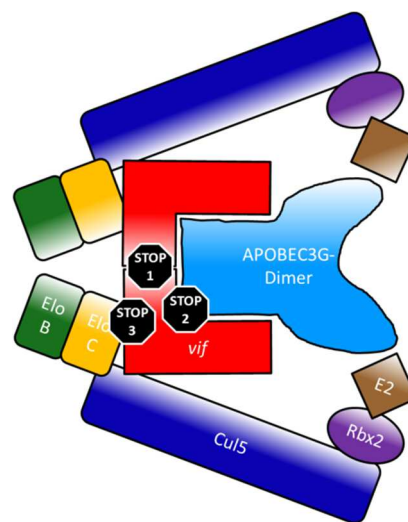


Abbildung 96: Mögliche Angriffspunkte antiretroviral wirkender Substanzen

Im Rahmen einer Kooperation mit OyaGen, Inc., USA, bestand die Möglichkeit, einige synthetisierte Substanzen auf Hemmung des APOBEC3G-Abbaus durch Adressierung einer anderen Position als die der *vif*-Elongin-Interaktion, zu testen. Die hierbei genutzten Testsysteme sollen im Folgenden erläutert werden. Sämtliche Assays wurden von Drs. Ryan P. Bennet und Kimberly M. Prohaska, OyaGen, Inc., durchgeführt.

7.1.1 Testung auf Hemmung der *vif*-Dimerisierung

In diesem Test wurden die Substanzen auf ihre Eigenschaft, die Dimerisierung von *vif* zu unterbinden, untersucht. Hierbei werden zwei verschiedene *vif*-Komplexe in eine 293T-Zelle

transfiziert: *vif-HA-REACH2* und *EGFP-V5-vif*. REACH2 dient in diesem Test als Quencher, das EGFP-Protein, ein grün fluoreszierendes Protein, als Fluorophor. Dimerisiert das *EGFP-V5-vif* mit dem *vif-HA-REACH2*-Komplex, so kommt es zu einem Quenching der EGFP-Fluoreszenz durch FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer). Ein Inhibitor dieser *vif*-Dimerisierung hätte demnach zur Folge, dass das Quenching durch FRET unterbunden und die Fluoreszenz von EGFP demnach erhalten bliebe. Durch Messung der Fluoreszenz-intensität nach Zugabe eines potentiellen *vif*-Dimerisierung-Inhibitors lässt sich somit auf dessen Hemmwirkung zurückschließen.

Die Substanzen wurden mittels HTS (*High Throughput Screening*) in vier verschiedenen Konzentrationen (20, 10, 2 und 1 μM (DMSO)) zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Fluoreszenzintensität gemessen; als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit DMSO, als Positivkontrolle solche, die mit dem Dimerisierungs-Antagonist SMVDA (Struktur nicht publiziert) versetzt worden waren.

7.1.2 Testung auf Hemmung des *vif*-abhängigen APOBEC3G-Abbaus

Wie der in Kapitel 3 beschriebene Test wird auch in diesem der APOBEC3G-Abbau gemessen. In diesem Test wurde das Protein *A3G-mCherry*, ein Komplex von APOBEC3G mit dem rot fluoreszierenden Protein *mCherry*, in *293T*-Zellen exprimiert. In jede dieser Zellen wurden nun 50 ng *vif* transfiziert. Über Messung der *mCherry*-Fluoreszenzintensität nach Zugabe eines Inhibitors lässt sich auf dessen Wirkung, die Interaktion von APOBEC3G und *vif* zu unterbinden, schließen.

Vier Stunden nach der Transfektion wurden die zu untersuchenden Substanzen in vier verschiedenen Konzentrationen (20, 10, 2 und 1 μM (DMSO)) zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit *vif* und DMSO, als Positivkontrolle solche, die zwar mit der zu testenden Substanz, allerdings nicht mit *vif* versetzt worden waren.

7.1.3 Testung auf Hemmung der APOBEC3G- und *vif*-abhängigen Infektiosität

In diesem Test sollten die Substanzen auf Hemmung der Infektiosität von HI-Viren getestet werden. Für diesen Test wurden HEK293T-Zellen sowie Vektoren von Wildtyp- und Pseudotyp-HI-Viren verwendet. Bei den verwendeten Vektoren der Wildtyp-HI-Viren wurde das Gen *nef* gegen das grüne Fluoreszenzprotein *EGFP* ausgetauscht, bei den Vektoren der Pseudotyp-HI-Viren wurde im *vif*-Gen ein Stoppcodon gesetzt, sodass dieses kein *vif* produziert. Letzteres, versetzt mit APOBEC3G, dient als Positivkontrolle (minimale Infektiosität), da APOBEC3G hier seine volle Aktivität entfalten und das Virus an der Replikation hindern kann. In der Abwesenheit von APOBEC3G hingegen weisen sowohl die Wildtyp- als auch die Pseudotyp-HI-Viren eine hohe Infektiosität auf und dienen daher als Negativkontrolle (maximale Infektiosität).

Zur Messung der Infektiosität wurden die HEK293T-Zellen zunächst mit dem jeweiligen viralen Vektor, dem Hüllprotein *VSV-G* sowie dem APOBEC3G-Komplex *V5-A3G* im Verhältnis 1 : 0.5 : 0.08 versetzt. Vier Stunden nach dieser Transfektion wurden die zu untersuchenden Substanzen mit einer Konzentration von 15 μ M (DMSO) zu den Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die viralen Partikel durch Filtration vom Rest getrennt. Anschließend wurden sie zu *TZM-bl* Reporterzellen gegeben, in deren Genom das Enzym Luciferase, an das der HIV-LTR-Promoter gebunden ist, codiert ist. Demzufolge wird Luciferase bei erfolgreicher HIV-Infektion ebenfalls exprimiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe des SteadyGlo™-Reagenzes (Promega), welches durch die Luciferase unter Auftreten von Biolumineszenz oxidiert wird. Durch Messung der Intensität dieser Biolumineszenz 30 Minuten nach Zugabe des Reagenzes kann auf Infektiosität der Viren und damit auf die Hemmwirkung der Substanzen geschlossen werden.

7.1.4 Testergebnisse und Ausblick

Folgende 37 Substanzen wurden in den drei oben erläuterten Testsystemen auf ihre Hemmwirkung untersucht:

- A19-Amide: CM167, CM157, CM209, CM138, CM211, CM142, CM240, CM141, CM253, CM218, CM228, CM210, CM217, CM214, CM221, FM322, FM328, FM382, FM352
- A19-Amine: CM216, CM215, CM161, CM242, FM332, FM336, FM390, FM345
- Sonstige: CM46, CM51, CM47, FM402, FM141, FM149, FM166, FM169, FM175, FM173

Zwei dieser Substanzen wiesen in den Tests eine Aktivität auf: FM390 und CM215. Im *vif*-Dimerisierungs-Assay konnte bei CM215 eine schwach dosisabhängige Wirkung beobachtet werden (Hemmwerte: 21 % (20 μ M), 11 % (10 μ M), 1 % (2 μ M), -6 % (1 μ M)), während diese Eigenschaft bei FM390 nicht nachgewiesen werden konnte. Im Test auf Hemmung des *vif*-abhängigen APOBEC3G-Abbaus hingegen wiesen beide Substanzen eine dosisabhängige Hemmwirkung auf, wie in Abbildung 97 dargestellt ist.

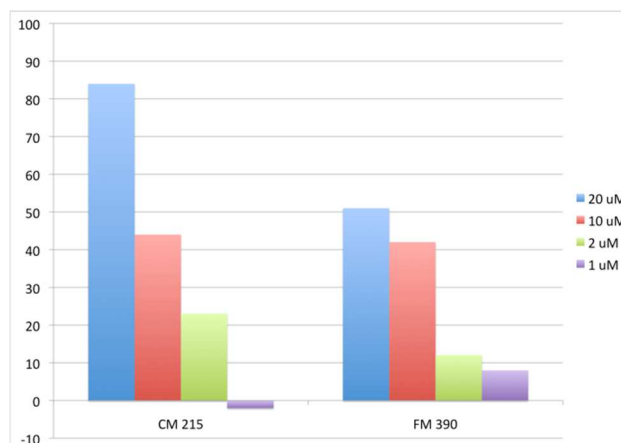


Abbildung 97: Ergebnisse des Tests auf Hemmung des *vif*-abhängigen APOBEC3G-Abbaus

Wie bereits bei der Erläuterung des Testsystems beschrieben, steht eine 100 %ige Fluoreszenzintensität für eine vollständige Hemmung des APOBEC3G-Abbaus. CM215 weist in diesem Test gute Hemmwerte auf. Bei einer Konzentration von 20 μ M beträgt die Fluoreszenzintensität 84 %, bei 10 μ M 44 % und bei 2 μ M 23 %; bei 1 μ M liegt die Intensität unter der ursprünglichen. Auch im Test auf Hemmung der APOBEC3G- und *vif*-abhängigen Infektiosität zeigt CM215 gute Ergebnisse, wie aus dem folgenden Diagramm ersichtlich wird.

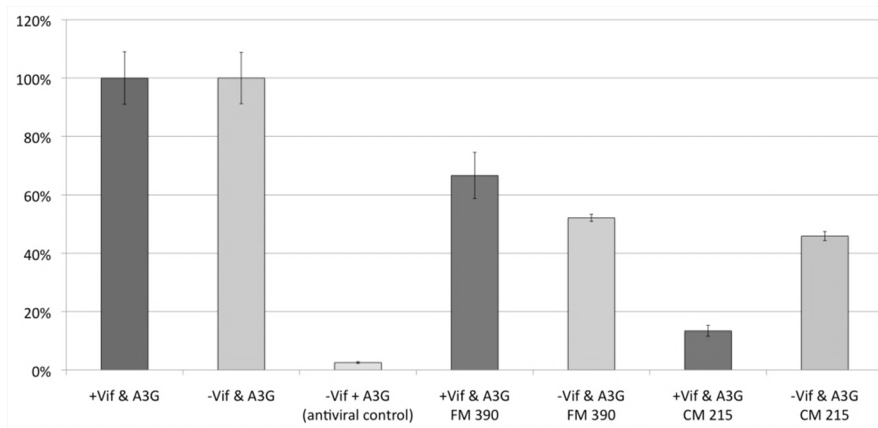


Abbildung 98: Ergebnisse des Tests auf Hemmung der Infektiosität

Sind APOBEC3G und *vif* gemeinsam an- (+) oder abwesend (-), ist die Infektiosität maximal, da sich die HI-Viren so ungehindert vermehren können. Diese beiden Fälle („+Vif & A3G“ bzw. „-Vif & A3G“) dienen, wie bereits erwähnt, als Negativkontrolle (100 % Infektiosität bzw. 0 % Hemmung): Ist nur *vif* abwesend, kann APOBEC3G seine antivirale Wirkung voll entfalten und die Viren an der Replikation hindern, weshalb hier eine minimale Infektiosität vorliegt („-Vif + A3G (antiviral control)“). Um zu überprüfen, ob bei den zu testenden Substanzen unspezifische Hemmung vorliegt, wird die Infektiosität sowohl bei der gemeinsamen An- als auch Abwesenheit von APOBEC3G und *vif* gemessen. Im Falle einer spezifischen Hemmung sollte sie bei der Anwesenheit erniedrigt, bei der Abwesenheit hingegen weiterhin hoch sein. FM390 stellt ein Beispiel für eine unspezifische Hemmung dar: Bei der Anwesenheit von APOBEC3G und *vif* zeigt sich eine Erniedrigung der Infektiosität auf ca. 76 %, allerdings sinkt diese bei der Abwesenheit von APOBEC3G und *vif* auf ca. 52 %. CM215 zeigt nicht nur eine deutlich bessere Hemmung (13 % Infektiosität), sondern auch eine erheblich höhere Spezifität, da die Hemmung bei der Abwesenheit von APOBEC3G und *vif* abnimmt (46 % Infektiosität).

Aufgrund der guten Testergebnisse von CM215 in den Tests auf Hemmung des APOBEC3G-Abbaus sowie der Infektiosität gilt es, sich mit seiner Molekülstruktur auseinanderzusetzen und erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen, um darauf basierend mögliche Weiterentwicklungen zu erarbeiten. Die Molekülstruktur von CM215 ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

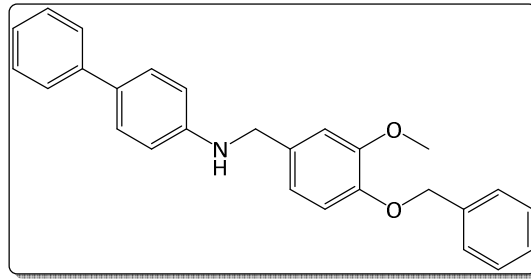


Abbildung 99: Struktur von CM215

Bei dieser Substanz handelt es sich um das biphenyl-substituierte A19-Amin, bei dem der Pyrrolidin-Ring von A19 durch einen weiteren Phenylrest ersetzt wurde. Betrachtet man die Substanzen, die in den Assays getestet wurden, lassen sich erst Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen. Zum einen wird ersichtlich, dass A19-Amide keine Hemmwirkung aufweisen. Nicht nur das entsprechende Amid-Derivat von CM215 (CM209), sondern alle A19-Amide zeigen keinerlei Hemmwirkung. Betrachtet man die getesteten Amine, so lässt sich feststellen, dass der zweite Phenylring von Notwendigkeit ist. Weder das unsubstituierte Anilin-Derivat (CM216) noch das cyclohexyl- (CM161) oder methyl-substituierte Derivat (CM242) zeigen eine Hemmwirkung. FM332, ein A19-Derivat ohne Methoxy-Gruppe zeigt ebenfalls keinerlei Hemmung. Allerdings weist FM390, das sich von ersterem durch eine „Verschiebung“ der Benzoyloxy-Gruppe von *para*- in *meta*-Position unterscheidet, eine erhöhte Hemmwirkung. Die beiden A19-Derivate mit Piperidin-substituierten Anilinrest (FM336 und FM345) zeigen, ebenfalls wie sämtliche Substanzen anderer Stoffklassen, keinerlei Hemmwirkung.

Aus diesen Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich nun Ideen für Weiterentwicklungen ableiten. Von eminenter Wichtigkeit ist die Abwesenheit der Carbonyl-Gruppe, da sämtliche A19-Amide keinerlei Hemmung zeigten, folglich müssen zukünftige Weiterentwicklungen zwingend vom Amin-Typ sein. Da sich auch der Phenyl-substituierte Anilinrest als am potentesten herausgestellt hat, sollte hierauf ein Schwerpunkt gesetzt werden. Künftige Synthesen könnten darauf abzielen, das Biphenyl-System mit verschiedenen Resten und an verschiedenen Positionen zu substituieren. Weiterhin könnte die Auswirkung der „Verschiebung“ der Benzoyloxy-Gruppe von CM215 von *para*- in *meta*-Position untersucht werden.

7.2 Testung auf die Hemmung parasitärer Cystein-Proteasen

Von den synthetisierten Substanzen wurden stichprobenartig vierzehn ausgewählt und in einem im AK routinemäßig durchgeführten Testverfahren auf die Hemmung der Enzyme Cathepsin B, Cathepsin L sowie Rhodesain getestet. Diese drei Enzyme gehören zu den Cystein-Proteasen, also zu eiweißspaltenden Enzymen mit der Aminosäure Cystein im katalytischen Zentrum. Die lysosomalen Endoproteasen Cathepsin B und L haben eine wichtige Aufgabe bei der Verdauung von Zellbestandteilen, ihre Überexpression wird jedoch mit Krebs und Immunerkrankungen in Zusammenhang gebracht, was für diese Fälle die Entwicklung von Hemmstoffen nötig macht. Rhodesain ist ein essentielles Enzym von *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dem Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit.

Sämtliche Tests fanden bei einer Inhibitor-Endkonzentration von 20 µM statt, als Vergleich diente ein Test mit reinem DMSO. Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle dargestellt.

| Substanz | Cathepsin B | Cathepsin L | Rhodesain |
|----------|-------------|-------------|-----------|
| CM167 | 0 | 0 | 0 |
| CM157 | 0 | 0 | 0 |
| CM209 | 0 | 0 | 0 |
| CM138 | 0 | 0 | 0 |
| CM211 | 0 | 0 | 0 |
| CM142 | 0 | 0 | 0 |
| CM240 | 2.0 | 0 | 0 |
| CM218 | 0 | 0 | 0 |
| CM210 | 0 | 0 | 0 |
| CM217 | 5.2 | 0 | 0 |
| CM221 | 0 | 0 | 0 |
| CM216 | 0 | 0 | 0 |
| CM215 | 0 | 0 | 0 |
| CM257 | 6.5 | 0 | 1.7 |

Tabelle 7: Testergebnisse der Routinetests auf Hemmung der Enzyme

Cathepsin B, Cathepsin L und Rhodesain

Der Großteil der Substanzen zeigt bei keinem der getesteten Enzyme eine Hemmwirkung. Lediglich CM240, CM217 und CM257 zeigen bei Cathepsin B eine Hemmung im einstelligen Bereich sowie letztgenannte Substanz eine solche bei Rhodocain – diese Hemmwirkung ist jedoch derart gering, dass eine Verwendung der Strukturen als Basis für Weiterentwicklungen außer Bedeutung ist.

Die Tabellen 8 bis 10 zeigen abschließend die Testbedingungen.

| | |
|---------------------|---|
| Volumina | 180 µL Puffer, 5 µL Enzym, 10 µL DMSO bzw. Inhibitor, 5 µL Substrat |
| Substrat | Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin-HCl (<i>Bachem</i>), [S] = 100 µM / $K_m = 150 \mu\text{M}$ |
| Enzym | Cathepsin B (human liver) (<i>Calbiochem</i>) |
| Pufferlösung | 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Anregungswellenlänge: 380 nm, Detektionswellenlänge: 460 nm |
| Fluorimeter | Infinite F200 Pro (<i>Tecan</i>) |

Tabelle 8: Testbedingungen des Cathepsin B-Assays

| | |
|---------------------|---|
| Volumina | 180 µL Puffer, 5 µL Enzym, 10 µL DMSO bzw. Inhibitor, 5 µL Substrat |
| Substrat | Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin-HCl (<i>Bachem</i>), [S] = 10 µM / $K_m = 826.5 \text{ nM}$ |
| Enzym | Cathepsin L (human liver) (<i>Calbiochem</i>) |
| Pufferlösung | 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Anregungswellenlänge: 380 nm, Detektionswellenlänge: 460 nm |
| Fluorimeter | Infinite F200 Pro (<i>Tecan</i>) |

Tabelle 9: Testbedingungen des Cathepsin L-Assays

| | |
|---------------------|--|
| Volumina | 180 µL Puffer, 5 µL Enzym, 10 µL DMSO bzw. Inhibitor, 5 µL Substrat |
| Substrat | Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin-HCl (<i>Bachem</i>), [S] = 6.25 µM, $K_m = 6.50 \mu\text{M}$ |
| Enzym | Rhodesain-Lyophilisat (1:150-Verdünnung mit Puffer) |
| Pufferlösung | 50 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DTT |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Anregungswellenlänge: 380 nm, Detektionswellenlänge: 460 nm |
| Fluorimeter | Infinite F200 Pro (<i>Tecan</i>) |

Tabelle 10: Testbedingungen des Rhodesain-Assays

7.3 Testung auf Cytotoxizität und antitrypanosomale Aktivität

Im Rahmen der Mitgliedschaft im Sonderforschungsbereich 630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“) war es möglich, die Cytotoxizität sowie die antitrypanosomale, Aktivität einiger synthetisierter Substanzen zu bestimmen. Die Testungen wurden am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Die IC_{50} -Werte der Substanzen wurden *in vitro* mit Hilfe des Blue[®]-Assays ermittelt, welcher auf der zellulären Reduktion des wasserlöslichen, blauen Farbstoffs Alamar Blue (Resazurin) durch $NADH/H^+$ zu dem pinkfarbenen Fluoreszenzfarbstoff Resofurin beruht. Je höher die Cytotoxizität einer zugesetzten Verbindung ist, desto langsamer läuft diese Reduktion ab. Die Messung der Farbentwicklung erfolgt photometrisch. Sämtliche Cytotoxizitätsmessungen wurden an der Maus-Makrophagenzelllinie J774.1 durchgeführt. Die antitrypanosomale Aktivität der Verbindungen wurde an *Trypanosoma brucei brucei* getestet; die photometrischen Messungen erfolgten 48 bzw. 72 Stunden nach Zugabe von Alamar Blue.

Die folgende Tabelle stellt die Testergebnisse übersichtlich dar.

| Substanz | Cytotoxizität | Präzipitation, | <i>T. b. b.</i> 48 h, | STABW, | <i>T. b. b.</i> 72 h | STABW, |
|----------|------------------|----------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | IC ₅₀ | µM | IC ₅₀ , µM | µM | IC ₅₀ , µM | µM |
| CM167 | > 100 | 20 | 13.17 | 1.24 | 21.30 | 2.58 |
| CM209 | > 100 | 100 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM138 | > 100 | 100 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM211 | > 100 | 20 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM142 | 35.8 | 4 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM240 | 9.2 | 100 | 0.94 | 0.42 | 0.96 | 0.01 |
| CM253 | > 100 | 100 | 27.00 | 3.35 | > 40 | n.d. |
| CM218 | > 100 | - | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM228 | 53.2 | 100 | 5.41 | 3.09 | 15.91 | 15.89 |
| CM210 | 32.5 | 100 | 1.45 | 1.44 | 2.85 | 0.77 |
| CM217 | > 100 | 100 | 15.02 | 0.44 | 16.51 | 0.67 |
| CM214 | > 100 | 20 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM221 | > 100 | 4 | > 40 | n.d. | > 40 | n.d. |
| CM216 | > 100 | - | 20.78 | 0.96 | 19.69 | 3.30 |
| CM215 | > 100 | 20 | 15.40 | 1.61 | 17.74 | 0.46 |
| CM161 | > 100 | 100 | 3.36 | 0.76 | 4.29 | 1.56 |
| CM237 | 50 | - | 2.49 | 0.13 | 3.19 | 0.12 |
| CM245 | > 100 | 100 | 3.74 | 0.91 | 3.80 | 0.45 |
| CM242 | > 100 | - | 16.55 | 0.55 | 18.42 | 0.88 |

Tabelle 11: Testergebnisse auf Cytotoxizität und antitrypanosomale Aktivität (*T. b. b.* = *Trypanosoma brucei brucei*, n.d. = not determined)

Die Cytotoxizität der Substanzen wurde bis zu einer Konzentration von 100 µM gemessen, zusätzlich wurde die Präzipitation bis zu dieser Grenze bestimmt. Letztere bezeichnet die Konzentration, ab der die Substanz in der verwendeten Pufferlösung ausfällt. Da nicht komplett gelöste Substanzen keine verlässliche Bestimmung der Cytotoxizität zulassen, sind hier folglich nur solche IC₅₀-Werte von Bedeutung, die unterhalb der Präzipitationskonzentration liegen. Die Substanzen, bei denen dieser Sachverhalt zutrifft, sind CM240, CM228, CM210, CM218, CM216, CM237 und CM242, wobei bei den vier letztgenannten im Messbereich keine Präzipitation auftrat. Die antitrypanosomale Aktivität

der Substanzen wurde bis zu einer Konzentration von 40 μM untersucht. Zunächst sollen hier die A19-Amide betrachtet werden. Sieben Substanzen (CM209, CM138, CM211, CM142, CM218, CM214 und CM221) zeigen im Bereich bis 40 μM keinerlei Hemmwirkung; CM167, CM253 und CM217 weisen mit IC_{50} -Werten von 13.17, 27.00 bzw. 15.02 μM (48 h) Hemmungen im mittleren Bereich auf. Eine starke Hemmung zeigen CM240, CM228 und CM210 (0.94, 5.41 bzw. 1.45 μM (48 h)). Betrachtet man nun die Molekülstrukturen, so erkennt man, dass die drei stark hemmenden A19-Amide eine Gemeinsamkeit aufweisen: Einen Piperazin-Ring in *para*-Stellung zum Anilin-Stickstoff (CM240 unsubstituiert, CM228 boc-substituiert, CM210 methyl-substituiert). Diese Struktureinheit scheint demzufolge maßgeblich für die hohe antitrypanosomale Wirkung verantwortlich zu sein. Die biologische Aktivität dieser drei Substanzen wird durch mehr oder weniger stark ausgeprägte Cytotoxizitätswerte bestätigt (9.2, 53.2 bzw. 32.5 μM); die Selektivitätsindices von 9.8 (CM240), 9.8 (CM228) und 24.3 (CM210) eher gering. Verglichen mit den A19-Amiden weisen die entsprechenden Amine eine höhere antitrypanosomale Wirkung auf. Während CM216, CM215 und CM242 hier mit IC_{50} -Werten von 20.78, 15.40 bzw. 16.55 μM (48 h) Hemmungen im mittleren Bereich aufweisen, zeigen CM161, CM237 und CM245 eine deutlich stärkere Aktivität (3.36, 2.49 bzw. 3.74 μM (48 h)); die Selektivitätsindices der drei letztgenannten Substanzen liegen bei 29.8 (CM161), 20.1 (CM237) bzw. 26.7 und damit über dem Durchschnitt der Amidverbindungen. Eine strukturelle Ähnlichkeit lässt sich hier allerdings erkennen (CM161: cyclohexyl-substituiert, CM245: methoxy-substituiert, CM242: methyl-substituiert; jeweils in *para*-Position zum Anilin-Stickstoff).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zum einen ein Piperazin-Ring in *para*-Stellung zum Anilin-Stickstoff eine hohe allgemeine biologische Aktivität sowie eine hohe antitrypanosomale Wirkung aufweisen. Da die Hemmwerte der A19-Amine im Durchschnitt über denjenigen der entsprechenden Amide liegen, scheint sich auch dieses Strukturmerkmal positiv auf die antitrypanosomale Wirkung auszuwirken. Es bliebe zu überprüfen, wie sich A19-Amine mit Piperazin-Ring in den Tests verhielten, da unter den getesteten Substanzen keine diese beiden Merkmale vereinende dabei war.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die stetige Forschung an neuen, verbesserten Wirkstoffen gegen die Immunschwächekrankheit AIDS bzw. die Infektion mit dem HI-Virus ist aufgrund der weltweit über 34 Millionen infizierten Personen ohne Frage von erheblicher Bedeutung. Mit der HAART-Therapie existiert seit mehreren Jahren eine Möglichkeit, die Ausbreitung des HI-Virus im Körper weitgehend zu unterbinden. Trotz der vielen verschiedenen antiretroviralen Arzneistoffe, die heute auf dem Markt sind, ist das HI-Virus oft in der Lage, aufgrund seiner starken Mutationsrate eine Behandlung zu erschweren oder gar wirkungslos zu machen. Mit dem neuartigen Therapieansatz, der die Aufrechterhaltung des menschlichen antiretroviralen Schutzmechanismus durch Hemmung des APOBEC3G-Abbaus zum Ziel hat, existiert ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung der Infektion. Im Gegensatz zu den HAART-Virustatika, die den Viruseintritt in die Zelle verhindern oder eines seiner essentiellen Enzyme, HIV-Protease, -Integrase oder Reverse Transkriptase blockieren, soll hier das menschliche Immunsystem aufrechterhalten werden, sodass es die Abwehr des Virus selbst übernehmen kann. Dies stellt einen enormen Vorteil gegenüber der HAART dar, da in diesem Falle Mutationen des Virusgenoms zumindest in der Theorie bedeutungslos blieben.

In Kapitel 2.4.3 wurden verschiedene, diesen Therapieansatz unterstützende Angriffspunkte beschrieben. Einer dieser Möglichkeiten besteht darin, die Interaktion zwischen *vif* und Elongin-C mit geeigneten Inhibitoren zu unterbinden. Diesem Ansatz widmete sich die vorliegende Dissertation. Auf Basis der Kristallstruktur von Elongin-C wurden in Vorarbeiten Dockingstudien durchgeführt und potentielle Elongin-C-Antagonisten synthetisiert bzw. kommerziell erworben und anschließend auf die Hemmung des *vif*-abhängigen APOBEC3G-Abbaus getestet. In ersten Tests erwies sich die Substanz A19 (Abb. 100) als sehr wirksam.

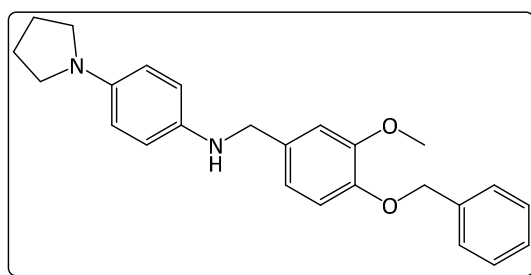


Abbildung 100: Struktur von A19

Im Folgenden wurden weitere Tests durchgeführt, in denen die Substanzen direkt an HIViren auf Hemmung der Virusreplikation getestet wurden. Auch in diesen Tests zeigte A19 hervorragende Ergebnisse; die Hemmung lag bei einer Konzentration von 30 μM bei 100 %. Aufgrund dieser Tatsache wurden mit dieser Substanz weitere, intensive Dockingstudien durchgeführt und in deren Folge eine Vielzahl an Derivaten von A19 synthetisiert.

Da allerdings weder die Hemmung des APOBEC3G-Abbaus noch die der Virusreplikation einen spezifischen Nachweis für die vorhergesagte Interaktion zwischen A19 und der Bindetasche von Elongin-C bzw. für die Hemmung der *vif*-Elongin-C-Interaktion liefert, sollten weitere Tests eben diese Interaktion analysieren. Nach Expression von Elongin-C wurden zunächst Mikrokalorimetrie-Experimente durchgeführt, die zwar Indizien, allerdings keinen eindeutigen Nachweis für eine Wechselwirkung zwischen Protein und Inhibitor lieferten. Da auch die im Weiteren durchgeführten Tests mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie keinen Nachweis für die Bindung liefern konnten, wurde eine weitere Testmethode, basierend auf der mikroskalierten Thermophorese (MST, Nanotemper) etabliert. Jedoch konnte auch mit diesen Assays eine Interaktion zwischen den potentiellen Hemmstoffen und dem Protein Elongin-C nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da für die *vif*-Elongin-C-Interaktion keine Positivkontrolle existiert.

Auch wenn durch die Tests, die die Bindung zwischen A19 und Elongin-C spezifisch nachweisen sollten, ein eindeutig positiver Nachweis nicht erbracht werden konnte, könnte die Tatsache, dass A19 in den Tests auf Hemmung des APOBEC3G-Abbaus und denjenigen auf Hemmung der Virusreplikation hervorragende Ergebnisse lieferte, dafür sprechen, dass die Substanz an einer anderen Stelle im Abbau von APOBEC3G eingreift; die hier möglichen Angriffspunkte wurden in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Im Rahmen einer Kooperation mit OyaGen, Inc., USA, wurden hierzu bereits erste Testungen durchgeführt (Kapitel 7.2). In diesen erwies sich die Substanz CM215 (Abb. 101) als sehr vielversprechend.

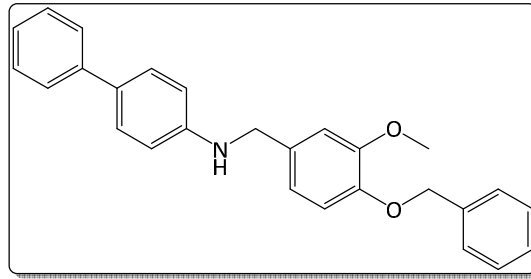


Abbildung 101: Struktur von CM215

CM215 zeigt in den Tests eine hohe Hemmung des *vif*-abhängigen APOBEC3G-Abbaus sowie der APOBEC3G- und *vif*-abhängigen Infektiosität der HI-Viren. Mit Hilfe der Testergebnisse konnten hier erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden. Auch wenn der genaue Wirkort von CM215 in weiteren Tests erst noch ermittelt werden muss, stellt diese Molekülstruktur aufgrund der bisherigen Testergebnisse bereits eine vielversprechende Basis für weitere Derivatisierungen dar. Nach Identifizierung der Bindestelle könnte die Verbindung durch intensive Docking-Berechnungen optimiert werden.

Die Theorie, dass die Replikation des HI-Virus durch Hemmung des APOBEC3G-Abbaus unterbunden werden kann, eröffnet ein komplett neues Gebiet im Bereich der Forschung an Wirkstoffen gegen die Immunschwächekrankheit AIDS. Die proteasomale Degradation von APOBEC3G kann an verschiedenen Angriffspunkten unterbunden werden. Die vorliegende Dissertation widmete sich der Suche nach Inhibitoren, die in diesem Abbauprozess an der Interaktion des viralen Proteins *vif* mit Elongin-C eingreifen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass Inhibitoren dieser Interaktion möglicherweise schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen könnten, denn durch die Blockade der SOCS-Box des Elongin-B/C-Komplexes wird nicht nur die Bindung von *vif* verhindert, sondern auch von anderen Proteinen, die eine SOCS-Box aufweisen. Diese wurden in Kapitel 2.4.2 beschrieben – es sind die SOCS-Proteine und das VHL-Protein. Erstere haben die Aufgabe, als negative Regulatoren des JAK-STAT-Signaltransduktionsweg die Januskinase mittels Initiation der Ubiquitylierung dem proteasomalen Abbau zuzuführen; das VHL-Protein ist für Analoges beim Transkriptionsfaktor HIF1a zuständig. Eine Blockade der SOCS-Box von Elongin-C hätte somit unter Umständen gravierende Folgen, denn dadurch wäre die Regulation des JAK-STAT-Signaltransduktionswegs durch die SOCS-Proteine und somit die Steuerung von Zellwachstum und -differenzierung unterbrochen, was zur Bildung von Tumoren führen

könnte. Ein ähnliches Bild ergibt sich in Bezug auf das VHL-Protein. Ist seine Bindung an Elongin–C blockiert, wäre seine Wirkung als Tumorsuppressor nicht mehr möglich. Die Folgen wären jene Symptome, die auch das Von Hippel-Lindau-Syndrom aufweist: Aufgrund der nicht mehr möglichen Regulation der HIF1a-Aktivität könnte es zur verstärkten Angiogenese und dadurch zur Bildung stark durchbluteter Tumore wie Hämangiomen und Hämangioblastomen kommen.

Sollte in weiteren Arbeiten ein eindeutig positiver Nachweis für A19 oder seine Derivate erbracht werden können, wäre es notwendig, den Einfluss solcher *vif*-Elongin–C-Inhibitoren hinsichtlich dieser Effekte zu untersuchen.

9 Summary

Because there are more than 34 millions of people infected with the HI-virus, the continuous research on new improved drugs against both the AIDS disease and the infection with the virus is of extreme importance. Although it is largely possible to inhibit the virus from reproducing by many different antiviral drugs within the HAART therapy, the virus is often complicating the therapy or making it inefficient because of its high mutation rate. The novel therapy approach described in this thesis is an attempt to keep the human anti-viral immune system active by preventing the degradation of the human protein APOBEC3G. Instead of hindering the virus from entering the cell or blocking its essential enzymes with HAART antiviral drugs, the human immune system should be kept capable of controlling the infection by itself which would be highly advantageous because mutations of the viral genome would become – at least in theory – irrelevant.

In chapter 2.4.3, several targets within the HI-virus supporting this therapy approach have been described. One possibility is to inhibit the interaction of *vif* and Elongin–C with suitable inhibitors which is the central topic of the PhD thesis presented here. Based on the crystal structure of Elongin–C, docking studies were conducted and potential Elongin–C-antagonists were synthesized or purchased and tested for their inhibition of the *vif*-dependent degradation of APOBEC3G. In the first assays, the substance A19 (figure 102) turned out to be very active.

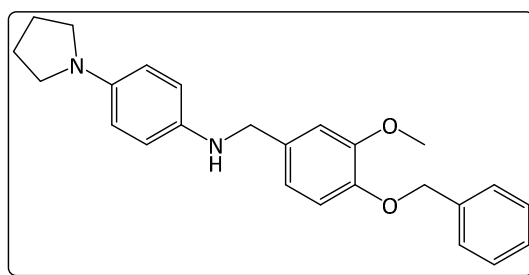


Figure 102: structure of A19

In the following, the substances were tested for their inhibition of viral replication. In these tests, A19 also showed excellent results with an inhibition of virus replication of 100% at

30 μ M. Thus, more intensive docking studies were performed and based on these results many derivatives were synthesized.

Since both assays, determination of the *vif*-dependent degradation of APOBEC3G and determination of viral replication, do not prove the inhibition of the interaction between *vif* and Elongin-C, occurrence direct testing system had to be established. After expression of Elongin-C, first experiments based on ITC and SPR delivered some indication - but no conclusive evidence - for an interaction between protein (Elongin-C) and inhibitor. Thus, a new assay based on microscale thermophoresis (MST) was established. Unfortunately, the results of these tests did also not provide any evidence for an interaction between the potential inhibitors and Elongin-C. However, since, there is no explicit positive control for this interaction the results should be treated with caution.

In ongoing assays which are performed in cooperation with OyaGen Inc., USA, some of the synthesized compounds were tested for inhibition of other interactions of the APOBEC3G-Elongin-C-*vif* complex. In these tests, CM 215 (figure 103) showed very promising results.

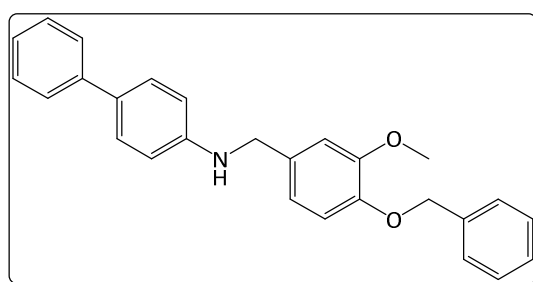


Figure 103: structure of CM215

CM215 shows a high inhibition of both, the *vif*-dependent degradation of APOBEC3G and the APOBEC3G- and *vif*-dependent infectivity. Based on these results first structure activity-relationships could be drawn.

The theory of preventing the replication of the HI-virus by inhibition of degradation of APOBEC3G establishes a completely new area within the research of drugs against AIDS. The degradation of APOBEC3G can be prevented by attacking different targets within the APOBEC3G complex. The aim of the present PhD thesis was to develop inhibitors of the

interaction between the viral protein *vif* and Elongin–C. Certainly it has to be kept in mind that inhibiting this interaction could cause some severe secondary effects:

By blocking the SOCS-box of the Elongin–B/C complex, not only the binding of *vif* but also the binding of other proteins described in chapter 2.4.2 is prevented – namely, the SOCS-proteins and the VHL-protein. While the former have the function to negatively regulate the JAK-STAT signaling pathway by marking the Janus kinase for proteasomal degradation, the latter fulfills an analogous function for the transcription factor HIF1a. Under these circumstances, blocking of the SOCS-box of Elongin–C might have serious consequences. The impossible regulation of the JAK-STAT signaling pathway by the SOCS-proteins could interrupt the regulation of cell growth and differentiation, therefore culminating in the formation of tumors. A similar situation could occur in case of the VHL-protein: inhibiting this tumor suppressor, the typical symptoms of the Von Hippel-Lindau-Syndrome like hemangiomae or hemangioblastomae could occur. If in future work A19 or its derivatives will be identified as inhibitors of the interaction between *vif* and Elongin–C, such effects should also be tested for.

Experimentaltteil

10 Allgemeine Vorbemerkungen

10.1 Verwendete Messgeräte

Schmelzpunktmessungen (Smp.)

Die Schmelzpunkte wurden an einem Schmelzpunktgerät Melting Point SMP 10 der Firma *BIBBY SCIENTIFIC LIMITED STONE* in einer offenen Glaskapillare gemessen. Die so bestimmten Werte sind nicht korrigiert.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektren wurden an einem Nicolet Avatar 330 Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer der Firma *Thermo electron corporation* aufgenommen, die Messung erfolgte mittels ATR-Technik (attenuated total reflection) an einem Diamantkristall. Die Angabe der Werte erfolgt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]. Die Intensität der Signale wird durch folgende Abkürzungen angegeben: s = stark, m = mittel, w = schwach, br = breit.

Mikrowellensynthesen

Die Mikrowellensynthesen wurden in einer Mikrowelle des Typs Discover System der Firma *CEM Matthews NC* durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind bei den jeweiligen Synthesen angegeben.

Magnetische Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR, ¹³C-NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem der folgenden Magnetresonanzspektrometer gemessen:

1. AVANCE III 400-Magnetresonanzspektrometer der *Fa. Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 400 MHz und einer Magnetfeldstärke von 9.4 Tesla.
2. Avance III HD 300-Magnetresonanzspektrometer der *Fa. Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 300 MHz und einer Magnetfeldstärke von 7.05 Tesla.
3. Fourier 300-Magnetresonanzspektrometer der *Fa. Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 300 MHz und einer Magnetfeldstärke von 7.05 Tesla.

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Als interner Standard dienten bei allen NMR-Spektren die Restprotonensignale der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.00$ ppm) und DMSO-d_6 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52$ ppm). Die Multiplizitäten der Signale werden durch folgende Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett dt = Dublett von Triplett, tt = Triplett von Triplett, q = Quartett, qt = Quintett, sext = Sextett, sep = Septett, m = Multiplett.

Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS-Spektren wurden an einem ESI Micromass LCT-Spektrometer der Firma *Micromass* aufgenommen.

Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS)

Die FD-MS-Spektren wurden an einem MAT 95-Spektrometer der Firma *Finnigan* aufgenommen.

10.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Zur Detektion der Substanzen dienten die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Ioddampf, *Ehrlich-Reagenz*, *Dragendorff-Reagenz* (Amine) und gesättigter wässriger Kaliumpermanganat-Lösung.

Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllmaterial wurde MN Kieselgel 60 M, Korngröße 0.040-0.063 mm oder 0.063-0.2 mm der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Zusammensetzung der Laufmittel für DC und SC sind in Volumenprozent angegeben. Je nach Trennproblem wurden Säulen verschiedener Durchmesser und Länge verwendet.

10.3 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von *Acros Organics*, *Sigma-Aldrich*, *Alfa-Aesar*, *Fluka*, oder *Merck* bezogen.

Ehrlich-Reagenz: Hellgelbes Sprühreagenz zum Anfärben von primären aromatischen Aminen. Zusammensetzung: 1 g 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/Methanol (3:1); Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

Dragendorff-Reagenz: Sprühreagenz zum Anfärben von tertiären Aminen. Zusammensetzung: 0.85 g basisches Bismutnitrat in 40 ml Wasser und 10 ml Eisessig. Anschließend besprühen mit 40%iger Kaliumiodid-Lösung in Ethanol.

10.4 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt und getrocknet (Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4 Å, Calciumchlorid, Natriumsulfat, Kaliumcarbonat). Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmitteln (Natrium, Phosphorpentoxid, Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4 Å, Kaliumhydroxid oder Natrium aufbewahrt. Als Schutzgas wurde Argon verwendet, welches zuvor durch Calciumchlorid getrocknet wurde.

11 Allgemeine synthetische Methoden

11.1 Methode A: Synthesen von Carbonsäureamiden und -estern

11.1.1 Methode A1: Verwendung von Phosphorylchlorid

Zu 1.0 Äq. in Dichlormethan gelöster Carbonsäure werden 2.0 Äq. des jeweiligenamins und 3.0 Äq. Triethylamin gegeben, anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren werden nun langsam 2.0 Äq. Phosphorylchlorid (POCl_3) zutropft. Nach Erwärmen auf RT wird für weitere 24 h gerührt. Im Anschluss wird gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und dreimal mit Dichlormethan und einmal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Gemisch im Vakuum eingengt und das Rohprodukt anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.1.2 Methode A2: Amidsynthese mittels DCC und HOBt

1.0 Äq. einer Carbonsäure wird in Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert und anschließend mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren werden 1.2 Äq. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hinzugegeben und es wird für weitere 12 h gerührt. Nun werden 1.2 Äq. *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) hinzugegeben und es wird wiederum für 12 h gerührt. Im Anschluss werden 1.1 Äq. einesamins hinzugegeben und es wird erneut für weitere 24 h gerührt. Anschließend wird abfiltriert, zum Filtrat gesättigte wässrige Kaliumcarbonat-Lösung hinzugegeben und dreimal mit Dichlormethan und einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.1.3 Methode A3: Amidkupplung mit Sulfurylchlorid

1.0 Äq. der Carbonsäure wird unter Rühren in Dichlormethan gelöst, das Gemisch anschließend mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt und 1.1 Äq. Sulfurylchlorid (SOCl₂) zugegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch noch für drei Stunden auf 50 °C erwärmt. Nach erneuter Abkühlung auf 0 °C werden 2.0 Äq. des jeweiligen Amins sowie 3.0 Äq. Triethylamin hinzugegeben, anschließend wird das Reaktionsgemisch für weitere drei Stunden gerührt. Im Anschluss wird gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und dreimal mit Dichlormethan sowie einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Gemisch im Vakuum eingengt und das Rohprodukt anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.1.4 Methode A4: Amidkupplung durch Aktivierung mit Propylphosphonsäuretrianhydrid (PPA)

1.0 Äq. der Carbonsäure, 1.2 Äq. des Amins sowie 5 Äq. Triethylamin werden unter Rühren in Dichlormethan oder Ethylacetat gelöst, das Gemisch wird anschließend mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Nun werden langsam 2.0 Äq. PPA (in Dichlormethan oder Ethylacetat gelöst) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für vierundzwanzig Stunden bei Raumtemperatur rührt. Nun wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und dreimal mit Dichlormethan sowie einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Phasen werden nach Trocknung über Natriumsulfat im Vakuum eingengt und das Rohprodukt anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.1.5 Methode A5: Amidkupplung unter Verwendung von *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)

1.0 Äq. der Carbonsäure wird in Dichlormethan gelöst und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 2.0 Äq. HBTU sowie 8.0 Äq. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig-Base)

hinzugegeben. Nach 30 min rühren werden schließlich 1.1 Äq. des jeweiligen Amins hinzugegeben. Nach rühren über Nacht wird Dichlormethan hinzugegeben und die organische Phase dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dreimal mit 10%iger wässriger Zitronensäure sowie einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung im Vakuum eingeengt und das Rohprodukt anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.^[93]

11.1.6 Methode A6: Säureveresterung unter saurer Katalyse

Die Carbonsäure wird in dem zu veresternden Alkohol gelöst, als Katalysator werden einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und das Reaktionsgemisch refluxiert. Nach vollständiger Umsetzung wird das der Alkohol im Vakuum eingeengt. Dichlormethan wird hinzugegeben und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung des Lösungsmittels wird dieses im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt ggf. mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.2 Methode B: Esterhydrolyse

11.2.1 Methode B1: Vollständige Hydrolyse organischer Carbonsäureester

1.0 Äq. des Carbonsäureesters wird einem 1:1-Gemisch von Wasser und THF mit 3.0 Äq. LiOH x H₂O, NaOH oder KOH versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von 5.0 Äq. 2 M Salzsäure angesäuert und anschließend dreimal mit Dichlormethan und zweimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.3 Methode C: Nucleophile Substitutionen an Alkoholen

11.3.1 Methode C1: Nucleophile Substitution aromatischer Hydroxylgruppen mit Benzylbromid

1.0 Äq. einer aromatischen Hydroxycarbonsäure und 2.66 Äq. 2 M Natriumhydroxid-Lösung werden in THF gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 0 °C mittels eines Eisbades werden langsam 1.16 Äq. Benzylbromid, gelöst in THF, hinzugegeben. Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch für 48 h refluxiert. Nach Abkühlung auf RT wird zweimal mit Diethylether gewaschen, das THF im Vakuum abdestilliert und der wässrige Rückstand mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Der ausfallende Feststoff wird abfiltriert, getrocknet und ggf. mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[95]

11.4 Methode D: Reduktionen

11.4.1 Methode D1: Amidreduktion mit Hilfe von Boran-Tetrahydrofuran-Komplex

1.0 Äq. der Amidkomponente werden unter Argon in wasserfreiem THF bei 0 °C vorgelegt. Nach langsamer Zugabe von 7.0 Äq. Boran-Tetrahydrofuran-Komplex wird das Reaktionsgemisch für eine Stunde zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Gemisch vorsichtig mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 angesäuert und für eine weitere Stunde gerührt. Nun wird der pH-Wert mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 9 eingestellt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[100]

11.4.2 Methode D2: Reduktion von Säureamiden zu Aminen mittels Lithiumaluminiumhydrid

1. Äq. des Carbonsäureamids werden unter Rühren in trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend werden 1.75 Äq. LiAlH_4 in ebenfalls trockenem THF gelöst und langsam zur Amidlösung hinzugegeben. Es wird bis zur vollständigen Umsetzung refluxiert. Zur abgekühlten Lösung werden gesättigte Natriumsulfat-Lösung und Dichlormethan hinzugegeben. Durch Zugabe von KOH-Lösung wird das ausgefallene $\text{Al}(\text{OH})_3$ in Lösung gebracht und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Lösungsmittel über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeengt und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[101, 102]

11.4.2 Methode D3: Reduktion aromatischer Nitro- zu Aminogruppen

Die jeweilige aromatische Nitroverbindung wird unter Rühren in trockenem THF in einer Wasserstoff-Druckapparatur gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (5%) wird mit Wasserstoff ein Druck von 100 psi angelegt und das Reaktionsgemisch für 12 Stunden gerührt. Anschließend wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung mittels Säulenchromatographie weiter umgesetzt werden.^[103]

11.5 Methode E: Nucleophile Substitutionen mit Aminen

11.5.1 Methode E1: Reaktion von 1,4-Diaminobenzol mit Dibromalkanen zu *N,N*-cyclisierten Aminen

3.0 Äq. des aromatischen Diamins, 1.0 Äq. des Dibromalkans sowie 3.0 Äq. Kaliumcarbonat werden in Aceton vorgelegt und das Reaktionsgemisch anschließend für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengung des Lösungsmittels im Vakuum wird gesättigte

wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Anschließend wird das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

11.5.2 Methode E2: Reaktion von sekundären Aminen mit Bromalkanen

1.0 Äq. der Aminkomponente und 1.0 Äq. des Alkylbromids werden unter Rühren in Dioxan gelöst, anschließend werden 3.0 Äq. Natriumcarbonat hinzugegeben. Nach Erhitzen auf 80 °C wird für weitere 24 h gerührt. Nach Reaktionsende wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Wasser hinzugegeben und dreimal mit Dichlormethan und einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungsmittel werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird anschließend durch Säulenchromatographie aufgereinigt.^[104]

11.6 Methode F: Einführung von Schutzgruppen

11.6.1 Methode F1: Einführung von Boc-Schutzgruppen an Amine

1.0 Äq. des jeweiligenamins wird in Dichlormethan gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. 1.5 Äq. Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) werden in Dichlormethan gelöst und langsam hinzugegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird für weitere 36 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingeeengt und mit Wasser versetzt, anschließend wird die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.6.2 Methode F2: Einführung einer Boc-Schutzgruppe an symmetrische Diamine

5.0 Äq. des Diamins werden in Dichlormethan gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird unter Rühren eine Lösung aus 1.0 Äq. Di-*tert*-butyldicarbonat hinzugegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird der entstandene Feststoff abfiltriert. Nach Einengung des Filtrats im Vakuum wird Ethylacetat hinzugegeben und dreimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wird das Lösungsmittel über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.^[105]

11.6.2 Methode F3: Einführung von Acetyl-Schutzgruppen an Amine

1.0 Äq. des Amins werden in Dichlormethan gelöst, anschließend werden 1.2 Äq. Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wird zweimal mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Anschließend wird das entstandene Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.^[106]

11.6.3 Methode F4: Einführung von Dimethylacetal-Schutzgruppen an Carbonylgruppen

Nach Lösen von 1.0 Äq. der Carbonylkomponente in Methanol werden 1.1 Äq. Orthoameisensäuretrimethylester sowie eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und anschließend gesättigte wässrige Kaliumcarbonat-Lösung hinzugegeben. Es wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Aktivkohle versetzt, letztere abfiltriert und das Lösungsmittel im

Vakuum eingengt. Das resultierende Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[107]

11.6.4 Methode F5: Schützen von Aminfunktionen durch Benzylierung

1.0 Äq. der Aminkomponente werden in THF gelöst und die Lösung mittels eines Eisbades auf 0 °C gelöst. Nun werden langsam 1.2 Äq. in Paraffinöl gelöstes Natriumhydrid hinzugegeben, dabei wird darauf geachtet, dass die Temperatur des Reaktionsgemisches 5 °C nicht übersteigt. Nach vollständiger Zugabe wird für weitere 15 min gerührt, anschließend werden langsam 1.2 Äq. Benzylbromid hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt, anschließend werden Ethylacetat und gesättigte wässrige Natriumchlorid-Lösung zugegeben. Die Phasen werden getrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.^[108]

11.7 Methode G: Entfernung von Schutzgruppen

11.7.1 Methode G1: Entfernung von Boc-Schutzgruppen

1.0 Äq. des Boc-geschützten Amins werden in Dichlormethan vorgelegt. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C mittels eines Eisbades werden langsam 10.0 Äq. Trifluoressigsäure hinzugetropft. Die Reaktionslösung wird für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gelöst, mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung oder, je nach Basizität des Amins, mit 0.1 M Natriumhydroxid-Lösung, versetzt. Es wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

11.7.2 Methode G2: Abspaltung von Acetyl-Schutzgruppen an Aminen

1.0 Äq. der Acetyl-geschützten Aminkomponente werden in einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Tetrahydrofuran vorgelegt. Nach Zugabe von 5.0 Äq. Lithiumhydroxid-Monohydrat wird das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Wasser werden die Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Nun wird die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan und einmal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen werden vereint und mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Die anschließende Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt durch Säulenchromatographie.

11.8 Methode H: Reaktionen am Aromaten

11.8.1 Methode H1: Kupplung von Piperazin an 1-Fluoro-4-Nitrobenzol

1.0 Äq. 1-Fluoro-4-Nitrobenzol wird unter Rühren in Acetonitril gelöst. Anschließend werden 2.5 Äq. in Acetonitril gelöstes Piperazin langsam hinzugegeben. Nach 30 Minuten rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlung in Wasser gegeben. Die organische Phase wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert und anschließend dreimal mit Wasser und einmal mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt, anschließend wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[109]

11.8.2 Methode H2: Buchwald-Hartwig-Kupplung von Arylhalogeniden mit sekundären Aminen

1.0 Äq. des Arylhalogenids, 1.0 Äq. des sekundären Amins werden unter Rühren in Toluol gelöst. Nun werden 1.2 Äq. Natrium-*tert*-butoxid, 0.12 Äq. Tri-*tert*-butylphosphin und 0.025 Äq. Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für

sieben Stunden auf 100 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird auf pH 7 eingestellt, dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt zu 50 ml eines 1:1-Gemischs aus Ethanol und 1 M Natronlauge gegeben. Nach einer Stunde refluxieren wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Zum Filtrat werden 30 ml Wasser hinzugegeben und 30 ml 1 N Salzsäure unter Rühren hinzugetropft. Nun wird dreimal mit Dichlormethan sowie einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet, anschließend werden die Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[79]

11.8.3 Methode H3: Elektrophile aromatische Substitution an Indol mit Aldehyden

1.0 Äq. Indol wird unter Rühren in Methanol gelöst. Nun werden 1.1 Äq. der Aldehydkomponente sowie 1.1 Äq. Natriumhydroxid hinzugegeben und das Reaktionsgemisch drei Tage lang bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Nach der Zugabe von Wasser wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit Dichlormethan sowie zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Einengung im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[110]

11.9 Methode I: Nucleophile Addition von Aminen an Carbonylverbindungen zu Iminen

1.0 Äq. der Carbonylverbindung sowie 1.0 Äq. des Amins werden unter Rühren in Toluol gelöst, anschließend wird Molekularsieb hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird nun für 12 Stunden unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung wird die organische

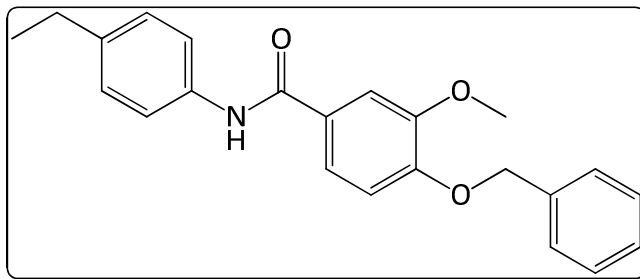
Phase abgetrennt und die wässrige dreimal mit Dichlormethan und einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingedunstet und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.^[111]

11.10 Methode J: α -Methylierung von Carbonylverbindungen mit Methyljodid

1.0 Äq. der Carbonylverbindung und 5.0 Äq. Natriumhydrid werden in THF vorgelegt und mittels eines Eisbades auf 0°C gekühlt. Nun werden langsam 1.5 Äq. Methyljodid zugetropft und es wird für weitere vier Stunden gerührt. Nachdem überschüssiges Natriumhydrid durch vorsichtige Wasserzugabe eliminiert wurde, wird die Reaktionsmischung mit gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung versetzt und dreimal mit Dichlormethan sowie zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

12 Synthetisierte Zielverbindungen

12.1 CM138: 4-Benzyloxy-*N*-(4-ethylphenyl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: $C_{23}H_{23}NO_3$

Molare Masse: 361.43 g/mol

Methode: A2

Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

364 mg, 0.37 ml, 3.00 mmol (3.0 Äq.) 4-Ethylanilin

248 mg, 1.2 mmol (1.2 Äq.) Dicyclohexylcarbodiimid

184 mg, 1.2 mmol (1.2 Äq.) *N*-Hydroxybenzotriazol-Hydrat

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 123 mg, 340 μmol, 34 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.82 (DCM/MeOH 10:1)

Schmelzpunkt: 173 °C

¹H-NMR: (DMSO, 400.13 MHz), δ [ppm] = 10.01 (s, 1 H, (CO)NH), 7.64 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH₂)), 7.57 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH₂CH), 7.54 (d, ³J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH₂)(C(OCH₃))), 7.48 – 7.34 (m, 5 H, OCH₂C(CH₂CH₂)₂(CH)), 7.17 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂)₂), 7.16 (d, ³J = 8

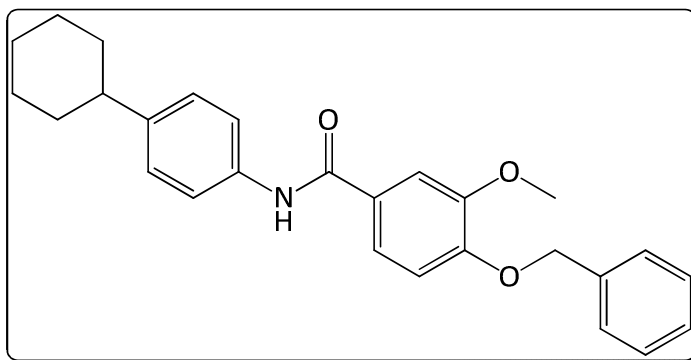
Hz, 1 H, (CO)CCHH), 5.18 (s, 2 H, OCH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 2.57 (q, ³J = 8 Hz, 2 H, CH₂CH₃), 1.17 (t, ³J = 7 Hz, 3 H, CH₂CH₃)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.16 ((CO)NH), 150.89 (COCH₂), 149.02 (COCH₃), 139.37 (CCH₂CH₃), 137.36 ((CO)NC), 137.16 (CCH₂O), 128.94, 128.37, 128.24, 127.79 (Ar-C), 121.23 ((CO)CCHCH), 121.01 ((NH)CC(CH₂)₂), 112.83 ((CO)CCHC(OCH₃)), ((CO)CCHC(OCH₃)), 111.64 ((CO)CCHCH), 70.25 (CH₂), 56.11 (OCH₃), 28.10 (CH₂CH₃), 16.21 (CH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₃H₂₃NO₃: 361.43 g/mol; gefunden: 361.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3321.68, 3072.42, 3035.64, 2962.09, 2920.40, 2847.67, 2365.49, 1650.40, 1580.93, 1523.72, 1499.21, 1450.17, 1413.39, 1384.79, 1323.50, 1233.60, 1213.17

12.2 CM141: 4-Benzyloxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₇H₂₉NO₃

Molare Masse: 415.52 g/mol

Methode: A4

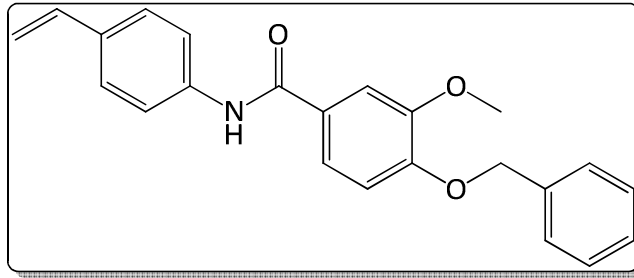
Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

175 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Cyclohexylanilin

507 mg, 0.73 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

764 mg, 0.8 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

| | |
|----------------------|---|
| | 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 120 mg, 288 mmol, 29 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.84 (DCM/MeOH 10:1) |
| Schmelzpunkt: | 177 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300.13 MHz), δ [ppm] = 9.99 (s, 1 H, (CO)NH), 7.63 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂), 7.56 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.53 (d, ³ J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH ₃))), 7.48 – 7.32 (m, 5 H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ (CH))), 7.18 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH) ₂), 7.14 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 5.18 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 2.43 (m, 1 H, CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.79 – 1.76 (m, 4 H, CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.45 – 1.15 (m, 6 H, CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.16 ((CO)NH), 150.90 (COCH ₂), 149.05 (COCH ₃), 143.31 (C(CH)(CH ₃) ₂), 137.44 ((CO)NC), 137.16 (CCH ₂ O), 128.94, 128.45, 128.35, 127.82 (Ar-C), 127.10 ((NH)C(CHCH) ₂), 123.19 ((CO)CCHCH), 120.99 ((NH)CC(CH ₂) ₂), 113.20 ((CO)CCHC(OCH ₃)), 110.98 ((CO)CCHCH), 70.19 (OCH ₂), 58.09 (CH ₃), 41.60 (CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 34.54 (CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 26.84 (CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 26.08 (CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₇ H ₂₉ NO ₃ : 415.52 g/mol; gefunden: 415.4 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3338.02, 2917.14, 2839.50, 1654.48, 1593.19, 1503.29, 1417.38, 1319.41, 1270.38, 1217.25 |

12.3 CM142: 4-Benzyloxy-3-methoxy-N-(4-vinylphenyl)benzamidSummenformel: $C_{23}H_{21}NO_3$

Molare Masse: 359.42 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

170 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Vinylanilin

507 mg, 0.73 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

764 mg, 0.8 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 111 mg, 309 mmol, 31 %, farbloser Feststoff

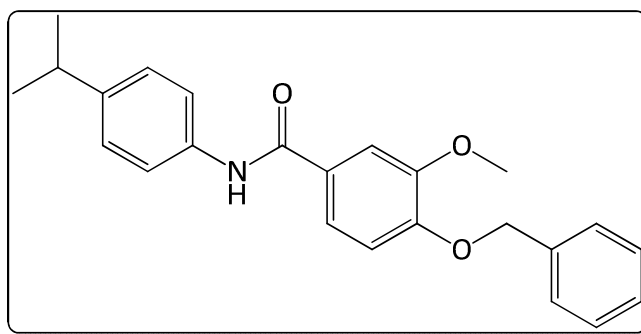
Rf: 0.80 (DCM/MeOH 10:1)

Schmelzpunkt: 199 °C

$^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 300.13 MHz), δ [ppm] = 10.12 (s, 1 H, (CO)NH), 7.75 (d, $^3J = 8$ Hz, 2 H, (NH)C(CH \underline{H}) $_2$), 7.58 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (CO)CCH \underline{H}), 7.55 (d, $^3J = 2$ Hz, 1 H, (CO)C(CH \underline{H})(C(OCH $_3$))), 7.48 – 7.32 (m, 7 H, OCH $_2$ C((CH \underline{H}) $_2$ (CH \underline{H})), (NH)C(CH \underline{H}) $_2$), 7.17 (d, $^3J = 8$ Hz, 1 H, (CO)CCH \underline{H}), 6.69 (dd, $^3J = 18$ Hz, $^4J = 11$ Hz, 1 H, CCH=CH $_2$), 5.76 (d, $^3J_{trans} = 18$ Hz, 1 H, CCH=CH $_2$), 5.19 (d, $^3J_{cis} = 11$ Hz, 1 H, CCH=CH $_2$), 5.19 (s, 2 H, OCH \underline{H}_2), 3.86 (s, 3 H, OCH \underline{H}_3)

| | |
|----------------------|---|
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 166.30 ($\underline{C}ONH$), 152.01 ($\underline{C}OCH_2$), 150.04 ($\underline{C}OCH_3$), 140.45 ($(CO)N\underline{C}$), 138.13 ($C\underline{C}HCH_2$), 137.64 ($\underline{C}CH_2O$), 133.81 ($\underline{C}CHCH_2$), 129.92, 129.43, 129.34, 128.65, 127.86 ($Ar-\underline{C}$), 122.32 ($(CO)C\underline{C}HCH$), 121.74 ($(NH)CC(\underline{C}H_2)_2$), 113.87 ($CCH\underline{C}H_2$), 113.34 ($(CO)C\underline{C}HC(OCH_3)$), 112.70 ($(CO)CCH\underline{C}H$), 71.26 ($\underline{C}H_2$), 57.12 ($O\underline{C}H_3$) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₁ NO ₃ : 359.42 g/mol; gefunden: 359.2 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3317.59, 3031.55, 2933.48, 2872.19, 1650.40, 1585.02, 1499.21, 1458.34, 1421.57, 1397.05, 1323.50, 1266.29, 1217.25 |

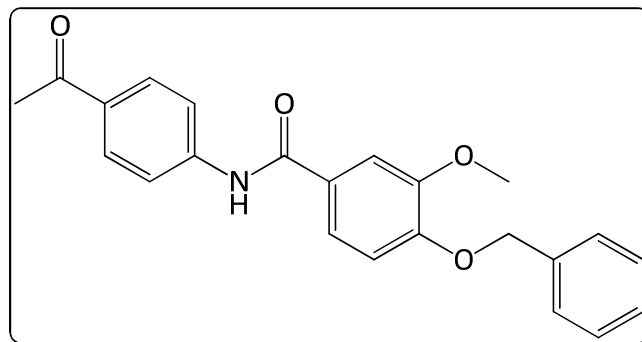
12.4 CM156: 4-Benzyloxy-N-(4-isopropylphenyl)-3-methoxybenzamid



| | |
|---------------|---|
| Summenformel: | C ₂₄ H ₂₅ NO ₃ |
| Molare Masse: | 375.46 g/mol |
| Methode: | A4 |
| Ansatz: | 387 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 203 mg, 2.04 ml, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Isopropylanilin 758 mg, 1.04 ml, 7.5 mmol (5 Äq.) Triethylamin 1.064 g, 1.07 ml, 1.8 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 355 mg, 946 μ mol, 63 %, farbloser Feststoff |

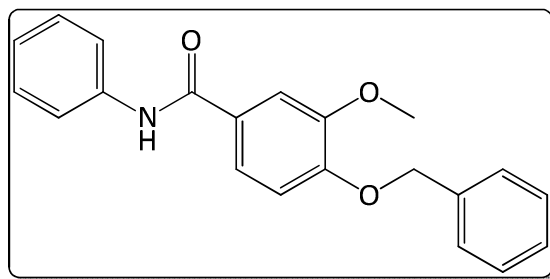
| | |
|----------------------|---|
| R _f : | 0.83 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 165 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300.13 MHz), δ [ppm] = 10.00 (s, 1 H, (CO)NH), 7.64 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂ H) ₂), 7.57 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ H), 7.54 (d, ³ J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH ₂ H)(C(OCH ₃))), 7.48 – 7.32 (m, 5 H, OCH ₂ C((CH ₂ H) ₂ (CH ₂ H))), 7.21 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂ H) ₂), 7.16 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ H), 5.18 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 2.86 (sp, 1 H, CH(CH ₃) ₂), 1.20 (d, 6 H, CH(CH ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.15 ((CO)NH), 150.91 (COCH ₂), 149.05 (COCH ₃), 144.04 (C(CH)(CH ₃) ₂), 137.44 ((CO)NC), 137.17 (CCH ₂ O), 128.94, 128.45, 128.36, 127.81 (Ar-C), 126.74 (NC(CH ₂ H) ₂), 121.23 ((CO)CCH ₂ H), 121.01 ((NH)C(CH ₂ H) ₂), 112.88 ((CO)CCH ₂ H(OCH ₃)), 111.70 ((CO)CCH ₂ H), 70.28 (CH ₂), 56.13 (CH ₃), 33.36 (CH(CH ₃) ₂), 24.45 ((CH ₃) ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₄ H ₂₅ NO ₃ : 375.46 g/mol; gefunden: 375.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 333.94, 3035.64, 2958.00, 2929.40, 2868.10, 2361.41, 1642.22, 1593.19, 1576.84, 1508.38, 1466.52, 1413.39, 1372.53, 1335.75, 1270.37, 1237.68, 1213.17 |

12.5 CM157: N-(4-Acetylphenyl)-4-benzyloxy-3-methoxybenzamid



| | |
|---------------|---|
| Summenformel: | C ₂₃ H ₂₁ NO ₃ |
| Molare Masse: | 375.42 g/mol |

| | |
|----------------------|---|
| Methode: | A4 |
| Ansatz: | 387 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzoyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 203 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Aminoacetophenon 758 mg, 1.04 ml, 7.5 mmol (5 Äq.) Triethylamin 1.064 g, 1.07 ml, 1.8 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 119 mg, 317 μmol, 21 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.57 (DCM/MeOH 10:1) |
| Schmelzpunkt: | 226 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.39 (s, 1 H, (CO)NH), 7.99 – 7.91 (m, 4 H, (NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 7.61 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ CH), 7.56 (d, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH ₂)(C(OCH ₃))), 7.48 – 7.33 (m, 5 H, OCH ₂ C((CH ₂ CH ₂) ₂ (CH))), 7.19 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ CH), 5.20 (s, 2 H, OCH ₂), 3.87 (s, 3 H, OCH ₃), 2.55 (s, 3 H, (CO)CH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 197.09 ((NH)(CH ₂ CH ₂) ₂ CCOCH ₃), 165.78 ((CO)NH), 151.29 (COCH ₂), 149.09 (COCH ₃), 144.24 ((CO)NC), 136.81 (CCH ₂ O), 132.27 ((NH)(CH ₂ CH ₂) ₂ C), 129.77 (CCOCH ₃), 128.96, 128.49, 128.39 (Ar-C), 127.27 ((NH)(CO)C), 121.60 ((CO)CCH ₂ CH), 119.88 ((NH)(CH ₂ CH ₂) ₂ C), 112.86 ((CO)CCH ₂ C(OCH ₃)), 111.80 ((CO)CCH ₂ CH), 70.29 (OCH ₂), 56.15 (COCH ₃), 26.96 ((CO)CH ₃) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₁ NO ₃ : 375.42 g/mol; gefunden: 375.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3321.68, 3076.50, 2929.40, 2868.10, 2357.32, 1670.83, 1646.31, 1589.10, 1499.21, 1462.43, 1413.39, 1380.70, 1315.32, 1266.29, 1213.17 |

12.6 CM167: 4-Benzyloxy-3-methoxy-N-phenylbenzamidSummenformel: $C_{21}H_{19}NO_3$

Molare Masse: 333.38 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 387 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

140 mg, 0.14 ml, 1.50 mmol (1.0 Äq.) Anilin

758 mg, 1.04 ml, 7.5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.064 g, 1.07 ml, 1.8 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 288 mg, 864 mmol, 58 %, farbloser Feststoff

Rf: 0.83 (DCM/MeOH 10:1)

Schmelzpunkt: 161 °C

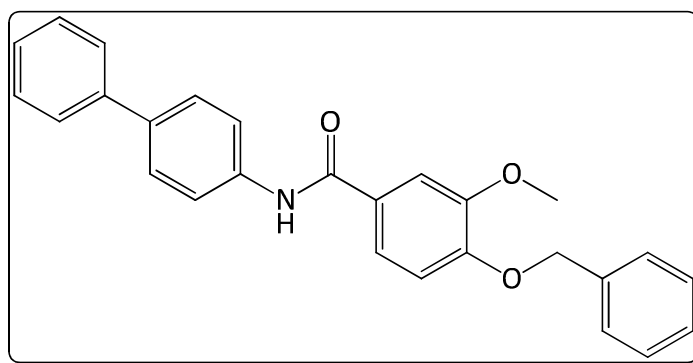
$^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 400.13 MHz), δ [ppm] = 10.06 (s, 1 H, (CO)NH), 7.75 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 1$ Hz, 2 H, (NH)C(CH₂)), 7.58 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.55 (d, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), 7.47 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 2 H, (NH)C(CHCH₂)), 7.43 – 7.39 (m, 2 H, OCH₂C(CHCH₂)), 7.36 – 7.32 (m, 3 H, OCH₂C((CHCH₂)₂(CH))), 7.17 (d, $^3J = 8$ Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.09 (tt, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (NH)C((CHCH₂)₂(CH))), 5.19 (s, 2 H, OCH₂), 3.84 (s, 3 H, OCH₃)

^{13}C -NMR: (DMSO, 100.62 MHz), δ [ppm] = 164.85 ((CO)NH), 150.52 (COCH₂), 148.61 (COCH₃), 139.23 ((CO)NC), 136.69 (CCH₂O), 128.52, 128.43, 127.93, 127.82 (Ar-C), 123.45 ((NH)C(CHCH)₂CH), 120.83 ((CO)CCHCH), 120.42 ((NH)C(CHCH)₂CH), 112.48 ((CO)CCHC(OCH₃)), 111.33 ((CO)CCHCH), 69.83 (CH₂), 55.69 (CH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₇H₁₉NO₃: 333.38 g/mol; gefunden: 333.2 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3325.77, 2937.57, 1646.31, 1593.19, 1503.29, 1433.83, 1319.41, 1270.37, 1213.17

12.7 CM209: *N*-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-4-benzyloxy-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₇H₂₃NO₃

Molare Masse: 409.48 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

170 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Aminobiphenyl

507 mg, 0.70 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

764 mg, 0.80 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 77 mg, 188 μ mol, 19 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.86 (DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 234 °C

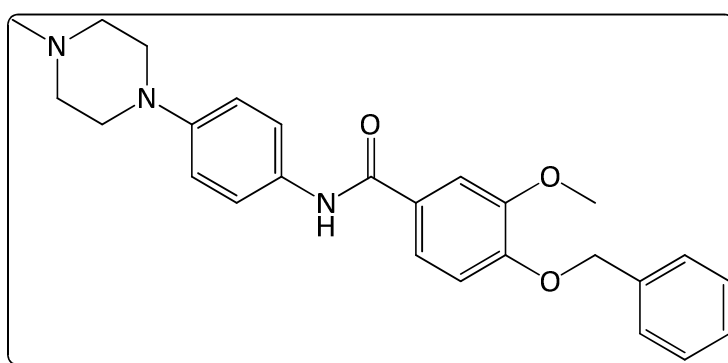
¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.19 (s, 1 H, (CO)NH), 7.87 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH)₂), 7.68 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 4 H, (NH)C(CHCH)₂, (NH)C(CHCH)₂C(CHCH)₂CH), 7.61 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.56 (d, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), 7.46 – 7.33 (m, 8 H, OCH₂C(CHCH)₂CH), (NH)C(CHCH)₂CC(CHCH)₂CH), 7.19 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 5.19 (s, 2 H, OCH₂), 3.84 (s, 3 H, OCH₃)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.39 ((CO)NH), 151.03 (COCH₂), 149.07 (COCH₃), 140.17 ((NH)C(CHCH)₂CC), 139.26 ((NH)C(CHCH)₂CC), 137.15 (CCH₂O), 135.52 ((CO)NC), 129.39, 128.95, 128.47, 128.38, 128.37, 127.69, 127.23(Ar-C), 126.74 ((NH)C(CHCH)₂), 121.35 ((CO)CCHCH), 121.13 ((NH)C(CH)₂), 112.86 ((CO)CCHC(OCH₃)), 111.71 ((CO)CCHCH), 70.27 (CH₂), 56.14 (CH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₇H₂₁NO₃: 409.48 g/mol; gefunden: 409.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3297.16, 2872.19, 1646.31, 1499.21, 1405.22, 1315.32, 1266.29, 1213.17

12.8 CM210: 4-Benzyloxy-3-methoxy-N-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)benzamid



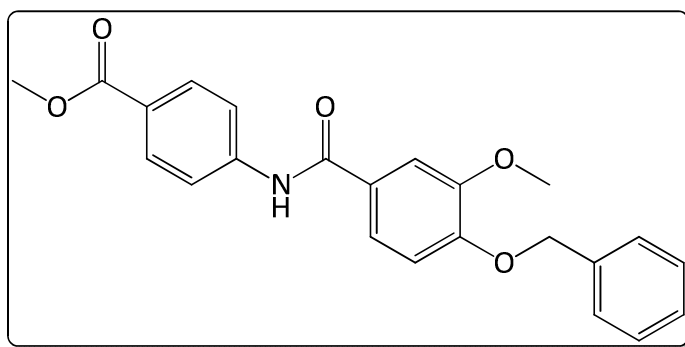
Summenformel: C₂₆H₂₉N₃O₃

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| Molare Masse: | 431.53 g/mol |
| Methode: | A4 |
| Ansatz: | 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 191 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)anilin 507 mg, 0.70 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin 764 mg, 0.80 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 70 mg, 162 μmol, 16 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.26 (DCM/MeOH 9:1) |
| Schmelzpunkt: | 217 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.89 (s, 1 H, (CO)NH), 7.58 – 7.34 (m, 9 H (CO)CCH, (CO)C(CH)(C(OCH ₃)), OCH ₂ C((CH ₂) ₂ (CH)), (NH)C(CH ₂) ₂), 7.15 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCH), 6.92 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂) ₂), 5.17 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 3.09 (m, 4 H, CN(CH ₂) ₂ NCH ₃), 2.45 (m, 4 H, CN(CH ₂) ₂ NCH ₃), 2.22 (s, 3 H, NCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.77 ((CO)NH), 150.74 (COCH ₂), 149.00 (COCH ₃), 147.87 (CN(CH ₂) ₂ NCH ₃), 137.19 (CCH ₂ O), 131.52 ((CO)NC), 128.94, 128.45, 128.38, 127.94 (Ar-C), 124.30, 122.03 ((NH)C(CH ₂) ₂), 121.08 ((CO)CCH), 115.90 ((NH)CC(CH ₂) ₂), 112.82 ((CO)CCH(OCH ₃)), 111.74 ((CO)CCH), 70.28 (OCH ₂), 55.11 (OCH ₃), 52.73 (CN(CH ₂) ₂ NCH ₃), 50.38 (CN(CH ₂) ₂ NCH ₃), 46.05 (CN(CH ₂) ₂ NCH ₃) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₃ : 431.53 g/mol; gefunden: 431.4 g/mol |

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3280.82, 2929.40, 2831.33, 2786.38, 2733.26, 1638.14, 1593.19, 1576.84, 1503.29, 1450.17, 1417.48, 1376.62, 1319.41, 1270.37, 1217.25

12.9 CM211: 4-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzamido)benzoesäuremethylester



Summenformel: C₂₃H₂₁NO₅

Molare Masse: 391.42 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

182 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Aminobenzoesäuremethylester

507 mg, 0.70 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

764 mg, 0.80 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 57 mg, 146 μmol, 15 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.83 (DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 219 °C

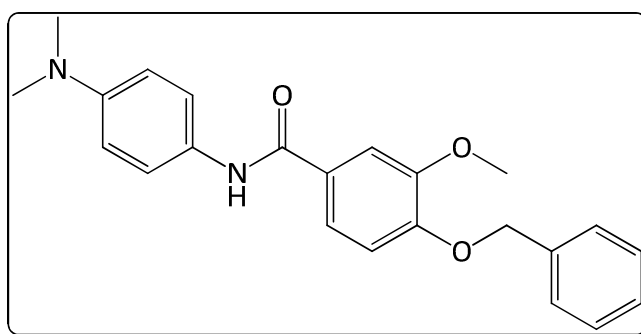
$^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.40 (s, 1 H, (CO)NH), 7.97 – 7.91 (m, 4 H, (NH)C(CH₂CH₂)₂), 7.60 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (CO)CCH₂CH), 7.55 (d, $^4J = 2$ Hz, 1 H, (CO)C(CH₂)(C(OCH₃))), 7.48 – 7.32 (m, 5 H, OCH₂C((CH₂CH₂)₂(CH))), , 7.19 (d, $^3J = 8$ Hz, 1 H, (CO)CCH₂CH), 5.19 (s, 2 H, OCH₂), 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 3.83 (s, 3 H, (CO)OCH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 166.34 ((CO)OCH₃), 165.80 ((CO)NH), 151.28 (COCH₂), 149.07 (COCH₃), 144.30 ((CO)NC), 137.09 (CCH₂O), 130.56 ((NH)C(CH₂CH₂)C), 128.95, 128.48, 128.38, 127.27 (Ar-C), 124.51 ((NH)C(CH₂CH₂)C), 121.61 ((CO)CCH₂CH), 120.03 ((NH)CC(CH₂)₂), 112.86 ((CO)CCH₂C(OCH₃)), 111.78 ((CO)CCH₂CH), 70.27 (CH₂), 56.14 (COCH₃), 52.39 ((CO)OCH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₃H₂₁NO₅: 391.42 g/mol; gefunden: 391.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3333.94, 2937.57, 2357.32, 1711.69, 1646.31, 1585.02, 1417.48, 1262.20, 1217.25

12.10 CM214: 4-Benzyloxy-*N*-(4-(*N,N*'-dimethylamino)phenyl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₃H₂₄N₂O₃

Molare Masse: 376.45 g/mol

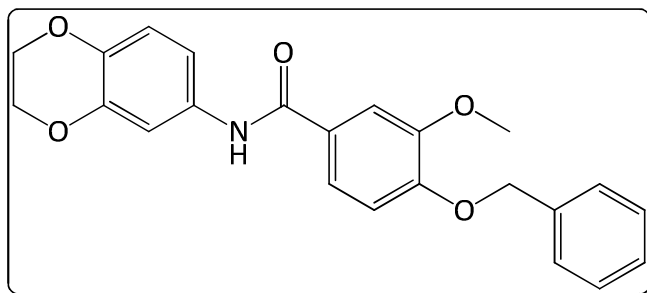
Methode: A4

Ansatz: 258 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| | 136 mg, 1.00 mmol (1.0 Äq.) 4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)anilin |
| | 507 mg, 0.70 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin |
| | 764 mg, 0.80 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) |
| | 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 99 mg, 263 μ mol, 26 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.62 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 185 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.83 (s, 1 H, (CO)N <u>H</u>), , 7.57 – 7.35 (m, 9 H (CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H, (CO)C(<u>H</u>)(C(OCH ₃)), OCH ₂ C((<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂ (<u>C</u> H)), (NH)C(<u>C</u> H) ₂), 7.15 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 6.72 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂), 5.17 (s, 2 H, O <u>C</u> H ₂), 3.85 (s, 3 H, O <u>C</u> H ₃), 2.87 (s, 6 H, N(<u>C</u> H ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.62 ((<u>C</u> O)NH), 150.67 (<u>C</u> OCH ₂), 148.98 (<u>C</u> OCH ₃), 147.69 (<u>C</u> N(CH ₃) ₂), 137.20 (<u>C</u> CH ₂ O), 129.33 ((CO)N <u>C</u>), 128.93, 128.44, 128.38, 128.05 (Ar- <u>C</u>), 124.94 ((NH)C(<u>C</u> H ₂) ₂), 122.43 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 112.91 ((NH)C(<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂), 112.82 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> (OCH ₃)), 111.41 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 70.25 (O <u>C</u> H ₂), 56.10 (O <u>C</u> H ₃), 40.95 (CN(<u>C</u> H ₃) ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₃ : 376.45 g/mol; gefunden: 376.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3280.82, 2929.40, 1638.14, 1576.84, 1503.29, 1417.48, 1319.41, 1270.37, 1213.17 |

12.11 CM219: 4-Benzyloxy-N-(2,3-dihydrobenzo-1,4-dioxin-6-yl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: $C_{23}H_{21}NO_5$

Molare Masse: 391.42 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

545 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-amin

1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.528 g, 1.60 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 740 mg, 1.891 mmol, 95 %, grau- bis blassrosafarbener Feststoff

R_f: 0.78 (DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 167 °C

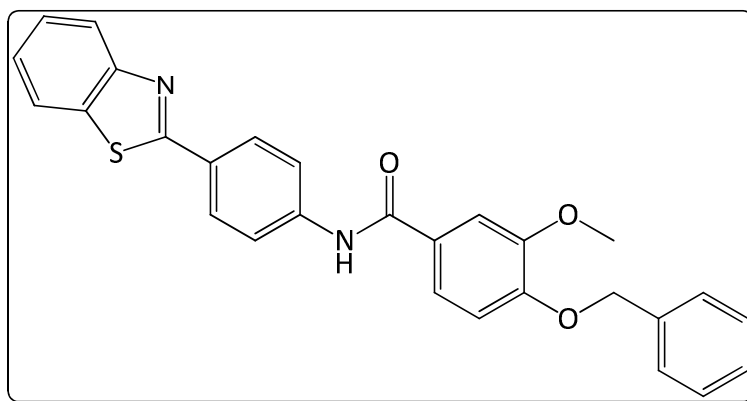
¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.92 (s, 1 H, (CO)NH), 7.55 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH), 7.52 (d, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), 7.48 – 7.34 (m, 6 H, OCH₂C((CHCH)₂CH), (NH)CCHCH), 7.17 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (NH)CCHCH), 7.15 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.82 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (NH)CCHCO), 5.17 (s, 2 H, OCH₂), 4.22 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.85 (s, 3 H, OCH₃)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.96 ((CO)NH), 150.86 (COCH₂), 149.03 (COCH₃), 143.26 ((NH)CCHCHCO), 139.96 ((NH)CCHCO), 137.16 (CCH₂O), 133.35 ((CO)NC), 128.94, 128.45, 128.37, 127.79 (Ar-C), 121.14 ((CO)CCHCH), 117.06 ((NH)CCHCH), 114.10 ((NH)CCHCH), 112.82 ((CO)CCHC(OCH₃)), 111.61 ((CO)CCHCH), 109.96 ((NH)CCHCO), 70.25 (CCH₂OC), 64.64, 64.41 (OCH₂CH₂O), 56.11 (CH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₃H₂₁NO₅: 391.42 g/mol; gefunden: 391.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317.59, 2974.35, 2872.19, 1642.22, 1601.36, 1503.29, 1417.48, 1270.37, 1217.25

12.12 CM218: *N*-(4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)-4-benzyloxy-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₈H₂₂N₂O₃S

Molare Masse: 466.55 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

662 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 2-(4-Aminophenyl)benzothiazol

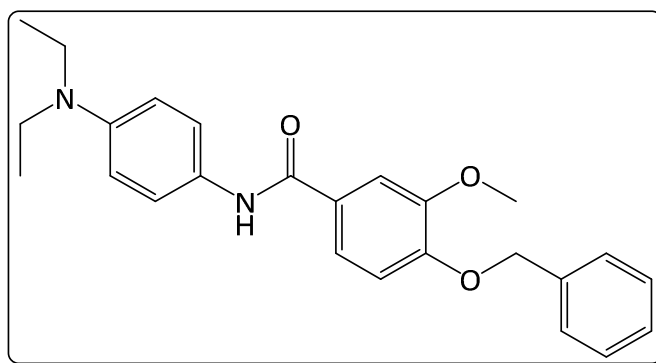
1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

50 ml DCM

| | |
|----------------------|---|
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 157 mg, 337 mmol, 17 %, farbloser Feststoff |
| Rf: | 0.84 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 251 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.40 (s, 1 H, (CO)NH), 8.15 – 7.98 (m, 6 H, (NH)C(CHCH) ₂ , SCCHCHCHCHCN), 7.63 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.62 – 7.35 (m, 8 H, (CO)C(CH)(C(OCH ₃)), OCH ₂ C(CHCH) ₂ CH), (NH)C(CHCH) ₂), 7.21 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 5.20 (s, 2 H, OCH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 167.49 ((CO)NH), 165.67 (CCSCCH), 154.12 (CCNCCH), 151.24 (COCH ₂), 149.09 (COCH ₃), 142.74 ((CO)NC), 137.12 (CCH ₂ O), 134.77 (CCSCCH), 128.96, 128.48, 128.39, 128.33, 128.20 (ArC), 127.37 ((NH)C(CHCH) ₂), 127.08 (CCNCCHCH), 125.75 (CCSCCHCH), 123.06 (CCSCCHCH), 122.78 (CCNCCHCH), 121.57 ((CO)CCHCH), 120.89 ((NH)CC(CH ₂) ₂), 112.88 ((CO)CCHC(OCH ₃)), 111.78 ((CO)CCHCH), 70.27 (CH ₂), 56.14 (CH ₃) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₈ H ₂₂ N ₂ O ₃ S: 466.55 g/mol; gefunden: 467.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3260.39, 2933.48, 1646.31, 1576.84, 1507.38, 1474.69, 1311.24, 1270.37, 1213.17 |

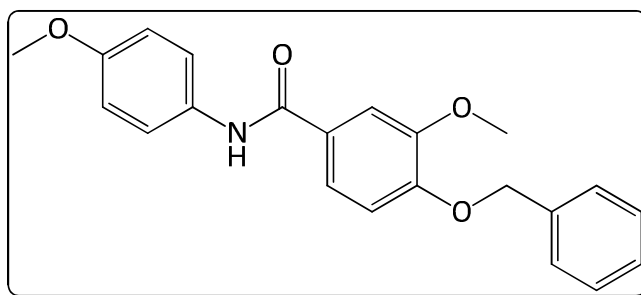
12.13 CM220: 4-Benzyloxy-N-(4-(diethylamino)phenyl)-3-methoxybenzamid



12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|--|
| Summenformel: | C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₃ |
| Molare Masse: | 404.50 g/mol |
| Methode: | A4 |
| Ansatz: | 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 239 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) (4- <i>N,N</i> -Diethylamino)anilin 1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin 1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) 50 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 178 mg, 440 μmol, 22 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.81 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 164 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.78 (s, 1 H, (CO)N <u>H</u>), , 7.57 – 7.34 (m, 9 H (CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H, (CO)C(<u>C</u> H)(C(OCH ₃)), OCH ₂ C((<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂ (<u>C</u> H)), (NH)C(<u>C</u> H) ₂), 7.14 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 6.65 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂), 5.17 (s, 2 H, O <u>C</u> H ₂), 3.85 (s, 3 H, O <u>C</u> H ₃), , 3.30 (q, ³ J = 7.0 Hz, 4H, N(<u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃) ₂), 1.07 (t, ³ J = 7.0 Hz, 6H, N(<u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.54 ((<u>C</u> O)N <u>H</u>), 150.63 (<u>C</u> O <u>C</u> H ₂), 148.99 (<u>C</u> O <u>C</u> H ₃), 144.67 (<u>C</u> N(<u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃) ₂), 137.22 (<u>C</u> <u>C</u> H ₂ O), 128.93, 128.43, 128.37, 128.24, 128.12 (Ar- <u>C</u>), 122.90 ((NH)C(<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂), 120.98 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 112.82 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> (OCH ₃)), 112.15 ((NH)C(<u>C</u> H <u>C</u> H) ₂), 111.41 ((CO)C <u>C</u> H <u>C</u> H), 70.25 (O <u>C</u> H ₂), 56.09 (O <u>C</u> H ₃), 44.22 (N(<u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃) ₂), 12.89 (N(<u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃) ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₃ : 404.50 g/mol; gefunden: 404.4 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3272.64, 2958.00, 1638.14, 1503.29, 1409.31, 1331.67, 1270.37, 1221.34 |

12.14 CM221: 4-Benzyloxy-3-methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-benzamid



Summenformel: $C_{22}H_{21}NO_4$

Molare Masse: 363.41 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

246 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Methoxyanilin

1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

50 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 449 mg, 1.236 mol, 57 %, farbloser, wollartiger Feststoff

R_f: 0.71 (DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 210 °C

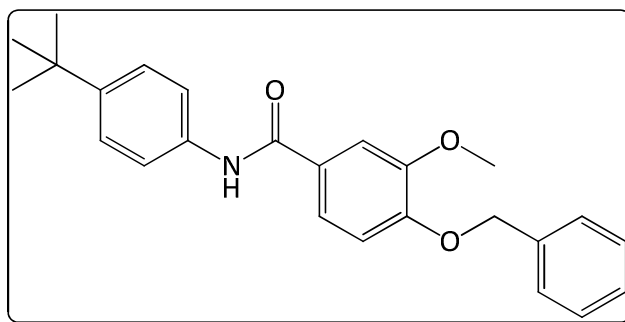
¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.96 (s, 1 H, (CO)NH), 7.64 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂)₂), 7.57 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.54 (d, ³J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), 7.49 – 7.34 (m, 5 H, OCH₂C((CHCH)₂(CH))), 7.16 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.93 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH)₂), 5.18 (s, 2 H, OCH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 3.74 (s, 3 H, (NH)C(CHCH)₂COCH₃)

^{13}C -NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.93 ($\underline{\text{C}}\text{O}$ NH), 155.88 ((NH)(CHCH) $\underline{\text{C}}$ OCH $\underline{\text{C}}$) 150.82 ($\underline{\text{C}}$ OCH $\underline{\text{C}}$), 149.02 ($\underline{\text{C}}$ OCH $\underline{\text{C}}$), 137.18 ($\underline{\text{C}}$ CH $\underline{\text{C}}$ O), 132.74 ((CO)N $\underline{\text{C}}$), 128.94, 128.45, 128.38, 127.83 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 122.53 ((NH)C($\underline{\text{C}}$ H $\underline{\text{C}}$) $\underline{\text{C}}$), 121.13 ((CO)C $\underline{\text{C}}$ HCH), 114.14 ((NH)C(CH $\underline{\text{C}}$ H) $\underline{\text{C}}$), 112.84 ((CO)C $\underline{\text{C}}$ HC(OCH $\underline{\text{C}}$)), 111.60 ((CO)CCH $\underline{\text{C}}$ H), 70.26 (O $\underline{\text{C}}$ H $\underline{\text{C}}$), 56.11 (O $\underline{\text{C}}$ H $\underline{\text{C}}$), 55.61 (NH((CHCH) $\underline{\text{C}}$)CO $\underline{\text{C}}$ H $\underline{\text{C}}$)

FD-MS: Berechnet für C₂₂H₂₁NO₄: 363.41 g/mol; gefunden: 363.2 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317.59, 3007.04, 2933.48, 2835.41, 1642.22, 1597.28, 1580.93, 1499.21, 1466.52, 1417.48, 1372.53, 1315.32, 1266.29, 1217.25

12.15 CM224: 4-Benzyloxy-*N*-(4-*tert*-butylphenyl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₅H₂₇NO₃

Molare Masse: 389.49 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

359 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-*tert*-Butylanilin

1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

50 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 193 mg, 496 μ mol, 25 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.82 (DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 108 °C

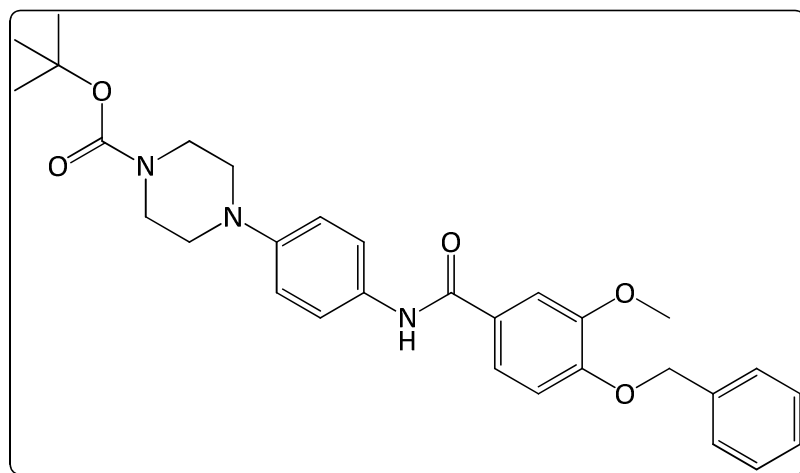
¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.02 (s, 1 H, (CO)NH), 7.66 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂)₂), 7.58 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH₂), 7.54 (d, ³J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH₂)(C(OCH₃))), 7.49 – 7.34 (m, 5 H, OCH₂C((CH₂)₂CH₂)), (NH)C(CH₂)₂, 7.16 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCH₂), 5.18 (s, 2 H, OCH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 1.28 (d, 9 H, CH(CH₃)₃)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.42 ((CO)NH), 151.19 (COCH₂), 149.32 (COCH₃), 146.53 (C(CH₃)₃), 137.45 (CCH₂O), 129.22 ((CO)NC), 128.73, 128.66, 128.07 (Ar-C), 125.92 ((NH)C(CH₂)₂), 121.51 ((CO)CCH₂), 120.92 ((NH)CC(CH₂)₂), 113.11 ((CO)CCH₂(OCH₃)), 111.96 ((CO)CCH₂), 70.54 (CH₂), 56.40 (CH₃), 34.80 (C(CH₃)₃), 31.97 ((CH₃)₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₅H₂₇NO₃: 389.49 g/mol; gefunden: 389.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3268.56, 3064.25, 2958.00, 2859.93, 1646.31, 1593.19, 1576.84, 1503.29, 1466.52, 1413.39, 1388.88, 1327.58, 1266.29, 1217.25

12.16 CM228: 4-(4-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzamido)phenyl)-piperazin-1-*tert*-butylcarboxylat



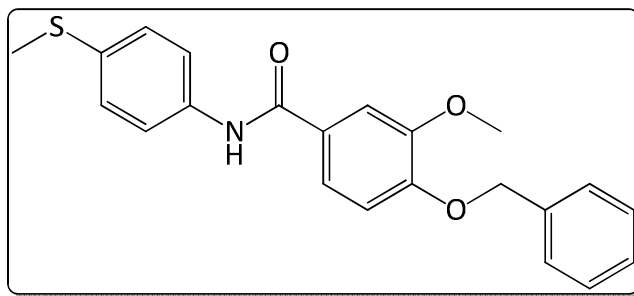
12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|--|
| Summenformel: | C ₃₀ H ₃₅ N ₃ O ₅ |
| Molare Masse: | 517.62 g/mol |
| Methode: | A4 |
| Ansatz: | 387 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 398 mg, 1.50 mmol (1.0 Äq.) <i>tert</i> -Butyl-4-(4-aminophenyl)piperazin-1-carboxylat 758 mg, 1.04 ml, 7.5 mmol (5 Äq.) Triethylamin 1.064 g, 1.07 ml, 1.8 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 55 mg, 106 mmol, 7 %, blassgelber Feststoff |
| R _f : | 0.73 (DCM/MeOH 10:1) |
| Schmelzpunkt: | 175 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.91 (s, 1 H, (CO)NH), , 7.61 – 7.34 (m, 9 H (CO)CCHCH, (CO)C(CH)(C(OCH ₃)), OCH ₂ C((CHCH) ₂ (CH)), (NH)C(CH) ₂), 7.15 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.95 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂), 5.17 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 3.45 (m, 4 H, N(CH ₂ CH ₂) ₂ N(CO)), 3.05 (m, 4 H, N(CH ₂ CH ₂) ₂ N(CO)), 1.42 (d, 9 H, (CO)OC(CH ₃) ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.98 ((CO)NH), 150.85 (COCH ₂), 149.02 (COCH ₃), 143.26 ((CO)OC(CH ₃) ₃), 139.96 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂ N(CO)), 137.15 (CCH ₂ O), 133.35 ((CO)(NH)C), 128.94, 128.45, 128.37, 127.77 (Ar-C), 121.16 ((CO)CCHCH), 117.06 ((NH)CC(CH ₂) ₂), 114.13 ((NH)C(CH) ₂), 112.82 ((CO)CCHC(OCH ₃)), 111.60 ((CO)CCHCH), 109.98 (OC(CH ₃) ₃), 70.25 (OCH ₂), 64.63 (N(CH ₂ CH ₂) ₂ N(CO)), 64.41 (N(CH ₂ CH ₂) ₂ N(CO)), 56.11 (OCH ₃), 28.52 (OC(CH ₃) ₃) |

FD-MS: Berechnet für C₃₀H₃₅N₃O₅: 517.62 g/mol; gefunden: 517.5 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3342.11, 290.26, 1691.26, 1646.31, 1585.02, 1503.29, 1421.57, 1323.50, 1221.34

12.17 CM229: 4-Benzoyloxy-3-methoxy-N-(4-(methylthio)phenyl)-benzamid



Summenformel: C₂₂H₂₁NO₃S

Molare Masse: 379.47 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzoyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

279 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) (4-Methylthio)anilin

1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

50 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 151 mg, 398 mmol, 20 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.82(DCM/MeOH 19:1)

Schmelzpunkt: 215 °C

¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.08 (s, 1 H, (CO)NH), 7.72 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1 Hz, 2 H, (CHCH)₂CS), 7.57 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H,

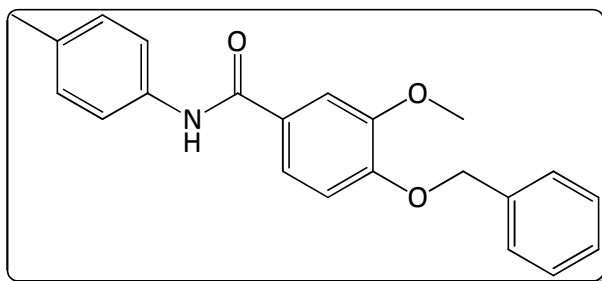
(CO)CCHCH), 7.54 (d, $^3J = 2$ Hz, 1 H, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), 7.49 – 7.34 (m, 5 H, OCH₂C((CHCH)₂(CH))), 7.26 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 1$ Hz, 2 H, (CHCH)₂CS), 7.17 (d, $^3J = 8$ Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 5.18 (s, 2 H, OCH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 2.46 (s, 3 H, SCH₃)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.22 ((CO)NH), 150.98 (COCH₂), 149.04 (COCH₃), 137.19 (CCH₂O), 137.15 ((CO)NC), 132.54 (CSCH₃), 128.94, 128.46, 128.38, 127.64 (Ar-C), 127.27 ((NH)C(CHCH)₂), 121.50 ((NH)C(CH₂)₂), 121.28 ((CO)CCHCH), 112.84 ((CO)CCHC(OCH₃)), 111.66 ((CO)CCHCH), 70.26 (OCH₂), 56.12 (OCH₃), 15.88 (SCH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₂H₂₁NO₃S: 379.47 g/mol; gefunden: 379.3 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317.59, 3027.47, 2933.48, 2361.41, 1642.22, 1580.93, 1503.29, 1454.26, 1413.39, 1397.05, 1372.52, 1311.24, 1311.24, 1266.29, 123.68

12.18 CM230: 4-Benzyloxy-N-(4-methylphenyl)-3-methoxybenzamid



Summenformel: C₂₂H₂₁NO₃

Molare Masse: 347.41 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 516 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

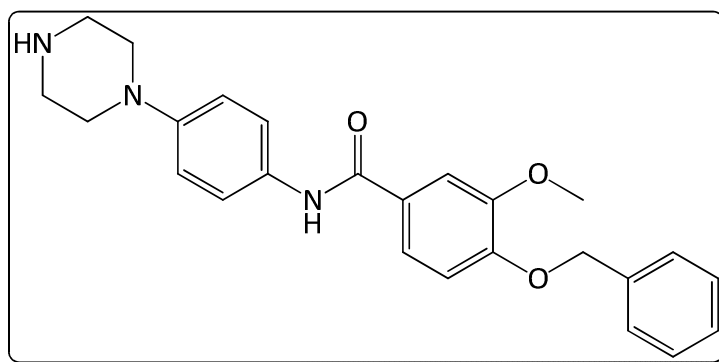
214 mg, 2.00 mmol (1.0 Äq.) 4-Methylanilin

1.014 g, 1.40 ml, 10 mmol (5 Äq.) Triethylamin

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| | 1.53 g, 1.55 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%) |
| | 50 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 170 mg, 489 µmol, 24 %, farbloser Feststoff |
| R _f : | 0.78 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 178 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.00 (s, 1 H, (CO)NH), 7.64 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂ CH ₂)), 7.57 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ CH), 7.54 (d, ³ J = 2 Hz, 1 H, (CO)C(CH ₂)(C(OCH ₃))), 7.49 – 7.34 (m, 5 H, OCH ₂ C((CH ₂ CH ₂) ₂ (CH))), 7.16 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCH ₂ CH), 7.15 (m, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 1 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂) ₂), 5.18 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 2.27 (s, 3 H, CCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 165.14 ((CO)NH), 150.89 (COCH ₂), 149.02 (COCH ₃), 137.17 (CCH ₂ O), 134.28 ((CO)NC), 132.87 (CCH ₃), 129.43 ((NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 128.94, 128.45, 128.37, 127.82 (Ar-C), 121.22 ((CO)CCH ₂ CH), 120.93 ((NH)C(CH ₂) ₂), 112.84 ((CO)CCH ₂ C(OCH ₃)), 111.65 ((CO)CCH ₂ CH), 70.26 (CH ₂), 56.11 (OCH ₃), 20.96 (CCH ₃) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₂ H ₂₁ NO ₃ : 347.41 g/mol; gefunden: 347.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3321.68, 3072.42, 3031.55, 2917.14, 2872.19, 2843.59, 1646.31, 1589.10, 1519.64, 1503.29, 1458.34, 1421.57, 1380.70, 1335.75, 1315.32, 1266.29, 1233.60, 1213.17 |

12.19 CM240: 4-(Benzyloxy)-3-methoxy-N-(4-(piperazin-1-yl)-phenyl)benzamid



Summenformel: $C_{25}H_{27}N_3O_3$

Molare Masse: 417.50 g/mol

Methode: G1

Ansatz: 129 mg, 0.249 mmol 4-(4-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzamido)-phenyl)piperazin-1-*tert*-butylcarboxylat (CM228)

25 ml DCM/Trifluoressigsäure 1:1

Ausbeute: 99 mg, 0.236 mmol, 95 %, hellgelber Feststoff

R_f: 0.42 (DCM/MeOH 3:1)

Schmelzpunkt: 232 °C

¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.94 (s, 1 H, (CO)NH), 7.60 – 7.55 (m, 4 H (CO)CCHCH, (CO)C(CH)(C(OCH₃))), (NH)C(CH₂)₂, 7.47 – 7.30 (m, 5 H, OCH₂C((CHCH)₂(CH)), 7.13 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.91 (d, ³J = 9 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH)₂), 5.15 (s, 2 H, OCH₂), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 3.03 (m, 4 H, CN(CH₂CH₂)₂NH), 2.87 (m, 4 H, CN(CH₂CH₂)₂NH)

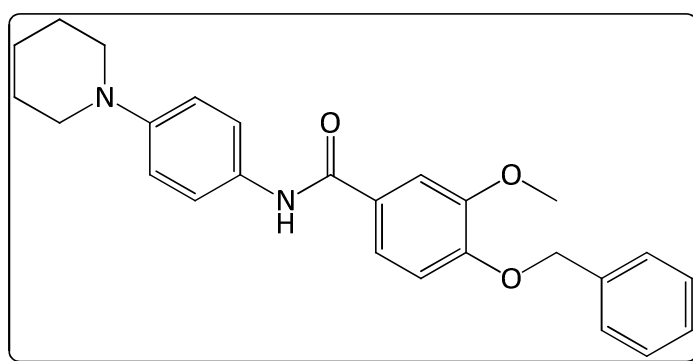
¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.93 ((CO)NH), 150.74 (COCH₂), 148.98 (COCH₃), 148.32 (CN(CH₂CH₂)₂NH), 137.09 (CCH₂O), 131.51 ((CO)NC), 128.90, 128.43, 128.32, 127.86 (Ar-C), 122.15 ((NH)C(CH₂)₂), 121.12 ((CO)CCHCH), 116.00 ((NH)C(CHCH)₂), 112.82 ((CO)CCHC(OCH₃)),

111.60 ((CO)CCH₂CH), 70.23 (OCH₂), 56.04 (OCH₃), 49.59
(CN(CH₂CH₂)₂NH), 45.55 (CN(CH₂CH₂)₂NH)

FD-MS: Berechnet für C₂₅H₂₇N₃O₃: 417.50 g/mol; gefunden: 417.4 g/mol

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293.08, 2823.16, 1638.14, 1585.02, 1503.29, 1454.26,
1319.41, 1270.37, 1213.17

12.20 CM248: 4-(Benzyloxy)-3-methoxy-N-(4-(piperidin-1-yl)-phenyl)benzamid



Summenformel: C₂₆H₂₈N₂O₃

Molare Masse: 416.51 g/mol

Methode: A4

Ansatz: 258 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure
(CM135)

177 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.) 4-(Piperidin-1-yl)anilin (CM247)

507 mg, 0.7 ml, 5 mmol (5 Äq.) Triethylamin

0.77 g, 0.78 ml, 1.2 mmol (1.2 Äq.) PPA/DCM (50 wt-%)

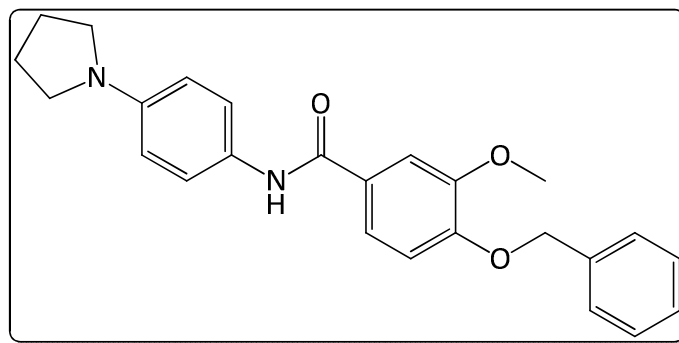
25 ml DCM

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 267 mg, 64 mmol, 64 %, weißer Feststoff

| | |
|----------------------|---|
| R _f : | 0.75 (DCM/MeOH 19:1) |
| Schmelzpunkt: | 233 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.87 (s, 1 H, (CO)NH), 7.56 (m, 4 H, (CO)CCHCH, (CO)C(CH)COCH ₃ , (NH)C(CH) ₂), 7.48 – 7.35 (m, 5 H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ (CH)),), 7.15 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.91 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂), 5.18 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 3.08 (m, 4 H, CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.61 (m, 4 H, CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.52 (m, 2 H, CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.76 ((CO)NH), 149.71 (COCH ₂), 148.64 (COCH ₃), 142.71 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂), 137.20 (CCH ₂ O), 130.72 ((CO)C), 129.14 ((CO)NC), 128.94, 128.45, 128.37 (Ar-C), 126.76 ((NH)C(CH) ₂), 122.07 ((CO)CCHCH), 116.46 ((NH)C(CHCH) ₂), 112.27 ((CO)CCHC(OCH ₃)), 111.57 ((CO)CCHCH), 70.25 (OCH ₂), 56.11 (OCH ₃), 50.51 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 25.79 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 18.42 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₃ : 416.51 g/mol; gefunden: 416.4 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3350.28, 2941.66, 1650.40, 1580.93, 1511.46, 1409.31, 1315.32, 1217.25 |

12.21 CM253: 4-(Benzyloxy)-3-methoxy-N-(4-(pyrrolidin-1-yl)-phenyl)benzamid

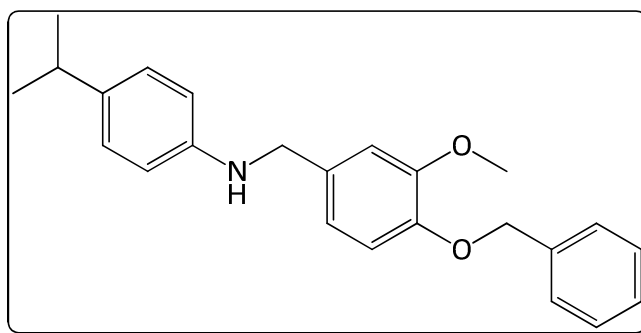


| | |
|---------------|---|
| Summenformel: | C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃ |
| Molare Masse: | 402.49 g/mol |

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|--|
| Methode: | A5 |
| Ansatz: | 516 mg, 2.0 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzoyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135) 356 mg, 2.2 mmol (1.1 Äq.) 4-(Pyrrolidin-1-yl)anilin 1.516 g, 4.0 mmol (2 Äq.) 2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) 2.068 g, 2.72 ml, 16.0 mmol (8.0 Äq.) <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA) 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 505 mg, 1.255 mmol, 63 %, grauer Feststoff |
| R _f : | 0.73 (DCM) |
| Schmelzpunkt: | 125 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 9.79 (s, 1 H, (CO)NH), 7.56 – 7.35 (m, 9 H, (CO)CCHCH, (CO)C(CH)COCH ₃ , OCH ₂ C((CHCH) ₂ (CH)), (CO)NC(CH) ₂), 7.14 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 6.52 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, NC(CHCH) ₂), 5.17 (s, 2 H, OCH ₂), 3.85 (s, 3 H, OCH ₃), 3.21 (m, 4 H, CN(CH ₂ CH ₂) ₂), 1.95 (m, 4 H, CN(CH ₂ CH ₂) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 164.52 ((CO)NH), 150.55 (COCH ₂), 148.98 (COCH ₃), 141.51 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂), 137.22 (CCH ₂ O), 128.94 ((CO)C), 128.94, 128.44, 128.38, 128.26 (Ar-C), 126.74 ((NH)C(CH) ₂), 122.80 ((CO)CCHCH), 118.61 ((NH)C(CHCH) ₂), 112.75 ((CO)CCHC(OCH ₃)), 111.76 ((CO)CCHCH), 70.21 (OCH ₂), 56.09 (OCH ₃), 47.93 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂), 25.41 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₃₀ H ₃₅ N ₃ O ₅ : 402.49 g/mol; gefunden: 402.3 g/mol |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3329.85, 3068.33, 2962.09, 2868.10, 2839.50, 1638.14, 1580.93, 1519.40, 1503.29, 1466.52, 1421.57, 1360.27, 1315.32, 1266.29, 1217.25 |

12.22 CM160: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-isopropylanilin



Summenformel: $C_{24}H_{27}NO_2$

Molare Masse: 361.48 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 188 mg, 0.5 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-isopropylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM156)

3.5 ml, 3.5 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 117 mg, 0.323 mmol, 65 %, brauner Feststoff

R_f: 0.76 (DCM/MeOH 99:1)

Schmelzpunkt: 59 °C

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.28 (m, 5 H, OCH₂C((CH₂CH)₂(CH))), 7.05 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH)₂), 6.93 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.83 (s, 2 H, CH₂OCC₂H), 6.59 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH)₂), 5.13 (s, 2 H, OCH₂), 4.20 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 2.81 (m, 1 H, CCH(CH₃)₂), 1.22 (d, ³J = 7 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂)

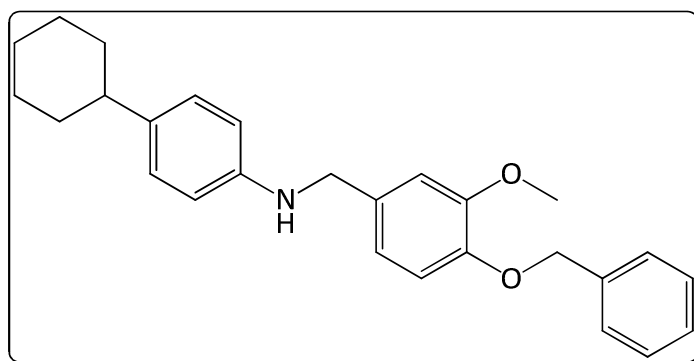
¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.83 (C=OCH₃), 147.37 (C=OCH₂), 146.29 ((NH)C(CH₂CH)₂), 138.27 (CCH(CH₃)₂), 137.25 (CCH₂O), 132.78 (CCH₂N)

128.64, 127.91, 127.35 (Ar-C), 127.20 ((NH)C(CH₂CH₂)₂), 119.79 (CH₂OCCH₂CH), 114.03 (CH₂OCCH₂CH), 113.10 ((NH)C(CH₂CH₂)₂), 111.42 (H₃COCCH₂), 71.11 (OCH₂), 56.03 (OCH₃), 48.71 ((NH)CH₂), 33.28 (CCH(CH₃)₂), 24.39 (CCH(CH₃)₂)

ESI-MS: Berechnet für C₂₄H₂₇NO₂: 361.48 g/mol; gefunden: 362.20 g/mol [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3378.89, 3035.64, 3011.12, 2949.83, 2917.14, 2868.10, 1617.71, 1593.10, 1515.55, 1466.52, 1417.48, 1376.62, 1360.27, 1315.32

12.23 CM161: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-cyclohexylanilin



Summenformel: C₂₇H₂₁NO₂

Molare Masse: 401.54 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 83 mg, 0.2 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-cyclohexylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM141)

1.4 ml, 1.4 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

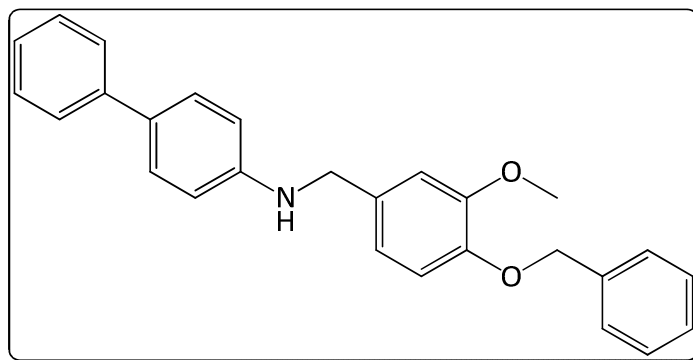
25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 48 mg, 120 μmol, 54 %, dunkelroter Feststoff

| | |
|----------------------|--|
| R _f : | 0.14 (DCM/PE 1:1) |
| Schmelzpunkt: | 94 °C |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 400 MHz), δ [ppm] = 7.44 – 7.30 (m, 5 H, OCH ₂ C(CH ₂ CH ₂) ₂ (CH)), 7.04 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 6.96 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.83 (s, 2 H, CH ₂ OCCH ₂ CH), 6.68 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 5.13 (s, 2 H, OCH ₂), 4.22 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.87 (s, 3 H, OCH ₃), 2.39 (m, 1 H, CCH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.83 – 1.81 (m, 4 H, CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 1.41 – 1.29 (m, 6 H, CH(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 100 MHz), δ [ppm] = 149.82 (C=OCH ₃), 147.58 (C=OCH ₂), 146.87 ((NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 137.19 (CCH ₂ O), 137.13 ((NH)(CH ₂ CH ₂) ₂ C), 132.53 (CCH ₂ N) 128.54, 127.82, 127.56, 127.26 (Ar-C), 120.27 (CH ₂ OCCH ₂ CH), 114.41 ((NH)C(CH ₂ CH ₂) ₂), 114.06 (CH ₂ OCCH ₂ CH), , 111.88 (H ₃ COCCH), 71.12 (OCH ₂), 56.04 (OCH ₃), 49.65 ((NH)CH ₂), 43.70 ((CH) ₂ C(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 34.70 ((CH) ₂ C(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 26.98 ((CH) ₂ C(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂), 26.20 ((CH) ₂ C(CH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₂₇ H ₂₁ NO ₂ : 401.54 g/mol; gefunden: 402.23 g/mol [M+H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3350.28, 2921.23, 2839.50, 1613.62, 1585.02, 1511.46, 1450.17, 1417.48, 1376.62, 1323.50 |

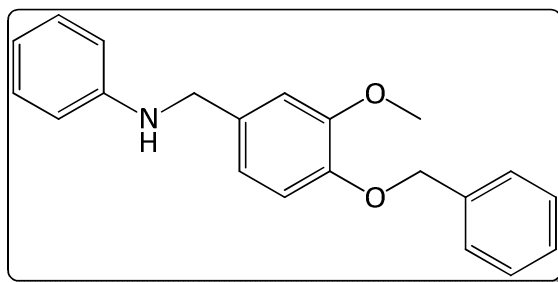
12.24 CM215: N-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-[1,1'-biphenyl]-4-amin



Summenformel: C₂₇H₂₅NO₂

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| Molare Masse: | 395.49 g/mol |
| Methode: | D1 |
| Ansatz: | 59 mg, 0.144 mmol (1.0 Äq.) <i>N</i> -([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-4-benzyloxy-3-methoxybenzamid (CM209) 1.0 ml, 1.0 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF) 25 ml Tetrahydrofuran |
| SC: | PE/DCM 2:1 → DCM |
| Ausbeute: | 38 mg, 0.098 mmol, 64 %, brauner Feststoff |
| R _f : | 0.77 (DCM) |
| Schmelzpunkt: | 124 °C |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.54 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH), 7.46 – 7.28 (m, 10 H, (NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH, OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH), 6.96 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.86 (s, 2 H, CH ₂ OCCH), 6.62 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH), 5.16 (OCH ₂) 4.29 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.89 (s, 3 H, OCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 149.83 (COCH ₃), 147.45 (COCH ₂), 143.12 (NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH, 141.13 ((NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH), 137.87 (CCH ₂ O), 131.87 (CCH ₂ N) 131.03 ((NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH), 129.33, 128.62, 127.90, 127.3 128.69, 128.59, 127.97, 127.87, 127.27, 126.35, 126.20 (Ar-C), 119.85 (CH ₂ OCCH), 113.97 ((NH)C(CHCH) ₂ CC(CHCH) ₂ CH), 113.64 (CH ₂ OCCH), 111.39 (H ₃ COCCH), 71.06 (OCH ₂), 56.03 (OCH ₃), 48.62 ((NH)CH ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₂₇ H ₂₅ NO ₂ : 395.49 g/mol; gefunden: 396.22 g/mol [M+H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3391.15, 3064.25, 3035.64, 2966.17, 2929.40, 2868.10, 2839.50, 2157.09, 1977.30, 1883.31, 1679.00, 1605.45, 1593.19, 1511.46, 1495.12, 1454.26, 1417.48, 1384.79, 1323.50, |

12.25 CM216: N-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)anilinSummenformel: $C_{21}H_{21}NO_2$

Molare Masse: 319.40 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 140 mg, 0.42 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxy-N-phenylbenzamid (CM167)

3.0 ml, 3.0 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 2:1 → DCM

Ausbeute: 86 mg, 0.239 mmol, 64 %, blassgelber Feststoff

R_f: 0.31 (PE/DCM 1:1)

Schmelzpunkt: 75 °C

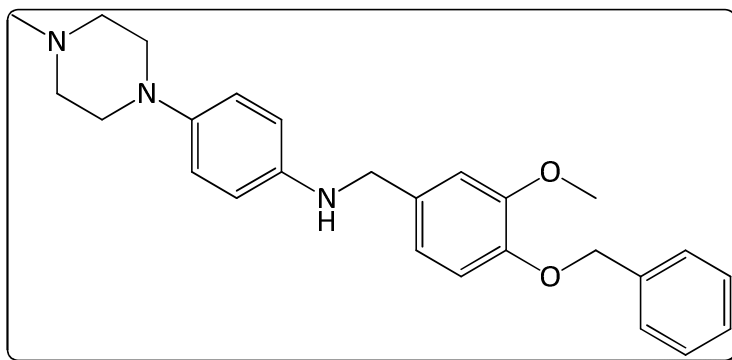
¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.35 – 7.19 (m, 5 H, OCH₂C(CH₂CH₂)₂(CH)), 7.17 (t, ³J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 6.82 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.73 (s, 2 H, CH₂OCCH₂CH), 6.62 (t, ³J = 7 Hz, 1 H, (NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 6.53 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 5.03 (s, 2 H, OCH₂), 4.12 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.76 (s, 3 H, OCH₃)

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.83 (C=OCH₃), 148.28 ((NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 147.36 (C=OCH₂), 137.25 (CCH₂O), 132.58 (CCH₂N), 129.33, 128.62, 127.90, 127.34 (Ar-C), 119.71 (CH₂OCCH₂CH), 117.63 ((NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 114.04 (CH₂OCCH₂CH), 112.93 ((NH)C(CH₂CH₂)₂CH), 111.33 (H₃COCCH), 71.10 (OCH₂), 56.02 (OCH₃), 48.26 ((NH)CH₂)

ESI-MS: Berechnet für C₂₁H₂₁NO₂: 319.40 g/mol; gefunden: 342.14 g/mol
[M+Na⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3374.80, 3074.90, 3002.95, 2937.57, 2868.10, 2831.33, 2365.49, 2157.09, 1977.30, 1826.11, 1638.14, 1601.36, 1507.38, 1458.34, 1429.74, 1380.70, 1315.32

12.26 CM235: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilin



Summenformel: C₂₆H₃₁N₃O₂

Molare Masse: 417.54 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 44 mg, 0.102 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-(*N*,*N*'-dimethylamino)phenyl)-3-methoxybenzamid (CM214)

0.7 ml, 0.7 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 2:1 → DCM

Ausbeute: 22 mg, 0.033 mmol, 32 %, dunkelgelbes Öl

R_f: 0.20 (DCM/MeOH 99:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, OCH₂C((CH₂)₂CH)), 6.93 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.88 – 6.83 (m, 4 H, CH₂OCCH₂, (NH)C(CH₂)₂CN(CH₂CH₂)₂NCH₃), 6.63 (d, ³J = 7 Hz, 2 H,

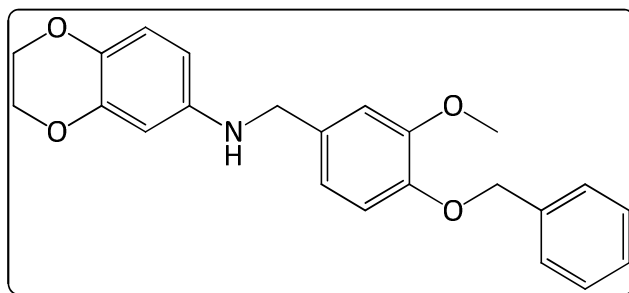
(NH)C(CH₂CH₂)₂CN(CH₂CH₂)₂NCH₃, 5.15 (OCH₂) 4.20 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.87 (s, 3 H, OCH₃), 3.51 – 3.38 (m, 4 H, C(NH)(CH₂CH₂)₂NCH₃), 3.01 – 3.86 (m, 4 H, CN(CH₂CH₂)₂NCH₃), 2.69 (s, 3 H, (NH)CH₃)

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.73 (C=OCH₃), 147.31 (C=OCH₂), 144.56 (CN(CH₂CH₂)₂NCH₃), 137.02 (CCH₂O), 138.91 ((NH)C(CHCH)₂), 133.71 (CCH₂N), 128.63, 128.51, 127.88 (Ar-C), 124.86 ((NH)C(CHCH)₂), 119.89 (CH₂OCCHCH), 118.79 ((NH)C(CHCH)₂), 117.44 (CH₂OCCHCH), 112.83 (H₃COCCH), 71.03 (OCH₂), 56.04 (OCH₃), 51.94 ((NH)(CH₂CH₂)₂NCH₃), 50.17 ((NH)(CH₂CH₂)₂NCH₃), 48.34 ((NH)CH₂), 45.84 (NCH₃)

FD-MS: Berechnet für C₂₆H₃₁N₃O₂: 417.54 g/mol; gefunden: 440.32 g/mol [M+Na⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3071.53, 3052.15, 2937.56, 2868.10, 2819.52, 2392.82, 2157.09, 1972.25, 1826.31, 1638.19, 1595.23, 1506.62, 1459.25, 1429.74, 1378.53, 1315.32

12.27 CM236: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-amin



Summenformel: C₂₃H₂₃NO₄

Molare Masse: 377.43 g/mol

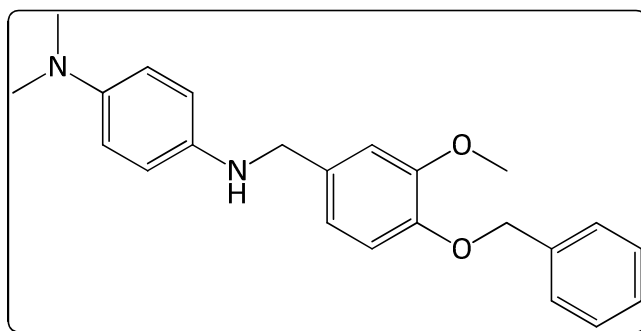
Methode: D1

Ansatz: 190 mg, 0.485 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(2,3-dihydrobenzo-1,4-dioxin-6-yl)-3-methoxybenzamid (CM219)

3.4 ml, 3.4 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

| | |
|----------------------|---|
| | 25 ml Tetrahydrofuran |
| SC: | PE/DCM 2:1 → DCM |
| Ausbeute: | 73 mg, 0.199 mmol, 41 %, dunkelrotes Öl |
| R _f : | 0.68 (DCM/MeOH 99:1) |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.46 – 7.31 (m, 5 H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH)), 6.94 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.83 (s, 2 H, CH ₂ OCCHCH), 6.72 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)CCHCH), 6.23 (m, 2 H, (NH)C(CH) ₂), 5.15 (OCH ₂), 4.19 (m, 4H, OCH ₂ CH ₂ O), 4.16 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 149.75 (COCH ₃), 147.35 (COCH ₂), 144.03 ((NH)CCHCO), 142.71 (NC), 137.21 (CCH ₂ O), 136.05 ((NH)CCHCHCO), 132.26 (CCH ₂ N), 128.57, 127.85, 127.29 (OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH), 119.82 (CH ₂ OCCHCH), 117.66 ((NH)CCHCHCO), 113.94 (CH ₂ OCCHCH), 111.42 (H ₃ COCCH), 107.20 ((NH)CCHCH), 102.05 ((NH)CCHCO), 71.04 (OCH ₂), 64.73, 64.19 (OCH ₂ CH ₂ O), 55.99 (OCH ₃), 49.24 ((NH)CH ₂) |
| FD-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₃ NO ₄ : 377.43 g/mol; gefunden: 378.19 g/mol [M+H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3031.55, 2966.17, 2868.10, 2161.18, 1621.79, 1597.28, 1511.46, 1458.34, 1417.48, 1368.44, 1323.50 |

12.28 CM237: N¹-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-N⁴,N⁴-dimethylbenzol-1,4-diamin

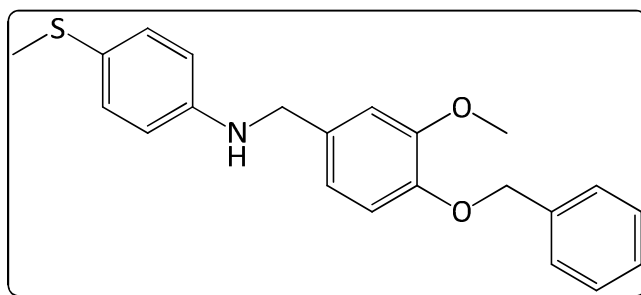


Summenformel: C₂₃H₂₆N₂O₂

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| Molare Masse: | 362.46 g/mol |
| Methode: | D1 |
| Ansatz: | 75 mg, 0.206 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy- <i>N</i> -(4-(<i>N</i> ', <i>N</i> '-dimethylamino)phenyl)-3-methoxybenzamid (CM214) 1.4 ml, 1.4 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF) 25 ml Tetrahydrofuran |
| SC: | PE/DCM 2:1 → DCM |
| Ausbeute: | 33 mg, 0.031 mmol, 44 %, dunkelrotes Öl |
| R _f : | 0.18 (DCM/MeOH 99:1) |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH)), 6.99 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.92 (s, 2 H, CH ₂ OCCCHCH), 6.70 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CN(CH ₃) ₂), 6.67 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CN(CH ₃) ₂), 5.16 (OCH ₂) 4.23 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃), 3.07 (s, 6 H, N(CH ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 149.48 (COCH ₃), 147.46 (COCH ₂), 144.13 (CN(CH ₃) ₂), 137.00 (CCH ₂ O), 136.93 ((NH)C(CHCH) ₂), 134.84 (CCH ₂ N), 128.76, 128.59, 127.91 (Ar-C), 124.34 (NC(CHCH) ₂), 122.37 (CH ₂ OCCCHCH), 118.17 ((NH)C(CHCH) ₂), 117.34 (CH ₂ OCCCHCH), 113.77 (H ₃ COCCH), 71.01 (OCH ₂), 56.09 (OCH ₃), 48.83 ((NH)CH ₂), 40.38 (N(CH ₃) ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ : 362.46 g/mol; gefunden: 362.21 |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3064.25, 3027.47, 2962.09, 2921.23, 2847.67, 2447.22, 2357.32, 2332.80, 1740.30, 1646.31, 1601.36, 1507.38, 1450.17, 1421.57, 1380.70 |

12.29 CM241: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-(methylthio)anilin



Summenformel: $C_{22}H_{23}NO_2S$

Molare Masse: 365.49 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 70 mg, 0.184 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxy-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamid (CM229)

1.3 ml, 1.3 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 2:1 → DCM

Ausbeute: 36 mg, 0.038 mmol, 54 %, braunes Öl

R_f: 0.66 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.28 (m, 5 H, OCH₂C((CHCH)₂(CH))), 7.21 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH₂)), 6.92 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.83 (s, 2 H, CH₂OCCHCH), 6.61 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH)₂), 5.15 (s, 2 H, OCH₂), 4.22 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 2.41 (s, 3 H, SCH₃)

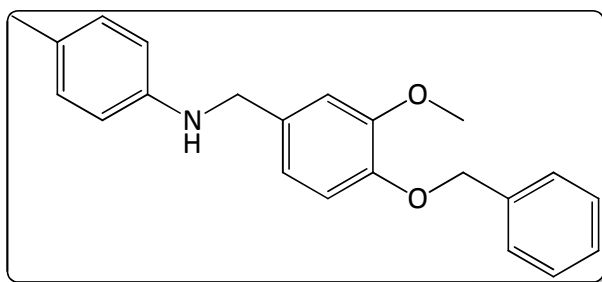
¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.81 (C=OCH₃), 147.45 (C=OCH₂), 146.38 ((NH)C(CHCH)₂), 137.14 (CCH₂O), 131.77 (CCH₂N), 131.26 ((NH)C(CHCH)₂), 128.59, 127.87, 127.26 (Ar-C), 125.14 (CSCH₃), 119.79 (CH₂OCCHCH), 113.95 (CH₂OCCHCH), 111.33 (H₃COCCH), 71.05 (OCH₂),

56.02 (OCH₃), 55.78 ((NH)C(CHCH)₂COCH₃), 48.54 ((NH)CH₂), 19.00 (SCH₃)

ESI-MS: Berechnet für C₂₂H₂₃NO₂S: 365.49 g/mol; gefunden: 366.28 [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3897.84, 3844.72, 3730.31, 3644.49, 3031.55, 2917.14, 2357.32, 2336.89, 1711.69, 1617.71, 1540.07, 1503.29,

12.30 CM242: *N*-(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-methylanilin



Summenformel: C₂₂H₂₃NO₂

Molare Masse: 333.42 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 110 mg, 0.317 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-methylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM230)

2.2 ml, 2.2 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 63 mg, 0.139 mmol, 54 %, hellbrauner Feststoff

R_f: 0.78 (DCM/MeOH 99:1)

Schmelzpunkt: 65 °C

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.44 – 7.28 (m, 5 H, OCH₂C(CH₂)₂(CH)), 6.99 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂)₂), 6.92 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.82 (s,

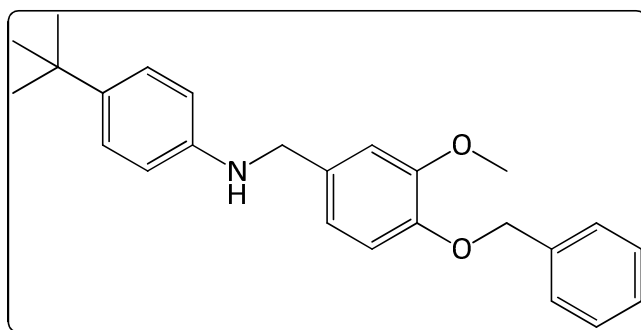
2 H, CH₂OCCH₂CH), 6.55 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CH₂CH)₂), 5.12 (s, 2 H, OCH₂), 4.19 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 2.24 (s, 3 H, CCH₃)

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.81 (COCH₃), 147.31 (COCH₂), 146.06 ((NH)C(CH₂CH)₂), 137.28 (CCH₂O), 132.82 (CCH₂N) 129.81, 128.62, 127.90, 127.34 (Ar-C), 126.80 (CCH₃), 119.69 (CH₂OCCH₂CH), 114.02 (CH₂OCCH₂CH), 113.12 ((NH)C(CH₂CH)₂), 111.34 (H₃COCCH₂), 71.09 (OCH₂), 56.01 (OCH₃), 48.62 ((NH)CH₂), 20.52 (CCH₃)

ESI-MS: Berechnet für C₂₂H₂₃NO₂: 333.42 g/mol; gefunden: 334.18 g/mol [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3395.23, 3039.73, 2921.23, 2868.10, 1814.98, 1875.14, 1801.59, 1617.71, 1589.10, 1515.55, 1454.26, 1417.48, 1384.79, 1360.27, 1331.67, 1307.15

12.31 CM243: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-(*tert*-butyl)-anilin



Summenformel: C₂₅H₂₉NO₂

Molare Masse: 375.50 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 76 mg, 0.195 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-*tert*-butylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM224)

1.4 ml, 1.4 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 23 mg, 0.031 mmol, 31 %, dunkelbrauner Feststoff

R_f: 0.26 (PE/DCM 1:1)

Schmelzpunkt: 71 °C

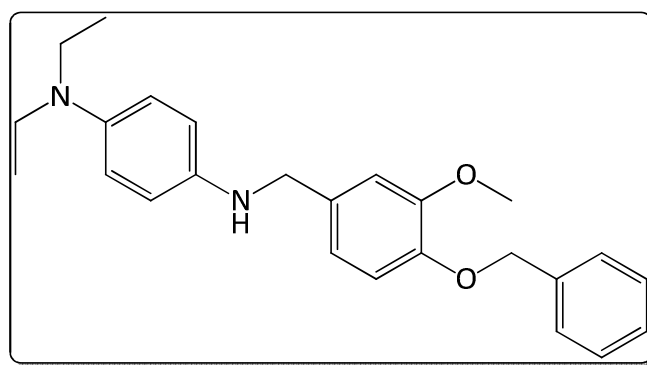
¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.44 – 7.28 (m, 5 H, OCH₂C((CHCH)₂(CH))), 7.21 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH₂)), 6.93 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.83 (s, 2 H, CH₂OCCHCH), 6.61 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH)₂), 5.14 (s, 2 H, OCH₂), 4.21 (s, 2 H, (NH)CH₂), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 1.27 (s, 3 H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 149.77 (C=OCH₃), 147.35 (C=OCH₂), 145.63 ((NH)C(CHCH)₂), 140.69 (C(CH₃)₃), 137.23 (CCH₂O), 132.56 (CCH₂N) 128.59, 127.86, 127.29 (Ar-C), 126.08 ((NH)C(CHCH)₂), 119.81 (CH₂OCCHCH), 113.96 (CH₂OCCHCH), 112.89 ((NH)C(CHCH)₂), 111.43 (H₃COCCH), 71.08 (OCH₂), 48.77 ((NH)CH₂), 33.93 (C(CH₃)₃), 31.59 (C(CH₃)₃)

ESI-MS: Berechnet für C₂₅H₂₉NO₂: 375.50 g/mol; gefunden: 376.24 g/mol [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3378.89, 3031.55, 3015.21, 2958.00, 2896.71, 2864.02, 1617.71, 1585.02, 1511.46, 1462.43, 1417.48, 1380.70, 1364.36, 1319.41

12.32 CM244: N¹-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-N⁴,N⁴-diethylbenzol-1,4-diamin

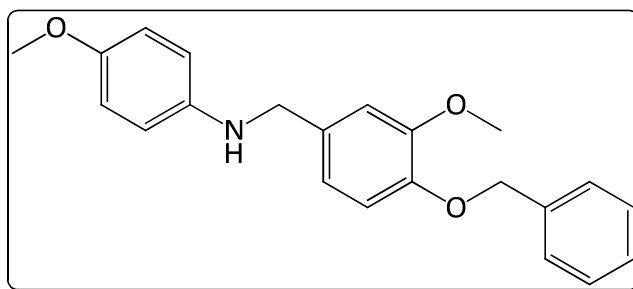


Summenformel: C₂₅H₃₀N₂O₂

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|---|
| Molare Masse: | 390.52 g/mol |
| Methode: | D1 |
| Ansatz: | 149 mg, 0.368 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy- <i>N</i> -(4-(diethylamino)phenyl)-3-methoxybenzamid (CM220) 2.6 ml, 2.6 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF) 25 ml Tetrahydrofuran |
| SC: | PE/DCM 2:1 → DCM |
| Ausbeute: | 26 mg, 0.037 mmol, 13 %, dunkelbraunes Öl |
| R _f : | 0.17 (DCM/MeOH 99:1) |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH)), 6.91 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.86 (s, 2 H, CH ₂ OCCCHCH), 6.70 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CN(CH ₂ CH ₃) ₂), 6.66 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂ CN(CH ₂ CH ₃) ₂), 5.16 (OCH ₂), 4.23 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃), 3.35 (q, ³ J = 7 Hz, 4 H, N(CH ₂ CH ₃) ₂), 1.21 (t, ³ J = 7 Hz, 6 H, N(CH ₂ CH ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 150.19 (COCH ₃), 147.65 (COCH ₂), 142.57 (CN(CH ₂ CH ₃) ₂), 137.01 (CCH ₂ O), 135.98 ((NH)C(CHCH) ₂), 135.31 (CCH ₂ N), 128.76, 128.61, 128.02 (Ar-C), 123.95 ((NH)C(CHCH) ₂), 122.06 (CH ₂ OCCCHCH), 116.46 (CH ₂ OCCCHCH), 115.45 ((NH)C(CHCH) ₂), 112.32 (H ₃ COCCH), 70.86 (OCH ₂), 56.08 (OCH ₃), 48.44 ((NH)CH ₂), 46.93 (N(CH ₂ CH ₃) ₂), 14.16 (N(CH ₂ CH ₃) ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₂ : 390.52 g/mol; gefunden: 391.24 g/mol [M+H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3338.02, 3060.16, 2921.23, 2851.76, 2463.56, 2357.32, 2336.89, 1728.04, 1674.91, 1593.19, 1511.46, 1450.17, 1421.57, 1384.79 |

12.33 CM245: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-methoxyanilin



Summenformel: $C_{22}H_{23}NO_3$

Molare Masse: 349.42 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 221 mg, 0.609 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxy-*N*-(4-methoxyphenyl)benzamid (CM221)

4.3 ml, 4.3 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 2:1 → DCM

Ausbeute: 43 mg, 0.133 mmol, 20 %, dunkelbraunes Öl

R_f: 0.73 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, OCH₂C(CHCH₂)₂(CH)), 6.95 (s, 1 H, H₃COCCH), 6.84 (s, 2 H, CH₂OCCHCH₂), 6.79 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH₂)₂), 6.63 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH₂)₂), 5.15 (s, 2 H, OCH₂), 4.20 (s, 2 H, NCH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 3.75 (s, 3 H, (NH)C(CHCH₂)₂COCH₃)

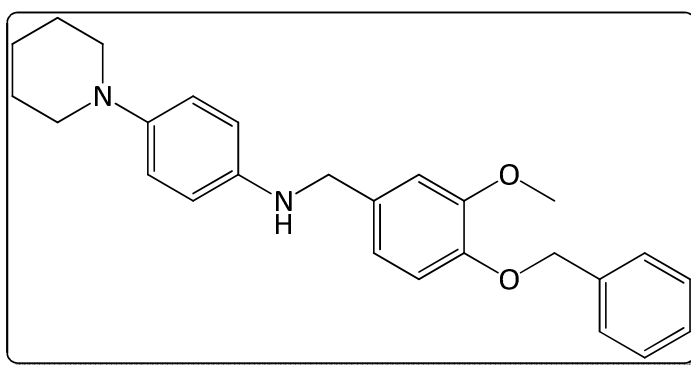
¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 153.06 ((NH)C(CHCH₂)₂COCH₃), 149.74 (COCH₃), 147.45 (COCH₂), 141.78 ((NH)C(CHCH₂)₂), 137.15 (CH₂O), 134.12 (CH₂N) 128.57, 127.84, 127.26 (Ar-C), 122.12 ((NH)C(CHCH₂)₂COCH₃), 120.12 (CH₂OCCHCH₂), 114.85

((NH)C(CH₂CH)₂COCH₃), 113.87 (CH₂OCCH₂CH), 111.63 (H₃COCCH₂), 71.03 (OCH₂), 56.02 (OCH₃), 55.78 ((NH)C(CH₂CH)₂COCH₃), 49.99 ((NH)CH₂)

ESI-MS: Berechnet für C₂₂H₂₃NO₃: 349.42 g/mol; gefunden: 350.17 g/mol [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3370.72, 3027.47, 2933.48, 2831.33, 2582.07, 2422.70, 2361.41, 1679.00, 1621.79, 1589.10, 1507.38, 1454.26, 1413.39, 1380.70,

12.34 CM254: *N*-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-(piperidin-1-yl)anilin



Summenformel: C₂₆H₃₀N₂O₂

Molare Masse: 402.53 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 83 mg, 0.139 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-*N*-(4-cyclohexylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM248)

1.0 ml, 1.0 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 22 mg, 0.034 mmol, 33 %, brauner Feststoff

R_f: 0.20 (PE/EE 1:1)

Schmelzpunkt: 90 °C

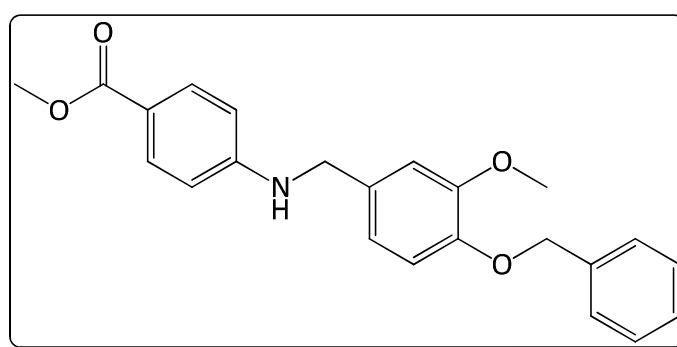
$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CHCH})_2(\text{CH})$), 6.93 (m, 3 H, H_3COCCH , $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 6.83 (s, 2 H, CH_2OCCHCH), 6.62 (d, $^3J = 8$ Hz, 2 H, $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 5.15 (s, 2 H, OCH_2), 4.19 (s, 2 H, $(\text{NH})\text{CH}_2$), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 3.00 (m, 4 H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.75 (m, 4 H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.56 (m, 2 H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 149.83 (COCH_3), 147.36 (COCH_2), 143.76 ($\text{CN}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 142.62 ($(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 137.30 (CCH_2O), 132.86 (CCH_2N), 128.65, 127.92, 127.35 (Ar-C), 119.79 ($(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 119.67 (CH_2OCCHCH), 114.04 (CH_2OCCHCH), 113.89 ($(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 113.57 (H_3COCCH), 71.43 (OCH_2), 56.79 (OCH_3), 53.26 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 49.04 ($(\text{NH})\text{CH}_2$), 26.04 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 24.09 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$)

ESI-MS: Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$: 402.53 g/mol; gefunden: 403.24 g/mol
[M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3391.15, 3039.73, 2962.09, 2929.40, 2843.59, 1609.53, 1589.10, 1515.55, 1462.43, 1417.48, 1376.62, 1331.67

12.34 CM257: 4-((4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)amino)benzoesäuremethylester



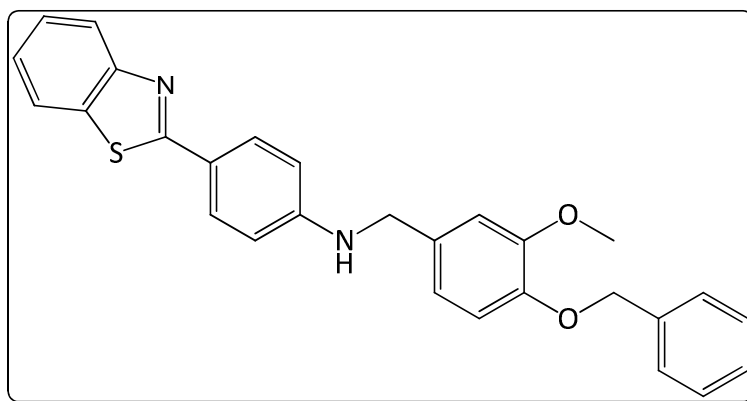
Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_4$

Molare Masse: 377.43 g/mol

Methode: D1

12 Synthetisierte Zielverbindungen

| | |
|----------------------|--|
| Ansatz: | 120 mg, 0.306 mmol (1.0 Äq.) 4-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzamido)benzoesäuremethylester (CM211) 2.1 ml, 2.1 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF) 25 ml Tetrahydrofuran |
| SC: | PE/DCM 2:1 → DCM |
| Ausbeute: | 24 mg, 0.063 mmol, 21 %, orangefarbenes Öl |
| R _f : | 0.56 (DCM) |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.44 – 7.29 (m, 5H, OCH ₂ C((CHCH) ₂ CH)), 7.00 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂), 6.97 (s, 1 H, H ₃ COCC _H), 6.81 (s, 2 H, CH ₂ OCCH _H), 6.65 (d, ³ J = 8 Hz, 2 H, (NH)C(CHCH) ₂), 5.13 (OCH ₂) 4.22 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃), 2.23 (s, 3 H, (CO)OCH ₃) |
| ¹³ C-NMR: | (CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 167.99 ((CO)OCH ₃), 152.60 ((NH)C(CHCH) ₂), 149.73 (COCH ₃), 147.51 (COCH ₂), 137.13 (CCH ₂ O), 134.02 (CCH ₂ N), 129.81 ((NH)C(CHCH) ₂ C), 128.56, 127.78, 127.25 (Ar-C), 120.24 (CH ₂ OCCH _H), 114.73 (CH ₂ OCCH _H), 113.84 ((NH)C(CHCH) ₂ C), 112.97 ((NH)C(CHCH) ₂ C), 111.71 (H ₃ COCC _H), 71.02 (OCH ₂), 56.03 (OCH ₃), 53.76 ((CO)OCH ₃) 47.84 ((NH)CH ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₂₃ H ₂₃ NO ₄ : 377.43 g/mol; gefunden: 334.21 g/mol [M-CO ₂ +H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3027.47, 2913.05, 2859.93, 2590.24, 2430.87, 2361.41, 1674.91, 1613.62, 1589.10, 1511.46, 1454.26, 1413.39, 1380.70, |

12.35 CM260: 4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-N-(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl)anilinSummenformel: $C_{28}H_{24}N_2O_2S$

Molare Masse: 452.57 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 51 mg, 0.109 mmol (1.0 Äq.) *N*-(4-(Benzothiazol-2-yl)phenyl)-4-benzyloxy-3-methoxybenzamid (CM218)

0.8 ml, 0.8 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 2:1 → DCM

Ausbeute: 20 mg, 0.063 mmol, 41 %, rotbrauner Feststoff

R_f: 0.79 (PE/DCM 1:1)

Schmelzpunkt: 106 °C

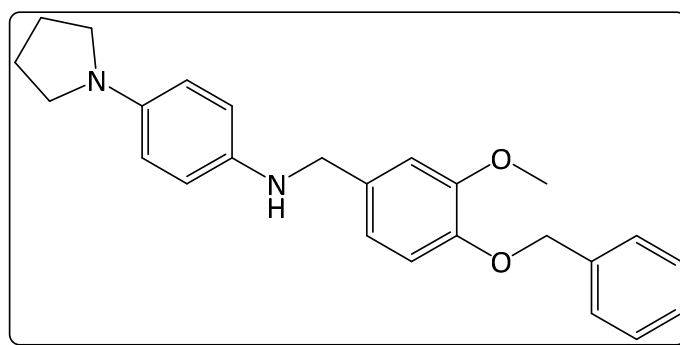
 $^1\text{H-NMR}$: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 8.02 (m, 2 H, SCCHCHCHCN), 7.48 – 7.30 (m, 9 H, $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$, SCCHCHCHCHCN , $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CHCH})_2\text{CH}$), 6.91 (s, 1 H, H_3COCCH), 6.84 (s, 2 H, CH_2OCCHCH), 6.71 (d, $^3J = 8$ Hz, 2 H, $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 5.16 (s, 2 H, OCH_2), 4.33 (s, 2 H, $(\text{NH})\text{CH}_2$), 3.88 (s, 3 H, OCH_3)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 160.29 (C₁), 156.43 ((NH)C(CH₂)₂), 152.60 (CCN₁C₁), 149.73 (C₂O), 147.51 (C₃O), 137.13 (C₄O), 134.77 (CC₁C₁), 131.33 (C₅H₂N), 129.81((NH)C(CH₂)₂), 129.45 (CCNC₁C₁), 129.45, 128.56, 127.84 (Ar-C), 126.44 (CCSC₁C₁), 122.63 (CCSC₁C₁), 120.79 (CCNC₁C₁), 120.24 ((CO)C₁C₁), 114.73 (CH₂OC₁C₁), 113.84 ((NH)C(CH₂)₂), 111.71 (H₃COC₁C₁), 71.02 (CH₂), 56.03 (CH₃) 49.72 ((NH)CH₂)

ESI-MS: Berechnet für C₂₃H₂₃NO₄: 452.57 g/mol; gefunden: 453.18 g/mol [M+H⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354.37, 3060.16, 3031.55, 2925.31, 2839.50, 2165.27, 1981.38, 1732.12, 1674.91, 1658.57, 1601.36, 1511.46, 1478.77, 1454.26, 1429.74, 1413.39, 1380.70, 1311.24

12.35 CM261: 4-(Benzyloxy)-3-methoxy-N-(4-(pyrrolidin-1-yl)-phenyl)benzamid



Summenformel: C₂₅H₂₆N₂O₃

Molare Masse: 388.50 g/mol

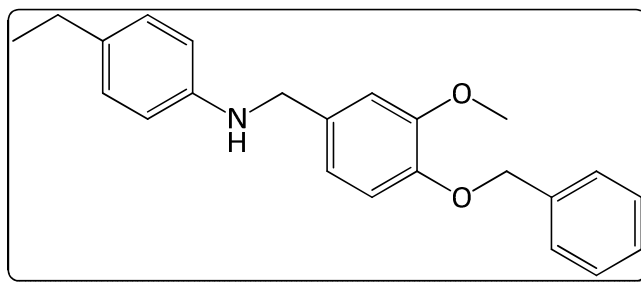
Methode: D1

Ansatz: 516 mg, 2.0 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure (CM135)

356 mg, 2.2 mmol (1.1 Äq.) 4-(Pyrrolidin-1-yl)anilin

1.516 g, 4.0 mmol (2 Äq.) 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)

| | |
|----------------------|--|
| | 2.068 g, 2.72 ml, 16.0 mmol (8.0 Äq.) N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) |
| | 25 ml DCM |
| SC: | DCM → DCM/MeOH 19:1 |
| Ausbeute: | 505 mg, 1.255 mmol, 63 %, grauer Feststoff |
| R _f : | 0.73 (DCM) |
| Schmelzpunkt: | 99 °C |
| ¹ H-NMR: | (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.29 (m, 5 H, OCH ₂ C(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ CH), 6.98 (s, 1 H, H ₃ COCCH), 6.82 (s, 2 H, CH ₂ OCCHCH), 6.74 – 6.39 (m, 4 H, (NH)C(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ CN), 5.15 (s, 2 H, OCH ₂), 4.41 – 4.04 (s, 2 H, (NH)CH ₂), 3.88 (s, 3 H, OCH ₃), 3.34 – 3.15 (m, 4 H, N(CH ₂ CH ₂) ₂), 1.98 (s, 4 H, N(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 154.91 (CN(CH ₂ CH ₂) ₂), 151.14 (COCH ₃), 147.22 (COCH ₂), 137.22 (CCH ₂ O), 136.71 ((NH)C(CHCH) ₂), 128.63 (CCH ₂ N), 128.55, 127.80, 127.25 (Ar-C), 122.38 ((NH)C(CHCH) ₂), 119.83 (CH ₂ OCCHCH), 116.91 ((NH)C(CHCH) ₂), 112.92 (CH ₂ OCCHCH), 111.91 (H ₃ COCCH), 71.07 (OCH ₂), 56.00 (OCH ₃), 47.79 ((NH)CH ₂), 46.02 (N(CH ₂ CH ₂) ₂) 25.53 (N(CH ₂ CH ₂) ₂) |
| ESI-MS: | Berechnet für C ₃₀ H ₃₅ N ₃ O ₅ : 388.50 g/mol; gefunden: 387.18 g/mol [M-H ⁺] |
| IR: | $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3093.73, 2958.00, 2847.67, 2161.18, 1597.28, 1511.46, 1462.43, 1409.31, 1364.36, 1331.67 |

12.36 CM269: N-(4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzyl)-4-ethylanilinSummenformel: $C_{23}H_{25}NO_2$

Molare Masse: 347.45 g/mol

Methode: D1

Ansatz: 43 mg, 0.119 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-N-(4-ethylphenyl)-3-methoxybenzamid (CM138)

0.8 ml, 0.8 mmol (7.0 Äq.) Boran-THF-Komplex (1M Lösung in THF)

25 ml Tetrahydrofuran

SC: PE/DCM 1:1 → DCM

Ausbeute: 23 mg, 0.066 mmol, 55 %, rötlicher Feststoff

R_f: 0.74 (DCM/MeOH 99:1)

Schmelzpunkt: 73 °C

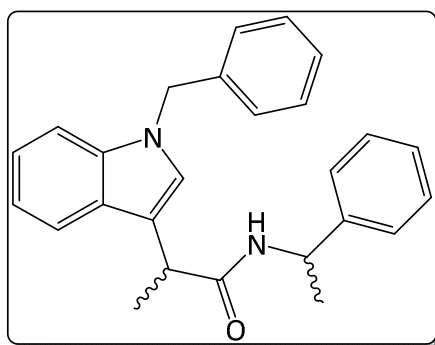
$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.45 – 7.30 (m, 5 H, $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CHCH})_2(\text{CH})$), 7.02 (d, $^3J = 8$ Hz, 2 H, $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 6.94 (s, 1 H, H_3COCCH), 6.84 (s, 2 H, CH_2OCCHCH), 6.60 (d, $^3J = 8$ Hz, 2 H, $(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 5.15 (s, 2 H, OCH_2), 4.22 (s, 2 H, $(\text{NH})\text{CH}_2$), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 2.54 (q, $^3J = 7.7$ Hz, 2 H, CCH_2CH_3), 1.19 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_2CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 149.70 (COCH_3), 147.59 (COCH_2), 144.19 ($(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 139.88 ($\text{CCH}(\text{CH}_3)_2$), 137.09 (CCH_2O), 128.70 (CCH_2N), 128.67, 128.56, 128.42 (Ar-C), 127.25 ($(\text{NH})\text{C}(\text{CHCH})_2$), 120.28 (CH_2OCCHCH), 113.79 (CH_2OCCHCH), 111.65 (H_3COCCH), 71.00 (OCH_2), 56.03 (OCH_3), 49.16 ($(\text{NH})\text{CH}_2$), 33.95 (CCH_2CH_3), 24.96 (CCH_2CH_3)

ESI-MS: Berechnet für $C_{23}H_{25}NO_2$: 347.45 g/mol; gefunden: 370.21 g/mol
[M+Na⁺]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3321.68, 3031.55, 2925.31, 2851.76, 2361.41, 1621.79,
1576.84, 1523.72, 1429.74, 1315.32

12.37 CM116 2-(1-Benzyl-1H-indol-3-yl)-N-(1-phenylethyl)-propanamid



Summenformel: $C_{26}H_{26}N_2O$

Molare Masse: 382.51 g/mol

Methode: J

Ansatz: 100 mg, 0.27 mmol (1.0 Äq.) 2-(1-Benzyl-1H-indol-3-yl)-N-(1-phenylethyl)-acetamid (CM112)

32 mg, 1.35 mmol (5.0 Äq.) Natriumhydrid (60 %ige Suspension in Paraffin)

57 mg, 0.03 ml, 0.40 mmol (1.5 Äq.) Methyljodid

25 ml THF

SC: PE/DCM 4:1 → DCM

Ausbeute: 93 mg, 0.24 mmol, 90 %, bräunlicher Feststoff

R_f: 0.52 (DCM/EE 4:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.69 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NCCH), 7.38 – 7.09 (m, 14 H, Ar-H), 6.24 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NHH), 5.31 (m, 1 H, NHCH),

5.27 (s, 2 H, NCH_2), 3.89 (q, 1 H, $(\text{CO})\text{CH}$), 2.67 (m, ${}^3J = 11$ Hz, 3 H, NCHCH_3), 1.44 (zwei Dubletts, Integralverhältnis 1:2, ${}^3J = 7$ Hz, 3 H, $(\text{CO})\text{CHCH}_3$)

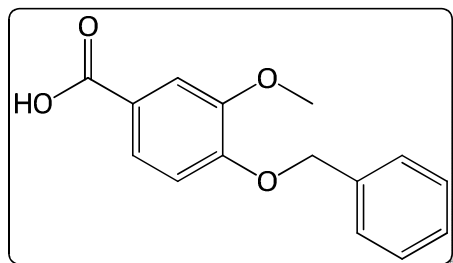
${}^{13}\text{C}$ -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.53 ($\text{C}=\text{O}$), 140.74, 137.58, 136.61, 128.78, 128.62, 128.41, 127.62, 127.29, 127.19, 126.83, 126.61, 122.02, 119.42, 118.99, 109.79, 108.51 (Ar-C), 50.36 (NCH_2), 50.03 (NHCH_3), 31.82 (COCH), 29.97 (NHCHCH_3), 15.55 (COCHCH_3)

ESI-MS: Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: 382.20 g/mol; gefunden: 383.4 g/mol [$\text{M}+\text{H}^+$]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3669.87, 3306.36, 3056.62, 3028.66, 2971.77, 2927.41, 2363.34, 2342.12, 2114.56, 1993.07, 1709.59, 1628.59, 1524.45

13 Synthetisierte Zwischenstufen

13.1 CM135: 4-Benzyloxy-3-methoxybenzoesäure



Summenformel: $C_{15}H_{14}O_4$

Molare Masse: 258.27 g/mol

Methode: C1

Ansatz: 5.044 g, 30 mmol (1.0 Äq.) 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure

5.986 g, 4.16 ml, 35 mmol (1.16 Äq.) Benzylbromid

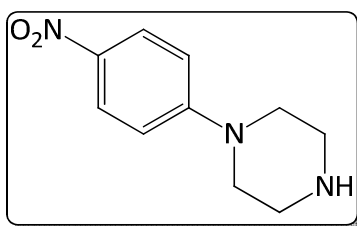
40 ml 2 M Natronlauge

Ausbeute: 6.276 g, 24.3 mmol, 81 %, blassgelber Feststoff

R_f: 0.27 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.70 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 7.61 (d, ⁴J = 2 Hz, 1 H, (CO)CCHCOCH₃), 7.45 – 7.32 (m, 5 H, , OCH₂C(CHCH)₂(CH)), 6.93 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CO)CCHCH), 5.24 (s, 2 H, OCH₂), 3.96 (s, 3 H, OCH₃)

Die Angaben entsprechen den Literaturangaben.^[93]

13.2 CM137: 1-(4-Nitrophenyl)piperazinSummenformel: C₁₀H₁₃N₃O₂

Molare Masse: 207.23 g/mol

Methode: H1

Ansatz: 4.23 g, 3.14 ml, 30 mmol (1.0 Äq.) 1-Fluoro-4-nitrobenzol

6.46 g, 75 mmol (2.5 Äq.) Piperazin

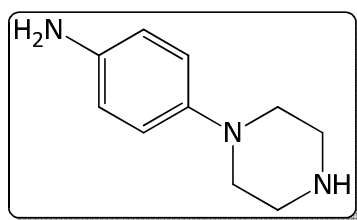
50 ml Acetonitril

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 4.23 g, 20.4 mmol, 68 %, dunkelgelbfarbener Feststoff

R_f: 0.56 (DCM/MeOH 19:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.09 (d, ³J = 9 Hz, 2 H, O₂NC(CHCH)₂N),
6.83 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, O₂NC(CHCH)₂N), 3.40 (m, 4 H, CN(CH₂CH₂)₂NH),
3.03 (m, 4 H, CN(CH₂CH₂)₂NH))

Die Angaben entsprechen den Literaturangaben.^[109]**13.3 CM143: 4-(Piperazin-1-yl)anilin**Summenformel: C₁₀H₁₅N₃

Molare Masse: 177.25 g/mol

Methode: D3

Ansatz: 4.14 g, 20 mmol (1.0 Äq.) 1-(4-Nitrophenyl)piperazin (CM137)

Wasserstoff

Spatelspitze Pd/C (5%)

25 ml Tetrahydrofuran

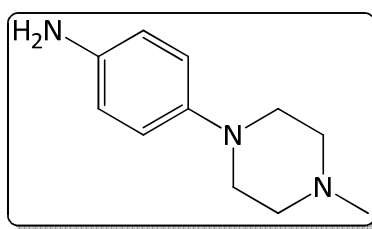
Ausbeute: 3.33 g, 18.8 mmol, 94 %, schwarzbrauner Feststoff

R_f: 0.38 (DCM/MeOH 19:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.83 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 6.67 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 3.46 (s, 2 H, NH₂), 3.13 (t, ³J = 5 Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 2.68 (t, ³J = 5 Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 2.42 (s, 3 H, CH₃)

Die Angaben entsprechen den Literaturangaben.^[109]

13.4 CM145: 4-(4-Methylpiperazin-1-yl)anilin



Summenformel: C₁₁H₁₇N₃

Molare Masse: 191.27 g/mol

Methode: E2

Ansatz: 355 mg, 2 mmol (1.0 Äq.) 4-(4-Piperazin-1-yl)anilin (CM143)

284 mg, 0.125 ml, 2 mmol (1.0 Äq.) Methyljodid

0.505 g, 0.7 ml, 10 mmol (2.0 Äq.) Triethylamin

0.166 g, 1 mmol (0.5 Äq.) Kaliumiodid

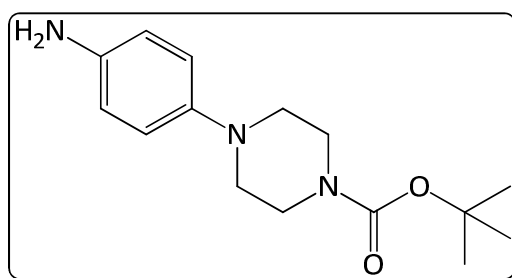
SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 268 mg, 1.40 mmol, 70 %, schwarzer Feststoff

R_f: 0.33 (DCM/MeOH 49:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.83 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 6.67 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 3.46 (s, 2 H, NH₂), 3.13 (t, ³J = 5 Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 2.68 (t, ³J = 5 Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 2.42 (s, 3 H, CH₃)

13.5 CM146: *tert*-Butyl-4-(4-aminophenyl)piperazin-1-carboxylat



Summenformel: C₁₅H₂₃N₃O₂

Molare Masse: 277.36 g/mol

Methode: F1

Ansatz: 355 mg, 2 mmol (1.0 Äq.) 4-(4-Piperazin-1-yl)anilin (CM143)
 240 mg, 2.2 mmol (1.1 Äq.) Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O)
 0.303 g, 0.4 ml, 6 mmol (3.0 Äq.) Triethylamin

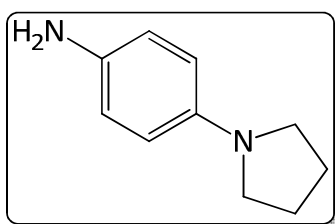
SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 410 mg, 1.48 mmol, 74 %, schwarzes Öl

R_f: 0.31 (DCM/MeOH 49:1)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.80 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 6.64 (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 2 H, H₂NC(CHCH)₂N), 3.56 (t, $^3J = 5$ Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 2.96 (t, $^3J = 5$ Hz, 4 H, N(CH₂CH₂)₂N(CO)), 1.47(s, 9 H, OC(CH₃)₃)

13.7 CM246: 4-(Pyrrolidin-1-yl)anilin



Summenformel: C₁₀H₁₄N₂

Molare Masse: 162.23 g/mol

Methode: E1

Ansatz: 4.324 g, 40 mmol (3.0 Äq.) 1,4-Phenylendiamin

2.879 g, 1.58 ml, 13.3 mmol (1.0 Äq.) 1,4-Dibrombutan

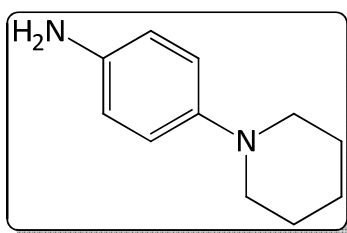
5.528 g, 40 mmol (3.0 Äq.) Kaliumcarbonat

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 1.445 g, 8.9 mmol, 67 %, schwarzer Feststoff

R_f: 0.53 (DCM/MeOH 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.80 – 6.49 (m, 4 H, H₂NC(CHCH)₂N), 3.28 (m, 4 H, N(CH₂CH₂)₂), 1.98 (m, 4 H, N(CH₂CH₂)₂)

13.8 CM247: 4-(Piperidin-1-yl)anilinSummenformel: C₁₁H₁₆N₂

Molare Masse: 176.26 g/mol

Methode: E1

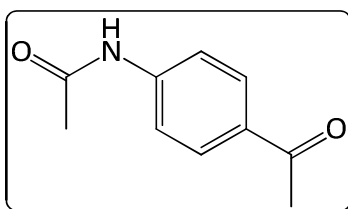
Ansatz: 1.41 g, 40 mmol (3.0 Äq.) 1,4-Phenylendiamin
3.058 g, 1.80 ml, 13.3 mmol (1.0 Äq.) 1,5-Dibrompentan
1.80 g, 40 mmol (3.0 Äq.) Kaliumcarbonat

SC: DCM → DCM/MeOH 19:1

Ausbeute: 1.479 g, 8.34 mmol, 63 %, schwarzer Feststoff

R_f: 0.56 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.81 – 6.51 (m, 4 H, H₂NC(CHCH₂)₂N), 3.35 (m, 4 H, N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.72 (m, 4 H, N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.56(m, 2 H, N(CH₂CH₂)₂CH₂)

13.9 CM249: N-(4-Acetylphenyl)acetamidSummenformel: C₁₀H₁₁NO₂

Molare Masse: 177.20 g/mol

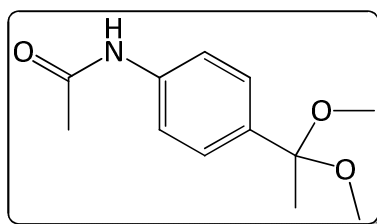
Methode: F3
Ansatz: 5.464 g, 40 mmol (1.0 Äq.) 4-Aminoacetophenon
5.11 g, 4.75 ml, 50 mmol (1.2 Äq.) Essigsäureanhydrid
50 ml Dichlormethan

Ausbeute: 6.911 g, 39 mmol, 98 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.58 (DCM/MeOH 49:1)

¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 10.31 (s, 1 H, NH), 7.91 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, NC(CHCH)₂), 7.71 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, NC(CHCH)₂), 2.52 (s, 3 H, C(CO)CH₃), 2.08 (s, 3 H, N(CO)CH₃)

13.10 CM252: *N*-(4-(1,1-Dimethoxyethyl)phenyl)acetamid



Summenformel: C₁₂H₁₇NO₃

Molare Masse: 223.27 g/mol

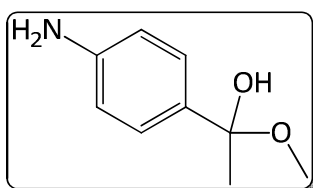
Methode: F3

Ansatz: 1.772 g, 10 mmol (1.0 Äq.) *N*-(4-Acetylphenyl)acetamid (CM249)
1.067 g, 1.1 ml, 11 mmol (1.1 Äq.) Trimethylorthoformiat
Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat
50 ml Methanol

Ausbeute: 1.77 g, 7.9 mmol, 79 %, gelber Feststoff

R_f: 0.67 (DCM/MeOH 49:1)
¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.92 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, NC(CHCH₂)₂), 7.63 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, NC(CH₂CH)₂), 3.48 (s, 6 H, (OCH₃)₂), 2.57 (s, 3 H, N(CO)CH₃), 2.21 (s, 3 H, C(OCH₃)₂CH₃)

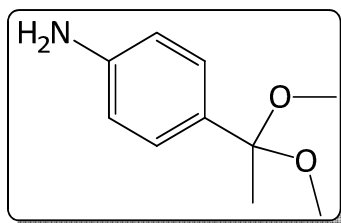
13.11 CM252b: 1-(4-Aminophenyl)-1-methoxyethanol



Summenformel: C₉H₁₃NO₂
Molare Masse: 167.21 g/mol
Nebenprodukt

Methode: F3
Ansatz: 1.772 g, 10 mmol (1.0 Äq.) *N*-(4-Acetylphenyl)acetamid (CM249)
1.067 g, 1.1 ml, 11 mmol (1.1 Äq.) Trimethylorthoformiat
Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat
50 ml Methanol

R_f: 0.17 (DCM/MeOH 49:1)
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.95 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, NC(CHCH₂)₂), 7.14 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2 H, H₂NC(CH₂CH)₂N), 3.49 (s, 3 H, COH), 2.59 (s, 3 H, COCH₃)

13.12 CM259 4-(1,1-Dimethoxyethyl)anilinSummenformel: C₁₀H₁₅NO₂

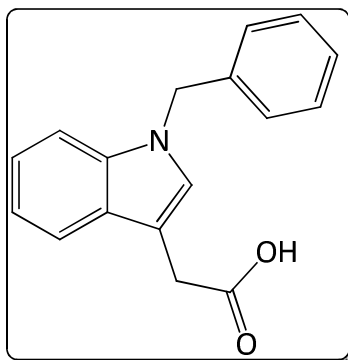
Molare Masse: 181.23 g/mol

Methode: G2

Ansatz: 1.77 g, 7.9 mmol (1.0 Äq.) *N*-(4-(1,1-Dimethoxyethyl)phenyl)acetamid (CM252)

1.66 g, 40 mmol (5.0 Äq.) Lithiumhydroxid-Monohydrat

Ausbeute: 1.346 g, 7.43 mmol, 94 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.23 (DCM/MeOH 49:1)¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.71 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, NC(CH₂CH₂)), 7.63 (d, ³J = 8 Hz, 2 H, NC(CH₂CH₂)), 3.48 (s, 6 H, (OCH₃)₂), 2.57 (s, 3 H, N(CO)CH₃), 2.21 (s, 3 H, C(OCH₃)₂CH₃)**13.13 CM107: *N*-Benzyl-3-indolessigsäure**Summenformel: C₁₇H₁₅NO₂

13 Synthetisierte Zwischenstufen

Molare Masse: 265.31 g/mol

Methode: F5

Ansatz: 1.75 g, 10 mmol (1.0 Äq.) 3-Indolessigsäure

3.42 g, 2.35 ml, 20 mmol (2 Äq.) Benzylbromid

2.4 g, 100 mmol (10 Äq.) Natriumhydrid (60% in Petroleum)

50 ml THF

SC: DCM/MeOH 99:1 → DCM/MeOH 10:1

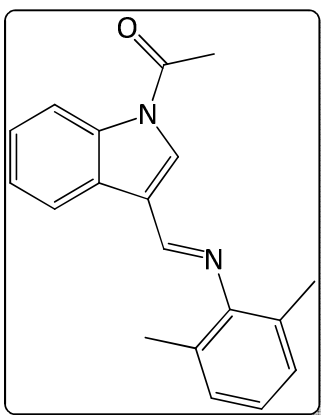
Ausbeute: 2.07 g, 7.8 mmol, 78 %, weißer Feststoff

R_f: 0.42 (DCM/MeOH 10:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.62 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1 H, NC(CH)), 7.30 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 5 Hz, 1 H, NCC(CH)), 7.29 – 7.12 (m, 8 H, NC(CH)CH(CH), NCH, NCH₂(CHCH)₂CH), 5.29 (s, 2 H, NCH₂), 3.82 (s, 2 H, COCH₂)

Die Angaben entsprechen den Literaturangaben.^[108]

13.14 CM111: (E)-1-(3-(((2,6-Dimethylphenyl)imino)methyl)-1H-indol-1-yl)ethanon

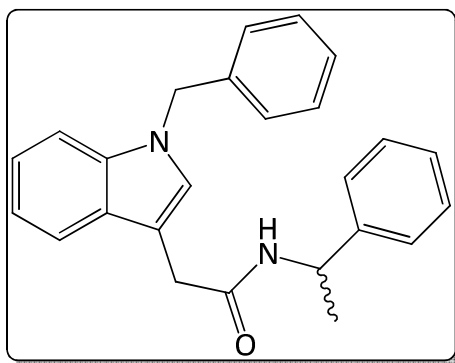


Summenformel: C₁₉H₁₈N₂O

13 Synthetisierte Zwischenstufen

| | |
|----------------------|---|
| Molare Masse: | 290.36 g/mol |
| Methode: | I |
| Ansatz: | 936 mg, 5.0 mmol (1.0 Äq.) 1-Acetyl-1 <i>H</i> -indol-3-carboxaldehyd 606 mg, 0.62 ml, 5.0 mmol (1.0 Äq.) 2,6-Dimethylanilin 50 ml Toluol Molsieb |
| SC: | PE/EE 19:1 |
| Ausbeute: | 1.106 g, 3.81 mmol, 76 %, dunkelroter Feststoff |
| R _f : | 0.71 (PE/EE 19:1) |
| ¹ H-NMR: | (CDCl ₃ , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.58 (dd, ³ J = 7 Hz, ⁴ J = 1 Hz, 1 H, H ₃ C(CO)NCC <u>H</u>), 8.51 (d, ³ J = 8 Hz, 1 H, H ₃ C(CO)NCCHCHCH <u>H</u>), 8.40 (s, 1 H, H ₃ C(CO)NCHCC <u>H</u> N), 7.83 (s, 1 H, H ₃ C(CO)N <u>H</u>), 7.51 – 7.41 (m, 2 H, H ₃ C(CO)NCCHC <u>H</u> CH), 7.13 (d, ³ J = 7 Hz, 2 H, NC(C(CH ₃)C <u>H</u>) ₂ CH), 7.02 (d, ³ J = 7 Hz, 1 H, NC(C(CH ₃)CH) ₂ C <u>H</u>), 2.71 (s, 3 H, (CO)C <u>H</u> ₃), 2.24 (s, 6 H, (C <u>H</u> ₃) ₂) |
| ¹³ C-NMR: | (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 168.55 ((<u>C</u> O)CH ₃), 155.95 (H ₃ C(CO)NCHC <u>C</u> HN), 151.66 (N <u>C</u> (C(CH ₃) ₂), 136.63 (H ₃ C(CO)N <u>C</u>), 129.95 (H ₃ C(CO)N <u>C</u> H), 128.28 (H ₃ C(CO)NCC <u>C</u>), 128.18 (NC(C(CH ₃)C <u>H</u>) ₂ CH), 127.22 (NC(<u>C</u> (CH ₃)CH) ₂ CH), 126.40 (NC(C(CH ₃)CH) ₂ C <u>H</u>), 124.79 (H ₃ C(CO)NCH <u>C</u>), 123.75 (H ₃ C(CO)NCCHC <u>H</u>), 122.77 (H ₃ C(CO)NCCHCHC <u>H</u>), 120.72 ((H ₃ C(CO)NCCHCHCHC <u>H</u>), 116.44 ((H ₃ C(CO)N <u>C</u> H), 23.97 ((CO)C <u>H</u> ₃), 18.47 ((<u>C</u> H ₃) ₂) |

13.15 CM112: 2-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)-*N*-(1-phenylethyl)-acetamid



Summenformel: $C_{25}H_{24}N_2O$

Molare Masse: 368.47 g/mol

Methode: A2

Ansatz: 531 mg, 2.0 mmol (1.0 Äq.) *N*-Benzyl-3-indolessigsäure (CM107)

267 mg, 0.29 ml, 2.2 mmol (1.1 Äq.) (*R,S*)-1-Phenylethylamin

495 mg, 2.4 mmol (1.2 Äq.) Dicyclohexylcarbodiimid

324 mg, 2.4 mmol (1.2 Äq.) *N*-Hydroxybenzotriazol-Hydrat

25 ml DCM

SC: PE/DCM 4:1 → DCM

Ausbeute: 656 mg, 1.78 mmol, 69 %, bräunlicher Feststoff

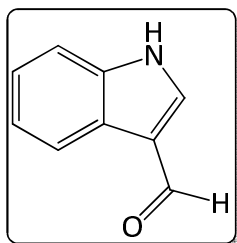
R_f: 0.31 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.51 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NCCH), 7.24 – 6.98 (m, 13 H, Ar-H), 5.99 (m, 1 H, NHH), 5.22 (s, 2 H, NCH2), 5.08 (m, 1 H, NHCH), 3.68 (m, 2 H, (CO)CH2), 1.28 (d, ³J = 7 Hz, 3 H CH3)

¹³C-NMR: (DMSO, 75 MHz), δ [ppm] = 170.62 (C=O), 143.38 (HNCH(CH₃)C), 137.43 (CH₂N), 136.92 (NCH₂), 128.88, 128.58, 127.84, 127.79, 127.64, 127.17, 126.86 (Ar-C), 126.06 (HNCH(CH₃)C(CH₂)₂), 122.44 (CH₂NCCHCH), 119.85 (CH₂NCCHCHCH), 119.15 (CH₂NCCHCHCHCH),

110.07 ($\text{CH}_2\text{NC}\underline{\text{H}}$), 108.50 ($\text{CH}_2\text{NCH}\underline{\text{C}}$), 50.02 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 48.64 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}$),
33.55 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 21.92 ($\text{NHCH}\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

13.16 CM178: 1*H*-Indol-3-carboxaldehyd



Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$

Molare Masse: 145.16 g/mol

Methode: G2

Ansatz: 3.744 g, 20 mmol (1.0 Äq.) 1-Acetyl-1*H*-indol-3-carboxaldehyd

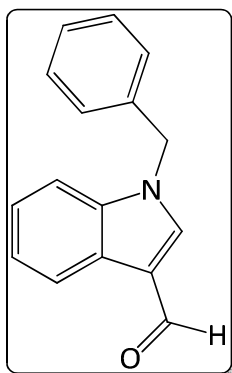
6.0 g, 100 mmol (5.0 Äq.) Lithiumhydroxid-Monohydrat

100 ml Tetrahydrofuran/Methanol 1:1

Ausbeute: 2.874 g, 19.8 mmol, 99 %, gelber Feststoff

R_f: 0.41 (DCM/MeOH 49:1)

¹H-NMR: (CDCl_3 , 300.13 MHz), δ [ppm] = 10.07 (s, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{O}$), 8.80 (s, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$),
8.34 – 8.31 (m, 1 H, $\text{NCCHCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 7.86 (d, $^3J = 3$ Hz, 1 H, $\text{NCH}\underline{\text{H}}$), 7.45
(m, 1 H, $\text{NC}\underline{\text{C}}\text{H}$), 7.35 – 7.32 (m, 2 H, $\text{NCCHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$)

13.17 CM200: 1-Benzyl-1H-indole-3-carboxaldehydSummenformel: C₁₆H₁₃NO

Molare Masse: 235.28 g/mol

Methode: F4 (geänderte Mengen)

Ansatz: 291 mg, 2 mmol (1.0 Äq.) 1H-Indol-3-carboxaldehyd

100 mg, 2.4 mmol (1.2 Äq.) Natriumhydrid (60% in Petroleum)

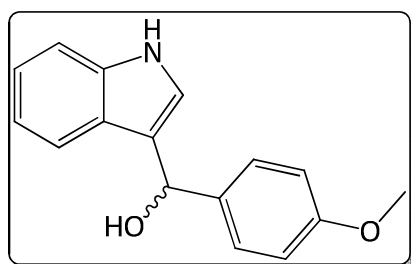
410 mg, 0.29 ml, 2.4 mmol (1.2 Äq.) Benzylbromid

25 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 351 mg, 1.66 mmol, 83 %, gelber Feststoff

R_f: 0.63 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300.13 MHz), δ [ppm] = 9.99 (s, 1 H, CHO), 8.36 – 8.32 (m, 1 H, NCCHCHCHCH), 7.70 (s, 1 H, NCH), 7.45 (m, 1 H, NCCH), 7.36 – 7.30 (m, 6 H, NCCHCHCH, NCH₂(CHCH)₂CH), 7.20 – 7.16 (m, 2 H, NCH₂(CHCH)₂CH), 5.34 (s, 2 H, CH₂)

13.18 CM258: (1H-Indol-3-yl)(4-methoxyphenyl)methanolSummenformel: C₁₆H₁₅NO₂

Molare Masse: 253.30 g/mol

Methode: H3

Ansatz: 2.343 g, 20 mmol (1.0 Äq.) 1H-Indol

2.995 g, 2.676 ml, 22 mmol (1.1 Äq.) Anisaldehyd

880 mg, 22 mmol (1.1 Äq.) Natriumhydroxid

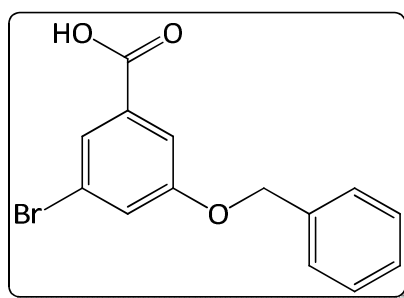
50 ml Methanol

SC: PE/EE 19:1 → 1:1

Ausbeute: 1.317 g, 5.2 mmol, 26 %, roter Feststoff

R_f: 0.73 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300.13 MHz), δ [ppm] = 7.82 (s, 1 H, NH), 7.42 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NCCHCHCHCH), 7.24 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NCCH), 7.13 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CHCH)₂COCH₃), 7.02 – 6.97 (m, 2 H, NCCHCHCH), 6.79 d, ³J = 8 Hz, 1 H, (CHCH)₂COCH₃), (6.44 (d, ³J = 3 Hz, 1 H, NCH), 5.85 (s, 1 H, HCOH), 3.66 (s, 3 H, OCH₃)

13.19 CM176: 3-Benzyloxy-5-bromobenzoessäureSummenformel: $C_{14}H_{11}BrO_3$

Molare Masse: 307.14 g/mol

Methode: C1

Ansatz: 1. Schritt

1.085 g, 5 mmol (1.0 Äq.) 3-Hydroxy-5-bromobenzoessäure

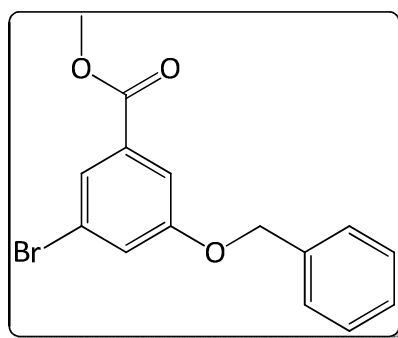
990 mg, 0.70 ml, 5.8 mmol (1.16 Äq.) Benzylbromid

8 ml, 2M Natronlauge

50 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.213 g, 3.95 mmol, 79 %, blassgelber Feststoff

R_f: 0.31 (DCM/MeOH 9:1) $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.84 (d, $^4J = 1$ Hz, 1 H, (CO)CCHBr), 7.63 (d, $^4J = 1$ Hz, 1 H, (CO)CCHCOCH₂), 7.45 – 7.35 (m, 6 H, (CO)CCHBrCH), $\text{OCH}_2\text{C}(\text{CHCH)_2(\text{CH})$), 5.10 (s, 2 H, OCH₂)

13.20 CM181: 3-Benzyloxy-5-bromobenzoensäuremethylesterSummenformel: $C_{15}H_{13}BrO_3$

Molare Masse: 321.17 g/mol

Methode: A6

Ansatz: 307 mg, 1 mmol (1.0 Äq.) 3-Benzyloxy-5-bromobenzoensäure (CM176)

3 Tropfen Schwefelsäure

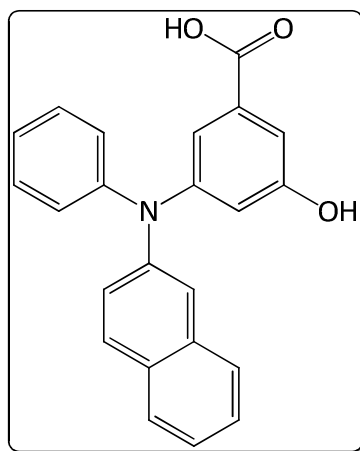
50 ml Methanol

Ausbeute: 305 mg, 0.95 mmol, 95 %, gelber Feststoff

R_f: 0.84 (DCM)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.78 (d, ⁴J = 1 Hz, 1 H, (CO)CCHBr), 7.59 (d, ⁴J = 1 Hz, 1 H, (CO)CCHCOCH₂), 7.42 – 7.32 (m, 6 H, (CO)CCHBrCH), OCH₂C(CHCH)₂(CH), 5.09 (s, 2 H, OCH₂), 3.91 (s, 3 H, (CO)OCH₃)

13.21 CM185: 3-Hydroxy-5-(naphthalen-2-yl(phenyl)amino)-benzoessäure



Summenformel: $C_{23}H_{17}NO_3$

Molare Masse: 355.39 g/mol

Methode: H2

Ansatz: 280 mg, 0.91 mmol (1.0 Äq.) 3-Benzyloxy-5-bromobenzoessäure (CM176)

200 mg, 0.91 mmol (1.0 Äq.) *N*-Phenyl-2-naphthylamin

22 mg, 0.11 mmol (0.12 Äq.) Tri-*tert*-butylphosphin (1.0 M in Toluol)

105 mg, 1.10 mmol (1.2 Äq.) Natrium-*tert*-butoxid

18 mg, 0.02 mmol (0.025 Äq.) Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0)

25 ml Toluol

Ausbeute: 138 mg, 0.44 mmol, 51 %, brauner Feststoff

R_f: 0.25 (DCM/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.74 (d, ³J = 9 Hz, 2 H, NCCHCCHCHCHCH), 7.65 (d, ³J = 8 Hz, 1 H, NCCHCHCH), 7.45 – 7.16 (m, 11 H, NC(CHCH)₂CH, NCCHCHCCHCHCHCHCCH, , NCCHC(COOH)CHC(OH)CH), 6.98 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, NC(CHCH)₂CH)

Anhang: Ergebnisse der MST-Messungen

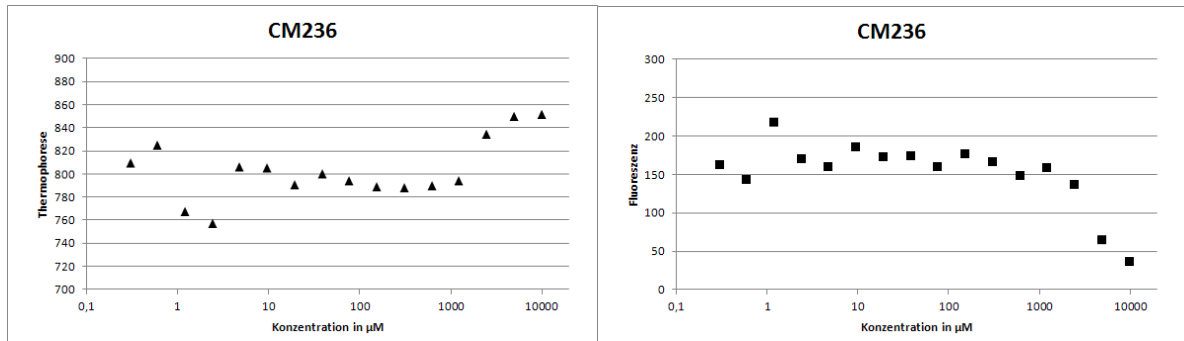


Abbildung 104: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von CM236

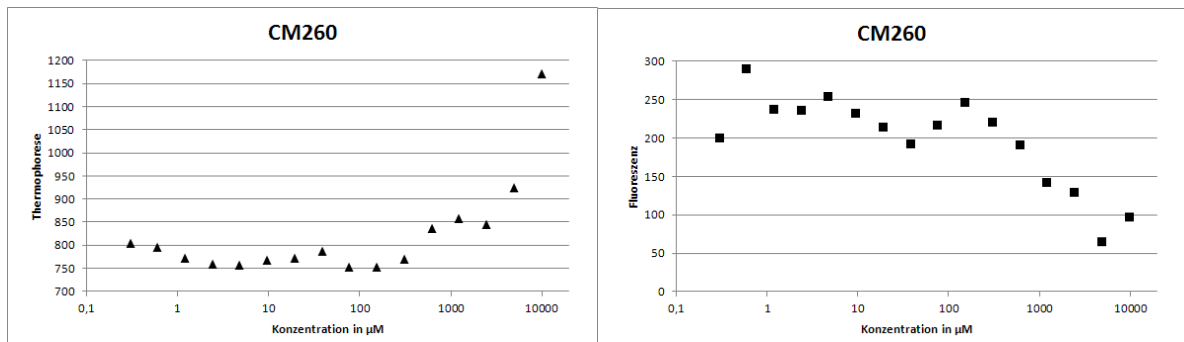


Abbildung 105: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von CM260

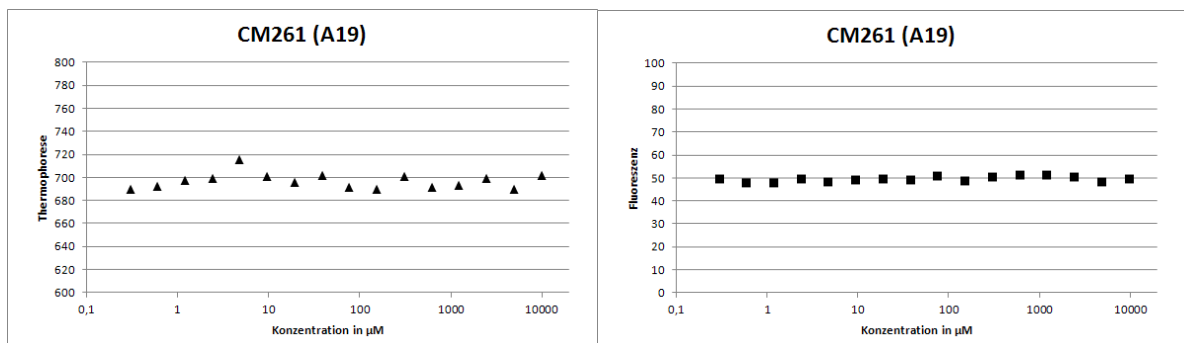


Abbildung 106: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von CM261 (A19)

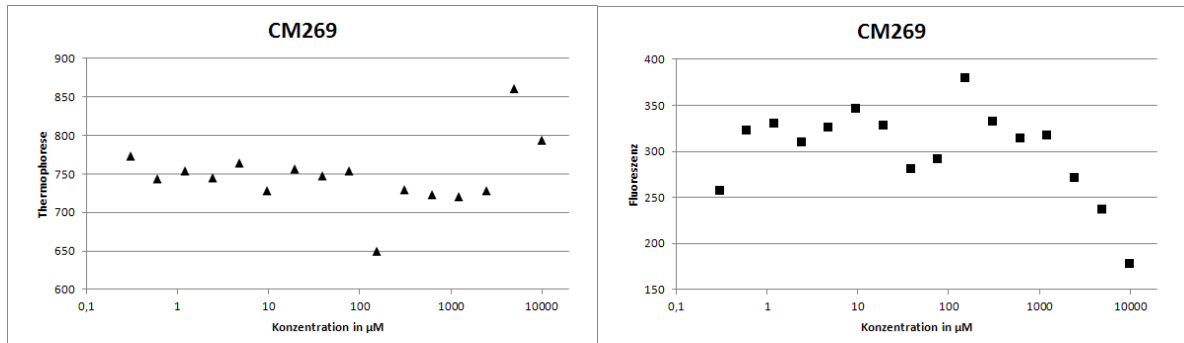


Abbildung 107: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von CM269

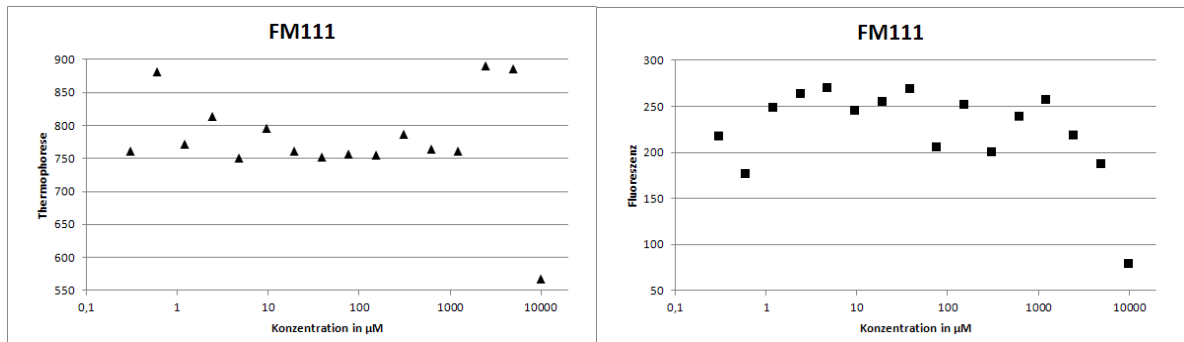


Abbildung 108: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM111

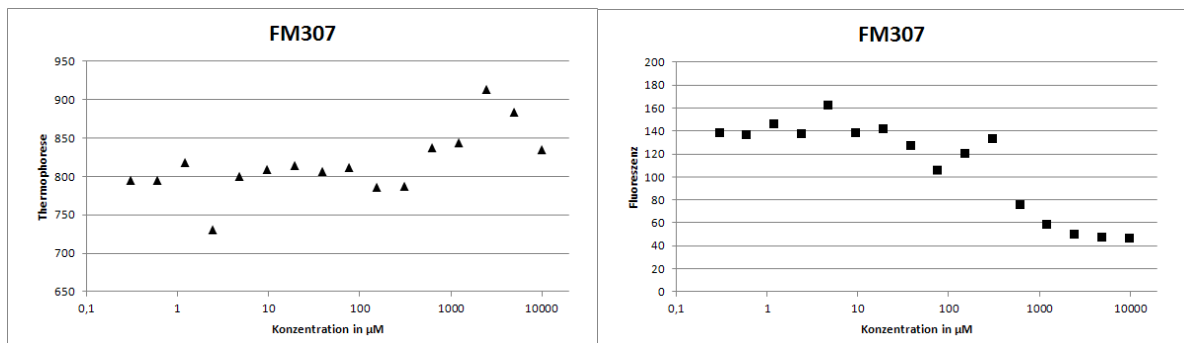


Abbildung 109: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM307

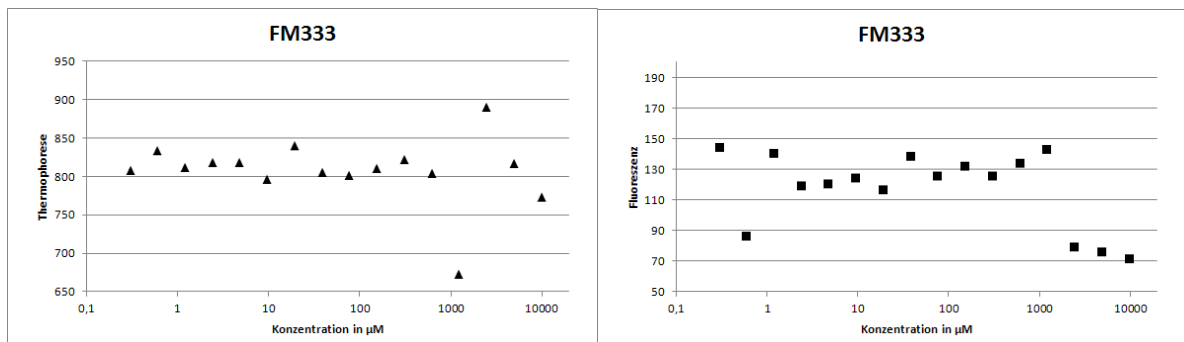


Abbildung 110: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM333

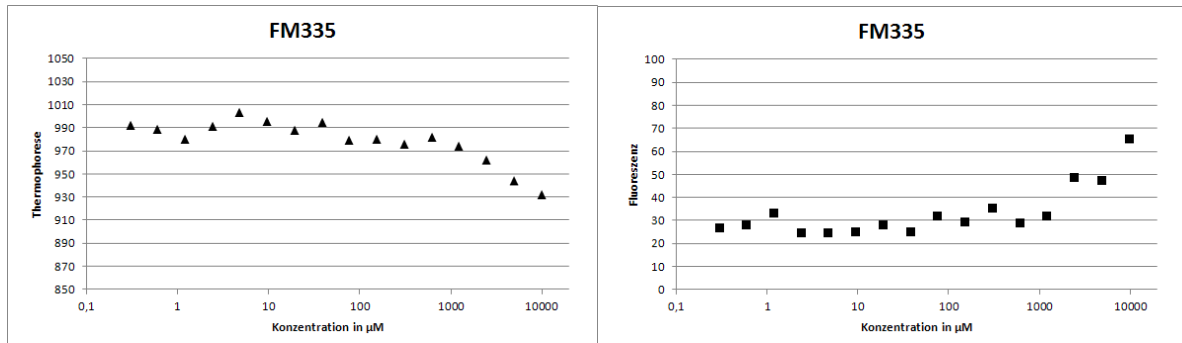


Abbildung 111: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM335

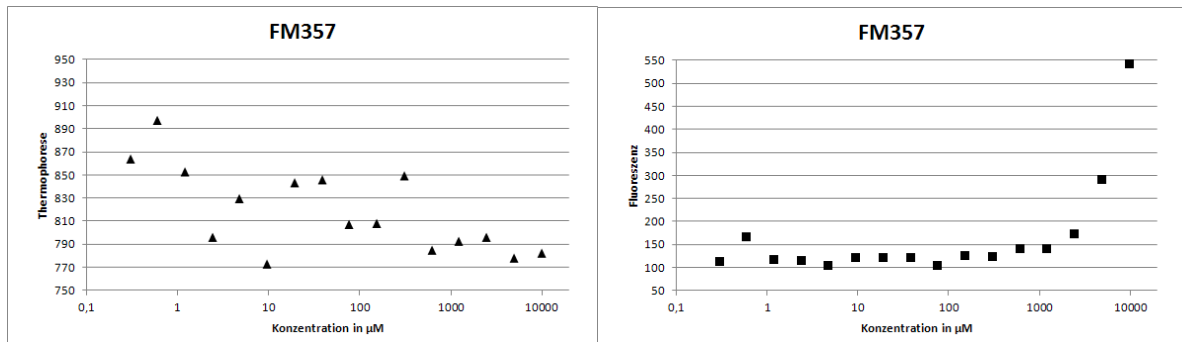


Abbildung 112: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM357

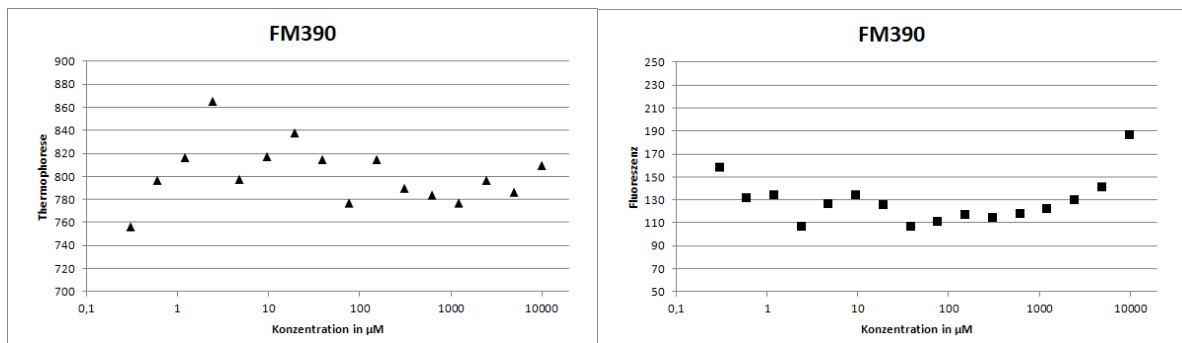


Abbildung 113: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM390

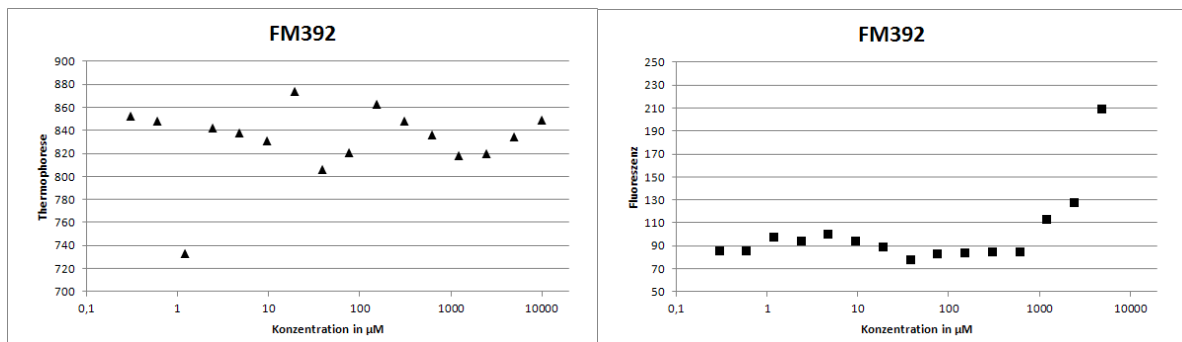


Abbildung 114: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM392

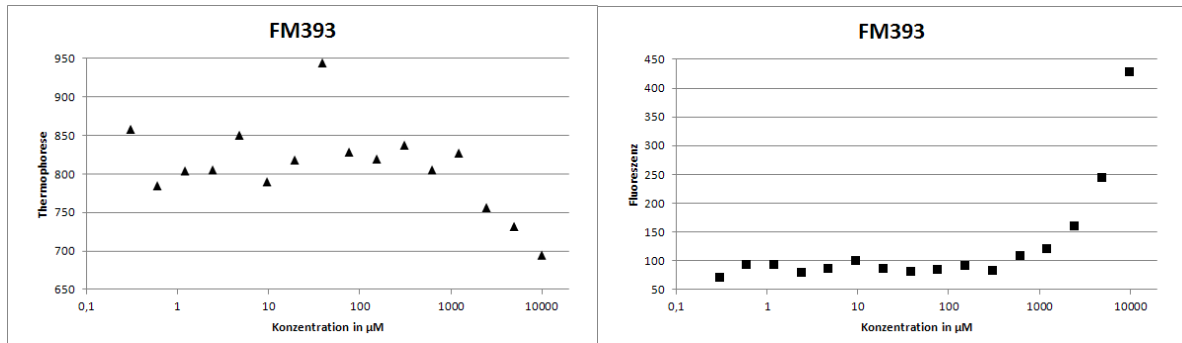


Abbildung 115: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM393

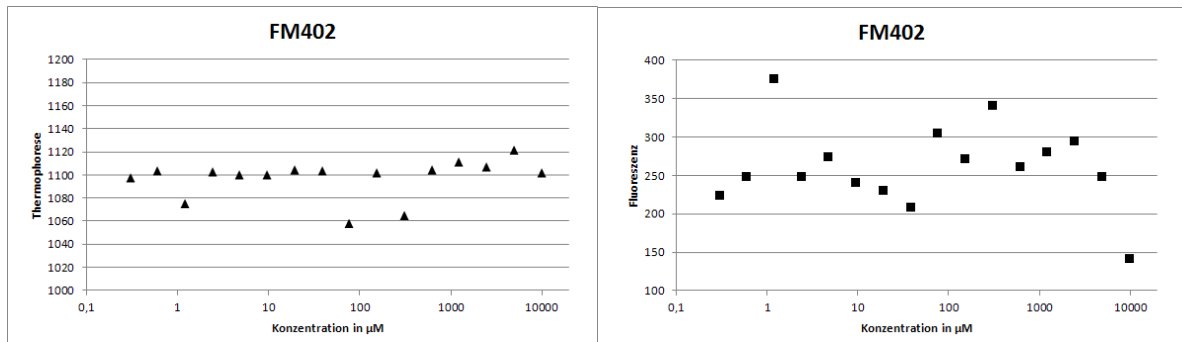


Abbildung 116: Thermophoresis- und Fluoreszenzmessung von FM402

Literaturverzeichnis

- [1] *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, S. Suerbaum, H. Hahn, G.-D. Buchard, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, 7. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg **2012**
- [2] *Infektionskrankheiten*, N. Suttorp, M. Mielke, W. Kiehl, B. Stück, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2004**
- [3] UNAIDS Global Report Epidemie Report Update (UNAIDS **2012**),
- [4] Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Institutes, **28/2012**,
- [5] *Medizinische Mikrobiologie*, H. Hof, R. Dörries, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2005**
- [6] *Mikrobiologische Diagnostik*, B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, P. Kimmig, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2009**
- [7] *Molekulare Virologie*, s. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2010**
- [8] G. Myers, G. N. Pavlakis, *Evolutionary potential of complex retroviruses*. In: J. Levy (Hrsg.): *The Retroviridae*. Vol. 1. Plenum Press, New York **1992**, 51 – 105.
- [9] *Review of Medical Microbiology and Immunology*, W. Levinson, 11th edition, McGraw-Hill Medical **2010**.
- [10] H. Deng et al., *Nature* **1996**, 381 (6584), 661 – 666.
- [11] *Viral Genome Replication*, C. E. Cameron, M. Gotte, K. D. Raney, 1st edition, Springer Verlag **2009**.
- [12] Y. Suzuki, R. Craigie, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, Mar; 5(3),187 – 196.
- [13] Morales-Ramirez, J.; Teppler, H.; Kovacs, C. et al. *ART-naïve* **2005**, 6, 17 – 20.
- [14] *Medizinische Chemie*, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, H. J. Roth, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart **2010**

- [15] *Arzneimittelwirkungen*, E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2013**
- [16] *WHO Drug Information* **2007**, Vol. 21 No. 1, 66.
- [17] Dunkle LM. et al., Elvucitabine: potent antiviral activity demonstrated in multidrug-resistant HIV infection, *Antiviral Therapy* **2003**, 8, 5.
- [18] Brinkman, K et al. *Lancet* **1999**, 9184, 1112 – 1115.
- [19] Dauer, B. *J. of HIV Therapy* **2005**, 4, 72 – 74.
- [20] Substanzklassen/Medikamentenübersicht des Buches HIV 2011
- [21] *GSK and Concert Pharmaceuticals form alliance to develop novel deuterium-modified drugs*, **2009**.
- [22] 10th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, April 15 – 17, **2009**, Amsterdam
- [23] S. P. Ovenden, J. Yu, S. S. Wan et al., *Phytochemistry* **2004**, 65 (24), 3255 – 3259.
- [24] Dolutegravir ("572") Holds Up in Heavily Raltegravir-Resistant Patients, Phase 2B Study Finds Nelson Vergel, *The Body PRO*, **2011**.
- [25] *Conference Reports for NATAP, ICAAC Chicago Sept 17 – 20*, **2011**.
- [26] R.T. Steigbigel, D.A. Cooper, P.N. Kumar et al., *N. Engl. J. Med.* **2008**, 4, 339 – 354.
- [27] *20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Atlanta, GA March 3 – 6, **2013**.
- [28] J. M. Strizki, C. Tremblay, S. Xu, L. Wojcik, N. Wagner, W. Gonsiorek, R. W. Hipkin, C. Chou, C. Pugliese-Sivo, Y. Xiao, J. R. Tagat, K. Cox, T. Priestley, S. Sorota, W. Huang, M. Hirsch, G. R. Reyes, B. M. Baroudy, *Antimicrob. Agents Chemother* **2005**, 49 (12), 4911 – 4919
- [29] O. M. Klibanov, S. H. Williams, C.A. Iler, *Current Opinion in Investigational Drugs* **2010**, 11 (8), 940 – 950.

- [30] *AIDS Patient Care STDS* **2008**, 22 (2), 159 – 60.
- [31] J. M. Jacobson, D. R. Kuritzkes, E. Godofsky, et al., *Antimicrob. Agents Chemother* **2009**, 53 (2), 450 – 457.
- [32] G. Moyle, E. DeJesus, M. Boffito, et al., *Clin Infect Dis.* **2009**, 48(6), 798 – 780
- [33] A. M. Sheehy, N. C. Gaddis, J. D. Choi, M. H. Malim, *Nature* **2002**, 418 (6898), 646 – 650.
- [34] H. C. Smith, *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, 36 (5), 239 – 244.
- [35] J. P. Donahue, M. L. Vetter, N. A. Mukhtar, R. T. D'Aquila, *Virology* **2008**, 377 (1), 49 – 53.
- [36] W. C. Greene, Z. Debyser, Y. Ikeda, E. O. Freed, E. Stephens, W. Yonemoto, R. W. Buckheit, J. A. Este, T. Cihlar, *Antiviral Research* **2008**, 80 (3), 251 – 265.
- [37] L. Chelico, C. Prochnow, D. A. Erie, X. S. Chen, M. F. Goodman, *The Journal of Biological Chemistry* **2011**, 285 (21), 16195 – 16205.
- [38] X. Li X, J. Ma, Q. Zhang, X. Yin, C. Zhai, X. You, L. Yu, F. Guo, L. Zhao, Z. Li, Y. Zeng, S. Cen, *Virology* **2011**, 414 (2), 130 – 136.
- [39] J. L. Mbisa, R. Barr, J. A. Thomas, N. Vandegraaff, I. J. Dorweiler, E. S. Svarovskaia, W. L. Brown, L. M. Mansky, R. J. Gorelick, R. S. Harris, A. Engelman, V. K. Pathak, *Journal of Virology* **2007**, 81 (13), 7099–7110.
- [40] H. A. Sadler, M. D. Stenglein, R. S. Harris, L. M. Mansky, *Journal of Virology* **2010**, 84 (14), 7396 – 7404.
- [41] F. Guo, S. Cen, M. Niu, J. Saadatmand, L. Kleiman, *Journal of Virology* **2006**, 80 (23), 11710 – 11722.
- [42] A. Takaori, *Uirusu* **2005**, 55 (2), 267 – 272.
- [43] K. Luo et al., *Journal of Virology* **2007**, 81 (13), 7238 – 7248.
- [44] C. Hu et al., *Journal of Virology* **2010**, 84, 11981 – 11993.

- [45] J. H. Simon, M. H. Malim, *Journal of Virology* **1996**, *70*, 5295 – 5305.
- [46] N. C. Gaddis *et al.*, *Journal of Virology* **2003**, *77*, 5810 – 5820.
- [47] J. H. Miller, V. Presnyak, H. C. Smith, *Retrovirology* **2007**, *81* (4)
- [48] L. S. Wolfe, B. J. Stanley, C. Liu, W. K. Eliason, Y. Xiong, *Journal of Virology* **2010**, *84* (14), 7135 – 7139.
- [49] B. J. Stanley, E. S. Ehrlich, L. Short, Y. Yu, Z. Xiao, X.-F. Yu, Y. Xiong, *Journal of Virology* **2008**, *82* (17), 8656 – 8663.
- [50] T. Kamura, S. Sato, D. Haque, L. Liu, W.G. Kaelin, R.C. Conaway, J.W. Conaway, *Genes Dev.* **1998**, *12*(24), 3872 – 3881.
- [51] D. Mukhopadhyay, H. Riezman, *Science* **2007**, *315* (5809), 201 – 205.
- [52] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu Rev Biochem* **1992**, *61*, 761 – 807.
- [53] H. Barriere, C. Nemes, K. Du, G. L. Lukacs, *Mol Biol Cell* **2007**, *18* (10), 3952 – 3965.
- [54] S. Polo, S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, P. P. Di Fiore, *Nature* **2002**, *416* (6879), 451 – 455.
- [55] K. Flick, I. Ouni, J. A. Wohlschlegel, C. Capati, W. H. McDonald, J. R. Yates, P. Kaiser, *Nat Cell Biol* **2004**, *6* (7), 634 – 641.
- [56] C. Esser, S. Alberti, J. Höhfeld, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1695* (1–3), 171 – 188.
- [57] K. Robzyk, J. Recht, M. A. Osley, *Science* **2000**, *287* (5452), 501 – 504.
- [58] M. Karin, Y. Ben-Neriah, *Annu Rev Immunol* **2000**, *18*, 621 – 663.
- [59] D. Hebenstreit, J. Horejs-Hoeck, A. Duschl, *Drug News Perspect* **2005**, *18* (4), 243 – 249.
- [60] D. L. Krebs, D. J. Hilton, *Stem Cells* **2001**, *19* (5), 378 – 387.
- [61] A. Yoshimura, T. Naka, M. Kubo, *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 454 – 465

- [62] P. L. Choyke, G. M. Glenn, M. M. Walther *et al.*, *Radiology* **1995**, *194*, 629 – 642.
- [63] E. R. Maher, L. Iselius, J. R. Yates *et al.*, *J Med Genet* **1991**, *28*, 443 – 447
- [64] W. G. Kaelin, *Clinical Cancer Research* **2007**, *13 (2)*, 680s – 684s.
- [65] Y. Takagi, A. Pause, R. C. Conaway, J. W. Conaway, *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272 (43)*, 27444 – 27449.
- [66] S. L. Kroll, W. R. Paulding, P. O. Schnell, M. C. Barton, J. W. Conaway, R. C. Conaway, M. F. Czyzyk-Krzeska, *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274 (44)*, 30109 – 30114.
- [67] X. Yu, Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, X.-F. Yu, *Science* **2003**, *302*, 1056 – 1060.
- [68] R. S. Harris, M. T. Liddament, *Nature Reviews Immunology* **2004**, *4*, 868 – 877.
- [69] M. J. Wichroski, K. Ichiyama, T. M. Rana, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280 (9)*, 8387 – 8396.
- [70] *Protein Degradation: Vol. 2: The Ubiquitin-Proteasome System*, R. J. Mayer, A. J. Ciechanover, M. Rechsteiner, 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2005**
- [71] R. Nathans, H. Cao, N. Sharova, A. Ali, M. Sharkey, R. Stranksa, M. Stevensen, T. Rana, *Nat Biotechno* **2008**, *26 (10)*, 166 – 170.
- [72] T. Zuo, D. Liu, W. Lv, X. Wang, J. Wang, M. Lv, W. Huang, J. Wu, H. Zhang, H. Jin, L. Zhang, W. Kong, X. Yu, *Journal of Virology*, **2012** *86 (10)*, 5497 – 5507.
- [73] A. Cwik, Z. Hell, A. Hegedüs Z. Finta, Z. Horváth, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3985 – 3987.
- [74] C. O. Kangani, D. E. Kelley, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 8917 – 8920.
- [75] R. Sharma, S. K. Vadivel, R. I. Duclos Jr., A. Makriyannis, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 5780 – 5782.
- [76] H. Xu, C- Wolf, *ChemComm* **2009**, 1715 – 1717.

- [77] L. Alakonda, M. Periasamy, *Synthesis* **2012**, *44*, 1063 – 1068.
- [78] R. M. Jones, J. Daniel, A. M. Kawasaki, L. A. Lopez, J. V. Moody, L. Thoresen, B. Ullman, Patent WO 2009/078983 A1
- [79] H. Murata, P. M. Lahti, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4974 – 4977.
- [80] MEROPS, "The Peptidase Database", to be found under <http://merops.sanger.ac.uk/>.
- [81] N. D. Rawlings, F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong, A. J. Barrett, *Nucleic Acids Research* **2007**, *36*, D320.
- [82] H. M. Berman, *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235–242.
- [83] K. Brocklehurst, F. Willenbrock, E. Salih (Eds.) "*Hydrolytic Enzymes*". (A. Neuberger und K. Brocklehurst, eds.), Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [84] F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459–4488.
- [85] F. Ashall, *Trends in Biochemical Sciences* **1986**, *11*, 518–520.
- [86] A. Singh, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 35236–35241.
- [87] G. N. Rudenskaya, D. V. Pupov, *Biochemistry Moscow* **2008**, *73*, 1–13.
- [88] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agricultural and Biological Chemistry* **1978**, *42*, 523–528.
- [89] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [90] B. J. Gour-Salin, P. Lachance, C. Plouffe, A. C. Storer, R. Menard, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 720–725.
- [91] K. Hanada, M. Tamai, S. Morimoto, T. Adachi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agricultural and Biological Chemistry* **1978**, *42*, 537–541.
- [92] *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, L. J. Roberts, J.D. Morrow, McGraw-Hill-Verlag, New York **2001**.
- [93] S. I. Kirin, D. Wissenbach, N. Metzler-Nolte, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1168–1173.

- [94] Lit.: M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1098-1104.
- [95] Y. Catel, F. Aladedunye, R. Przybylski, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11081 – 11089.
- [96] A. Korn, S. Rudolph-Böhner, L. Moroder, *Tetrahedron* **1994**, *50 (28)*, 8381–8392.
- [97] K. Mori, H. Iwasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1, 87-90.
- [98] S. Saito, K. Komada, T. Moriwake, *Org. Synth.* **1998**, *73*, 184.
- [99] S. Saito, K. Komada, T. Moriwake, *Org. Synth.* **1998**, *9*, 220.
- [100] C. Pardo, E. Sesnilo, E. Gutierrez-Puebla, A. Monge, J. Elguero, A. Fruchier, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1607 – 1611.
- [101] H. Andres, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1989**, *27 (11)*, 1307–1315.
- [102] N. Assimomytis, Y. Sariyannis, G. Stavropoulos, P. G. Tsoungas, G. Varvounis, P. Cordopatis, *Synlett* **2009**, 2777 –2782.
- [103] A. V. Smirnov, L. S. Kalandadze, V. N. Sakharov, M. V. Dorogov, A. V. Ivachtchenko, *J. Heterocyclic Chem* **2007**, *44*, 1247–1251.
- [104] K. Vinay, S. Naveen, C. S. Ananda Kumar, S. B. Benakaprasad, M. A. Sridhar, J. Shashidhara, Prasad, K. S. Rangappa, *Struct. Chem.* **2008**, *19*, 765–770.
- [105] Dissertation von Markus Schiller, **2009**, Würzburg.
- [106] D. R. Stuart, M. Bertrand-Laperle, K. M. N. Burgess, K. Fagnou, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130 (49)*, 16474–16475.
- [107] J. P. Richard, K. B. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129 (21)*, 6952–6961.
- [108] Atta-ur-Rahman, T. Fatima, Naim M. Hasan, *J. Chem. Soc. Pakistan* **1989**, *11*, 24–211.
- [109] S. W. Kim, J. G. Lee, E. J. Lee, H.-Y. P. Choo, C. Y. Yoo, D. Y. Lee, K. R. Roh, E. K. Kim, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, *6 (6)*, 851–854.

[110] S. Nomura, E. Kawanishi, S. Tanabe, K. Ueta, Patent WO2005012326 A1

[111] M. M. Hania, *E-Journal of Chemistry* **2009**, 6 (3), 629–632.

Quellenverzeichnis

- Abb. 1-4: UNAIDS AIDSInfo, Epidemiological Status,
<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>
- Abbildung 5: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/ff/Verlauf_einer_HIV-Infektion.png
- Abbildung 6: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d4/HIV_Antigen_Antibody_de.svg/500px-HIV_Antigen_Antibody_de.svg.png
- Abbildung 7: *Molekulare Virologie*, s. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2010**, 412 (abgeändert)
- Abb. 8,9: Diplomarbeit Christoph Menrath (abgeändert)
- Abbildung 10: <http://www.salvagetherapies.org/images/cd4.jpg> (abgeändert)
- Abbildung 11: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c8/Reverse_Transcriptase_1HIV.png
- Abbildung 13: <http://biomacs.kuleuven.be/tetrameer-integrase-large.jpg>
- Abbildung 15: <http://www.organische-chemie.ch/chemie/2007jan/polyme1.jpg>
- Abbildung 16: http://2.bp.blogspot.com/-R4ulJul77xg/T07MmbhSTPI/AAAAAAAAAAk/SugzAAjMjSk/s1600/HIV_1Protease_4.png
- Abbildung 17: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 10. Auflage, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München **2009**, 883 (abgeändert)
- Abbildung 18: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 10. Auflage, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München **2009**, 883 (abgeändert)

Abbildung 19: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/>

Protein_APOBEC3G_PDB_2JYW.png

R. P. Bennett, J. D. Salter, X. Liu, J. E. Wedekind, H. C. Smith, *The Journal of Biological Chemistry*, **2008**, *283* (48), 33331.

Abbildung 22: L. S. Wolfe, B. J. Stanley, C. Liu, W. K. Eliason, Y. Xiong, *Journal of Virology*, **2010**, *84* (14), 7136.

Abbildung 24: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e7/>

Protein_SOCS2_PDB_2c9w.png/250px-Protein_SOCS2_PDB_2c9w.png

Abbildung 25: http://cdn.zmescience.com/wp-content/uploads/2009/03/vhl_components.jpeg

Abbildung 26: B. J. Stanley, E. S. Ehrlich, L. Short, Y. Yu, Z. Xiao, X.-F. Yu, Y. Xiong, *Journal of Virology*, **2008**, *82* (17), 8659.

Abbildung 27: B. J. Stanley, E. S. Ehrlich, L. Short, Y. Yu, Z. Xiao, X.-F. Yu, Y. Xiong, *Journal of Virology*, **2008**, *82* (17), 8657.

Abbildung 73: <http://www.rci.rutgers.edu/~longhu/Biacore/pic/spr.gif>

Abbildung 77: <http://www.nanotemper-technologies.com/uploads/pics/>

NT_technology_4.jpg

Abbildung 97, 98: Drs. Ryan P. Bennet and Kimberly M. Prohaska, OyaGen, Inc

Curriculum Vitae

